

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991371 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/50* (2015.01)
A61P 7/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.06

(54) ЛЕЧЕНИЕ ЛИМФЕДЕМЫ И СВЯЗАННЫХ СОСТОЯНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПЛАЦЕНТАРНЫХ АДГЕЗИВНЫХ КЛЕТОК

(31) 62/430,123

(32) 2016.12.05

(33) US

(86) PCT/US2017/064789

(87) WO 2018/106742 2018.06.14

(71) Заявитель:
СЕЛУЛЭРИТИ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хэрири Роберт Дж., Хэ Шуюн (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предлагаются способы применения прилипающих к пластику для культуры ткани плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток, называемых здесь плацентарными адгезивными клетками, для лечения лимфедемы и связанных с лимфедемой нарушений.

A1

201991371

201991371

A1

ЛЕЧЕНИЕ ЛИМФЕДЕМЫ И СВЯЗАННЫХ СОСТОЯНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАЦЕНТАРНЫХ АДГЕЗИВНЫХ КЛЕТОК

1. Область техники

Здесь предлагаются способы применения прилипающих к пластику для культуры ткани плацентарных адгезивных клеток, например, плацентарных стволовых клеток, называемых здесь плацентарными адгезивными клетками, для лечения лимфедемы и связанных с лимфедемой нарушений.

2. Уровень техники

Плацента является особенно привлекательным источником стволовых клеток. Поскольку плаценты млекопитающих многочисленны и, как правило, выбрасываются как медицинские отходы, они представляют собой уникальный источник полезных с медицинской точки зрения стволовых клеток. Здесь предлагаются такие выделенные плацентарные стволовые клетки, популяции плацентарных стволовых клеток и способы их применения для лечения лимфедемы и заболеваний или нарушений, поддающихся лечению при лечении лимфедемы.

3. КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь предлагаются способы индукции лимфангиогенеза у субъектов, например, у являющихся людьми субъектов, включающие введение прилипающих к пластику для культуры ткани плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток (плацентарных адгезивных клеток, описанных в разделе 5.3 ниже).

В конкретном варианте осуществления здесь предлагается способ лечения индивидуума, имеющего лимфедему или заболевание или нарушение, поддающееся лечению при лечении лимфедемы, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества прилипающих к пластику для культуры ткани плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток (плацентарных адгезивных клеток, описанных в разделе 5.3 ниже), в количестве и в течение времени, достаточных для заметной положительной динамики лимфедемы или уменьшения интенсивности одного или более симптомов указанного заболевания

или нарушения. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение плацентарных адгезивных клеток указанному индивидууму в количестве и в течение времени, достаточных для уменьшения интенсивности одного или более симптомов или осложнений, связанных с лимфедемой или вызванных ей, таких как отек части или всей одной или обеих ног, отек части или всей одной или обеих рук, тяжесть или стеснение в руке или ноге, безболезненный отек ноги или руки с возникновением ямок при надавливании, ограниченное движение или ощущение ограниченного движения в руке или ноге, боль или дискомфорт в руке или ноге, инфекция в коже или под ней, целлюлит, лимфангит, лимфорея, импетиго, эритема кожи пораженной руки или ноги, положительный признак Капоши-Штеммера или затвердевание и/или утолщение кожи пораженной руки или ноги по сравнению с индивидуумом до введения указанных плацентарных адгезивных клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфедема представляет собой лимфедему стадии 0, стадии 1, стадии 2 или стадии 3. В некоторых других вариантах осуществления лимфедема является дополнением к лимфедеме.

В некоторых вариантах осуществления отек, подвергнутый лечению введением плацентарных адгезивных клеток, не является отеком, вызванным или связанным с венозной недостаточностью, сердечной недостаточностью, апноэ во сне или почечной недостаточностью.

В некоторых вариантах осуществления способность плацентарных адгезивных клеток к индукции лимфангиогенеза у субъекта и/или лечению лимфедемы или заболевания или нарушения, поддающегося лечению при лечении лимфедемы, у субъекта, подтверждается измерением уровней экспрессии LYVE-1 (рецептора-1 гиалуронана эндотелия лимфатических сосудов) у субъекта.

В другом конкретном варианте осуществления способов индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, плацентарные адгезивные клетки вводят индивидууму путем инъекции, например инъекции в конечность, пораженную лимфедемой. В другом конкретном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки вводят внутримышечно.

В другом конкретном варианте осуществления способов

индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, плацентарные адгезивные клетки вводят индивидууму посредством внутривенной инфузии. В конкретном варианте осуществления указанная внутривенная инфузия представляет собой внутривенную инфузию в течение от приблизительно 1 до приблизительно 8 часов.

В других конкретных вариантах осуществления способов индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, плацентарные адгезивные клетки вводят подкожно, внутрикожно, внутриартериально, интратекально или внутрибрюшинно; или путем имплантации указанному индивидууму матрицы или каркаса, включающего плацентарные адгезивные клетки.

В некоторых вариантах осуществления способов индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, приблизительно 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 или 1×10^{10} плацентарных адгезивных клеток вводят индивидууму. В некоторых вариантах осуществления от 1×10^4 до 1×10^5 , от 1×10^5 до 1×10^6 , от 1×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 1×10^9 или от 1×10^9 до 1×10^{10} плацентарных адгезивных клеток вводят индивидууму.

В другом конкретном варианте осуществления способов индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, указанные плацентарные адгезивные плацентарные клетки были подвергнуты пролиферации *in vitro* в течение не более 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 удвоений популяции. В другом конкретном варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки получают из культуры указанных клеток, которая была пассирована по крайней мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз или более.

В другом варианте осуществления способов индукции лимфангиогенеза и способов лечения, описанных здесь, указанные плацентарные адгезивные клетки были подвергнуты криоконсервации и оттаиванию перед введением субъекту.

В конкретном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, прилипают к пластику для культуры ткани и являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки обладают способностью к дифференцировке в остеогенные или хондрогенные клетки. В другом варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются адгезивными к пластику для культуры ткани; CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии; и обладают способностью к дифференцировке в клетки, имеющие одну или более характеристик остеогенных или хондрогенных клеток, например характеристик остеоцитов или хондроцитов. В других вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, кроме того, обладают способностью к дифференцировке в клетки, имеющие одну или более характеристик нервных клеток или нейрогенных клеток, например характеристик нейронов; одну или более характеристик глиальных клеток, например характеристик глии или астроцитов; одну или более характеристик жировых клеток, например характеристик адипоцитов; одну или более клеток поджелудочной железы; и/или одну или более характеристик клеток сердца.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ и имеют одну или более характеристик из CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A, B, C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺ и/или OCT-4⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии и/или ОТ-ПЦР. В другом варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные

клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺ и имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ или SH4⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарными адгезивными клетками и имеют одну или более дополнительных характеристик из CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любую их комбинацию. В другом конкретном варианте указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, CD133⁻, CD200⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ или PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток), что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются, или, кроме того, являются, ABC-p⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, или OCT-4⁺ (POU5F1⁺), например, что можно обнаружить с помощью ОТ-ПЦР, где ABC-p представляет собой специфический для плаценты белок ABC-транспортер (также известный как белок устойчивости рака молочной железы (BCRP) и белок устойчивости к митоксантрон (MXR)). В другом варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, являются, кроме того, SSEA3⁻ или SSEA4⁻, например, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, где SSEA3 представляет собой стадийноспецифический эмбриональный антиген 3, а SSEA4 представляет собой стадийноспецифический эмбриональный антиген 4. В другом варианте осуществления любые из плацентарных

адгезивных клеток, описанных здесь, являются, кроме того, SSEA3⁻ и SSEA4⁻.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, имеют одну или более дополнительных характеристик из MHC-I⁺ (HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (например, HLA-DP,DQ,DR⁻) или HLA-G⁻. В другом варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, имеют, кроме того, все характеристики из MHC-I⁺ (например, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (например, HLA-DP,DQ,DR⁻) и HLA-G⁻.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ клетками и имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, SH3⁺ или SH4⁺. В другом варианте осуществления указанные клетки являются, кроме того, CD44⁺. В другом варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{низкий уровень}, CD184/CXCR4⁻, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любой их комбинацией. В другом варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{трудноразличимый}, CD184/CXCR4⁻, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, и PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток).

В другом варианте осуществления раскрытых здесь способов выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD200⁺ и HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ и CD200⁺; CD200⁺ и OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ и HLA-

G⁻; CD73⁺ и CD105⁺; или OCT-4⁺; или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления раскрытых здесь способов выделенные плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более характеристик из CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, MHC-I⁺ или ABC-p⁺, где ABC-p представляет собой специфический для плаценты белок ABC-транспортер (также известный как белок устойчивости рака молочной железы (BCRP) и белок устойчивости к митоксантрону (MXR)). В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻ и OCT-4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ и SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ и OCT-4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, MHC-1⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и ABC-p⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ и OCT-4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ и SSEA4⁻. В конкретном варианте осуществления указанные OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ и SSEA4⁻ клетки, кроме того, являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ и SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и CD34⁻, и либо SH3⁺, либо SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻ и либо CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, либо OCT-4⁺. В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ и CD200⁺.

В некоторых вариантах осуществления любых из вышеуказанных характеристик плацентарных адгезивных клеток, используемых в описанных здесь способах, экспрессия клеточного маркера

(например, кластера дифференцировки или иммуногенного маркера) определяется с помощью проточной цитометрии. В некоторых других вариантах экспрессия клеточного маркера определяется с помощью ОТ-ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, например, CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ клетки экспрессируют один или более генов на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, причем указанные один или более генов представляют собой один или более из ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN и ZC3H12A, и причем указанные мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки. В некоторых вариантах осуществления указанную экспрессию указанных одного или более генов определяют, например, с помощью ОТ-ПЦР или анализа с использованием микрочипов, например, с использованием микрочипа U133-A (Affymetrix). В другом варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки экспрессируют указанные один или более генов при культивировании в течение, например, где-то от приблизительно 3 до приблизительно 35 удвоений популяции, в среде, содержащей 60% DMEM-LG (например, от Gibco) и 40% MCDB-201 (например, от Sigma); 2% фетальной телячьей сыворотки (например, от Hyclone Labs.); 1x инсулин-трансферрин-селен (ITS); 1x линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин (LA-BSA); 10⁻⁹ М дексаметазон (например, от Sigma); 10⁻⁴ М 2-фосфат аскорбиновой кислоты (например, от Sigma); эпидермальный фактор роста 10 нг/мл (например, от R&D Systems); и тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) 10 нг/мл (например, от R&D Systems). В другом варианте

осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки экспрессируют указанные один или более генов при культивировании в течение от приблизительно 3 до приблизительно 35 удвоений популяции, в среде, содержащей 60% DMEM-LG (например, от Gibco) и 40% MCDB-201 (например, от Sigma); 2% фетальной телячьей сыворотки (например, от Hyclone Labs.); 1x инсулин-трансферрин-селен (ITS); 1x линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин (LA-BSA); 10^{-9} М дексаметазон (например, от Sigma); 10^{-4} М 2-фосфат аскорбиновой кислоты (Sigma); эпидермальный фактор роста 10 нг/мл (например, от R&D Systems); и тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) 10 нг/мл (например, от R&D Systems).

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, экспрессируют CD200 и ARTS1 (аминопептидазный регулятор фактора некроза опухоли типа 1); ARTS-1 и LRAP (аргининаминопептидазу лейкоцитарного происхождения); IL6 (интерлейкин-6) и TGFB2 (трансформирующий фактор роста, бета 2); IL6 и KRT18 (кератин 18); IER3 (немедленный ранний ответ 3), MEST (гомолог специфического для мезодермы транскрипта) и TGFB2; CD200 и IER3; CD200 и IL6; CD200 и KRT18; CD200 и LRAP; CD200 и MEST; CD200 и NFE2L3 (фактор 3, подобный ядерному фактору эритроидного происхождения 2); или CD200 и TGFB2 на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга (BM-MSC), причем указанные мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки. В других вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки экспрессируют ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 и MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, и TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, и TGFB2; или IER3, MEST и TGFB2 на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга BM-MSC, причем указанные мезенхимные стволовые

клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки.

Когда используются клетки человека, обозначения генов повсюду относятся к последовательностям человека, и, как хорошо известно специалистам в данной области техники, репрезентативные последовательности можно найти в литературе или в GenBank. Зонды для последовательностей могут быть определены с помощью последовательностей, которые являются общедоступными, или из коммерческих источников, например, специфические зонды TAQMAN® или TAQMAN® Angiogenesis Array (Applied Biosystems, часть № 4378710).

В различных вариантах осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, содержатся в популяции клеток, по крайней мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток которой являются указанными выделенными плацентарными адгезивными клетками. В некоторых других вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки в указанной популяции клеток по существу не включают клетки с генотипом матери; например, по крайней мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% плацентарных адгезивных клеток в указанной популяции имеют генотип плода, т.е. являются фетальными по происхождению. В некоторых других вариантах осуществления популяция клеток, включающая указанные плацентарные адгезивные клетки, по существу не включают клетки с генотипом матери; например, по крайней мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанной популяции имеют генотип плода, т.е. являются фетальными по происхождению. В некоторых других вариантах осуществления популяция клеток, включающая указанные плацентарные адгезивные клетки, включает клетки с генотипом матери; например, по крайней мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанной популяции имеют генотип матери, т.е. являются материнскими по происхождению.

В одном варианте осуществления любого из вариантов осуществления плацентарных адгезивных клеток (например, плацентарных адгезивных клеток) здесь плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающей указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, например при культивировании в условиях пролиферации).

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, применимые в предлагаемых здесь способах, не экспрессируют CD34, что можно обнаружить с помощью иммунолокализации, после воздействия 1-100 нг/мл VEGF в течение от 4 до 21 дня. В конкретном варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются прилипающими к пластику для культуры ткани. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток образует отростки или трубчатые структуры при культивировании в присутствии ангиогенного фактора, такого как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) или основной фактор роста фибробластов (bFGF), например, на подложке, такой как MATRIGEL™.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, секретируют один или более или все из VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, фоллистатина, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, или галектина-1, например, в культуральную среду, в которой клетка или клетки выращиваются. В другом варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки экспрессируют повышенные уровни CD202b, IL-8 и/или VEGF в условиях гипоксии (например, менее чем приблизительно 5% O₂) по сравнению с нормоксическими условиями

(например, приблизительно 20% или приблизительно 21% O₂).

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, могут вызывать образование отростков или трубчатых структур в популяции эндотелиальных клеток, контактирующих с указанными адгезивными клетками, полученными из плаценты. В конкретном варианте осуществления полученные из плаценты ангиогенные клетки сокультивируют с эндотелиальными клетками человека, образуя отростки или трубчатые структуры или поддерживая отростки эндотелиальных клеток, например, при культивировании в присутствии белков экстраклеточного матрикса, таких как коллаген типа I и IV, и/или ангиогенные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) или основной фактор роста фибробластов (bFGF), например, на подложке или в ней, такой как плацентарный коллаген или MATRIGEL™, в течение по крайней мере 4 дней.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в описанных здесь способах индукции лимфангиогенеза и способах лечения, являются аутологичными по отношению к реципиенту. В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки, используемые в соответствии с описанными здесь способами индукции лимфангиогенеза и способами лечения, являются гетерологичными по отношению к реципиенту.

Маркеры клеточной поверхности, молекулярные и генетические маркеры плацентарных адгезивных клеток, используемых в предлагаемых здесь способах, подробно описаны в разделе 5.3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления плацентарных адгезивных клеток, используемых в соответствии с описанными здесь способами

индукции лимфангиогенеза и способами лечения, указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки вводят указанному индивидууму один раз. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки вводят указанному индивидууму в виде двух или более отдельных введений. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно от 1×10^4 до 1×10^5 выделенных плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно от 1×10^5 до 1×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно от 1×10^6 до 1×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно от 1×10^7 до 1×10^8 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума. В других конкретных вариантах осуществления указанное введение включает введение от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 2×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 2×10^6 до приблизительно 3×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 3×10^6 до приблизительно 4×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 4×10^6 до приблизительно 5×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 5×10^6 до приблизительно 6×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 6×10^6 до приблизительно 7×10^6 выделенных адгезивных плацентарных клеток на килограмм указанного индивидуума; от приблизительно 7×10^6 до приблизительно 8×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм

указанного индивидуума; от приблизительно 8×10^6 до приблизительно 9×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума; или от приблизительно 9×10^6 до приблизительно 1×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 2×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума указанному индивидууму. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение от приблизительно $1,3 \times 10^7$ до приблизительно $1,5 \times 10^7$ выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума указанному индивидууму. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение до приблизительно 3×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток на килограмм указанного индивидуума указанному индивидууму. В конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение от приблизительно 5×10^6 до приблизительно 2×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток указанному индивидууму. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно 150×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток в приблизительно 20 миллилитрах раствора указанному индивидууму.

В конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение от приблизительно 5×10^6 до приблизительно 2×10^7 выделенных плацентарных адгезивных клеток указанному индивидууму, причем указанные клетки содержатся в растворе, содержащем 10% декстрана, например декстрана-40, 5% человеческого сывороточного альбумина и необязательно иммунодепрессант.

В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение приблизительно от 5×10^7 до 3×10^9 выделенных плацентарных адгезивных клеток внутривенно. В конкретных вариантах осуществления указанное введение включает

введение приблизительно 9×10^8 выделенных плацентарных адгезивных клеток или приблизительно $1,8 \times 10^9$ выделенных плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение подкожно приблизительно от 5×10^6 до 1×10^8 выделенных плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанное введение включает введение подкожно приблизительно 9×10^6 выделенных плацентарных адгезивных клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, используемые в предлагаемых здесь способах, могут быть генетически сконструированы для продуцирования одного или более белков, которые способствуют ангиогенезу. В некоторых вариантах осуществления указанные белки, которые способствуют ангиогенезу, представляют собой один или более из фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, VEGFD), фактора роста фибробластов (FGF) (например, FGF2), ангиогенина (ANG), эпидермального фактора роста (EGF), эпителиальный нейтрофил-активирующий белка 78 (ENA-78), фоллистатина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), связанного с ростом онкогенного белка (GRO), интерлейкина-6 (IL-6), IL-8, лептина, моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), MCP-3, субъединицы В тромбоцитарного фактора роста (PDGFB), хемокина, выделяемого Т-клетками при активации, трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β I), тромбопоэтина (Тро), тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (TIMP1), TIMP2 и/или рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR).

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 продемонстрирована секреция выбранных ангиогенных белков адгезивными клетками, полученными из плаценты.

На фиг. 2 продемонстрирован ангиогенный эффект кондиционированной в результате культивирования полученных из плаценты адгезивных клеток среды на формирование трубок из эндотелиальных клеток человека (HUVEC).

На фиг. 3 продемонстрирован ангиогенный эффект

кондиционированной в результате культивирования полученных из плаценты адгезивных клеток среды на миграцию эндотелиальных клеток человека.

На фиг. 4 продемонстрирован эффект кондиционированной в результате культивирования полученных из плаценты адгезивных клеток среды на пролиферацию эндотелиальных клеток человека.

На фиг. 5 продемонстрировано образование трубок из HUVEC и адгезивных клеток, полученных из плаценты.

На фиг. 6 продемонстрирована секреция VEGF и IL-8 адгезивными клетками, полученными из плаценты, в условиях гипоксии и нормоксии.

На фиг. 7 продемонстрирован положительный эффект плацентарной адгезивной клетки на ангиогенез в модели ангиогенеза на хориоаллантаисных оболочках куриных эмбрионов. bFGF: основной фактор роста фибробластов (положительный контроль). MDAMB231: ангиогенная линия клеток рака молочной железы (положительный контроль). Ось Y: степень образования кровеносных сосудов.

На фиг. 8 продемонстрирован положительный эффект кондиционированной в результате культивирования плацентарных адгезивных клеток среды (супернатантов) на ангиогенез в модели ангиогенеза на хориоаллантаисных оболочках куриных эмбрионов. bFGF: основной фактор роста фибробластов (положительный контроль). MDAMB231: ангиогенная линия клеток рака молочной железы (положительный контроль). Ось Y: степень образования кровеносных сосудов.

Фиг.9: CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки усиливают ангиогенез в модели односторонней ишемии задней конечности (HLI) у мышей db/db. Фиг. 9A: Лазерный доплеровский анализ через 14, 28 и 42 дня после перевязки (n=9). Фиг. 9B: Количественный анализ CD31⁺ кровеносных сосудов в бедре через 42 дня после HLI (n=4). Фиг. 9C: Количественный анализ α SMA⁺ кровеносных сосудов в бедре через 42 дня после HLI (n=4). Фиг. 9D: Распределение по размерам α SMA⁺ кровеносных сосудов в бедре через 42 дня после HLI (n=4). Фиг. 9E:

Полуколичественная оценка функции конечности через 4, 28 и 42 дня после HLI (n=9). Все графики показывают среднее значение $\pm$ s.e.m. (стандартная погрешность среднего значения). *, $p<0,05$; **, $p<0,01$. N=число животных.

Фиг.10: CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки стимулируют дифференцировку M2-макрофагов в модели односторонней HLI у мышей db/db. Фиг. 10A: Количественная оценка CD68⁺ макрофагов через 7, 14 и 28 дней после HLI (n=4); Фиг. 10B: Количественная оценка CD68⁺ Arg1⁺ макрофагов через 7, 14 и 28 дней после HLI (n=4). Фиг. 10C-E: фенотип поверхности CD206 (10C), HLA-I (10D) и CD80 (10E) у макрофагов человека до и после сокультивирования с LPS, IL-4 и плацентарными адгезивными клетками в течение 48 часов. Все графики показывают среднее значение $\pm$ s.e.m. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,005$; ****, $p<0,001$. N=число животных.

Фиг. 11: Опосредуемый CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными адгезивными клетками ангиогенез зависит от Т-клеток. Фиг. 11A: Лазерный доплеровский анализ через 14, 28 и 42 дня после HLI в модели HLI на мышцах дикого типа (WT) и голых мышцах Balb/c (WT: n=15; голые: n=9). Фиг. 11B: Количественная оценка CD31⁺ кровеносных сосудов в бедре через 42 дня после HLI (n=5). Фиг. 11C Количественная оценка α SMA⁺ кровеносных сосудов в бедре через 42 дня после HLI (n=5). Фиг. 11D: Лазерный доплеровский анализ через 7, 14, 21, 28 и 35 дней после HLI в модели HLI на голых мышцах Balb/c с восстановленными Т-клетками (n=12). Все графики показывают среднее значение $\pm$ s.e.m. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,005$; ****, $p<0,001$. N=число животных.

Фиг. 12: Индуцированная CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными клетками дифференцировка в M2-макрофаги зависит от Т-клеток. Фиг. 12A: Количественная оценка всех CD68⁺ макрофагов в бедре через 7 дней после HLI (n=5). Фиг. 12B: Количественная оценка CD68⁺ Arg1⁺ M2-макрофагов в бедре через 7 дней после HLI (n=5). Все графики показывают среднее значение $\pm$ s.e.m. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,005$. N=число животных.

Фиг. 13: CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки оказывают системный артериогенный эффект в модели двусторонней HLI у мышей db/db. Фиг. 13А: Лазерный доплеровский анализ на первой и второй поврежденных задних конечностях (n=13). Фиг. 13В: Количественная оценка кровеносных сосудов на основе рентгеноангиографии (n=5). Фиг. 13С-Д: Репрезентативные рентгеноангиограммы. Фиг. 13Е: Количественная оценка CD31⁺ кровеносных сосудов в бедре через 64 дня после первого повреждения (носитель: n=9; плацентарные адгезивные клетки: n=13). Фиг. 13F: Количественная оценка α SMA⁺ кровеносных сосудов в бедре через 64 дня после первого повреждения (носитель: n=9; плацентарные адгезивные клетки: n=13). Фиг. 13G: Распределение по размеру α SMA⁺ крупных кровеносных сосудов в бедре через 64 дня после первого повреждения (носитель: n=9; адгезивные клетки плаценты: n=13). Фиг. 13H: Лазерный доплеровский анализ в первой и второй поврежденных задних конечностях (n=18). Фиг. 13I: Количественная оценка кровеносных сосудов на основе рентгеноангиографии (n=5). Фиг. 13J: Количественная оценка CD68⁺ Arg1⁺ макрофагов через 7 дней после второго повреждения (n=4). Все графики показывают среднее значение $\pm$ s.e.m. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005. N=число животных.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

5.1. Определения.

Используемый здесь термин «приблизительно» применительно к указанному числовому значению обозначает значение в пределах плюс или минус 10% от указанного числового значения.

Используемый здесь термин «ангиогенный» в отношении описанных здесь адгезивных клеток, получаемых из плаценты, означает, что клетки могут образовывать сосуды или сосудоподобные отростки, или что клетки могут стимулировать ангиогенез (например, образование сосудов или сосудоподобных структур) в другой популяции клеток, например эндотелиальных клеток.

Используемый здесь термин «ангиогенез» относится к процессу образования кровеносных сосудов, который включает, но без

ограничения этим, активацию эндотелиальных клеток, их миграцию, пролиферацию, ремоделирование матрикса и стабилизацию клеток.

Используемый здесь термин «полученный (происходящий)» означает выделенный из или иным образом очищенный. Например, адгезивные клетки, получаемые из плаценты, являются выделенными из плаценты. Термин «полученный (происходящий)» охватывает клетки, которые культивируют из клеток, выделенных непосредственно из ткани, например, плаценты, и клетки, которые культивируют или размножают из первичных изолятов.

Используемый здесь термин «иммунолокализация» означает обнаружение соединения, например, клеточного маркера, с использованием иммунного белка, например, антитела или его фрагмента, например, в проточной цитометрии, сортировке клеток с активацией флуоресценции, магнитной сортировке клеток, гибридизации *in situ*, иммуногистохимии или т.п.

Используемый здесь термин «SH2» относится к антителу, которое связывается с эпитопом клеточного маркера CD105. Таким образом, клетки, которые упоминаются как SH2⁺, являются CD105⁺.

Используемые здесь термины «SH3» и «SH4» относятся к антителам, которые связываются с эпитопами, присутствующими в клеточном маркере CD73. Таким образом, клетки, которые упоминаются как SH3⁺ и/или SH4⁺, являются CD73⁺.

Плацента имеет генотип плода, который развивается внутри нее, но также находится в тесном физическом контакте с материнскими тканями во время беременности. Как таковой, используемый здесь термин «фетальный генотип» означает генотип плода, например, генотип плода, связанного с плацентой, из которой получены конкретные выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, в противоположность генотипу матери, которая вынашивала плод. Используемый здесь термин «материнский генотип» означает генотип матери, которая вынашивала плод, например, плод, связанный с плацентой, из которой получены конкретные выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь.

Используемый здесь термин «выделенная клетка», например «выделенная плацентарная клетка», «выделенная плацентарная

стволовая клетка» и т.п., означает клетку, которая по существу отделена от других, отличных клеток ткани, например, плаценты, из которой получена стволовая клетка. Клетка является «выделенной», если по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или по крайней мере на 99% клеток, например, нестволовых клеток, с которыми стволовая клетка связана в природе, или стволовых клеток, имеющих отличный профиль маркеров, отделены от стволовых клеток, например, во время сбора и/или культивирования стволовых клеток.

Используемый здесь термин «мультипотентная» применительно к клетке означает, что клетка обладает способностью к дифференцировке в некоторые, но не обязательно во все типы клеток организма, или в клетки, имеющие характеристики некоторых, но не всех типов клеток организма, или клетки одного или более из трех зародышевых слоев. В некоторых вариантах осуществления, например, выделенная плацентарная клетка (плацентарная адгезивная клетка), описанная в разделе 5.3 ниже, которая способна к дифференцировке в клетку, обладающую характеристиками нейрогенных, хондрогенных и/или остеогенных клеток, является мультипотентной клеткой.

Используемый здесь термин «популяция выделенных клеток» означает популяцию клеток, которая по существу отделена от других клеток ткани, например плаценты, из которой получена популяция клеток.

Используемый здесь термин «плацентарные адгезивные клетки» означает прилипающие к пластику для культуры ткани клетки, которые выделены из плаценты млекопитающего либо в виде первичных изолятов, либо культивируемых клеток, независимо от числа пассажей после первичной культуры, например, плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 ниже. Однако термин «плацентарные адгезивные клетки», как он здесь используется, не относится к, и плацентарные адгезивные клетки, используемые в предлагаемых здесь способах, не являются, трофобластам(ами), цитотрофобластам(ами), синцитиотрофобластам(ами), ангиобластам(ами), гемангиобластам(ами), эмбриональным зародышевым клеткам(ами), эмбриональным стволовым клеткам(ами),

клеткам(ами), полученным из внутренней клеточной массы бластоциста, или клеткам(ами), полученным из гонадного гребня позднего эмбриона, например эмбриональным половым клеткам(ами). Плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, также не являются полученными из амниона адгезивными клетками, описанными в патенте США с № 8637409, озаглавленном «Полученные из амниона ангиогенные клетки», описание которого в полном объеме включено сюда посредством ссылки. Клетка считается «стволовой клеткой», если клетка демонстрирует характерные признаки стволовой клетки, например маркер или профиль экспрессии генов, связанный с одним или более типов стволовых клеток; способность к репликации по крайней мере 10-40 раз в культуре и способность к дифференцировке в клетки, демонстрирующие характеристики дифференцированных клеток одного или более из трех зародышевых слоев. Если здесь не указано иное, термин «плацентарные» включает пуповину. В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, раскрытые здесь, дифференцируются *in vitro* в условиях дифференцировки, дифференцируются *in vivo* или как *in vitro*, так и *in vivo*.

Как здесь используется, плацентарная клетка является «позитивной» по конкретному маркеру, когда этот маркер можно обнаружить выше фона. Обнаружение конкретного маркера может быть осуществлено, например, или с использованием антител, или с помощью олигонуклеотидных зондов или праймеров на основе последовательности гена или мРНК, кодирующей маркер. Например, плацентарная клетка является позитивной, например, по CD73, поскольку CD73 можно обнаружить на плацентарных адгезивных клетках в количестве, заметно превышающем фон (по сравнению, например, с подобранным по изотипу контролем). Клетка также является позитивной по маркеру, когда этот маркер можно использовать, чтобы отличить эту клетку от по крайней мере одного другого типа клеток, или можно использовать для отбора или выделения клетки, когда он присутствует или экспрессируется клеткой. В контексте, например, обнаружения с использованием антител определение «позитивная», в качестве указания на

присутствие конкретного маркера клеточной поверхности, означает, что маркер можно обнаружить с использованием антитела, например флуоресцентно-меченного антитела, специфического для этого маркера; «позитивная» также относится к клетке, демонстрирующей маркер в количестве, которое генерирует сигнал, например, в цитометре, который заметно выше фона. Например, клетка является «CD200⁺», если клетка детектируемо метится антителом, специфическим для CD200, и сигнал от антитела заметно выше, чем у контроля (например, фона или подобранного по изотипу контроля). И наоборот, «негативная» в том же контексте означает, что маркер клеточной поверхности не может быть обнаружен с использованием антитела, специфического для этого маркера, по сравнению с контролем (например, фоном или подобранном по изотипу контролем). Например, клетка является «CD34⁻», если клетка не метится воспроизводимо и детектируемо антителом, специфическим для CD34, в большей степени, чем контроль (например, фон или подобранный по изотипу контроль). Маркеры, не обнаруженные или не обнаруживаемые с использованием антител, определяют как позитивные или негативные аналогичным образом, используя соответствующий контроль. Например, клетка или популяция клеток может быть определена как ОСТ-4⁺, если количество РНК для ОСТ-4, обнаруженное в РНК из клетки или популяции клеток, заметно превышает фон, что определяется, например, способом обнаружения РНК, таким как ОТ-ПЦР, слот-блоты и т.д. Кроме особо оговоренных здесь случаев, маркеры в виде кластеров дифференцировки («CD») обнаруживаются с использованием антител. В некоторых вариантах осуществления ОСТ-4 определяется как присутствующий, и клетка является «ОСТ-4⁺», если мРНК для ОСТ-4 можно обнаружить с использованием ОТ-ПЦР.

Используемое здесь обозначение «низкий уровень» применительно к экспрессии маркера, обнаруживаемого в ходе проточной цитометрии, означает, что маркер экспрессируется в менее чем 10% исследованных клеток, или что флуоресценция, относящаяся к маркеру, например, обнаруживаемому в ходе проточной цитометрии, составляет менее 1 log выше фона.

Используемый здесь термин «лечить» включает устранение,

положительную динамику, уменьшение тяжести или ослабление в динамике времени заболевания, нарушения или состояния или любого их параметра или симптома.

5.2. Лечение лимфедемы и заболеваний или нарушений, вызванных лимфедемой.

Здесь предлагаются способы лечения лимфедемы или заболеваний или нарушений, вызванных лимфедемой, включающие введение эффективного количества плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток, описанных в разделе 5.3, ниже. Плацентарные адгезивные клетки способны поддерживать рост эндотелиальных клеток и популяций эндотелиальных клеток, а также эпителиальных клеток и популяций эпителиальных клеток в лимфатической системе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение плацентарных адгезивных клеток указанному индивидууму в количестве и в течение времени, достаточных для уменьшения интенсивности одного или более симптомов или осложнений, связанных с лимфедемой или вызванных ей, таких как отек части или всей одной или обеих ног, отек части или всей одной или обеих рук, тяжесть или стеснение в руке или ноге, безболезненный отек ноги или руки с возникновением ямок при надавливании, ограниченное движение или ощущение ограниченного движения в руке или ноге, боль или дискомфорт в руке или ноге, инфекция в коже или под ней, целлюлит, лимфангит, лимфорея, импетиго, эритема кожи пораженной руки или ноги, положительный признак Капоши-Штеммера или затвердевание и/или утолщение кожи пораженной руки или ноги по сравнению с индивидуумом до введения указанных плацентарных адгезивных клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфедема представляет собой лимфедему стадии 0, стадии 1, стадии 2 или стадии 3. В некоторых других вариантах осуществления лимфедема является дополнением к лимфедеме.

Стадии лимфедемы. Лимфедема, как правило, протекает в четыре стадии. На стадии 0 белок начинает накапливаться под кожей, вызывая локальное накопление воды и сопровождаясь ощущением тяжести или усталости в пораженной конечности или области. На стадии 1 лимфедемы стопа и/или руки (часть

конечностей, наиболее удаленная от тела) начинают опухать и приобретать отекший вид; вдавления или «ямки» могут быть очевидны; кожа также сохраняет небольшую ямку при нажатии пальцем. Это известно как «отек с возникновением ямок при надавливании». На этой стадии отек может уменьшаться ночью по сравнению с днем, и поднятие пораженной конечности может уменьшить отек. На стадии 2 лимфедемы отек конечности приобретает губчатую консистенцию, и возникновением ямок при надавливании уменьшается или отсутствует по сравнению со стадией 1. Лимфедема не реагирует на поднятие конечности. Теперь отек связан или вызван фиброзом и рубцовой тканью под кожей. На стадии 3, также известной как лимфостатическая слоновость (elephantiasis), пораженная конечность является довольно опухшей. Кожа, как правило, становится сухой и шелушащейся, с развитием гиперкератоза и отвердения. Жидкость может вытекать из кожи, могут образоваться пузырьки, заполненные жидкостью, и часто встречаются кожные инфекционные заболевания.

Введение плацентарных адгезивных клеток или терапевтических композиций, содержащих такие клетки, индивидууму с лимфедемой, нуждающемуся в этом, может быть осуществлено, например, путем трансплантации, имплантации (например, самих клеток или клеток как части комбинации матрицы с клетками), инъекции (например, непосредственно в место, пораженное заболеванием или состоянием, например, непосредственно в ишемический участок в сердце индивидуума, перенесшего инфаркт миокарда), инфузии, доставки через катетер или любым другим способом, известным в данной области техники, для обеспечения клеточной терапии.

В одном варианте осуществления терапевтические клеточные композиции предоставляются индивидууму, нуждающемуся в этом, например, путем инъекции в одно или более мест у индивидуума. В конкретном варианте осуществления терапевтические клеточные композиции вводятся путем внутрисердечной инъекции, например, в ишемическую область в сердце. В других конкретных вариантах осуществления клетки инъецируются на поверхность сердца, в соседнюю область или даже в более отдаленную область. В предпочтительных вариантах осуществления клетки могут

направляться в пораженную или поврежденную область.

Индивидууму, имеющему лимфедему, можно вводить плацентарные адгезивные клетки в любое время, когда эти клетки будут терапевтически полезными. В некоторых вариантах осуществления, например, плацентарные адгезивные клетки или терапевтические композиции настоящего изобретения вводят в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или 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 или 30 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 лет от диагностирования лимфедемы.

Также здесь предлагаются наборы для применения при лечении лимфедемы. Наборы обеспечивают терапевтическую клеточную композицию, содержащую плацентарные адгезивные клетки, которые могут быть приготовлены в фармацевтически приемлемой форме, например, путем смешивания с фармацевтически приемлемым носителем, и аппликатор, вместе с инструкциями по применению. Идеально, когда набор можно использовать в полевых условиях или у кровати, например, в кабинете врача.

В конкретном варианте осуществления предлагаемые здесь способы лечения включают введение плацентарных адгезивных клеток, например, терапевтической композиции, содержащей плацентарные адгезивные клетки, пациенту с лимфедемой, причем терапевтическая клеточная композиция вводится в виде комплекса матрицы с клетками. В некоторых вариантах осуществления матрица представляет собой каркас, предпочтительно биорассасывающийся, включающий, по крайней мере, клетки.

С этой целью здесь, кроме того, предлагаются популяции плацентарных адгезивных клеток, которые приводят в контакт, например, инкубируют или культивируют в присутствии, одним(ого) или более факторов, которые стимулируют дифференцировку стволовых клеток или клеток-предшественников по лимфангиогенному пути. Такие факторы включают, но без ограничения ими, такие факторы, как факторы роста, хемокины, цитокины, клеточные продукты, деметилирующие агенты и другие факторы, которые в

настоящее время известны или позже будут определены для стимуляции дифференцировки, например стволовых клеток, по лимфангиогенным путям или линиям дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки могут дифференцироваться по лимфангиогенным путям или линиям дифференцировки *in vitro* при культивировании клеток в присутствии факторов, включающих по крайней мере один из деметилирующего агента, BMP (костного морфогенетического белка), FGF (фактора роста фибробластов), белка фактора Wnt, белка хеджехов и/или фактора против Wnt.

Плацентарные адгезивные клетки и популяции таких клеток могут предоставляться терапевтически или профилактически индивидууму, имеющему лимфедему или симптом или осложнения лимфедемы.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят терапевтически эффективное количество плацентарных адгезивных клеток, например, в популяции клеток, которые включают плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления популяция включает приблизительно 50% плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления популяция представляет собой по существу гомогенную популяцию плацентарных адгезивных клеток. В других вариантах осуществления популяция включает, по крайней мере, приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% плацентарных адгезивных клеток.

Плацентарные адгезивные клетки могут вводиться индивидууму в форме терапевтической композиции, содержащей клетки и другое терапевтическое средство, такое как инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), интерлейкин 18 (IL-8), антитромбогенный агент (например, гепарин, производные гепарина, урокиназа или PPACK (декстрофенилаланин-пролин-аргинин-хлорметилкетон), соединение с антитромбиновой активностью, антагонист рецептора тромбоцитов, антитело против тромбина, антитело против рецептора тромбоцитов,

аспирин, дипиридамо́л, протамин, гирудин, ингибитор простагландина и/или ингибитор тромбоцитов), антиапоптотический агент (например, эритропоэтин (Еро), производное или аналог Еро или их соли, тромбопоэтин (Тро), IGF-I, IGF-II, фактор роста гепатоцитов (HGF) или ингибитор каспазы), противовоспалительное средство (например, ингибитор MAP киназы p38, стати́н, ингибитор IL-6, ингибитор IL-1, Пемиролас́т, Транилас́т, Ремика́де, Сиролиму́с и/или нестероидное противовоспалительное соединение (например, ацетилсалициловая кислота, ибупрофе́н, Тепоксали́н, Толметин или Супрофе́н)) иммунодепрессант или иммуномодулирующий агент (например, ингибитор кальциневрина, например, циклоспорин, Такролиму́с, ингибитор mTOR, такой как Сиролиму́с или Эверолиму́с; антипролиферативное средство, такое как азатиоприн и/или микофенола́т мофети́л; кортикостероид, например, преднизоло́н или гидрокортизо́н; антитело, такое как моноклональное антитело против рецептора IL-2R α , Базиликсима́б, Даклизума́б, поликлональные антитела против Т-клеток, например, против тимоцитарного глобулина (ATG), против лимфоцитарного глобулина (ALG), и/или моноклональное антитело против Т-клеток OKT3) и/или антиоксидант (например, пробу́кол; витамины А, С и/или Е, коэнзим Q-10, глутатио́н, L-цистеи́н, N-ацетилцистеи́н или производное антиоксиданта, аналог или соль любого из вышеприведенных соединений). В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, содержащие плацентарные адгезивные клетки, кроме того, содержат один или более дополнительных типов клеток, например, клетки взрослого организма (например, фибробласты или эндодермальные клетки), стволовые клетки и/или клетки-предшественники. Такие терапевтические средства и/или один или более дополнительных типов клеток могут вводиться индивидууму, нуждающемуся в этом, индивидуально или в комбинации двух или более таких соединений или агентов.

В некоторых вариантах осуществления индивидуумом, подвергаемым лечению, является млекопитающее. В конкретном варианте осуществления индивидуумом, подвергаемым лечению, является человек.

5.3. Выделенные плацентарные адгезивные клетки и популяции выделенных плацентарных клеток

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные адгезивные клетки, применимые для лечения индивидуумов, имеющих заболевание или нарушение системы кровообращения, представляют собой клетки, которые можно получить из плаценты или ее части, которые прилипают к подложке для культивирования ткани и имеют характеристики мультипотентных клеток или стволовых клеток, но не являются трофобластами. В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах, обладают способностью к дифференцировке в неплацентарные типы клеток.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах, могут быть либо фетальными, либо материнскими по происхождению (т.е. могут иметь генотип либо плода, либо матери, соответственно). Предпочтительно, когда выделенные плацентарные адгезивные клетки и популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток являются фетальными по происхождению. Используемое здесь выражение «фетальные по происхождению» или «нематеринские по происхождению» указывает на то, что выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток получены из пуповины или плацентарных структур, связанных с плодом, т.е. которые имеют генотип плода. Используемое здесь выражение «материнские по происхождению» указывает на то, что клетки или популяции клеток получены из плацентарных структур, связанных с матерью, например, которые имеют генотип матери. Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные адгезивные клетки или популяции клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, могут включать выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые являются исключительно фетальными или материнскими по происхождению, или могут включать смешанную популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток как фетальных, так и материнских по происхождению. Выделенные плацентарные адгезивные клетки и популяции клеток, включающих

выделенные плацентарные адгезивные клетки, могут быть идентифицированы и отобраны по морфологическим характеристикам, маркерам и характеристикам культуры, обсуждаемым ниже. В некоторых вариантах осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, описанные здесь, являются аутологичными реципиенту, например индивидууму, у которого есть заболевание или нарушение системы кровообращения. В некоторых других вариантах осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, описанные здесь, являются гетерологичными для реципиента, например индивидуума, у которого есть заболевание или нарушение системы кровообращения.

5.3.1 Физические и морфологические характеристики

Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки при культивировании в первичных культурах или в культуре клеток прилипают к подложке для культивирования ткани, например к поверхности контейнера для культивирования ткани (например, пластику для культуры ткани), или к поверхности для культуры ткани, покрытой экстраклеточным матриксом или лигандами, такими как ламинин, коллаген (например, нативный или денатурированный), желатин, фибронектин, орнитин, витронектин и экстраклеточный мембранный белок (например, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)). Выделенные плацентарные адгезивные клетки в культуре имеют, как правило, фибробластоидный, звездчатый вид с рядом цитоплазматических отростков, идущих от центрального тела клетки. Однако плацентарные адгезивные клетки морфологически отличаются от фибробластов, культивируемых в тех же условиях, поскольку выделенные плацентарные адгезивные клетки демонстрируют большее число таких отростков, чем фибробласты. Морфологически выделенные плацентарные адгезивные клетки также отличаются от гемопоэтических стволовых клеток, которые, как правило, принимают более округлую или образующую булыжник морфологию в культуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные

адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах, при культивировании в среде для выращивания образуют эмбриоидоподобные тельца. Эмбриоидоподобные тельца представляют собой независимые скопления клеток, которые могут расти поверх прилипшего слоя пролиферирующих выделенных плацентарных адгезивных клеток. Термин «эмбриоидоподобный» используется, поскольку скопления клеток напоминают эмбрионидные тельца, скопления клеток, которые растут из культур эмбриональных стволовых клеток. Среда для выращивания, в которой могут развиваться эмбриоидоподобные тельца в пролиферирующей культуре выделенных плацентарных адгезивных клеток, включает среду, содержащую, например, DMEM-LG (например, от Gibco); 2% фетальной телячьей сыворотки (например, от Hyclone Labs.); 1x инсулин-трансферрин-селен (ITS); 1x линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин (LA-BSA); 10^{-9} М дексаметазон (например, от Sigma); 10^{-4} М 2-фосфат аскорбиновой кислоты (например, от Sigma); эпидермальный фактор роста 10 нг/мл (например, от R&D Systems); и тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) 10 нг/мл (например, от R&D Systems).

5.3.2. Маркеры клеточной поверхности, молекулярные и генетические маркеры

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например выделенные мультипотентные плацентарные адгезивные клетки или выделенные плацентарные стволовые клетки, и популяции таких выделенных плацентарных адгезивных клеток, применимые в раскрытых здесь способах, например способах лечения заболевания или нарушения системы кровообращения, представляют собой прилипающие к пластику для культуры ткани плацентарные адгезивные клетки человека, которые обладают характеристиками мультипотентных клеток или стволовых клеток, и экспрессируют множество маркеров, которые могут использоваться для идентификации и/или выделения клеток или популяций клеток, которые включают стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки являются лимфангиогенными, например, *in vitro* или *in vivo*. Выделенные плацентарные адгезивные клетки и популяции (т.е. две или более

выделенных плацентарных адгезивных клеток) плацентарных клеток, описанные здесь, включают плацентарные адгезивные клетки и популяции клеток, содержащие плацентарные клетки, полученные непосредственно из плаценты или любой ее части (например, хориона, котиледона плаценты или т.п.). Популяции выделенных плацентарных клеток также включают популяции (т.е. две или более) выделенных плацентарных адгезивных клеток в культуре и популяцию в контейнере, например в мешке. Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки не являются мезенхимными клетками, полученными из костного мозга, мезенхимными стволовыми клетками жировой ткани или мезенхимными клетками, полученными из пуповинной крови, плацентарной крови или периферической крови. Плацентарные клетки, например, плацентарные мультипотентные клетки и плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, описаны здесь и, например, в патенте США с № 7311904, 7311905 и 7468276; и в публикации заявки на патент США с № 2007/0275362, раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки во всей их полноте.

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой выделенные плацентарные мультипотентные клетки. В одном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки способны к дифференцировке в клетки с фенотипом нервных клеток, клетки остеогенного фенотипа и/или клетки хондрогенного фенотипа. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD45⁻ или CD90⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD45⁻ и CD90⁺, что можно обнаружить с помощью проточной

цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD45⁻ или CD90⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD45⁻ и CD90⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, т.е. клетки являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, CD105⁺ и CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, CD105⁺, CD200⁺ клетки, кроме того, являются CD80⁻ и CD86⁻.

В некоторых вариантах осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ и имеют одну или более характеристик из CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A, B, C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, и/или OCT-4⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии или ОТ-ПЦР. В других вариантах осуществления любые из CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ клеток, описанных выше, имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ или SH4⁺. В другом конкретном варианте осуществления клетки, кроме того, являются CD44⁺. В другом конкретном варианте осуществления любых из вышеуказанных выделенных CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарных адгезивных клеток клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻ или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любую их комбинацию.

В другом варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{низкий уровень}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, HLA-G⁻ или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любую их комбинацию. В другом варианте

осуществления $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ клетки, кроме того, являются $CD13^+$, $CD29^+$, $CD33^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54/ICAM^+$, $CD62E^-$, $CD62L^-$, $CD62P^-$, $SH3^+$ ($CD73^+$), $SH4^+$ ($CD73^+$), $CD80^-$, $CD86^-$, $CD90^+$, $SH2^+$ ($CD105^+$), $CD106/VCAM^+$, $CD117^-$, $CD144/VE$ -кадгерин^{низкий уровень}, $CD184/CXCR4^-$, $CD200^+$, $CD133^-$, OCT-4⁺, SSEA4⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻ и PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток).

В другом конкретном варианте любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, кроме того, являются ABC-p⁺, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, или OCT-4⁺ (POU5F1⁺), что можно определить с помощью ОТ-ПЦР, где ABC-p представляет собой специфический для плаценты белок ABC-транспортер (также известный как белок устойчивости рака молочной железы (BCRP) и белок устойчивости к митоксантрон (MXR)), а OCT-4 представляет собой белок Октамер-4 (POU5F1). В другом конкретном варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, кроме того, являются SSEA3⁻ или SSEA4⁻, что можно определить с помощью проточной цитометрии, где SSEA3 представляет собой стадийспецифический эмбриональный антиген 3, а SSEA4 представляет собой стадийспецифический эмбриональный антиген 4. В другом конкретном варианте осуществления любые из описанных здесь плацентарных адгезивных клеток, кроме того, являются SSEA3⁻ и SSEA4⁻.

В другом конкретном варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, имеют одну или более дополнительных характеристик из MHC-I⁺ (например, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (например, HLA-DP,DQ,DR⁻) или HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, имеют одну или более дополнительных характеристик из MHC-I⁺ (например, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (например, HLA-DP,DQ,DR⁻) и HLA-G⁻.

Здесь также предлагаются популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяции клеток, например, популяции плацентарных адгезивных клеток, включающие, например, обогащенные, выделенные (ыми) плацентарные (ыми) адгезивные (ыми) клетки (ами), которые применимы в способах и композиции,

раскрытых здесь. Предпочтительные популяции клеток включают выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем популяции клеток включают, например, по крайней мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% выделенных CD10⁺, CD105⁺ и CD34⁻ плацентарных адгезивных клеток; т.е. по крайней мере, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в указанной популяции представляют собой выделенные CD10⁺, CD105⁺ и CD34⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD90⁺ или CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD90⁺ и CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления любые из выделенных CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарных адгезивных клеток, описанных выше, имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ или SH4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки или выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD44⁺. В конкретном варианте осуществления любой из популяций клеток, включающих вышеуказанные выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки, выделенные плацентарные адгезивные клетки, имеют одну или более дополнительных характеристик из CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{низкий уровень}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любую их комбинацию. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺

клетки, кроме того, являются CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE- кадгерин^{низкий уровень}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻ и PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток).

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, имеют одну или более или все характеристики из CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺ и ABC-p⁺, причем указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки получены путем физического и/или ферментативного разрушения плацентарной ткани. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и ABC-p⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и CD34⁻, причем указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки имеют по крайней мере одну из следующих характеристик: CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA4⁻ и SSEA4⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ и SSEA4⁻. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA4⁻ и SSEA4⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и CD34⁻, и либо SH2⁺, либо SH3⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺ и SH3⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ и SSEA4⁻, и либо SH2⁺, либо SH3⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и CD34⁻, и либо SH2⁺, либо SH3⁺, и имеют по крайней мере одну характеристику из CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻ или SSEA4⁻. В другом конкретном варианте осуществления

выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, и SSEA4⁻, и либо SH2⁺, либо SH3⁺.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах и композициях, являются SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ и OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45⁻, SSEA4⁻ или SSEA4⁻. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA4⁻ и SSEA4⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ и SSEA4⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, CD34⁻ или CD45⁻.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах и композициях, являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, и SH4⁺; причем указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из OCT-4⁺, SSEA4⁻ или SSEA4⁻.

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в раскрытых здесь способах и композициях, являются CD200⁺ или HLA-G⁻. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD200⁺ и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанными стволовыми клетками являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺ или HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию эмбриоидоподобных тел в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих

выделенные плацентарные адгезивные клетки, в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются стволовыми или мультипотентными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применяемая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки (ами). В конкретном варианте осуществления указанная популяция представляет собой популяцию плацентарных адгезивных клеток. В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно 20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарными адгезивными клетками. Предпочтительно, когда по крайней мере приблизительно 70% клеток в указанной клеточной популяции представляют собой выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки. Более предпочтительно, когда по крайней мере приблизительно 90%, 95% или 99% указанных клеток представляют собой выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления популяций клеток указанные выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки также являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ и CD105⁺. В другом варианте осуществления указанная популяция клеток образует одно или более эмбриоидоподобных телец при культивировании в условиях, которые делают возможным образование

эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления указанная клеточная популяция отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются стволовыми клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются CD73⁺, CD105⁺ и CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, и CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, при культивировании этой популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются выделенными плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применяемая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки(ами). В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно

20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными адгезивными клетками. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 70% указанных клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 90%, 95% или 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления указанных популяций выделенные плацентарные адгезивные клетки являются HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток образует одно или более эмбриоидоподобных телец при культивировании в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция плацентарных адгезивных клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются стволовыми клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция плацентарных адгезивных клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти характеристики.

В некоторых других вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более характеристик из CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁻, HLA-G⁻ или ABC-p⁺. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻ и OCT-4⁺. В

другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ и SH4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ и OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁻, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и ABC-p⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ и OCT-4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ и SSEA4⁻. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ и SSEA4⁻ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, и SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются OCT-4⁺ и CD34⁻, и либо SH3⁺, либо SH4⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻ и либо CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, либо OCT-4⁺.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются CD200⁺ и OCT-4⁺. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте

осуществления выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец популяцией плацентарных адгезивных клеток, которая включает выделенные клетки, при культивировании популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются стволовыми клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти характеристики.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки(ами). В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно 20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарными адгезивными клетками. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 70% указанных клеток представляют собой указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 80%, 90%, 95% или 99% клеток в указанной клеточной популяции являются указанными выделенными CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарными адгезивными клетками. В конкретном варианте осуществления выделенных популяций указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления

указанные выделенные CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления популяция клеток образует одно или более эмбриоидоподобных телец при культивировании в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных тел. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются выделенными CD200⁺, OCT-4⁺ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ и CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающей указанные клетки, при культивировании популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются выделенными CD73⁺, CD105⁺,

HLA-G⁻ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применяемая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки(ами). В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно 20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарными адгезивными клетками. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 70% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарными адгезивными клетками. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 90%, 95% или 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления вышеуказанных популяций, указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ и CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются

CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются CD73⁺ и CD105⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, включающей указанные CD73⁺, CD105⁺ клетки, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти характеристики.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные плацентарные адгезивные клетки(ами), которые являются CD73⁺, CD105⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных тел в популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, включающих указанные клетки, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают

возможным образование эмбриоидоподобных телец. В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно 20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 70% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 90%, 95% или 99% клеток в указанной популяции клеток являются выделенными CD73⁺, CD105⁺ плацентарными адгезивными клетками. В конкретном варианте осуществления вышеуказанных популяций указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, OST-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD73⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OST-4⁺ и CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными выделенными CD73⁺, CD105⁺ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрирует эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются OST-4⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции выделенных

плацентарных адгезивных клеток, включающих указанные клетки, при культивировании в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных тел. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются ОСТ-4⁺ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрирует эти характеристики.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные плацентарные адгезивные клетки (ами), которые являются ОСТ-4⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных тел в популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, включающих указанные клетки, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных тел. В различных вариантах осуществления по крайней мере приблизительно 10%, по крайней мере приблизительно 20%, по крайней мере приблизительно 30%, по крайней мере приблизительно 40%, по крайней мере приблизительно 50% или по крайней мере приблизительно 60% клеток в указанной популяции клеток представляют собой указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления по крайней мере приблизительно 70% клеток в указанной популяции клеток представляют собой указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки. В другом

варианте осуществления по крайней мере приблизительно 80%, 90%, 95% или 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления вышеуказанных популяций указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток отделена от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ и CD34⁻ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95% или по крайней мере приблизительно 99% клеток в указанной выделенной популяции клеток представляют собой выделенные HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ и CD34⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных

адгезивных клеток, которые не являются HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ и CD34⁻ плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления указанная выделенная популяция плацентарных адгезивных клеток по существу не содержит материнских компонентов; например, по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанного клетки в указанной выделенной популяции плацентарных адгезивных клеток являются нематеринскими по происхождению.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117 и CD133⁻ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95% или по крайней мере приблизительно 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117 и CD133⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными выделенными плацентарными адгезивными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117 и CD133⁻ плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению, т.е. имеют генотип плода. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанных клеток в указанной выделенной популяции плацентарных адгезивных клеток являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном

варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти характеристики.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻ и CD117⁻ плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая для описанных здесь способов и композиций, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные плацентарные адгезивные клетки(ами), причем по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95% или по крайней мере приблизительно 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻ и CD117⁻ плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанных клеток в указанной популяции клеток являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ и CD117 плацентарные адгезивные клетки. В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая для описанных здесь

способов и композиций, представляет собой популяцию клеток, включающую, например, обогащенную, выделенные CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ и CD117 плацентарные адгезивные клетки(ами), причем по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 80%, по крайней мере приблизительно 90%, по крайней мере приблизительно 95% или по крайней мере приблизительно 99% клеток в указанной популяции представляют собой CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ и CD117 плацентарные адгезивные клетки. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанных клеток в указанной популяции клеток являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти характеристики.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, являются HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻ и CD133⁻ и, кроме того, являются CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ и/или HLA-G⁻, и/или негативными по CD117. В другом варианте осуществления популяция клеток, применяемая в описанных здесь способах и композициях, представляет собой популяцию клеток, включающую выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем по крайней мере приблизительно 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или приблизительно 99% клеток в указанной популяции являются выделенными плацентарными адгезивными клетками, которые являются HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻, и которые, кроме того, являются

позитивными по CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 и/или негативными по CD117 и/или HLA-G. В конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не являются указанными клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанных клеток в указанной популяции клеток являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток отделены от плацентарных адгезивных клеток, которые не демонстрируют эти маркеры.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые являются CD200⁺ и CD10⁺, что можно определить по связыванию с антителами, и CD117⁻, что можно определить либо по связыванию с антителами, либо с помощью ОТ-ПЦР. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, которые являются CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁻, МНС класса I⁺ и β -2-микроглобулин⁺. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой плацентарные адгезивные клетки, экспрессия по крайней мере одного клеточного маркера в которых по крайней мере в два раза выше, чем в мезенхимных стволовых клетках (например, полученных из костного мозга мезенхимных стволовых клеток). В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные

плацентарные адгезивные клетки являются нематеринскими по происхождению. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% указанных клеток в указанной популяции клеток являются нематеринскими по происхождению.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, например, плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, которые имеют одну или более характеристик из CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE- кадгерин^{низкий уровень}, CD184/CXCR4⁻, β2-микроглобулин^{низкий уровень}, MHC-IV, HLA-G ^{низкий уровень} и/или PDL1^{низкий уровень}. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются по крайней мере CD29⁺ и CD54⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются по крайней мере CD44⁺ и CD106⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются по крайней мере CD29⁺.

В другом варианте осуществления популяция клеток, применимая в описанных здесь способах и композициях, включает выделенные плацентарные адгезивные клетки, и по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанной популяции клеток представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые имеют одну или более характеристик из CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE- кадгерин^{трудноразличимый}, CD184/CXCR4⁻, β2-микроглобулин^{трудноразличимый}, HLA-I^{трудноразличимый}, HLA-II⁻, HLA-G^{трудноразличимый} и/или PDL1^{трудноразличимый}. В другом конкретном варианте осуществления по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанной популяции клеток являются CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺,

CD106/VCAM⁺, CD144/VE-кадгерин^{трудноразличимый}, CD184/CXCR4⁻, β 2-микроглобулин^{трудноразличимый}, HLA-I^{трудноразличимый}, MHC-II⁻, HLA-G^{трудноразличимый} и PDL1^{трудноразличимый}.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые имеют одну или несколько или все характеристики из CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺ и ABC-p⁺, где ABC-p представляет собой специфический для плаценты белок ABC-транспортер (также известный как белок устойчивости рака молочной железы (BCRP) и белок устойчивости к митоксантрону (MXR)), причем указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки получают путем перфузии млекопитающего, например, человека, из плаценты которого была слита пуповинная кровь и которая была перфузирована для удаления остаточной крови.

В другом конкретном варианте осуществления любой из вышеуказанных характеристик экспрессия клеточного маркера (например, кластера дифференцировки или иммуногенного маркера) определяется с помощью проточной цитометрии; в другом конкретном варианте осуществления экспрессия маркера определяется с помощью ОТ-ПЦР.

Анализ профиля экспрессии генов подтверждает, что выделенные плацентарные адгезивные клетки и популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток отличимы от других клеток, например мезенхимных стволовых клеток, например мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга. Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки можно отличить, например, от мезенхимных стволовых клеток на основе экспрессии одного или более генов, экспрессия которых значительно выше в выделенных плацентарных адгезивных клетках, или в некоторых выделенных стволовых клетках пуповины, по сравнению с мезенхимными стволовыми клетками, полученными из костного мозга. В частности, выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в предлагаемых здесь способах лечения, можно отличить

от мезенхимных стволовых клеток на основе экспрессии одного или более генов, экспрессия которых значительно выше (т.е. по крайней мере в два раза выше) в выделенных плацентарных адгезивных клетках, чем в равном количестве мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, причем один или более генов представляют собой ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A или комбинацию любых из вышеперечисленных генов, при выращивании клеток в эквивалентных условиях. Смотрите, например, публикацию заявки на патент США с № 2007/0275362, раскрытие которой полностью включено сюда посредством ссылки. В некоторых конкретных вариантах осуществления указанная экспрессия указанных одного или более генов определяется, например, с помощью ОТ-ПЦР или анализа с использованием микрочипов, например, с использованием микрочипа U133-A (Affymetrix). В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки экспрессируют указанные один или более генов при культивировании в течение ряда удвоений популяции, например, где-нибудь от приблизительно 3 до приблизительно 35 удвоений популяции, в среде, содержащей DMEM-LG (например, от Gibco); 2% фетальной телячьей сыворотки (например, от Hyclone Labs.); 1х инсулин-трансферрин-селен (ITS); 1х линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин (LA-BSA); 10^{-9} М дексаметазон (например, от Sigma); 10^{-4} М 2-фосфат аскорбиновой кислоты (например, от Sigma); эпидермальный фактор роста 10 нг/мл (например, от R&D Systems) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) 10 нг/мл (например, от R&D Systems). В другом конкретном варианте осуществления геном, специфическим для выделенных плацентарных клеток или специфическим для выделенных клеток пуповины, является CD200.

Конкретные последовательности этих генов можно найти в GenBank под номерами доступа: NM_001615 (ACTG2), BC065545

(ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 или BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN) и BC005001 (ZC3H12A), на март 2008 года.

В некоторых вариантах осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки экспрессируют каждый из ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, F1110781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, и ZC3H12A на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, при выращивании клеток в эквивалентных условиях.

В конкретных вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки экспрессируют CD200 и ARTS1 (аминопептидазный регулятор фактора некроза опухоли типа 1); ARTS-1 и LRAP (аргининаминопептидазу лейкоцитарного происхождения); IL6 (интерлейкин-6) и TGFB2 (трансформирующий фактор роста, бета 2); IL6 и KRT18 (кератин 18); IER3 (немедленный ранний ответ 3), MEST (гомолог специфического для мезодермы транскрипта) и TGFB2; CD200 и IER3; CD200 и IL6; CD200 и KRT18; CD200 и LRAP; CD200 и MEST; CD200 и NFE2L3 (фактор 3, подобный ядерному фактору эритроидного происхождения 2); или CD200 и TGFB2 на заметно

более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга (BM-MSC), причем указанные мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки. В других конкретных вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки экспрессируют ARTS-1, CD200, IL6 и LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 и MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, и TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, и TGFB2; или IER3, MEST и TGFB2 на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, BM-MSC, причем указанные мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки.

Экспрессию вышеупомянутых генов можно оценить с помощью стандартных методов. Например, зонды на основе последовательности гена(ов) могут быть индивидуально выбраны и сконструированы с помощью традиционных методов. Экспрессию генов можно оценить, например, на микрочипе, содержащем зонды для одного или более генов, например, с использованием ранжированного ряда Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 или Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (Santa Clara, Calif.). Экспрессия этих генов может быть оценена, даже если последовательность для конкретного номера доступа в GenBank изменена, поскольку специфические для измененной последовательности зонды могут быть легко созданы, используя хорошо известные стандартные методы.

Уровень экспрессии этих генов может быть использован для подтверждения идентичности популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, для идентификации популяции клеток как включающей по крайней мере множество выделенных плацентарных адгезивных клеток или т.п. Популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, идентичность которых подтверждена, могут быть

клональными, например, популяциями выделенных плацентарных адгезивных клеток, размноженных из одной выделенной плацентарной клетки, или смешанной популяцией стволовых клеток, например популяцией клеток, включающей только выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые размножены из множества выделенных плацентарных адгезивных клеток, или популяцией клеток, включающей выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, и по крайней мере один другой тип клеток.

Уровень экспрессии этих генов можно использовать для отбора популяций выделенных плацентарных адгезивных клеток. Например, популяция клеток, например клонально размноженных клеток, может быть отобрана, если экспрессия одного или более из перечисленных выше генов значительно выше в образце из популяции клеток, чем в эквивалентной популяции мезенхимных стволовых клеток. Такой отбор может быть из популяции из множества выделенных популяций плацентарных клеток, из множества популяций клеток, идентичность которых неизвестна и т.д.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть отобраны на основе уровня одного или более таких генов по сравнению с уровнем экспрессии указанного одного или более генов, например, в мезенхимных стволовых клеток в качестве контроля, например, уровнем экспрессии указанного одного или более генов в равном количестве полученных из костного мозга мезенхимных стволовых клеток. В одном варианте осуществления уровень экспрессии указанного одного или более генов в образце, включающем равное количество мезенхимных стволовых клеток, используют в качестве контроля. В другом варианте осуществления контролем для выделенных плацентарных адгезивных клеток, исследуемых в определенных условиях, является числовое значение, представляющее собой уровень экспрессии указанных одного или более генов в мезенхимных стволовых клетках в указанных условиях.

В некоторых вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки (например, плацентарные адгезивные клетки®), применимые в предлагаемых здесь способах, не экспрессируют CD34, что можно

обнаружить с помощью иммунолокализации, после воздействия 1-100 нг/мл VEGF в течение 4-21 дня. В конкретном варианте осуществления указанные плацентарные адгезивные клетки являются прилипающими к пластику для культуры ткани. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток индуцирует образование отростков или трубчатых структур у эндотелиальных клеток при культивировании в присутствии лимфангиогенного фактора, такого как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), или основной фактор роста фибробластов (bFGF), например, на подложке, такой как MATRIGEL™.

В другом аспекте предлагаемые здесь плацентарные адгезивные клетки, популяция клеток, например популяция плацентарных адгезивных клеток или популяция клеток, в которой по крайней мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98% клеток представляют собой плацентарные адгезивные клетки, секретируют один или более или все из VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, фоллистатина, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR или галектина-1, например, в культуральную среду, в которой выращивают клетку или клетки. В другом варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки экспрессируют повышенные уровни CD202b, IL-8 и/или VEGF в условиях гипоксии (например, менее чем приблизительно 5% O₂) по сравнению с нормоксическими условиями (например, приблизительно 20% или приблизительно 21% O₂).

В другом варианте осуществления любые из плацентарных адгезивных клеток или популяций клеток, включающих плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, могут вызывать образование отростков или трубчатых структур в популяции эндотелиальных клеток, контактирующих с указанными адгезивными клетками, полученными из плаценты. В конкретном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки сокультивируют с эндотелиальными клетками человека, которые образуют отростки или трубчатые структуры, или поддерживают образование отростков у эндотелиальных клеток, например, при культивировании в

присутствии белков экстраклеточного матрикса, таких как коллаген типа I и IV, и/или ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) или основной фактор роста фибробластов (bFGF), например, в или на подложке, такой как плацентарный коллаген или MATRIGEL™, в течение по крайней мере 4 дней. В другом варианте осуществления любые из популяций клеток, включающих плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, секретируют ангиогенные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF) или интерлейкин-8 (IL-8), и, таким образом, могут индуцировать образование отростков или трубчатых структур у эндотелиальных клеток человека при культивировании в присутствии белков экстраклеточного матрикса, таких как коллаген типа I и IV, например, в или на подложке, такой как плацентарный коллаген или MATRIGEL™

В другом варианте осуществления любая из вышеуказанных популяций клеток, включающих адгезивные клетки, полученные из плаценты, (плацентарные адгезивные клетки), секретирует ангиогенные факторы. В конкретных вариантах осуществления популяция клеток секретирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF) и/или интерлейкин-8 (IL-8)). В других конкретных вариантах осуществления популяция клеток, включающая плацентарные адгезивные клетки, секретирует один или более ангиогенных факторов и тем самым индуцирует миграцию эндотелиальных клеток человека в анализе заживления ран *in vitro*. В других конкретных вариантах осуществления популяция клеток, включающая адгезивные клетки, полученные из плаценты, индуцирует созревание, дифференцировку или пролиферацию эндотелиальных клеток человека, эндотелиальных клеток-предшественников, миоцитов или миобластов.

Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки демонстрируют вышеуказанные характеристики (например, комбинации

маркеров клеточной поверхности и/или профилей экспрессии генов) в первичной культуре или во время пролиферации в среде, содержащей, например, DMEM-LG (Gibco), 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (Hyclone Laboratories), 1х инсулин-трансферрин-селен (ITS); 1х линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин (LA-BSA); 10^{-9} М дексаметазон (Sigma); 10^{-4} М 2-фосфат аскорбиновой кислоты (Sigma); эпидермальный фактор роста 10 нг/мл (R&D Systems); тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) 10 нг/мл (R&D Systems) и 100 Е пенициллина/1000 Е стрептомицина.

В некоторых вариантах осуществления любых из плацентарных адгезивных клеток, раскрытых здесь, клетки являются человеческими. В некоторых вариантах осуществления любых из плацентарных адгезивных клеток, раскрытых здесь, характеристиками клеточных маркеров или характеристиками экспрессии генов являются человеческие маркеры или человеческие гены.

В другом конкретном варианте осуществления указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, указанные клетки или популяция были размножены, например, пассированы по крайней мере, приблизительно или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз или более, или подвергнуты пролиферации в течение по крайней мере, приблизительно или не более 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 удвоений популяции. В другом конкретном варианте осуществления указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, указанные клетки или популяция являются первичными изолятами. В другом конкретном варианте осуществления выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые здесь раскрыты, указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки являются фетальными по происхождению (т.е. имеют генотип плода).

В некоторых вариантах осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки не дифференцируются во время культивирования в среде для выращивания, т.е. в среде, составленной для стимулирования пролиферации, например, во время пролиферации в среде для выращивания. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки не нуждаются в питающем слое для пролиферации. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки не дифференцируются в культуре в отсутствие питающего слоя, исключительно из-за отсутствия питающего клеточного слоя.

В другом варианте осуществления клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем множество указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток является позитивным по альдегиддегидрогеназе (ALDH), что оценивается путем исследования альдегиддегидрогеназной активности. Такие исследования известны в данной области техники (смотрите, например, Bostian and Berts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). В конкретном варианте осуществления в указанном анализе ALDH используется ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oreg.) в качестве маркера альдегиддегидрогеназной активности. В конкретном варианте осуществления указанное множество составляет от приблизительно 3% до приблизительно 25% клеток в указанной популяции клеток. В другом варианте осуществления здесь предлагается популяция выделенных клеток пуповины, например мультипотентных выделенных клеток пуповины, причем множество указанных выделенных клеток пуповины является позитивным по альдегиддегидрогеназе, что оценивается путем исследования альдегиддегидрогеназной активности, в котором используется ALDEFLUOR® в качестве индикатора альдегиддегидрогеназной активности. В конкретном варианте осуществления указанное множество составляет от приблизительно 3% до приблизительно 25% клеток в указанной популяции клеток. В другом варианте осуществления указанная популяция выделенных плацентарных

адгезивных клеток или выделенных клеток пуповины демонстрирует активность ALDH, превышающую в по крайней мере три или по крайней мере пять раз таковую в популяции мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, содержащей приблизительно такое же количество клетки и культивируемой в тех же условиях.

В некоторых вариантах осуществления любых из популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, плацентарные адгезивные клетки в указанных популяциях клеток по существу не включают клетки с генотипом матери; например, по крайней мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% плацентарных адгезивных клеток в указанной популяции имеют генотип плода. В некоторых других вариантах осуществления любых из популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, популяции клеток, включающие указанные плацентарные адгезивные клетки, по существу не включают клетки с генотипом матери; например, по крайней мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанной популяции имеют генотип плода.

В конкретном варианте осуществления любых из вышеуказанных выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяций выделенных плацентарных адгезивных клеток кариотип клеток, или по крайней мере приблизительно 95% или приблизительно 99% клеток в указанной популяции, является нормальным. В другом конкретном варианте осуществления любых из вышеуказанных плацентарных адгезивных клеток или клеточных популяций клетки или клетки в популяции клеток являются нематеринскими по происхождению.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, несущих любую из вышеуказанных комбинаций маркеров, могут быть объединены в любом соотношении. Любые две или более из вышеуказанных популяций выделенных плацентарных клеток могут быть объединены с образованием популяции выделенных плацентарных клеток. Например, популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток может включать первую популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток, характеризующихся одной из комбинаций маркеров,

описанных выше, и вторую популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток, характеризующихся другой из комбинаций маркеров, описанных выше, причем указанные первая и вторая популяции объединены в соотношении приблизительно 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 или приблизительно 99:1. Подобным образом могут быть объединены любые три, четыре, пять или более описанных выше выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяций выделенных плацентарных адгезивных клеток.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, применимые в описанных здесь способах и композициях, могут быть получены, например, путем разрушения плацентарной ткани, с использованием ферментативного расщепления или без него (смотрите раздел 5.4.3) или перфузии (смотрите раздел 5.4.4). Например, популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток могут быть получены в соответствии со способом, включающим перфузию плаценты млекопитающего, из которой была слита пуповинная кровь и которая была перфузирована для удаления остаточной крови; перфузию указанной плаценты перфузионным раствором; и сбор указанного перфузионного раствора, причем указанный перфузионный раствор после перфузии содержит популяцию плацентарных адгезивных клеток, которая включает выделенные плацентарные адгезивные клетки; и выделение множества указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток из указанной популяции клеток. В конкретном варианте осуществления перфузионный раствор пропускают как через пупочную вену, так и через пупочные артерии и собирают после того, как он выходит из плаценты. В другом конкретном варианте осуществления перфузионный раствор пропускают через пупочную вену и собирают из пупочных артерий, или пропускают через пупочные артерии и собирают из пупочной вены.

В различных вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, содержащиеся в популяции клеток, полученных в результате перфузии плаценты, составляют по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или по крайней мере 99,5% от указанной популяции плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные

адгезивные клетки, собранные путем перфузии, включают фетальные и материнские клетки. В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, собранные путем перфузии, являются в по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или по крайней мере 99,5% случаях фетальными клетками.

В другом конкретном варианте осуществления здесь предлагается композиция, содержащая популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, собранную путем перфузии, причем указанная композиция содержит по крайней мере часть перфузионного раствора, использованного для сбора выделенных плацентарных адгезивных клеток.

Выделенные популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, могут быть получены путем расщепления плацентарной ткани разрушающим ткани ферментом с получением популяции плацентарных адгезивных клеток, включающей клетки, и отделения, или по существу отделения, множества плацентарных адгезивных клеток от остальной части указанных плацентарных адгезивных клеток. Вся или любая часть плаценты может быть подвергнута расщеплению для получения выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь. В конкретных вариантах осуществления, например, указанная плацентарная ткань может представлять собой целую плаценту, амниотическую оболочку, хорион, комбинацию амниона и хориона или комбинацию любых из вышеперечисленных. В другом конкретном варианте осуществления тканеразрушающий фермент представляет собой трипсин или коллагеназу. В различных вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, содержащиеся в популяции клеток, полученных в результате расщепления плаценты, составляют по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или по крайней мере 99,5% от указанной популяции плацентарных адгезивных клеток.

Выделенные популяции плацентарных адгезивных клеток, описанных выше, и популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, как правило, могут включать приблизительно, по крайней мере или не более чем 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} или более выделенных плацентарных адгезивных клеток. Популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, применимые в описанных здесь способах лечения, включают по крайней мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% жизнеспособных выделенных плацентарных адгезивных клеток, например, определяемых, например, путем исключения трипанового синего.

5.3.3 Рост в культуре

Рост выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь в разделе 5.3, как и в случае любых клеток млекопитающих, частично зависит от конкретной среды, выбранной для выращивания. В оптимальных условиях количество выделенных плацентарных адгезивных клеток обычно удваивается приблизительно за 1 день. Во время культивирования выделенные плацентарные адгезивных клетки, описанные здесь, прилипают к подложке в культуре, например, к поверхности контейнера для культуры ткани (например, пластику чашки для культуры ткани, покрытому фибронектином пластику и т.п.) и образуют монослой.

Популяции плацентарных адгезивных клеток, которые включают выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, при культивировании в соответствующих условиях могут образовывать эмбриоидоподобные тельца, т.е. трехмерные кластеры клеток растут на слое прилипших клеток. Клетки внутри эмбриоидоподобных телец могут экспрессировать маркеры, связанные с очень ранними стволовыми клетками, например, OCT-4, Nanog, SSEA3 и SSEA4. Клетки внутри эмбриоидоподобных телец, как правило, не прилипают к подложке для культуры, как описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки, но, как правило, остаются прикрепленными к прилипшим клеткам во время культивирования. Жизнеспособность клеток эмбриоидоподобных телец зависит от прилипших выделенных плацентарных адгезивных клеток, поскольку эмбриоидоподобные тельца не образуются в отсутствие прилипших выделенных плацентарных адгезивных клеток. Прилипшие выделенные плацентарные адгезивные клетки, таким образом, способствуют росту одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции

плацентарных адгезивных клеток, которые включают прилипшие выделенные плацентарные адгезивные клетки. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что клетки эмбриоидоподобных телец растут на прилипших выделенных плацентарных адгезивных клетках так же, как эмбриональные стволовые клетки растут на питающем слое клеток.

5.4. Способы получения выделенных плацентарных клеток

5.4.1. Композиция для сбора стволовых клеток

Далее здесь предлагаются способы сбора и выделения плацентарных адгезивных клеток, например выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных в разделе 5.3 выше. Как правило, такие клетки получают из плаценты млекопитающего с использованием физиологически приемлемого раствора, например композиции для сбора клеток. Приводимая в качестве примера композиция для сбора клеток подробно описана в соответствующей публикации заявки на патент США № 2007/0190042, озаглавленной «Улучшенная среда для сбора плацентарных стволовых клеток и консервирования органов», описание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

Композиция для сбора клеток может содержать любой физиологически приемлемый раствор, подходящий для сбора и/или культивирования клеток, например выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, например, физиологический раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Кребса, модифицированный раствор Кребса, раствор Игла, 0,9% NaCl и т.д.), культуральную среду (например, DMEM, H.DMEM и т.д.) и т.п.

Композиция для сбора клеток может содержать один или более компонентов, которые имеют тенденцию сохранять выделенные плацентарные адгезивные клетки, т.е. предотвращать гибель выделенных плацентарных адгезивных клеток или отсрочивать гибель выделенных плацентарных адгезивных клеток, уменьшать количество выделенных плацентарных адгезивных клеток в популяции клеток, которые погибают, или т.п., от момента сбора до момента культивирования. Такими компонентами могут быть, например, ингибитор апоптоза (например, ингибитор каспазы или ингибитор

JNK); вазодилататор (например, сульфат магния, антигипертензивное лекарственное средство, предсердный натрийуретический пептид (ANP), адренокортикотропин, кортикотропин-рилизинг-гормон, нитропруссид натрия, гидралазин, аденозинтрифосфат, аденозин, индометацин или сульфат магния, ингибитор фосфодиэстеразы и т.д.); ингибитор некроза (например, 2-(1H-индол-3-ил)-3-пентиламиномалеимид, дитиокарбамат пирролидина или клоназепам); ингибитор TNF- α ; и/или перфторуглерод с функцией переноса кислорода (например, перфтороктилбромид, перфтордецилбромид и т.д.).

Композиция для сбора клеток может содержать один или более тканеразрушающих ферментов, например, металлопротеазу, сериновую протеазу, нейтральную протеазу, РНКазу или ДНКазу или т.п. Такие ферменты включают, но без ограничения ими, коллагеназы (например, коллагеназу I, II, III или IV, коллагеназу из *Clostridium histolyticum* и т.д.); диспазу, термолизин, эластазу, трипсин, Либеразу, гиалуронидазу и т.п.

Композиция для сбора клеток может содержать бактерицидно или бактериостатически эффективное количество антибиотика. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления антибиотик представляет собой макролид (например, тобрамицин), цефалоспорин (например, цефалексин, цефрадин, цефуроксим, цефпрозил, цефаклор, цефиксим или цефадроксил), кларитромицин, эритромицин, пенициллин (например, пенициллин V) или хинолон (например, офлоксацин, цiproфлоксацин или норфлоксацин), тетрациклин, стрептомицин и т.д. В конкретном варианте осуществления антибиотик активен в отношении грамположительных и/или грамотрицательных бактерий, например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и т.п. В одном варианте осуществления антибиотик представляет собой гентамицин, например, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,01% (в отношении веса к объему) в культуральной среде. Композиция для сбора клеток также может содержать одно или более из следующих соединений: аденозин (от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ); D-глюкозу (от приблизительно 20 мМ до приблизительно 100 мМ); ионы

магния (от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ); макромолекулу с молекулярной массой более 20000 дальтон, в одном варианте осуществления, присутствующую в количестве, достаточном для поддержания целостности эндотелия и жизнеспособности клеток, (например, синтетический или встречающийся в природе коллоид, полисахарид, такой как декстран, или полиэтиленгликоль, присутствующий в количестве от приблизительно 25 г/л до приблизительно 100 г/л или от приблизительно 40 г/л до приблизительно 60 г/л); антиоксидант (например, бутилоксианизол, бутилгидрокситолуол, глутатион, витамин С или витамин Е, присутствующие в количестве от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 100 мкМ); восстановитель (например, N-ацетилцистеин, присутствующий в количестве от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 5 мМ); средство, предотвращающее поступление кальция в клетки (например, верапамил присутствующий в количестве от приблизительно 2 мкМ до приблизительно 25 мкМ); нитроглицерин (например, от приблизительно 0,05 г/л до приблизительно 0,2 г/л); антикоагулянт, в одном варианте осуществления, присутствующий в количестве, достаточном для предотвращения свертывания остаточной крови (например, гепарин или гирудин, присутствующие в концентрации от приблизительно 1000 единиц/л до приблизительно 100000 единиц/л); или амилоридсодержащее соединение (например, амилорид, этилизопропиламилорид, гексаметиленамилорид, диметиламилорид или изобутиламилорид, присутствующие в количестве от приблизительно 1,0 мкМ до приблизительно 5 мкМ).

5.4.2 Сбор и обработка плаценты

Как правило, плаценту человека получают вскоре после ее выхода после родов. В предпочтительном варианте осуществления плаценту получают от пациента после информированного согласия и после того, как полный анамнез пациента собран и присоединен к плаценте. Предпочтительно, когда сбор анамнеза продолжается после родов. Такой анамнез может быть использован для координации последующего применения плаценты или выделенных из нее плацентарных адгезивных клеток. Например, выделенные плацентарные адгезивные клетки человека могут использоваться, в

свете собранного анамнеза, для персонализированного лекарственного средства для младенца, связанного с плацентой, или для родителей, братьев и сестер или других родственников младенца.

Перед получением выделенных плацентарных адгезивных клеток предпочтительно удаляются пуповинная кровь и плацентарная кровь. В некоторых вариантах осуществления после родов пуповинная кровь в плаценте извлекается. Плацента может быть подвергнута обычному процессу извлечения пуповинной крови. Как правило, иглу или канюлю используют, движением самотеком, для обескровливания плаценты (смотрите, например, Anderson, патент США с № 5372581; Hessel et al., патент США с № 5415665). Иглу или канюлю обычно помещают в пупочную вену, и плаценту можно осторожно помассировать, чтобы помочь сливу пуповинной крови из плаценты. Такое извлечение пуповинной крови может быть осуществлено коммерчески, например, LifeBank USA, Cedar Knolls, NJ. Предпочтительно, когда дренаж плаценты осуществляется самотеком без дополнительных манипуляций, чтобы минимизировать разрушение ткани во время извлечения пуповинной крови.

Как правило, плацента транспортируется из родильного помещения в другое место, например лабораторию, для извлечения пуповинной крови и сбора стволовых клеток, например, путем перфузии или диссоциации ткани. Плаценту предпочтительно транспортировать в стерильном, теплоизолированном устройстве для транспортировки (поддерживая температуру плаценты между 20-28°C), например, помещая плаценту, с пережатым проксимальным концом пуповины, в стерильный пластиковый пакет с застежкой-молнией, который затем помещается в изолированный контейнер. В другом варианте осуществления плацента транспортируется в наборе для сбора пуповинной крови, по существу, как описано в заявке, по которой принято решение о выдаче патента США № 7147626, раскрытие которой включено сюда посредством ссылки. Предпочтительно, когда плацента доставляется в лабораторию через четыре-двадцать четыре часа после родов. В некоторых вариантах осуществления проксимальный конец пуповины пережимается,

предпочтительно в пределах 4–5 см (сантиметров) от вхождения в плацентарный диск, до извлечения пуповинной крови. В других вариантах осуществления проксимальный конец пуповины пережимается после извлечения пуповинной крови, но до дальнейшей обработки плаценты.

Плаценту до сбора клеток можно хранить в стерильных условиях и либо при комнатной температуре, либо при температуре от 5°C до 25°C. Плацента может храниться в течение периода от четырех до двадцати четырех часов, до сорока восьми часов или дольше, чем сорок восемь часов, до перфузии плаценты для удаления любой остаточной пуповинной крови. В одном варианте осуществления плаценту собирают от приблизительно 0 часов до приблизительно 2 часов после выхода. Плаценту предпочтительно хранить в растворе антикоагулянта при температуре от 5°C до 25°C. Подходящие растворы антикоагулянтов хорошо известны в данной области техники. Например, может использоваться раствор гепарина или варфарина натрия. В предпочтительном варианте осуществления раствор антикоагулянта включает раствор гепарина (например, 1% в весовом отношении в 1:1000 растворе). Обескровленная плацента предпочтительно хранится не более 36 часов до сбора плацентарных адгезивных клеток.

Плаценту млекопитающего или ее часть, однажды собранную и приготовленную, как правило, как описано выше, можно обработать любым известным в данной области техники способом, например, можно перфузировать или разрушить, например, расщепить с использованием одного или более тканеразрушающих ферментов для получения выделенных плацентарных адгезивных клеток.

5.4.3 Физическое разрушение и ферментативное расщепление ткани плаценты

В одном варианте осуществления стволовые клетки собирают из плаценты млекопитающего путем физического разрушения части всего органа. Например, плацента или ее часть могут быть, например, раздавлены, разрезаны, измельчены, нарезаны кубиками, измельчены, вымочены или т.п. Затем ткань можно культивировать для получения популяции выделенных плацентарных адгезивных

клеток. Как правило, ткань плаценты разрушают с использованием, например, культуральной среды, физиологического раствора или композиции для сбора стволовых клеток (смотрите раздел 5.4.1 и ниже).

Плаценту можно расчленить на компоненты до физического разрушения и/или ферментативного расщепления и извлечения стволовых клеток. Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть получены из всей или части амниотической оболочки, хориона, пуповины, котиледонов плаценты или любой их комбинации, в том числе из целой плаценты. Предпочтительно, когда выделенные плацентарные адгезивные клетки получают из плацентарной ткани, содержащей амнион и хорион. Как правило, выделенные адгезивные плацентарные клетки могут быть получены путем разрушения небольшой массы плацентарной ткани, например массы плацентарной ткани, которая составляет приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20., 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или приблизительно 1000 кубических миллиметров в объеме. Может быть использован любой способ физического разрушения, при условии, что способ разрушения оставляет жизнеспособным множество, более предпочтительно большинство и более предпочтительно по крайней мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% клеток в указанном органе, что можно определить, например, путем исключения трипанового синего.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, как правило, могут быть собраны из плаценты или ее части в любое время в пределах приблизительно первых трех дней после выхода плаценты, но предпочтительно между приблизительно 8 часами и приблизительно 18 часами после выхода.

В конкретном варианте осуществления разрушенную ткань культивируют в среде для культуры ткани, подходящей для пролиферации выделенных плацентарных адгезивных клеток (смотрите, например, раздел 5.5 ниже, описывающий культуру плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток).

В другом конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки собирают путем физического

разрушения плацентарной ткани, причем физическое разрушение включает ферментативное расщепление, которое может быть достигнуто путем использования одного или более тканеращепляющих ферментов. Плацента или ее часть также могут быть физически разрушены и расщеплены с использованием одного или более ферментов, и полученный материал затем погружают в композицию для сбора клеток или вводят в нее.

Предпочтительная композиция для сбора клеток содержит один или более тканеразрушающих ферментов. Ферменты, которые могут использовать для разрушения ткани плаценты, включают папаин, дезоксирибонуклеазы, сериновые протеазы, такие как трипсин, химотрипсин, коллагеназу, диспазу или эластазу. Сериновые протеазы могут ингибироваться альфа-2-микроглобулином в сыворотке, и поэтому среда, используемая для расщепления, обычно не содержит сыворотку. EDTA и ДНКазы обычно используются в процедурах ферментативного расщепления для повышения эффективности извлечения клеток. Продукт расщепления предпочтительно разводят во избежание удержания клеток в вязком лизате.

Может быть использована любая комбинация ферментов для расщепления тканей. Типичные концентрации для расщепления с использованием трипсина включают от 0,1% до приблизительно 2% трипсина, например, приблизительно 0,25% трипсина. Протеазы могут использоваться в комбинации, т.е. двух или более протеаз в одной и той же реакции расщепления, или могут использоваться последовательно для высвобождения плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток и плацентарных мультипотентных клеток. Например, в одном варианте осуществления плаценту или ее часть сначала расщепляют с использованием подходящего количества коллагеназы I от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг/мл, например, в течение 30 минут, с последующим расщеплением трипсином в концентрации приблизительно 0,25%, например, в течение 10 минут при 37°C. Сериновые протеазы предпочтительно используют последовательно после применения других ферментов.

В другом варианте осуществления ткань может быть дополнительно разрушена путем добавления хелатора, например этиленгликоль-бис (2-аминоэтилового эфира) -N,N,N'N'-тетрауксусной кислоты (EGTA) или этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) к композиции для сбора стволовых клеток, содержащей стволовые клетки, или к раствору, в котором ткань разрушают и/или расщепляют, до выделения стволовых клеток с использованием композиции для сбора стволовых клеток.

После расщепления продукт расщепления промывают, например, три раза культуральной средой, и промытые клетки высевают в колбы для культивирования. Затем клетки выделяют путем дифференциальной адгезии и характеризуют на предмет, например, жизнеспособности, маркеров клеточной поверхности, дифференцировки и т.п.

Понятно, что в случае, если целая плацента или часть плаценты включает как фетальные, так и материнские клетки (например, если часть плаценты содержит хорион или котиледоны), выделенные плацентарные адгезивные клетки могут включать смесь плацентарных адгезивных клеток, полученных как из фетального, так и из материнского источника. В случае, если часть плаценты не содержит или содержит незначительное количество материнских клеток (например, амнион), выделенные из нее плацентарные адгезивные клетки будут включать почти исключительно фетальные плацентарные адгезивные клетки (т.е. плацентарные адгезивные клетки с генотипом плода).

Плацентарные клетки, например плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, могут быть выделены из разрушенной плацентарной ткани путем дифференциальной трипсинизации (смотрите раздел 5.3.5 ниже) с последующим культивированием в одном или более новых контейнеров для культивирования в свежей среде для пролиферации, необязательно с последующей второй дифференциальной стадией трипсинизации.

5.4.4 Перфузия плаценты

Плацентарные клетки, например плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, также могут быть получены путем перфузии плаценты млекопитающих. Способы перфузии плаценты

млекопитающих для получения плацентарных адгезивных клеток описаны, например, у Hariri, патентах США с № 7045148 и № 7255529, а также в публикациях заявок на патенты США №№ 2007/0275362 и 2007/0190042, раскрытие каждого из которых включено сюда посредством ссылки во всей их полноте.

Плацентарные клетки могут быть собраны путем перфузии, например, через плацентарную сосудистую сеть, с использованием, например, композиции для сбора клеток в качестве перфузионного раствора. В одном варианте осуществления плаценту млекопитающего перфузируют путем пропускания перфузионного раствора через одну или обе из пупочной артерии и пупочной вены. Движение перфузионного раствора через плаценту может быть осуществлено с использованием, например, движения в плаценту самотеком. Предпочтительно, когда перфузионный раствор пропускают через плаценту, используя насос, например, перистальтический насос. Пупочную вену можно, например, канюлировать с использованием канюли, например, TEFLON® или пластиковой канюли, которая соединена со стерильным устройством для соединения, таким как стерильная трубка. Стерильное устройство для соединения соединено с перфузионным коллектором.

При подготовке к перфузии плаценту предпочтительно ориентируют (например, подвешивают) таким образом, чтобы пупочная артерия и пупочная вена находились в самой верхней точке плаценты. Плаценту можно перфузировать путем пропускания перфузионной жидкости через сосудистую сеть плаценты и окружающие ткани. Плаценту также можно перфузировать путем подачи перфузионной жидкости в пупочную вену и сбора из пупочных артерий, или подачи перфузионной жидкости в пупочные артерии и сбора из пупочной вены.

В одном варианте осуществления, например, пупочная артерия и пупочная вена соединены одновременно, например, с пипеткой, которая через гибкий соединитель соединена с резервуаром для перфузионного раствора. Перфузионный раствор подается в пупочную вену и артерию. Перфузионный раствор экссудировать из и/или проходит через стенки кровеносных сосудов в окружающие ткани

плаценты и собирается в подходящем открытом сосуде с поверхности плаценты, которая была прикреплена к матке матери во время беременности. Перфузионный раствор также можно вводить через отверстие в пуповине и позволять вытекать или просачиваться из отверстий в стенке плаценты, которая соединялась со стенкой матки матери. Плацентарные клетки, которые собирают этим способом, который можно назвать способом «сгонного резервуара», обычно представляют собой смесь клеток плода и матери.

В другом варианте осуществления перфузионный раствор пропускают через пупочные вены и собирают из пупочной артерии, или пропускают через пупочную артерию и собирают из пупочных вен. Плацентарные клетки, собранные этим способом, который можно назвать способом «замкнутой цепи», обычно являются почти исключительно клетками плода.

Понятно, что перфузия с использованием способа «сгонного резервуара», т.е., когда перфузат собирают после того, как он выделился с материнской стороны плаценты, приводит к смеси клеток плода и матери. В результате клетки, собранные этим способом, могут включать смешанную популяцию плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток или плацентарных мультипотентных клеток, как фетального, так и материнского происхождения. Напротив, перфузия только через сосудистую сеть плаценты в способе замкнутой цепи, в котором перфузионная жидкость проходит через один или два плацентарных сосуда и собирается исключительно через оставшиеся сосуды, приводит к сбору популяции плацентарных адгезивных клеток почти исключительно фетального происхождения.

В одном варианте осуществления перфузия способом замкнутой цепи может быть выполнена следующим образом. Плаценту после родов получают в пределах приблизительно 48 часов после родов. Пуповину пережимают и разрезают над зажимом. Пуповину можно выбросить или обработать для извлечения, например, стволовых клеток пуповины, и/или для обработки оболочки пуповины для получения биоматериала. Амниотическая оболочка может быть сохранена во время перфузии или может быть отделена от хориона, например, с помощью расслаивания пальцами. Если амниотическую

оболочку отделяют от хориона до перфузии, ее можно, например, выбросить или обработать, например, для получения стволовых клеток путем ферментативного расщепления или для получения, например, биоматериала амниотической оболочки, например биоматериала, описанного в публикации заявки на патент США с № 2004/0048796, раскрытие которой полностью включено сюда посредством ссылки. После очистки плаценты от всех видимых сгустков крови и остаточной крови, например, с использованием стерильной марли, сосуды пуповины обнажаются, например, путем частичного разрезания оболочки пуповины, чтобы обнажить поперечное сечение пуповины. Сосуды определяются и открываются, например, путем продвижения закрытого зажима типа «крокодил» по разрезанному концу каждого сосуда. Приспособление, например пластиковая трубка, соединенная с устройством для перфузии или перистальтическим насосом, затем вставляется в каждую из плацентарных артерий. Насосом может быть любой насос, подходящий для этой цели, например, перистальтический насос. Затем в плацентарную вену вставляется пластиковая трубка, соединенная со стерильным резервуаром для сбора, например, с мешком для крови, таким как мешок для сбора 250 мл. Альтернативно, трубка, соединенная с насосом, вставляется в плацентарную вену, а трубки к резервуару(ам) для сбора вставляются в одну или обе плацентарные артерии. Затем плаценту перфузируют объемом перфузионного раствора, например, приблизительно 750 мл перфузионного раствора. Затем клетки в перфузате собирают, например, центрифугированием. В некоторых вариантах осуществления плаценту перфузируют перфузионным раствором, например, 100–300 мл перфузионного раствора, для удаления остаточной крови перед перфузией для сбора плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток и/или плацентарных мультипотентных клеток. В другом варианте осуществления плаценту не перфузируют перфузионным раствором для удаления остаточной крови перед перфузией для сбора плацентарных адгезивных клеток.

В одном варианте осуществления проксимальный конец пуповины пережимается во время перфузии и, более предпочтительно,

пережимается в пределах 4–5 см (сантиметра) от вхождения пуповины в плацентарный диск.

Первый сбор перфузионной жидкости из плаценты млекопитающего во время процесса обескровливания, как правило, окрашен остаточными эритроцитами пуповинной крови и/или плацентарной крови. Перфузионная жидкость становится более бесцветной по мере продолжения перфузии, и остаточные клетки пуповинной крови вымываются из плаценты. Как правило, от 30 до 100 мл (миллилитра) перфузионной жидкости достаточно для первоначального обескровливания плаценты, но можно использовать больше или меньше перфузионной жидкости в зависимости от наблюдаемых результатов.

Объем перфузионной жидкости, используемый для выделения плацентарных адгезивных клеток, может варьировать в зависимости от собираемого количества клеток, размера плаценты, числа сборов, которые должны быть сделаны из одной плаценты, и т.д. В различных вариантах осуществления объем перфузионной жидкости может составлять от 50 мл до 5000 мл, от 50 мл до 4000 мл, от 50 мл до 3000 мл, от 100 мл до 2000 мл, от 250 мл до 2000 мл, от 500 мл до 2000 мл или от 750 мл до 2000 мл. Как правило, после обескровливания плаценту перфузируют с использованием 700–800 мл перфузионной жидкости.

Плаценту можно перфузировать множество раз на протяжении нескольких часов или нескольких дней. Если плаценту необходимо перфузировать множество раз, ее можно поддерживать или культивировать в асептических условиях в контейнере или другом подходящем сосуде и перфузировать композицией для сбора клеток или стандартным перфузионным раствором (например, нормальным физиологическим раствором, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор («PBS»)) с антикоагулянтом или без него (например, гепарина, варфарина натрия, кумарина, бисгидроксикумарина) и/или с или без антимикробного средства (например, β -меркаптоэтанола (0,1 мМ); антибиотиков, таких как стрептомицин (например, в дозе 40–100 мкг/мл), пенициллин (например, в дозе 40 Е/мл), амфотерицин В (например, в дозе 0,5

мкг/мл). В одном варианте осуществления выделенную плаценту поддерживают или культивируют в течение некоторого периода времени без сбора перфузата, так что плацента поддерживается или культивируется в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа или 2 или 3 или более дней до перфузии и сбора перфузата. Перфузированная плацента может поддерживаться в течение одного или более дополнительных периодов времени, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более часов, и подвергаться перфузии второй раз с использованием, например, 700-800 мл перфузионной жидкости. Плаценту можно перфузировать 1, 2, 3, 4, 5 или более раз, например, один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В предпочтительном варианте осуществления перфузия плаценты и сбор перфузионного раствора, например композиции для сбора клеток, повторяются до тех пор, пока количество извлекаемых ядросодержащих клеток не упадет ниже 100 клеток/мл. Перфузаты в разные моменты времени могут дополнительно обрабатываться индивидуально для извлечения зависящих от времени популяций клеток, например стволовых клеток. Перфузаты из разных моментов времени также могут быть объединены. В предпочтительном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки собирают за время от приблизительно 8 часов до приблизительно 18 часов после выхода плаценты.

Предпочтительно перфузия приводит к сбору значительно большего количества плацентарных адгезивных клеток, чем количество, которое можно получить из плаценты млекопитающего, не перфузированной указанным раствором и не обработанной иным способом для получения плацентарных адгезивных клеток (например, путем разрушения ткани, например ферментативного расщепления). В этом контексте «значительно больше» означает на по крайней мере 10% больше. Перфузия дает значительно больше плацентарных адгезивных клеток, чем, например, количество плацентарных адгезивных клеток, выделяемых из культуральной среды, в которой культивировалась плацента или ее часть.

Плацентарные клетки могут быть выделены из плаценты путем

перфузии раствором, содержащим одну или более протеаз или других тканеразрушающих ферментов. В конкретном варианте осуществления плацента или ее часть (например, амниотическая оболочка, амнион и хорион, плацентарная долька или котиледон, пуповина или комбинация любого из вышеперечисленных) доводится до 25–37°C и инкубируется с одним или более тканеразрушающих ферментов в 200 мл культуральной среды в течение 30 минут. Клетки из перфузата собирают, доводят до 4°C и промывают холодной смесью ингибиторов, содержащей 5 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреитол и 2 мМ бета-меркаптоэтанол. Плацентарные адгезивные клетки промывают через несколько минут холодной (например, при 4°C) композицией для сбора стволовых клеток.

5.4.5 Выделение, сортировка и характеристика плацентарных клеток

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например клетки, описанные в разделе 5.3 выше, независимо от того, получены ли они путем перфузии или физического разрушения, например, ферментативного расщепления, могут быть сначала очищены от (т.е. быть отделены от) других клеток с помощью центрифугирования в градиенте фиколла. При таком центрифугировании может соблюдаться любой стандартный протокол для скорости центрифугирования и т.д. В одном варианте осуществления, например, клетки, собранные из плаценты, получают из перфузата с помощью центрифугирования при 5000xg в течение 15 минут при комнатной температуре, которое позволяет отделить клетки, например, от дебриса и тромбоцитов. В другом варианте осуществления плацентарный перфузат концентрируют до приблизительно 200 мл, осторожно наслаивают на Фиколл и центрифугируют при приблизительно 1100xg в течение 20 минут при 22°C, и слой клеток на границе раздела низкой плотности собирают для дальнейшей обработки.

Клеточные осадки могут быть ресуспендированы в свежей композиции для сбора стволовых клеток или в среде, подходящей для поддержания клеток, например, для поддержания стволовых клеток, например, в бессывороточной среде IMDM, содержащей 2Е/мл гепарина и 2 мМ EDTA (GibcoBRL, NY). Общую фракцию

моноклеарных клеток можно выделить, например, с использованием Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Норвегия) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем.

Плацентарные клетки, полученные путем перфузии или расщепления, могут, например, быть дополнительно или первоначально выделены путем дифференциальной трипсинизации с использованием, например, 0,05% раствора трипсина с 0,2% EDTA (Sigma, St. Louis Mo.). Дифференциальная трипсинизация возможна, поскольку выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые являются прилипающими к пластику для культуры ткани, обычно отделяются от пластиковых поверхностей в пределах приблизительно пяти минут, тогда как для других адгезивных популяций, как правило, требуется инкубация в течение более 20–30 минут. Отделенные плацентарные адгезивные клетки можно собрать после трипсинизации и нейтрализации трипсина, используя, например, нейтрализующий трипсин раствор (TNS, Cambrex). В одном варианте осуществления выделения адгезивных клеток аликвоты, например, приблизительно $5-10 \times 10^6$ клеток, помещают в каждую из нескольких колб T-75, предпочтительно покрытых фибронектином колб T75. В таком варианте осуществления клетки можно культивировать с использованием коммерчески доступной среды для выращивания мезенхимных стволовых клеток (MSCGM) (Cambrex) и поместить в термостат для культуры ткани (37°C , 5% CO_2). Через 10–15 дней неприлипающие клетки удаляют из колб путем промывания PBS. Затем PBS заменяется MSCGM. Колбы предпочтительно ежедневно проверяют на предмет присутствия различных типов адгезивных клеток и, в частности, идентификации и размножения кластеров фибробластоидных клеток.

Количество и тип клеток, собранных из плаценты млекопитающего, можно контролировать, например, путем определения изменений морфологии и маркеров клеточной поверхности, используя стандартные методы обнаружения клеток, такие как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуоцитохимия (например, окрашивание тканеспецифическими или специфическим для клеточных маркеров антителами), сортировка

клеток с активацией флуоресценции (FACS), магнитной сортировке клеток (сортировка клеток с использованием магнитных шариков, MACS), путем изучения морфологии клеток с помощью световой или конфокальной микроскопии и/или путем определения изменений экспрессии генов с использованием хорошо известных в данной области техники методов, таких как ПЦР и анализ профилей экспрессии генов. Эти методы также могут использоваться для идентификации клеток, которые являются позитивными по одному или более конкретных маркеров. Например, используя антитела против CD34, можно определить, используя описанные выше методы, содержит ли клетка определяемое количество CD34; если это так, то клетка является CD34⁺. Аналогичным образом, если клетка продуцирует достаточное для обнаружения путем ОТ-ПЦР количество РНК для OCT-4 или значительно больше РНК для OCT-4, чем клетка взрослого организма, клетка является OCT-4⁺. Антитела против маркеров клеточной поверхности (например, маркеров CD, таких как CD34) и последовательности специфических для стволовых клеток генов, таких как OCT-4, хорошо известны в данной области техники.

Плацентарные клетки, в частности клетки, которые были выделены путем разделения с помощью фиколла, дифференциальной адгезии или их комбинации, могут быть отсортированы с использованием сортировщика клеток с активацией флуоресценции (FACS). Сортировка клеток с активацией флуоресценции (FACS) является хорошо известным способом разделения частиц, включая клетки, основанным на флуоресцентных свойствах частиц (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151: 150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных компонентов отдельных частиц приводит к небольшому электрическому заряду, делающему возможным электромагнитное разделение положительных и отрицательных частиц из смеси. В одном варианте осуществления антитела или лиганды, специфические для маркеров клеточной поверхности, помечены различными флуоресцентными метками. Клетки пропускаются через сортировщик клеток, что позволяет разделить клетки на основе их способности связываться с используемыми антителами. Отсортированные с помощью FACS частицы могут быть

непосредственно помещены в отдельные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетов для облегчения разделения и клонирования.

В одной схеме сортировки клетки из плаценты, например плацентарные адгезивные клетки, сортируют на основе экспрессии одного или более из маркеров CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 и/или HLA-G. Это может быть выполнено вместе с процедурами селекции таких клеток на основе их адгезионных свойств в культуре. Например, селекция на основе адгезии к пластику для культуры ткани может быть выполнена до или после сортировки на основе экспрессии маркеров. В одном варианте осуществления, например, клетки сортируются сначала на основе экспрессии в них CD34; CD34⁺ клетки сохраняются, а CD34⁻ клетки, которые, кроме того, являются CD200⁺ и HLA-G⁻, отделяются от всех других CD34⁻ клеток. В другом варианте осуществления клетки из плаценты сортируют на основе экспрессии в них маркеров CD200 и/или HLA-G; например, клетки, демонстрирующие CD200 и лишенные HLA-G, выделяют для дальнейшего применения. В конкретном варианте осуществления клетки, которые экспрессируют, например, CD200 и/или лишены, например, HLA-G, могут быть дополнительно отсортированы на основе экспрессии у них CD73 и/или CD105, или эпитопов, распознаваемых антителами SH2, SH3 или SH4, или отсутствия экспрессии CD34, CD38 или CD45. Например, в другом варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки сортируются по экспрессии или ее отсутствию CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 и CD45, и плацентарные адгезивные клетки плаценты, которые являются CD200⁺, HLA-G⁻, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻, отделяются от других плацентарных адгезивных клеток для дальнейшего применения.

В конкретных вариантах осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления отсортированных плацентарных адгезивных клеток, по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% клеток в популяции клеток, остающейся после сортировки, представляют собой выделенные плацентарные адгезивные клетки. Плацентарные клетки могут быть отсортированы по одному или нескольким маркерам, описанным в разделе 5.3 выше.

В конкретном варианте осуществления, например, плацентарные

адгезивные клетки, которые являются (1) прилипающими к пластику для культуры ткани и (2) CD10⁺, CD34⁻ и CD105⁺ отсортировываются от (т.е. отделяются от) других плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки, которые являются (1) прилипающими к пластику для культуры ткани и (2) CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ и CD200⁺ отсортировываются от (т.е. отделяются от) других плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки, которые являются (1) прилипающими к пластику для культуры ткани и (2) CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺ отсортировываются от (т.е. отделяются от) других плацентарных адгезивных клеток.

Что касается обнаружения плацентарных адгезивных клеток на основе нуклеотидных последовательностей, последовательности для перечисленных здесь маркеров, легко доступны в общедоступных базах данных, таких как GenBank или EMBL.

Что касается обнаружения и сортировки плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток или плацентарных мультипотентных клеток, с использованием антител, можно использовать любое антитело, специфическое для конкретного маркера, в комбинации с любым флуорофором или другой меткой, подходящей для обнаружения и сортировки клеток (например, сортировки клеток с активацией флуоресценции). Комбинации антитело/флуорофор для конкретных маркеров включают, но без ограничения ими, конъюгированные с флуоресцеином изотиоцианатом (FITC) моноклональные антитела против HLA-G (доступные от Serotec, Raleigh, NC), CD10 (доступные от BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA), CD44 (доступные от BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) и CD105 (доступный от R&D Systems Inc., Minneapolis, Minn.); конъюгированные с фикоэритрином (PE) моноклональные антитела против CD44, CD200, CD117 и CD13 (BD Biosciences Pharmingen); конъюгированные с фикоэритрином-Cy7 (PE Cy7) моноклональные антитела против CD33 и CD10 (BD Biosciences Pharmingen); конъюгированные с аллофикоцианином (APC) стрептавидин и моноклональные антитела против CD38 (BD Biosciences Pharmingen); и биотинилированный CD90 (BD

Biosciences Pharmingen). Другие антитела, которые могут использоваться, включают, но без ограничения ими, CD133-APC (Miltenyi), KDR-биотин (CD309, Abcam), CytokeratinK-Fitc (Sigma или Dako), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DR,DQ,DP-PE (BD), β -2-микроглобулин-PE (BD), CD80-PE (BD) и CD86-APC (BD). Другие комбинации антитело/метка, которые могут использоваться, включают, но без ограничения ими, CD45-PerCP (белок перидинхлорофилл); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (флуоресцеин); HLA-GF и 7-амино-актиномицин-D (7-AAD); HLA-ABC-F; и т.п. Этот список не является исчерпывающим, и другие антитела от других поставщиков также имеются в продаже.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, предлагаемые здесь, можно исследовать на CD117 или CD133, используя, например, конъюгированный с фикоэритрином-Cy5 (PE Cy5) стрептавидин и конъюгированные с биотином моноклональные антитела против CD117 или CD133; однако, используя эту систему, клетки могут оказаться позитивными по CD117 или CD133, соответственно, из-за относительно высокого фона.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть помечены антителом против одного маркера и обнаружены и/или отсортированы. Плацентарные клетки также могут быть помечены одновременно несколькими антителами против различных маркеров.

В другом варианте осуществления магнитные шарики могут использоваться для разделения клеток. Клетки могут быть отсортированы с использованием способа магнитной сортировки клеток (MACS), способа разделения частиц на основе их способности связываться с магнитными шариками (диаметр 0,5–100 мкм). Ряд полезных модификаций может быть выполнен на магнитных микросферах, включая ковалентное добавление антитела, которое специфически распознает конкретную молекулу клеточной поверхности или гаптен. Затем шарики смешивают с клетками для обеспечения связывания. Затем клетки пропускают через магнитное поле для отделения клеток со специфическим маркером клеточной поверхности. В одном варианте осуществления эти клетки затем могут быть выделены и повторно смешаны с магнитными шариками,

связанными с антителом против дополнительных маркеров клеточной поверхности. Клетки снова пропускают через магнитное поле, выделяя клетки, которые связываются с обоими антителами. Такие клетки затем могут быть разведены в отдельных планшетах, таких как микропланшеты для титрования для изоляции клонов.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки также могут быть охарактеризованы и/или отсортированы на основе морфологии клеток и характеристик роста. Например, выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть охарактеризованы как имеющие и/или отобранные на основе, например, фибробластоидного вида в культуре. Выделенные плацентарные адгезивные клетки также могут быть охарактеризованы как имеющие и/или отобранные на основе их способности образовывать эмбриоидоподобные тельца. В одном варианте осуществления, например, плацентарные адгезивные клетки, которые имеют фибробластоидную форму, экспрессируют CD73 и CD105 и образуют одно или более эмбриоидоподобных тел в культуре, отделяют от других плацентарных адгезивных клеток. В другом варианте осуществления ОСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, которые образуют одно или более эмбриоидоподобных тел в культуре, отделяют из других плацентарных адгезивных клеток.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть идентифицированы и охарактеризованы с помощью анализа колониеобразующих единиц. Анализы колониеобразующих единиц общеизвестны в данной области техники, такие как среда MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia).

Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть оценены на жизнеспособность, способность к пролиферации и продолжительность жизни с использованием стандартных методов, известных в данной области техники, таких как анализ исключения трипанового синего, анализ поглощения диацетата флуоресцеина, анализ поглощения йодида пропидия (для оценки жизнеспособности); и анализ поглощения тимидина, анализ пролиферации клеток путем метаболизма МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (для оценки пролиферации). Продолжительность

жизни может быть определена способами, хорошо известными в данной области техники, например путем определения максимального числа удвоений популяции в продленной культуре.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, также могут быть отделены от других плацентарных адгезивных клеток с использованием других методов, известных в данной области техники, например селективного роста желаемых клеток (позитивной селекции), избирательного уничтожения нежелательных клеток (негативной селекции); разделения на основе дифференциальной агглютинизации клеток в смешанной популяции, как, например, с использованием агглютинина сои; процедур замораживания-оттаивания; фильтрации; обычного и зонального центрифугирования; элютриационного центрифугирования (противоточного центрифугирования); гравитационного разделения частиц; противоточного распределения; электрофореза и т.п.

5.5. Культура выделенных плацентарных клеток

5.5.1. Культуральные среды

Выделенные плацентарные адгезивные клетки или популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, или клетки или плацентарная ткань, из которых вырастают плацентарные адгезивные клетки, могут использоваться для инициации или засева клеточных культур. Клетки, как правило, переносят в стерильные сосуды для культуры ткани либо без покрытия, либо с покрытием из экстраклеточного матрикса или лигандов, таких как ламинин, коллаген (например, нативный или денатурированный), желатин, фибронектин, орнитин, витронектин, полилизин, CELLSTART™ и/или экстраклеточной мембранный белок (например, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)), или другой подходящей биомолекулы или синтетического миметика.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки можно культивировать в любой среде и в любых условиях, признанных в данной области техники приемлемыми для культивирования клеток, например стволовых клеток. Предпочтительно культуральная среда содержит сыворотку. Выделенные плацентарные адгезивные клетки

можно культивировать, например, в DMEM-LG (модифицированной минимальной питательной среде Дульбекко, с низким содержанием глюкозы)/MCDB 201 (основной питательной среде для фибробластов кур), содержащей ITS (инсулин-трансферрин-селен), LA+BSA (линолевую кислоту-бычий сывороточный альбумин), дексаметазон L-аскорбиновую кислоту, PDGF, EGF, IGF-1 и пенициллин/стрептомицин; DMEM-HG (с высоким содержанием глюкозы), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS); DMEM-HG, содержащей 15% FBS; IMDM (модифицированной Исковым среде Дульбекко), содержащей 10% FBS, 10% лошадиной сыворотки и гидрокортизон; M199, содержащей от 1% до 20% FBS, EGF и гепарин; альфа-MEM (минимальной питательной среде), содержащей 10% FBS, GLUTAMAX™ и гентамицин; DMEM, содержащей 10% FBS, GLUTAMAX™ и гентамицин, и т.д.

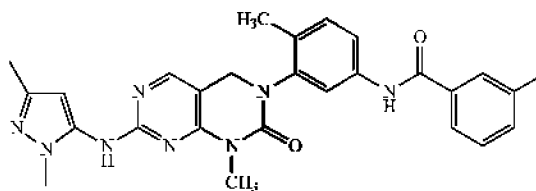
Другие среды, которые могут использоваться для культивирования плацентарных адгезивных клеток, включают DMEM (с высоким или низким содержанием глюкозы), основную питательную среду Игла, среду Хэма F10 (F10), среду Хэма F-12 (F12), модифицированную Исковом среде Дульбекко, среду для выращивания мезенхимных стволовых клеток (MSCGM), среду Лейбовица L-15, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, усовершенствованную DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) и CELL-GRO FREE.

Культуральная среда может быть дополнена одним или более компонентов, включая, например, сыворотку (например, фетальную бычью сыворотку (FBS), предпочтительно приблизительно 2-15% (в весовом отношении); лошадиную сыворотку (ES)), человеческую сыворотку (HS)); бета-меркаптоэтанол (BME), предпочтительно приблизительно 0,001% (в весовом отношении); один или более факторов роста, например тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), подавляющий лейкемию фактор (LIF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и эритропоэтин (EPO); аминокислоты, включая L-валин; и один или более антибиотиков и/или противогрибковых агентов для контроля загрязнения микроорганизмами, таких как,

например, пенициллин G, стрептомицина сульфат, амфотерицин В, гентамицин и нистатин, по одному или в комбинации.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки можно культивировать в стандартных условиях культивирования тканей, например, в чашках для культуры ткани или в многолуночных планшетах. Выделенные плацентарные адгезивные клетки также можно культивировать с использованием способа висячих капель. В этом способе выделенные плацентарные адгезивные клетки суспендируют до приблизительно 1×10^4 клеток на мл в приблизительно 5 мл среды, и одну или более капель среды помещают на внутренней стороне крышки контейнера для культуры ткани, например, чашки Петри на 100 мл. Капли могут представлять собой, например, одну каплю или множество капель, например, из многоканальной пипетки. Крышку аккуратно переворачивают и помещают сверху от дна чашки, которая содержит объем жидкости, например, стерильный PBS, достаточный для поддержания содержания влаги в атмосфере чашки, и стволовые клетки культивируют.

В одном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки культивируют в присутствии соединения, которое действует для поддержания недифференцированного фенотипа у выделенных плацентарных адгезивных клеток. В конкретном варианте осуществления соединение представляет собой замещенный 3,4-дигидропиридимол[4,5-d]пиримидин. В другом конкретном варианте осуществления соединение представляет собой соединение, имеющее следующую химическую структуру:



Соединение может приводиться в контакт с выделенными плацентарными адгезивными клетками, или популяцией выделенных плацентарных адгезивных клеток, например, в концентрации от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 10 мкМ.

5.5.2. Размножение и пролиферация плацентарных клеток

После получения выделенной плацентарной клетки или популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток (например,

плацентарной клетки или популяции плацентарных адгезивных клеток, отделенных от по крайней мере 50% плацентарных адгезивных клеток, с которыми стволовая клетка или популяция стволовых клеток обычно ассоциируется *in vivo*), клетка или популяция клеток могут быть пролиферированы и размножены *in vitro*. Например, популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток можно культивировать в контейнерах для культуры ткани, например, в чашках, колбах, многолуночных планшетах или т.п., в течение достаточного времени для пролиферации клеток до 70–90% конфлюэнтности, т.е. до тех пор, пока клетки и их потомство не займут 70–90% площади поверхности культивирования контейнера для культуры ткани.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут засеиваться в сосуды для культивирования с плотностью, обеспечивающей рост клеток. Например, клетки могут засеиваться с плотностью от низкой (например, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000 клеток/см²) до высокой (например, приблизительно 50000 или более клеток/см²). В предпочтительном варианте осуществления клетки культивируют в присутствии от приблизительно 0 до приблизительно 5 процентов по объему CO₂ в воздухе. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии от приблизительно 2 до приблизительно 25 процентов O₂ в воздухе, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 20 процентов O₂ в воздухе. Клетки предпочтительно культивируют при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C, предпочтительно при 37°C. Клетки предпочтительно культивируют в термостате. Культуральная среда может быть статической или встряхиваемой, например, с использованием биореактора. Плацентарные клетки, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, предпочтительно выращивают в условиях низкого окислительного стресса (например, с добавлением глутатиона, аскорбиновой кислоты, каталазы, токоферола, N-ацетилцистеина или т.п.).

После достижения менее чем 100% конфлюэнтности, например, от 70% до 90%, клетки могут быть пассированы. Например, клетки

могут быть подвергнуты ферментативной обработке, например трипсинизации, с использованием хорошо известных в данной области техники методов, для их отделения от поверхности культуры ткани. После удаления клеток с помощью пипетки и подсчета клеток приблизительно 10000–100000 клеток/см² переносят в новый контейнер для культивирования, содержащий свежую культуральную среду. Как правило, новая среда представляет собой среду того же типа, из которой были удалены выделенные плацентарные адгезивные клетки. Выделенные плацентарные адгезивные клетки можно пассировать приблизительно, по крайней мере или не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 раз или больше.

5.5.3 Популяции выделенных плацентарных клеток

Здесь также предлагается популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, например выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных выше в разделе 5.3, которые могут использоваться в описанных здесь способах и композициях. Популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток могут быть выделены непосредственно из одной или более плацент; т.е. популяция клеток может представлять собой популяцию плацентарных адгезивных клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, причем выделенные плацентарные адгезивные клетки получены из перфузата или содержатся в нем, или получены из разрушенной плацентарной ткани или содержатся внутри нее, например продукта расщепления плацентарной ткани (т.е. сбора клеток, полученных в результате ферментативного расщепления плаценты или ее части). Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки также можно культивировать и размножать для получения популяций выделенных плацентарных адгезивных клеток. Популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, также можно культивировать и размножать для получения популяций плацентарных клеток.

Популяции плацентарных клеток, применимые в предлагаемых здесь способах лечения, включают выделенные плацентарные адгезивные клетки, например, выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь в разделе 5.3. В различных вариантах

осуществления по крайней мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% клеток в популяции плацентарных клеток являются выделенными плацентарными адгезивными клетками. Т.е. популяция выделенных плацентарных адгезивных клеток может включать, например, до 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% клеток, которые не являются выделенными плацентарными адгезивными клетками.

Популяции выделенных плацентарных клеток, применимые в описанных здесь способах и композициях, можно получить, например, путем отбора выделенных плацентарных адгезивных клеток, полученных в результате либо ферментативного расщепления, либо перфузии, которые экспрессируют конкретные маркеры и/или демонстрируют конкретные характеристики культуры или морфологические характеристики. В одном варианте осуществления, например, здесь предлагается способ получения клеточной популяции путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD200 и не экспрессируют HLA-G; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD200 и не экспрессируют HLA-G, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD73, CD105 и CD200; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем идентификации плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD73, CD105 и CD200, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD200 и OCT-4; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора

плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD200 и ОСТ-4, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке, (b) экспрессируют CD73 и CD105 и (с) способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанную стволовую клетку, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD73 и CD105 и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанную стволовую клетку, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD73 и CD105 и не экспрессируют HLA-G; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD73 и CD105 и не экспрессируют HLA-G, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления способ получения популяции клеток включает отбор плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке (b) экспрессируют ОСТ-4 и (в) способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанную стволовую клетку, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, и отделение указанных клеток от других клеток с образованием популяции

клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют ОСТ-4 и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанную стволовую клетку, при культивировании указанной популяции в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток.

В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD10 и CD105 и не экспрессируют CD34; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD10 и CD105 и не экспрессируют CD34, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD10, CD105 и CD200 и не экспрессируют CD34; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD10, CD105 и CD200 и не экспрессируют CD34, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом конкретном варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые (а) прилипают к подложке и (b) экспрессируют CD10, CD90, CD105 и CD200 и не экспрессируют CD34 и CD45; и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции клеток. В другом конкретном варианте осуществления популяцию клеток получают путем отбора плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют CD10, CD90, CD105 и CD200, и не экспрессируют CD34 и CD45, и отделения указанных клеток от других клеток с образованием популяции

клеток.

Популяций клеток, включающих плацентарные адгезивные клетки, имеющие любую из комбинаций маркеров, описанных в разделе 5.3 выше, могут быть выделены или получены аналогичным образом.

В любом из вышеприведенных вариантов осуществления отбор выделенных популяций клеток может дополнительно включать отбор плацентарных адгезивных клеток, которые экспрессируют ABC-р (специфический для плаценты белок ABC-транспортер; смотрите, например, Allikmets et al., Cancer Res. 58(23): 5337-9 (1998)). Способ также может включать отбор клеток, демонстрирующих по крайней мере одну характеристику, специфическую, например, для мезенхимной стволовой клетки, например, экспрессию CD44, экспрессию CD90 или экспрессию комбинации вышеуказанных маркеров.

В вышеприведенных вариантах осуществления подложка может представлять собой любую поверхность, на которой может быть выполнено культивирование и/или отбор клеток, например выделенных плацентарных адгезивных клеток. Как правило, подложка представляет собой пластик, например, чашку для культуры ткани или многолуночный пластмассовый планшет. Пластик для культуры ткани может быть покрыт биомолекулой, например, ламинином или фибронектином.

Клетки, например выделенные плацентарные адгезивные клетки, могут быть отобраны для популяции плацентарных клеток любым способом, известным в области селекции клеток. Например, клетки могут быть отобраны с использованием антитела или антител против одного или более маркеров клеточной поверхности, например, в ходе проточной цитометрии или FACS. Отбор может быть осуществлен с использованием антител вместе с магнитными шариками. Антитела, которые являются специфическими для определенных связанных со стволовыми клетками маркеров, известны в данной области техники. Например, антитела против OCT-4 (Abeam, Cambridge, MA), CD200 (Abeam), HLA-G (Abeam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.), CD105 (Abeam; BioDesign International, Saco, Me.) и т.д. Антитела против других маркеров также доступны

коммерчески, например, антитела против CD34, CD38 и CD45 доступны, например, от StemCell Technologies или BioDesign International.

Популяции выделенных плацентарных клеток могут включать плацентарные адгезивные клетки, которые не являются стволовыми клетками, или клетки, которые не являются плацентарными адгезивными клетками.

Выделенные популяции клеток, включающие полученные из плаценты адгезивные клетки, описанные здесь, могут включать клетки второго типа, например, плацентарные адгезивные клетки, которые не являются полученными из плаценты адгезивными клетками, или, например, клетки, которые не являются плацентарными адгезивными клетками. Например, выделенная популяция адгезивных клеток, полученных из плаценты, может включать, например, может быть объединена с, популяцией(ей) клеток второго типа, причем указанные клетки второго типа представляют собой, например, эмбриональные стволовые клетки, клетки крови (например, плацентарную кровь, клетки плацентарной крови, пуповинную кровь, клетки пуповинной крови, периферическую кровь, клетки периферической крови, ядродержащие клетки плацентарной крови, пуповинную кровь или периферическую кровь и т.п.), стволовые клетки, выделенные из крови, (например, стволовые клетки, выделенные из плацентарной крови, пуповинной крови или периферической крови), ядродержащие клетки из плацентарного перфузата, например, все ядродержащие клетки из плацентарного перфузата; стволовые клетки пуповины, популяции ядродержащих клеток, полученных из крови, мезенхимные стромальные клетки, полученные из костного мозга, мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки, полученные из костного мозга, необработанный костный мозг, стволовые клетки взрослого организма (соматические), популяции стволовые клетки, содержащиеся в ткани, культивируемые клетки, например культивируемые стволовые клетки, популяции полностью дифференцированных клеток (например, хондроцитов, фибробластов, амниотических клеток, остеобластов, мышечных клеток, клеток сердца и т.д.), перициты и т.п. В

конкретном варианте осуществления популяция клеток, включающая адгезивные клетки, полученные из плаценты, включает плацентарные стволовые клетки или стволовые клетки из пуповины. В некоторых вариантах осуществления, в которых клетки второго типа представляют собой кровь или клетки крови, эритроциты были удалены из популяции клеток.

В конкретном варианте осуществления клетки второго типа представляют собой гематопоетическую стволовую клетку. Такие гемопоэтические стволовые клетки могут, например, содержаться в необработанной плацентарной крови, пуповинной крови или периферической крови; во всех ядродержащих клетках из плацентарной крови, пуповинной крови или периферической крови; в выделенной популяции CD34⁺ клеток из плацентарной крови, пуповинной крови или периферической крови; в необработанном костном мозге; во всех ядродержащих клетках из костного мозга; в выделенной популяции CD34⁺ клеток из костного мозга или т.п.

В другом варианте осуществления выделенную популяцию адгезивных клеток, полученных из плаценты, объединяют с множеством клеток взрослого организма или клеток-предшественников из сосудистой системы. В различных вариантах осуществления клетки представляют собой эндотелиальные клетки, эндотелиальные клетки-предшественники, миоциты, кардиомиоциты, перициты, ангиобласты, миобласты или кардиомиобласты.

В другом варианте осуществления клетки второго типа представляют собой клетки неэмбрионального типа, которыми манипулируют в культуре для экспрессии маркеров плюрипотентности и функций, связанных с эмбриональными стволовыми клетками.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных выделенных популяций адгезивных клеток, полученных из плаценты, либо адгезивные клетки, полученные из плаценты, либо клетки второго типа, либо и те и другие являются аутологичными или являются аллогенными по отношению к предполагаемому реципиенту клеток.

В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит адгезивные клетки, полученные из плаценты, и эмбриональные стволовые клетки. В другом конкретном варианте

осуществления композиция содержит адгезивные клетки, полученные из плаценты, и мезенхимные стромальные или стволовые клетки, например мезенхимные стромальные или стволовые клетки, полученные из костного мозга. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит гематопозитические стволовые клетки, полученные из костного мозга. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит адгезивные клетки, полученные из плаценты, и гематопозитические клетки-предшественники, например гематопозитические клетки-предшественники из костного мозга, фетальной крови, пуповинной крови, плацентарной крови и/или периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит адгезивные клетки, полученные из плаценты, и соматические стволовые клетки. В более конкретном варианте осуществления указанная соматическая стволовая клетка представляет собой нервную стволовую клетку, печеночную стволовую клетку, панкреатическую стволовую клетку, эндотелиальную стволовую клетку, сердечную стволовую клетку или мышечную стволовую клетку.

В других конкретных вариантах осуществления клетки второго типа составляют приблизительно, по крайней мере или не более 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% от клеток в указанной популяции. В других конкретных вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки в указанной композиции составляют по крайней мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% от клеток в указанной композиции. В других конкретных вариантах осуществления адгезивные клетки, полученные из плаценты, составляют приблизительно, по крайней мере или не более 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 45% от клеток в указанной популяции.

Клетки в выделенной популяции адгезивных клеток, полученных из плаценты, можно объединить с множеством клеток другого типа, например, с популяцией стволовых клеток, в соотношении приблизительно 100000000:1, 50000000:1, 20000000:1, 10000000:1, 5000000:1, 2000000:1, 1000000:1, 500000:1, 200000:1, 100000:1, 50000:1, 20000:1, 10000:1, 5000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100;

1:200; 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:5000; 1:10000; 1:20000; 1:50000; 1:100000; 1:500000; 1:1000000; 1:2000000; 1:5000000; 1:10000000; 1:20000000; 1:50000000; или приблизительно 1:100000000, при сравнении количества всех ядросодержащих клеток в каждой популяции. Клетки в выделенной популяции адгезивных клеток, полученных из плаценты, также можно объединить с множеством клеток множества типов клеток.

В других вариантах осуществления популяция плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, например, плацентарных адгезивных клеток, описанных выше, объединяют с остеогенными плацентарными адгезивными клетками (ОРАС), например, ОРАС, описанными в заявке на патент с серийным № 12/546556, поданной 24 августа 2009 г., озаглавленной «Способы и композиции для лечения костных дефектов плацентарными стволовыми клетками», или объединяют с ангиогенными клетками, полученными из амниона (AMDAC), например AMDAC, описанными в заявке на патент США с серийным № 12/622352, озаглавленный «Ангиогенные клетки, полученные из амниона», описание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

5.6. Получение банка плацентарных клеток.

Выделенные клетки из послеродовых плацент, например, выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, можно культивировать рядом различных способов для получения набора серий, причем, например, серия представляет собой набор индивидуально вводимых доз выделенных плацентарных адгезивных клеток. Такие серии могут, например, быть получены из клеток плацентарного перфузата или из клеток из расщепленной ферментами плацентарной ткани. Наборы серий плацентарных адгезивных клеток, полученных из множества плацент, могут быть размещены в банке выделенных плацентарных адгезивных клеток для, например, длительного хранения. Как правило, прилипающие к пластику для культуры ткани плацентарные адгезивные клетки получают из исходной культуры плацентарного материала для образования посевной культуры, которую размножают в контролируемых условиях с образованием популяций клеток в результате приблизительно равного числа удвоений. Серии

предпочтительно получают из ткани одной плаценты, но могут быть получены из ткани множества плацент.

В одном варианте осуществления серии плацентарных клеток получают следующим образом. Сначала плацентарную ткань разрушают, например, путем измельчения, расщепляют подходящим ферментом, например трипсином или коллагеназой (смотрите раздел 5.4.3 выше). Плацентарная ткань предпочтительно включает, например, весь амнион, весь хорион или и то и другое из одной плаценты, но может включать только часть либо амниона, либо хориона. Расщепленную ткань культивируют, например, в течение приблизительно 1–3 недель, предпочтительно, приблизительно 2 недель. После удаления неприлипающих клеток колонии высокой плотности, которые образуются, собирают, например, путем трипсинизации. Эти клетки собирают и ресуспендируют в удобном объеме культуральной среды, а затем используют для посева размножающихся культур. Размножающиеся культуры могут представлять собой любое расположение отдельных аппаратов для культивирования клеток, например, клеточную фабрику от NUNC™. Клетки могут быть последовательно поделены до любой степени для посева размножающихся культур, например, с использованием 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 или 10×10^4 клеток/см². Предпочтительно, когда для посева каждой размножающейся культуры используют от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^4 клеток/см². Количество размножающихся культур может быть больше или меньше в зависимости от конкретной плацент(ы), из которых получены клетки.

Размножающиеся культуры выращивают до достижения определенного значения плотности клеток в культуре, например, приблизительно 10×10^5 клеток/см². Клетки могут быть либо собраны и подвергнуты криоконсервации в этой точке, либо перенесены в новые размножающиеся культуры, как описано выше. Клетки могут пассироваться, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11, 14, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз перед применением. Запись кумулятивного числа удвоений популяции предпочтительно сохраняют

во время размножения культуры. Клетки из культуры могут быть размножены в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40 удвоений, или до 60 удвоений. Однако предпочтительно, когда число удвоений популяции, перед разделением популяции клеток на индивидуальные дозы, составляет от приблизительно 15 до приблизительно 30. Клетки могут культивироваться непрерывно в течение всего процесса размножения или могут быть заморожены в одной или нескольких точках во время размножения.

Клетки, используемые для индивидуальных доз, могут быть заморожены, например, подвергнуты криоконсервации для последующего применения. Индивидуальные дозы могут включать, например, от приблизительно 1 млн. до приблизительно 50 млн. клеток на мл и могут включать в общей сложности от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^{10} клеток.

Следовательно, в одном варианте осуществления банк плацентарных клеток может быть создан способом, включающим: размножение плацентарных адгезивных клеток первичной культуры из плаценты человека после родов в течение первого множества удвоений популяции; криоконсервацию указанных плацентарных адгезивных клеток для образования главного банка клеток; размножение множества плацентарных адгезивных клеток из главного банка клеток в течение второго множества удвоений популяции; криоконсервацию указанных плацентарных адгезивных клеток с образованием рабочего банка клеток; размножение множества плацентарных адгезивных клеток из рабочего банка клеток в течение третьего множества удвоений популяции; и криоконсервацию указанных плацентарных адгезивных клеток в индивидуальных дозах, причем указанные индивидуальные дозы вместе составляют банк плацентарных клеток. Необязательно, множество плацентарных адгезивных клеток из указанного третьего множества удвоений популяции может быть размножено в течение четвертого множества удвоений популяции и подвергнуто криоконсервации в индивидуальных дозах, причем указанные индивидуальные дозы вместе составляют банк плацентарных клеток.

В другом конкретном варианте осуществления указанные

плацентарных адгезивных клеток первичной культуры включают плацентарные адгезивные клетки из плацентарного перфузата. В другом конкретном варианте осуществления указанные плацентарных адгезивных клеток первичной культуры включают плацентарные адгезивные клетки из расщепленной плацентарной ткани. В другом конкретном варианте осуществления указанные плацентарных адгезивных клеток первичной культуры включают плацентарные адгезивные клетки из плацентарного перфузата и из расщепленной плацентарной ткани. В другом конкретном варианте осуществления все указанные плацентарные адгезивные клетки в указанной первичной культуре плацентарных клеток получены из одной и той же плаценты. В другом конкретном варианте осуществления способ, кроме того, включает стадию отбора CD200⁺ или HLA-G плацентарных адгезивных клеток из указанного множества указанных плацентарных адгезивных клеток из указанного рабочего банка клеток для образования индивидуальных доз. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁴ до приблизительно 10⁵ плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁵ до приблизительно 10⁶ плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁶ до приблизительно 10⁷ плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁷ до приблизительно 10⁸ плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁸ до приблизительно 10⁹ плацентарных адгезивных клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанные индивидуальные дозы включают от приблизительно 10⁹ до приблизительно 10¹⁰ плацентарных адгезивных клеток.

В предпочтительном варианте осуществления донора, от которого получена плацента (например, мать), проверяют на по крайней мере один патоген. Если мать дает позитивный результат на исследуемый патоген, вся серия из плаценты выбрасывается. Такая проверка может быть выполнена в любое время во время

получения серий плацентарных клеток, например, во время размножения культуры. Патогены, присутствие которых проверяется, могут включать, без ограничения, гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, вирус иммунодефицита человека (типы I и II), цитомегаловирус, герпесвирус и т.п.

5.7 Сохранение плацентарных клеток.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки, например, выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, могут быть сохранены, т.е. помещены в условия, обеспечивающие длительное хранение, или условия, которые подавляют гибель клетки, например, в результате апоптоза или некроза.

Плацентарные клетки могут быть сохранены с использованием, например, композиции, содержащей ингибитор апоптоза, ингибитор некроза и/или перфторуглерод с функцией переноса кислорода, как описано в соответствующей публикации заявки на патент США с № 2007/0190042, раскрытие которой включено сюда посредством ссылки в полном объеме. В одном варианте осуществления способ сохранения популяции клеток, применимой в описанных здесь способах и композициях, включает приведение указанной популяции клеток в контакт с композицией для сбора клеток, содержащей ингибитор апоптоза и перфторуглерод с функцией переноса кислорода, причем указанный ингибитор апоптоза присутствует в количестве и в течение времени, достаточных для уменьшения или предотвращения апоптоза в популяции клеток, по сравнению с популяцией клеток, не контактировавших с ингибитором апоптоза. В конкретном варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза представляет собой ингибитор каспазы. В другом конкретном варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза представляет собой ингибитор JNK. В другом конкретном варианте осуществления указанный ингибитор JNK не модулирует дифференцировку или пролиферацию указанных клеток. В другом варианте осуществления указанная композиция для сбора клеток содержит указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод с функцией переноса кислорода в отдельных фазах. В другом варианте осуществления указанная композиция для сбора клеток содержит

указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод с функцией переноса кислорода в эмульсии. В другом варианте осуществления композиция для сбора, кроме того, содержит эмульгатор, например лецитин. В другом варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод находятся при температуре от приблизительно 0°C до приблизительно 25°C во время контактирования с клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод находятся при температуре от приблизительно 2°C до 10°C или от приблизительно 2°C до приблизительно 5°C во время контактирования с клетками. В другом конкретном варианте осуществления указанное контактирование осуществляется во время транспортировки указанной популяции клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанное контактирование осуществляют во время замораживания и оттаивания указанной популяции клеток.

Популяции плацентарных адгезивных клеток могут быть сохранены, например, способом, включающим приведение указанной популяции клеток в контакт с ингибитором апоптоза и органосохраняющим соединением, причем указанный ингибитор апоптоза присутствует в количестве и в течение времени, достаточных для уменьшения или предотвращения апоптоза в популяции клеток по сравнению с популяцией клеток, не контактировавших с ингибитором апоптоза. В конкретном варианте осуществления органосохраняющее соединение представляет собой раствор UW (описанный в патенте США с № 4798824; также известный как ViaSpan; смотрите также Southard et al., Transplantation 49 (2): 251-257 (1990)) или раствор, описанный в Stern et al., патент США с № 5552267, раскрытия которых полностью включены сюда посредством ссылки. В другом варианте осуществления указанное органосохраняющее соединение представляет собой гидроксиэтилкрахмал, лактобионовую кислоту, рафинозу или их комбинацию. В другом варианте осуществления композиция для сбора клеток, кроме того, содержит перфторуглерод с функцией переноса кислорода, либо в двух фазах, либо в виде эмульсии.

В другом варианте осуществления способа плацентарные

адгезивные клетки приводят в контакт с композицией для сбора клеток, содержащей ингибитор апоптоза и перфторуглерод с функцией переноса кислорода, органосохраняющее соединение или их комбинацию, во время перфузии. В другом варианте осуществления указанные клетки приводят в контакт во время процесса разрушения ткани, например, ферментативного расщепления. В другом варианте осуществления плацентарные адгезивные клетки приводят в контакт с указанной композицией для сбора клеток после сбора путем перфузии или после сбора путем разрушения ткани, например ферментативного расщепления.

Как правило, во время сбора, обогащения и выделения плацентарных клеток предпочтительно минимизировать или исключить клеточный стресс из-за гипоксии и механический стресс. Поэтому в другом варианте осуществления способа клетка или популяция клеток подвергается воздействию гипоксических условий во время сбора, обогащения или выделения в течение менее шести часов во время указанного сохранения, причем гипоксические условия представляют собой концентрацию кислорода, которая ниже нормальной концентрации кислорода в крови. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток подвергается воздействию указанных гипоксических условий в течение менее двух часов во время указанного сохранения. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток подвергается воздействию указанных гипоксических условий в течение менее одного часа или менее тридцати минут или не подвергается воздействию гипоксических условий во время сбора, обогащения или выделения. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток не подвергается воздействию напряжения сдвига во время сбора, обогащения или выделения.

Плацентарные клетки могут быть подвергнуты криоконсервации, например, в среде для криоконсервации в небольших контейнерах, например, в ампулах. Подходящая среда для криоконсервации включает, но без ограничения ими, культуральную среду, включающую, например, среду для выращивания или среду для замораживания клеток, например, коммерчески доступную среду для замораживания клеток, например, C2695, C2639 или C6039 (Sigma).

Среда для криоконсервации предпочтительно содержит DMSO (диметилсульфоксид) в концентрации от приблизительно 2% до приблизительно 15% (в объемном отношении), например, приблизительно 10% (в объемном отношении). Среда для криоконсервации может содержать дополнительные агенты, например, метилцеллюлозу и/или глицерин. Плацентарные клетки предпочтительно охлаждают со скоростью приблизительно 1°C/мин во время криоконсервации. Предпочтительная температура криоконсервации составляет от приблизительно -80°C до приблизительно -180°C, предпочтительно от приблизительно -125°C до приблизительно -140°C°. Подвергнутые криоконсервации клетки могут быть перенесены в жидкий азот до оттаивания для применения. В некоторых вариантах осуществления, например, когда ампулы достигают приблизительно -90°C, их переносят в зону хранения в жидком азоте. Криоконсервация также может быть выполнена с использованием морозильной камеры с контролируемой скоростью. Подвергнутые криоконсервации клетки предпочтительно оттаивают при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C, предпочтительно до температуры приблизительно 37°C.

5.8 Композиции, содержащие выделенные плацентарные клетки.

Плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, например, в разделе 5.3, могут быть объединены с любым физиологически приемлемым или приемлемым с медицинской точки зрения соединением, композицией или устройством для применения в способах и композициях, описанных здесь. Композиции, применимые в предлагаемых здесь способах лечения, могут содержать любую одну или более плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь (смотрите раздел 5.3 выше). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтически приемлемую композицию, например композицию, содержащую плацентарные адгезивные клетки в фармацевтически приемлемом носителе.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая выделенные плацентарные адгезивные клетки, дополнительно содержит матрицу, например децеллюляризованную матрицу или

синтетическую матрицу. В другом конкретном варианте осуществления указанная матрица представляет собой трехмерный каркас. В другом конкретном варианте осуществления указанная матрица содержит коллаген, желатин, ламинин, фибронектин, пектин, орнитин или витронектин. В другом конкретном варианте осуществления матрица представляет собой амниотическую оболочку или биоматериал, полученный из амниотической оболочки. В другом конкретном варианте осуществления указанная матрица содержит экстраклеточный мембранный белок. В другом конкретном варианте осуществления указанная матрица содержит синтетическое соединение. В другом конкретном варианте осуществления указанная матрица содержит биоактивное соединение. В другом конкретном варианте осуществления указанное биоактивное соединение представляет собой фактор роста, цитокин, антитело или органическую молекулу с М.м. менее 5000 дальтон.

В другом варианте осуществления композиция, применимая в предлагаемых здесь способах лечения, содержит среду, кондиционированную в результате культивирования любых из вышеупомянутых плацентарных адгезивных клеток или любой из вышеупомянутых популяций плацентарных клеток.

5.8.1. Подвергнутые криоконсервации выделенные плацентарные клетки

Популяции выделенных плацентарных клеток, применимые в описанных здесь способах и композициях, можно сохранить, например, подвергнуть криоконсервации для последующего применения. Способы криоконсервации клеток, таких как стволовые клетки, хорошо известны в данной области техники. Популяции выделенных плацентарных клеток могут быть получены в форме, которую можно легко ввести индивидууму, например, популяции выделенных плацентарных клеток, которая содержится в контейнере, подходящем для медицинского применения. Такой контейнер может представлять собой, например, шприц, стерильный пластиковый пакет, колбу, банку или другой контейнер, из которого можно легко дозировать популяцию выделенных плацентарных клеток. Например, контейнер может представлять собой мешок для крови или другой пластиковый приемлемый с медицинской точки зрения пакет,

подходящий для внутривенного введения жидкости реципиенту. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой контейнер, который делает возможной криоконсервацию объединенной клеточной популяции.

Популяция подвергнутых криоконсервации выделенных плацентарных клеток может включать выделенные плацентарные клетки, полученные от одного донора или от множества доноров. Популяция выделенных плацентарных клеток может быть полностью соответствующей по HLA-предполагаемому реципиенту или частично или полностью несоответствующей по HLA.

Таким образом, в одном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки могут использоваться в способах и описаны здесь в форме композиции, содержащей популяцию плацентарных клеток, прилипающих к пластику для культуры ткани, в контейнере. В конкретном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются криоконсервированными. В другом конкретном варианте осуществления контейнер представляет собой пакет, колбу или банку. В другом конкретном варианте осуществления указанный пакет представляет собой стерильный пластиковый пакет. В другом конкретном варианте осуществления указанный пакет подходит для, позволяет или облегчает внутривенное введение указанной популяции выделенных плацентарных клеток, например, путем внутривенной инфузии. Пакет может включать множество полостей или отделений, которые связаны между собой, чтобы можно было смешивать выделенные плацентарные адгезивные клетки и один или более других растворов, например лекарственное средство, до или во время введения. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит одно или более соединений, которые облегчают криоконсервацию объединенной клеточной популяции. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция выделенных плацентарных клеток содержится в физиологически приемлемом водном растворе. В другом конкретном варианте осуществления указанный физиологически приемлемый водный раствор представляет собой 0,9% раствор NaCl. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция выделенных плацентарных клеток включает плацентарные адгезивные клетки,

которые соответствуют по HLA реципиенту указанной клеточной популяции. В другом конкретном варианте осуществления указанная объединенная клеточная популяция включает плацентарные адгезивные клетки, которые по крайней мере частично не соответствуют по HLA реципиенту указанной клеточной популяции. В другом конкретном варианте осуществления указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки получены от множества доноров.

В некоторых вариантах осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки в контейнере представляют собой выделенные CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки, причем указанные клетки были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере. В конкретном варианте осуществления указанные CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки также являются CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки также являются CD45⁻ или CD90⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки также являются CD45⁻ и CD90⁺. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{трудноразличимый}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA4⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток) или любую их комбинация. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-кадгерин^{трудноразличимый}, CD184/CXCR4⁺, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻ и PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток).

В некоторых других вариантах осуществления вышеупомянутые

выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой выделенные CD200⁺, HLA-G⁻ плацентарные адгезивные клетки, причем указанные клетки были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ клетки, которые были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой CD200⁺, OСТ-4⁺ стволовые клетки, которые были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD73⁺, CD105⁺ клетками, которые были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере, причем указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец при культивировании с популяцией плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки являются CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ клетками, которые были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере. В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой OСТ-4⁺ плацентарные адгезивные клетки, которые были подвергнуты криоконсервации и содержатся в контейнере, причем указанные клетки способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных телец при культивировании с популяцией плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобных телец.

В другом конкретном варианте осуществления вышеупомянутые выделенные плацентарные адгезивные клетки представляют собой плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, которые являются CD34⁻, CD10⁺ и CD105⁺CD34⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии (например, плацентарными адгезивными клетками). В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные обладают способностью к дифференцировке в клетки фенотипа нервных клеток, клетки остеогенного фенотипа

или клетки хондрогенного фенотипа. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD200⁺. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD90⁺ или CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления выделенные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, CD90⁺ или CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, кроме того, являются CD90⁺ или CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ клетки, кроме того, являются CD90⁺ и CD45⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ клетки, кроме того, являются CD80⁻ и CD86⁻, что можно обнаружить с помощью проточной цитометрии. В другом конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, SH3⁺ или SH4⁺. В другом конкретном варианте осуществления клетки, кроме того, являются CD44⁺. В конкретном варианте осуществления любых из выделенных CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарных адгезивных клеток, указанных выше, клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ и/или PDL1⁺.

В конкретном варианте осуществления любых из вышеупомянутых подвергнутых криоконсервации выделенных плацентарных адгезивных клеток указанный контейнер представляет собой пакет. В различных конкретных вариантах осуществления указанный контейнер включает приблизительно, по крайней мере или самое большее 1×10⁶ указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток, 5×10⁶ указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток, 1×10⁷ указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток, 5×10⁷ указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки, 1×10⁸ указанные

выделенные плацентарные адгезивные клетки, 5×10^8 указанные
 выделенные плацентарные адгезивные клетки, 1×10^9 указанные
 выделенные плацентарные адгезивные клетки, 5×10^9 указанные
 выделенные плацентарные адгезивные клетки, 1×10^{10} указанные
 выделенные адгезивные плацентарные клетки, или 5×10^{10} указанных
 выделенных адгезивных плацентарных клеток. В других конкретных
 вариантах осуществления любых из вышеуказанных подвергнутых
 криоконсервации популяций указанные выделенные плацентарные
 адгезивные клетки пассировались приблизительно, по крайней мере
 или не более 5 раз, не более 10 раз, не более 15 раз или не
 более 20 раз. В другом конкретном варианте осуществления любых
 из вышеуказанных подвергнутых криоконсервации выделенных
 плацентарных адгезивных клеток указанные выделенные плацентарных
 адгезивные клетки были размножены внутри указанного контейнера.

В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная
 доза адгезивных клеток, полученных из плаценты, может включать,
 в различных вариантах осуществления, приблизительно, по крайней
 мере или не более чем 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} или более
 адгезивных клеток, полученных из плаценты. В некоторых вариантах
 осуществления фармацевтические композиции, предлагаемые здесь,
 включают популяции адгезивных клеток, полученных из плаценты,
 которые содержат 50% жизнеспособных клеток или более (т.е. по
 крайней мере 50% клеток в популяции являются функциональными или
 живыми). Предпочтительно, когда по крайней мере 60% клеток в
 популяции являются жизнеспособными. Более предпочтительно, когда
 по крайней мере 70%, 80%, 90%, 95% или 99% клеток в популяции в
 фармацевтической композиции являются жизнеспособными.

5.8.2 Генно-инженерные плацентарные клетки.

Кроме того, здесь предлагаются плацентарные адгезивные
 клетки, например любые плацентарные мультипотентные клетки или
 плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше,
 или фармацевтические композиции, содержащие такие плацентарные
 адгезивные клетки, причем плацентарные адгезивные клетки были
 генетически сконструированы для продукции рекомбинантных или

экзогенных цитокинов, связанных или способствующих ангиогенезу. В некоторых вариантах осуществления указанные белки, которые способствуют ангиогенезу, представляют собой один или более из фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, VEGFD), фактора роста фибробластов (FGF) (например, FGF2), ангиогенина (ANG), эпидермального фактора роста (EGF), эпителиальный нейтрофил-активирующего белка 78 (ENA-78), фоллистатина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), связанного с ростом онкогенного белка (GRO), интерлейкина-6 (IL-6), IL-8, лептина, моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), MCP-3, субъединицы В тромбоцитарного фактора роста (PDGFB), хемокина, выделяемого Т-клетками при активации, трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β I), тромбопоэтина (Тро), тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (TIMP1), TIMP2 и/или рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR).

Могут использоваться методы для генной инженерии клеток, например, с использованием ретровирусных векторов, аденовирусных векторов, аденоассоциированных вирусных векторов, полиэтиленгликоля или другие методы, известные специалистам в данной области техники. Они включают использование экспрессионных векторов, которые транспортируют и экспрессируют молекулы нуклеиновой кислоты в клетках. (смотрите Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). Векторная ДНК может быть введена в прокариотические или эукариотические клетки с помощью традиционных методов трансформации или трансфекции. Подходящие способы трансформации или трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989), и других лабораторные руководства.

Плацентарные клетки, например плацентарные адгезивные клетки, описанные в разделе 5.3 выше, могут быть генетически модифицированы путем введения ДНК или РНК в клетку, например, кодирующей представляющий интерес белок ДНК или РНК, способами,

включающими вирусный перенос, включая использование, например, векторов на основе ДНК- или РНК-содержащих вирусов, таких как ретровирусы (в том числе лентивирусы), вакуолизирующий обезьяний вирус 40 (SV40), аденовирус, вирус Синдбис и бычий папилломавирус; химический перенос, в том числе методы трансфекции с использованием фосфата кальция и трансфекции с использованием DEAE декстрана; перенос с помощью мембранного слияния с использованием, например, нагруженных ДНК мембранных везикул, таких как липосомы, «тени» эритроцитов и протопласты; или методы физического переноса, такие как микроинъекция, электропорация или перенос «голой» ДНК. Плацентарные адгезивные клетки могут быть генетически изменены путем вставки экзогенной ДНК или путем замены сегмента клеточного генома экзогенной ДНК. Вставка экзогенной последовательности(ей) ДНК может быть осуществлена, например, с помощью гомологичной рекомбинации или вирусной интеграции в геном клетки-хозяина или путем включения ДНК в клетку, в частности в ее ядро, с использованием плазмидного экспрессионного вектора и последовательности ядерной локализации. ДНК может включать один или более промоторов, которые обеспечивают позитивную или негативную индукцию экспрессии представляющего интерес белка с использованием некоторых химических веществ/лекарственных средств, например тетрациклина; в других вариантах осуществления промоторы могут быть конститутивными.

Трансфекция с использованием фосфата кальция может использоваться для введения, например, плазмидной ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес белок, в клетку. В некоторых вариантах осуществления ДНК объединяют с раствором хлорида кальция, затем добавляют к забуференному фосфатом раствору. После образования осадка раствор добавляют непосредственно к культивируемым клеткам. Обработка DMSO или глицерином может использоваться для повышения эффективности трансфекции, и уровни стабильных трансфектантов могут быть увеличены с использованием бис-гидроксиэтиламиноэтансульфоната (BES). Системы трансфекции с использованием фосфата кальция коммерчески доступны (например,

PROFECTION®, Promega Corp., Madison, WI). Трансфекция с использованием DEAE-декстрана также может использоваться.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки также могут быть генетически сконструированы путем микроинъекции. В некоторых вариантах осуществления стеклянную микропипетку направляют в ядро клеток под световым микроскопом для инъекции ДНК или РНК.

Плацентарные клетки также могут быть генетически модифицированы, используя электропорацию. В некоторых вариантах осуществления ДНК или РНК добавляют к суспензии культивируемых клеток, и суспензию клеток с ДНК/РНК помещают между двумя электродами и подвергают воздействию электрического импульса, вызывая транзиторную проницаемость во внешней мембране клеток, которая проявляется появлением пор в мембране.

Липосомная доставка ДНК или РНК для генетической модификации клеток может быть осуществлена с использованием катионных липосом, необязательно включающих диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) или диолеилфосфатидилхолин (DOPC), например, LIPOFECTIN® (Life Technologies, Inc.). Другие коммерчески доступные системы доставки включают EFFECTENE™ (Qiagen), DOTAP (Roche Molecular Biochemicals), FUGENE 6™ (Roche Molecular Biochemicals) и TRANSFECTAM® (Promega).

Вирусные векторы могут использоваться для генетического изменения плацентарных адгезивных клеток путем доставки, например, целевых генов, полинуклеотидов, антисмысловых молекул или рибозимных последовательностей в клетки. Ретровирусные векторы являются эффективными для трансдукции быстро делящихся клеток, хотя был разработан ряд ретровирусных векторов для эффективного переноса ДНК также в неделящиеся клетки. Пакующие клеточные линии для ретровирусных векторов известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления ретровирусный ДНК-вектор содержит два ретровирусных LTR, так что первый LTR расположен 5' от промотора SV40, который функционально связан с последовательностью гена-мишени, клонированной в сайт поликлонирования, за которым следует 3' второй LTR. После образования ретровирусный ДНК-вектор

переносится в паковую клеточную линию с использованием опосредованной фосфатом кальция трансфекции, как описано ранее. Спустя приблизительно 48 часов от продукции вируса собирают вирусный вектор, который теперь содержит последовательность целевого гена. Способы трансфекции клеток с использованием лентивирусных векторов, рекомбинантных вирусов герпеса, аденовирусных векторов или альфа-вирусных векторов известны в данной области техники.

Успешная трансфекция или трансдукция клеток-мишеней может быть продемонстрирована с использованием генетических маркеров в методе, известном специалистам в данной области техники. Например, было установлено, что зеленый флуоресцентный белок *Aequorea victoria* является эффективным маркером для идентификации и отслеживания генетически модифицированных гемопоэтических клеток. Альтернативные селективируемые маркеры включают ген β -Gal, рецептор усеченного фактора роста нервов или селективируемые маркеры – маркеры устойчивости к лекарственным средствам (включая, но без ограничения этим, NEO, MTX или гигромицин).

5.8.3 Фармацевтические композиции

Популяции выделенных плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных адгезивных клеток или популяций клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, могут быть составлены в фармацевтические композиции для применения *in vivo*, например, в предлагаемых здесь способах лечения. Такие фармацевтические композиции содержат популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток или популяцию клеток, включающих выделенные плацентарные адгезивные клетки, в фармацевтически приемлемом носителе, например физиологическом растворе или другом приемлемом физиологически приемлемом растворе для введения *in vivo*. Фармацевтические композиции, содержащие выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, могут содержать любую из или любую комбинацию выделенных популяций плацентарных клеток или выделенных плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь в другом месте.

Фармацевтические композиции могут содержать фетальные, материнские или как фетальные, так и материнские выделенные плацентарные адгезивные клетки. Фармацевтические композиции, предлагаемые здесь, могут, кроме того, содержать выделенные плацентарные адгезивные клетки, полученные от одного индивидуума или плаценты или от множества индивидуумов или плацент.

Предлагаемые здесь фармацевтические композиции могут содержать любое количество выделенных плацентарных адгезивных клеток. Например, единичная стандартная доза выделенных плацентарных адгезивных клеток может включать, в различных вариантах осуществления, приблизительно, по крайней мере или не более чем 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} или более выделенных плацентарных адгезивных клеток.

Предлагаемые здесь фармацевтические композиции содержат популяции клеток, которые включают 50% жизнеспособных клеток или более (т.е., по крайней мере 50% клеток в популяции являются функциональными или живыми). Предпочтительно, когда по крайней мере 60% клеток в популяции являются жизнеспособными. Более предпочтительно, когда по крайней мере 70%, 80%, 90%, 95% или 99% клеток в популяции в фармацевтической композиции являются жизнеспособными.

Предлагаемые здесь фармацевтические композиции могут содержать одно или более соединений, которые, например, способствуют приживлению, (например, антитела против T-клеточного рецептора, иммунодепрессант или т.п.); стабилизаторы, такие как альбумин, декстран 40, желатин, гидроксипропилкрахмал, плазмалит и т.п.

При приготовлении в виде раствора для инъекций, в одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит приблизительно 1%-1,5% HSA и приблизительно 2,5% декстрана. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 5×10^6 клеток на миллилитр до приблизительно 2×10^7 клеток на миллилитр в растворе, содержащем 5% HSA и 10% декстрана, необязательно содержащем

иммунодепрессант, например циклоспорин А в количестве, например, 10 мг/кг.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, например раствор, содержит множество клеток, например выделенных плацентарных адгезивных клеток, например, плацентарных стволовых клеток или плацентарных мультипотентных клеток, причем указанная фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $3,75 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 50×10^6 клеток/мл, от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 40×10^6 клеток/мл, от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 30×10^6 клеток/мл, от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 20×10^6 клеток/мл, от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 15×10^6 клеток/мл или от приблизительно 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 10×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит видимых скоплений клеток (т.е. никаких макроскопических скоплений клеток) или по существу не содержит таких видимых скоплений. Используемый здесь термин «макроскопические скопления клеток» означает агрегацию клеток, видимую без увеличения, например, видимую невооруженным глазом, и, как правило, относится к агрегации клеток размером более чем приблизительно 150 мкм. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% или 10% декстрана, например, декстрана-40. В конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит от приблизительно 7,5% до приблизительно 9% декстрана-40. В конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит приблизительно 5,5% декстрана-40. В некоторых вариантах

осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 1% до приблизительно 15% человеческого сывороточного альбумина (HSA). В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% HSA. В конкретном варианте осуществления указанные клетки были подвергнуты криоконсервации и оттаяны. В другом конкретном варианте осуществления указанные клетки были профильтрованы через фильтр от 70 до 100 мкм. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция не содержит видимых скоплений клеток. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит скопления менее чем приблизительно 200 клеток на 10^6 клеток, причем указанные скопления клеток видны только под микроскопом, например световым микроскопом. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит скопления менее чем приблизительно 150 клеток на 10^6 клеток, причем указанные скопления клеток видны только под микроскопом, например световым микроскопом. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит скопления менее чем приблизительно 100 клеток на 10^6 клеток, причем указанные скопления клеток видны только под микроскопом, например световым микроскопом.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ клеток на миллилитр, приблизительно 5,5% декстрана-40 (в отношении веса к объему), приблизительно 10% HSA (в отношении веса к объему) и приблизительно 5% DMSO (в весовом отношении).

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит множество клеток, например множество выделенных плацентарных адгезивных клеток в растворе, содержащем 10% декстрана-40, причем фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр, и причем указанная композиция не содержит скоплений клеток, видимых невооруженным глазом (т.е. не содержит макроскопических скоплений клеток). В некоторых вариантах

осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $3,75 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В конкретном варианте осуществления указанные клетки были подвергнуты криоконсервации и оттаяны. В другом конкретном варианте осуществления указанные клетки были профильтрованы через фильтр размером от 70 мкм до 100 мкм. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция содержит микроскопления менее чем приблизительно 200 клеток (т.е. скопления клеток, видимые только при увеличении) на 10^6 клеток. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит микроскопления менее чем приблизительно 150 клеток на 10^6 клеток. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит микроскопления менее чем приблизительно 100 клеток на 10^6 клеток. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит менее 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% или 2% DMSO или менее 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% DMSO.

Кроме того, здесь предлагаются композиции, содержащие клетки, причем указанные композиции получены одним из раскрытых здесь способов. Например, в одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки, причем фармацевтическая композиция получена способом, включающим фильтрацию раствора, содержащего плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, с образованием отфильтрованного раствора, содержащего клетки; разведение отфильтрованного раствора, содержащего клетки, первым раствором до приблизительно $1-50 \times 10^6$, $1-40 \times 10^6$, $1-30 \times 10^6$, $1-20 \times 10^6$, $1-15 \times 10^6$ или $1-10 \times 10^6$ клеток на миллилитр, например, до криоконсервации; и разведение полученного отфильтрованного раствора, содержащего клетки, вторым раствором, содержащим декстран, но не содержащим сывороточный альбумин человека (HSA), с получением указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение составляет не более приблизительно 15×10^6 клеток на

миллилитр. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение составляет не более приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение составляет не более приблизительно $7,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В некоторых других вариантах осуществления, если отфильтрованный содержащий клетки раствор перед разведением содержит менее чем приблизительно 15×10^6 клеток на миллилитр, фильтрация является необязательной. В некоторых других вариантах осуществления, если отфильтрованный содержащий клетки раствор перед разведением содержит менее чем приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток на миллилитр, фильтрация является необязательной. В некоторых других вариантах осуществления, если отфильтрованный содержащий клетки раствор перед разведением содержит менее чем приблизительно $7,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр, фильтрация является необязательной.

В конкретном варианте осуществления клетки подвергают криоконсервации между указанным разведением первым раствором для разведения и указанным разведением указанным вторым раствором для разведения. В другом конкретном варианте осуществления первый раствор для разведения содержит декстран и HSA. Декстран в первом растворе для разведения или во втором растворе для разведения может представлять собой декстран с любой молекулярной массой, например декстран, имеющий молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления указанный декстран в указанном первом растворе для разведения или указанном втором растворе составляет приблизительно 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% или 10% декстрана. В другом конкретном варианте осуществления декстран в указанном первом растворе для разведения или в указанном втором растворе для разведения представляет собой декстран-40. В другом конкретном варианте осуществления декстран в указанном первом растворе для разведения и указанном втором растворе для разведения представляет собой декстран-40. В другом конкретном варианте осуществления указанный декстран-40 в указанном первом

растворе для разведения составляет 5,0% декстрана-40. В другом конкретном варианте осуществления указанный декстран-40 в указанном первом растворе для разведения составляет 5,5% декстрана-40. В другом конкретном варианте осуществления указанный декстран-40 в указанном втором растворе для разведения составляет 10% декстрана-40. В другом конкретном варианте осуществления указанный HSA в указанном растворе, содержащем HSA, составляет от 1 до 15% HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанный HSA в указанном растворе, содержащем HSA, составляет приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанный HSA в указанном растворе, содержащем HSA, составляет 10% HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанный первый раствор для разведения содержит HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанный HSA в указанном первом растворе для разведения составляет 10% HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанный первый раствор для разведения содержит криопротектор. В другом конкретном варианте осуществления указанный криопротектор представляет собой DMSO. В другом конкретном варианте осуществления указанный декстран-40 в указанном втором растворе для разведения составляет приблизительно 10% декстрана-40. В другом конкретном варианте осуществления указанная композиция, содержащая клетки, содержит от приблизительно 7,5% до приблизительно 9% декстрана. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток на миллилитр до приблизительно $3,75 \times 10^6$ клеток на миллилитр.

В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию получают способом, включающим (а) фильтрацию раствора, содержащего плацентарные адгезивные клетки, например плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные

клетки, перед криоконсервацией для получения отфильтрованного содержащего клетки раствора; (b) криоконсервацию клеток в отфильтрованном растворе, содержащем клетки, в количестве приблизительно $1-50 \times 10^6$, $1-40 \times 10^6$, $1-30 \times 10^6$, $1-20 \times 10^6$, $1-15 \times 10^6$, или $1-10^6$ клеток на миллилитр; (c) оттаивание клеток; и (d) разведение отфильтрованного содержащего клетки раствора от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:11 (в объемном отношении) раствором декстрана-40. В некоторых вариантах осуществления, если количество клеток составляет менее чем приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток на миллилитр до стадии (a), фильтрация является необязательной. В другом конкретном варианте осуществления клетки на стадии (b) подвергаются криоконсервации в концентрации приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток на миллилитр. В другом конкретном варианте осуществления клетки на стадии (b) подвергаются криоконсервации в растворе, содержащем от приблизительно 5% до приблизительно 10% декстрана-40 и HSA. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (b) осуществляется до не более приблизительно 15×10^6 клеток на миллилитр.

В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию получают способом, включающим: (a) суспендирование плацентарных адгезивных клеток, например плацентарных стволовых клеток или плацентарных мультипотентных клеток, в 5,5% растворе декстрана-40, который содержит 10% HSA, с образованием раствора, содержащего клетки; (b) фильтрацию раствора, содержащего клетки, через 70-мкм фильтр; (c) разведение содержащего клетки раствора раствором, содержащим 5,5% декстрана-40, 10% HSA и 5% DMSO, до приблизительно $1-50 \times 10^6$, $1-40 \times 10^6$, $1-30 \times 10^6$, $1-20 \times 10^6$, $1-15 \times 10^6$ или $1-10 \times 10^6$ клеток на миллилитр; (d) криоконсервацию клеток; (e) оттаивание клеток; и (f) разведение содержащего клетки раствора от 1:1 до 1:11 (в весовом отношении) 10% декстраном-40. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (c) осуществляется до не более приблизительно 15×10^6 клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (c) осуществляется до не более приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах

осуществления указанное разведение на стадии (с) осуществляется до не более приблизительно $7,5 \times 10^6$ клеток/мл

В другом варианте осуществления композицию, содержащую клетки, получают способом, включающим: (a) центрифугирование множества клеток для сбора клеток; (b) ресуспендирование клеток в 5,5% растворе декстрана-40; (c) центрифугирование клеток для сбора клеток; (d) ресуспендирование клеток в 5,5% растворе декстрана-40, который содержит 10% HSA; (e) фильтрацию клеток через фильтр 70 мкм; (f) разведение клеток в 5,5% декстране-40, 10% HSA и 5% DMSO до приблизительно $1-50 \times 10^6$, $1-40 \times 10^6$, $1-30 \times 10^6$, $1-20 \times 10^6$, $1-15 \times 10^6$ или $1-10 \times 10^6$ клеток на миллилитр; (g) криоконсервацию клеток; (h) оттаивание клеток; и (i) разведение клеток от 1:1 до 1:11 (в объемном отношении) 10% декстраном-40. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (f) осуществляют до не более приблизительно 15×10^6 клеток на миллилитр. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (f) осуществляют до не более приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления указанное разведение на стадии (f) осуществляют до не более приблизительно $7,5 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых других вариантах осуществления, если количество клеток составляет менее чем приблизительно $10 \pm 3 \times 10^6$ клеток на миллилитр, фильтрация является необязательной.

Композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь, могут включать любые выделенные плацентарные адгезивные клетки, описанные здесь.

Могут использоваться другие инъекционные препараты, подходящие для введения клеточных продуктов.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенные плацентарные адгезивные клетки, которые являются по существу или полностью нематеринскими по происхождению, т.е. имеют генотип плода; например, по крайней мере приблизительно 90%, 95%, 98%, 99% или приблизительно 100% являются нематеринскими по происхождению. Например, в одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит

популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток, которые являются CD200⁺ и HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ и CD200⁺; CD200⁺ и OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻; CD73⁺ и CD105⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных теллец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающей указанную популяцию выделенных плацентарных клеток, при культивировании указанной популяции плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, или OCT-4⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных теллец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающей указанную популяцию выделенных плацентарных клеток, при культивировании указанной популяции плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, или комбинацией вышеуказанного, причем по крайней мере 70%, 80%, 90%, 95% или 99% указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток являются нематеринскими по происхождению. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток, которые являются CD10⁺, CD105⁺ и CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ и CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ и имеют по крайней мере одну характеристику из CD90⁺ или CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ и CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ и CD45⁻; CD200⁺ и HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ и CD200⁺; CD200⁺ и OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁻; CD73⁺ и CD105⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных теллец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки, при культивировании указанной популяции плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца; OCT-4⁺ и способствуют образованию одного или более эмбриоидоподобных теллец в популяции плацентарных адгезивных клеток, включающих указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки, при культивировании указанной популяции плацентарных адгезивных клеток в условиях, которые делают возможным образование эмбриоидоподобного тельца, или имеют одну или более характеристик из CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻,

CD86⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ и/или PDL1⁺; или комбинацию вышеуказанного, причем по крайней мере 70%, 80%, 90%, 95% или 99% указанных выделенных плацентарных адгезивных клеток являются нематеринскими по происхождению. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, содержит стволовую клетку, которая не получена из плаценты.

Выделенные плацентарные адгезивные клетки в композициях, например фармацевтических композициях, предлагаемых здесь, могут включать плацентарные адгезивные клетки, полученные от одного донора или от множества доноров. Выделенные плацентарные адгезивные клетки могут полностью соответствовать по HLA предполагаемому реципиенту или частично или полностью не соответствовать по HLA.

5.8.4 Включающие выделенные плацентарные клетки матрицы

Далее здесь предлагаются композиции, включающие матрицы, гидрогели, каркасы и т.п., которые содержат плацентарные клетки или популяцию выделенных плацентарных адгезивных клеток. Такие композиции могут использоваться вместо или в дополнение к клеткам в жидкой суспензии.

Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки можно высеять на природную матрицу, например на плацентарный биоматериал, такой как материал амниотической оболочки. Такой материал амниотической оболочки может быть, например, амниотической оболочкой, отсеченной непосредственно от плаценты млекопитающего; иммобилизованной или термически обработанной амниотической оболочкой, по существу сухой (т.е. <20% H₂O) амниотической оболочкой, ворсинчатой оболочкой (хорионом), по существу сухой ворсинчатой оболочкой, по существу сухой амниотической и ворсинчатой оболочкой и т.п. Предпочтительные плацентарные биоматериалы, на которые могут быть посеяны выделенные плацентарные адгезивные клетки, описаны у Hariri, заявке на патент США с № 2004/0048796, раскрытие которой включено сюда посредством ссылки во всей своей полноте.

Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть суспендированы в растворе гидрогеля, подходящем, например, для инъекции. Подходящие гидрогели для таких

композиций включают самособирающиеся пептиды, такие как RAD16. В одном варианте осуществления раствору гидрогеля, содержащему клетки, можно дать затвердеть, например, в форме, чтобы сформировать матрицу, в которой диспергированы клетки, для имплантации. Выделенные плацентарные адгезивные клетки в такой матрице также можно культивировать так, чтобы клетки были митотически размножены перед имплантацией. Гидрогель представляет собой, например, органический полимер (природный или синтетический), который сшит с помощью ковалентных, ионных или водородных связей с созданием трехмерной структуры открытой решетки, которая захватывает молекулы воды с образованием геля. Образующие гидрогель материалы включают полисахариды, такие как альгинат и его соли, пептиды, полифосфазины и полиакрилаты, которые сшиты ионными связями, или блоксополимеры, такие как блоксополимеры этиленоксида и пропиленгликоля, которые сшиты соответственно под влиянием температуры или pH. В некоторых вариантах осуществления гидрогель или матрица являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает полимеризующийся *in situ* гель (смотрите, например, публикацию заявки на патент США 2002/0022676, раскрытие которой полностью включено сюда посредством ссылки; Anseth et al., J. Control Release, 78 (1-3):199-209 (2002); Wang et al., Biomaterials, 24 (22):3969-80 (2003).

В некоторых вариантах осуществления полимеры являются, по крайней мере, частично растворимыми в водных растворах, таких как вода, забуференные солевые растворы или водно-спиртовые растворы, которые имеют заряженные боковые группы, или их одновалентной ионной солью. Примерами полимеров, имеющих кислотные боковые группы, которые могут взаимодействовать с катионами, являются полифосфазены, полиакриловые кислоты, полиметакриловые кислоты, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, поливинилацетат и сульфированные полимеры, такие как сульфированный полистирол. Сополимеры, имеющие кислотные боковые группы, образованные в результате реакции акриловой или метакриловой кислоты и моно- или поливиниловых

эфиров также могут использоваться. Примерами кислых групп являются карбоксильные группы, сульфогруппы, галогенированные (предпочтительно фторированные) спиртовые группы, фенольные ОН-группы в фенолах и ОН-группы кислот.

В конкретном варианте осуществления матрица представляет собой войлок, который может состоять из мультволоконной нити, изготовленной из биорассасывающегося материала, например, сополимеров PGA, PLA, PCL или их смесей, или гиалуроновой кислоты. Нить превращается в войлок с использованием стандартных методов обработки текстиля, состоящих из обжима, резки, прочесывания и иглопробивания. В другом предпочтительном варианте осуществления клетки настоящего изобретения высевают на каркасы в виде пен, которые могут представлять собой композитные структуры. Кроме того, трехмерный каркас может быть отформован в применимую форму, такую как конкретная структура в теле, подлежащая восстановлению, замене или дополнению. Другие примеры каркасов, которые могут использоваться, включают нетканые маты, пористые пены или самособирающиеся пептиды. Нетканые маты могут быть сформированы с использованием волокон, состоящих из синтетического рассасывающегося сополимера гликолевой и молочной кислот (например, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Пены, состоящие, например, из сополимера ϵ -капролактона и гликолевой кислоты (PCL/PGA), образованные в результате таких процессов, как сушка сублимацией или лиофилизация (смотрите, например, патент США с № 6355699), также могут использоваться в качестве каркасов.

Описанные здесь выделенные плацентарные адгезивные клетки или их сокультуры можно высевать на трехмерный каркас или основу и имплантировать *in vivo*. Такой каркас может быть имплантирован вместе с любым одним или более факторов роста, клеток, лекарственных средств или других компонентов, которые, например, стимулируют образование тканей.

Примеры каркасов, которые могут использоваться, включают нетканые маты, пористые пены или самособирающиеся пептиды. Нетканые маты могут быть сформированы с использованием волокон,

состоящих из синтетического рассасывающегося сополимера гликолевой и молочной кислот (например, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Пены, состоящие, например, из сополимера ϵ -капролактона и гликолевой кислоты (PCL/PGA), образованные в результате таких процессов, как сушка сублимацией или лиофилизация (смотрите, например, патент США с № 6355699), также могут использоваться в качестве каркасов.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки могут быть посеяны на или приведены в контакт с войлоком, который может быть, например, состоять из мультислокотной нити, изготовленной из биорассасывающегося материала, например, сополимеров PGA, PLA, PCL или их смесей, или гиалуроновой кислоты.

В другом варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки, предлагаемые здесь, могут быть посеяны на каркасы в виде пен, которые могут быть композитными структурами. Такие каркасы в виде пен могут быть отформованы в применимую форму, такую как часть определенной структуры тела, подлежащая восстановлению, замене или дополнению. В некоторых вариантах осуществления каркас обрабатывают, например, 0,1 М уксусной кислотой с последующей инкубацией в полилизине, PBS и/или коллагене перед инокуляцией клеток для усиления прикрепления клеток. Внешние поверхности матрицы могут быть модифицированы для улучшения прикрепления или роста клеток и дифференцировки ткани, например путем покрытия матрицы плазмой или добавления одного или более белков (например, коллагенов, растяжимых волокон, ретикулярных волокон), гликопротеинов гликозаминогликанов (например, гепаринсульфата, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, дерматансульфата, кератинсульфата и т.д.), клеточного матрикса и/или других материалов, таких как, но без ограничения этим, желатин, альгинаты, агар, агароза и растительные камеди и т.п.

В некоторых вариантах осуществления каркас включает или обрабатывается материалы(ами), которые делают его нетромбогенным. Эти обработки и материалы также могут

стимулировать и поддерживать рост, миграцию эндотелиальных клеток и отложение экстраклеточного матрикса. Примеры этих материалов и обработок включают, но без ограничения ими, природные материалы, такие как белки базальной мембраны, такие как ламинин и коллаген типа IV, синтетические материалы, такие как EPTFE, и силиконы полиуретанмочевины с различной жесткостью сегментов в молекуле, такие как PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). Каркас может также включать противотромбозные средства, такие как гепарин; каркасы также могут быть обработаны для изменения поверхностного заряда (например, покрыты плазмой) перед посевом выделенных плацентарных адгезивных клеток.

Плацентарные адгезивные клетки (например, плацентарные адгезивные клетки), предлагаемые здесь, также можно высевать на физиологически приемлемый керамический материал или приводить в контакт с ним, включая, но не ограничиваясь этим, моно-, ди-, три-, альфа-три-, бета-три- и тетракальцийфосфат, гидроксиапатит, фторапатиты, сульфаты кальция, фториды кальция, оксиды кальция, карбонаты кальция, фосфаты магния и кальция, биологически активные стекла, такие как BIOGLASS®, и их смеси. Пористые биосовместимые керамические материалы, имеющиеся в настоящее время в продаже, включают SURGIBONE® (CanMedica Corp., Канада), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Франция), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Швейцария) и костно-пластические продукты в виде минерализованных фибрилл коллагена, такие как HEALOS™. (DePuy, Inc., Raynham, Mass.) и VITOSS®, RHAKOSS™ и CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). Каркас может представлять собой смесь, композицию или композит из природных и/или синтетических материалов.

В одном варианте осуществления выделенные плацентарные адгезивные клетки высевают на или приводят в контакт с подходящим каркасом в количестве от приблизительно $0,5 \times 10^6$ до приблизительно 8×10^6 клеток/мл.

5.9 Иммуортиализованные линии клеток плаценты

Плацентарные адгезивные клетки млекопитающих, например

плацентарные адгезивные клетки, могут быть условно immortalizированы путем трансфекции любым подходящим вектором, содержащим ген, который стимулирует росту, т.е. ген, кодирующий белок, который в соответствующих условиях стимулирует рост трансфицированной клетки, так что продукция и/или активность стимулирующего рост белка регулируется внешним фактором. В предпочтительном варианте осуществления ген, стимулирующий рост, представляет собой онкоген, такой как, но без ограничения этим, v-мус, N-мус, c-мус, p53, большой Т-антиген SV40, большой Т-антиген полиомавируса, аденовирусный белок Е1а или белок Е7 вируса папилломы человека.

Внешней регуляции белка, стимулирующего рост, можно достичь, поместив стимулирующий рост ген под контроль регулируемого извне промотора, например промотора, активность которого можно контролировать, например, путем изменения температуры трансфицированных клеток или состава среды в контакте с клетками. В одном варианте осуществления можно использовать систему экспрессии гена, контролируемой тетрациклином (tet), (смотрите Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996). В отсутствие tet, tet-контролируемый трансаактиватор (tTA) в этом векторе сильно активирует транскрипцию с ph_{CMV*1} , минимального промотора из цитомегаловируса человека, слитого с последовательностями оператора tet. tTA является слитым белком репрессора (tetR) оперона tet-резистентности, происходящего из транспозона-10, *Escherichia coli* и кислого домена VP16 вируса простого герпеса. Низкие нетоксичные концентрации tet (например, 0,01-1,0 мкг/мл) почти полностью отменяют трансаактивацию с помощью tTA.

В одном варианте осуществления вектор, кроме того, содержит ген, кодирующий селектируемый маркер, например белок, который придает устойчивость к лекарственному средству. Бактериальный ген устойчивости к неомицину (neo^R) является одним из таких маркеров, который может использоваться в способах настоящего изобретения. Клетки, несущие neo^R , могут быть отобраны способами, известными специалистам со средним уровнем компетентности в

данной области техники, такими как добавление, например, 100–200 мкг/мл G418 в среду для выращивания.

Трансфекция может быть достигнута любым из множества способов, известных специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники, включая, но без ограничения этим, ретровирусную инфекцию. Как правило, клеточная культура может быть трансфицирована путем инкубации со смесью кондиционированной среды, собранной из линии клеток-продуцентов для вектора, и DMEM/F12, содержащей добавки N2. Например, культура плацентарных клеток, приготовленная, как описано выше, может быть инфицирована, например, через пять дней *in vitro* путем инкубации в течение приблизительно 20 часов в одном объеме кондиционированной среды и двух объемах DMEM/F12, содержащей добавки N2. Трансфицированные клетки, несущие селектируемый маркер, затем могут быть затем отобраны, как описано выше.

После трансфекции культуры пересевают на поверхность, которая обеспечивает пролиферацию, например, позволяет по крайней мере 30% клеток удваиваться в течение 24 часов. Предпочтительно, когда подложка представляет собой подложку из полиорнитина/ламиниона, состоящую из пластика для культуры ткани, покрытого полиорнитином (10 мкг/мл) и/или ламинином (10 мкг/мл), подложку из полилизина/ламиниона или поверхность, обработанную фибронектином. В культуры затем подается каждые 3–4 дня среда для выращивания, в которую может или может не быть добавлен один или более факторов, усиливающих пролиферацию. Усиливающие пролиферацию факторы могут быть добавлены в среду для выращивания при слиянии культур менее чем на 50%.

Условно immortalized линии плацентарных клеток можно пассировать, используя стандартные методы, такие как трипсинизация, при 80–95% конфлюэнтности. В некоторых вариантах осуществления приблизительно до двадцатого пассажа полезно поддерживать селекцию (например, путем добавления G418 для клеток, содержащих ген устойчивости к неомицину). Клетки также могут быть заморожены в жидком азоте для длительного хранения.

Клональные клеточные линии могут быть выделены из условно immortalized линии клеток плаценты человека, приготовленной

как описано выше. Как правило, такие клональные клеточные линии могут быть выделены с использованием стандартных методов, таких как предельное разведение или использование клонзапирающих колец, и размножены. Подача питательной среды и пассирование клональных клеточных линий, как правило, могут осуществляться, как описано выше.

Условно иммортализованные линии клеток плаценты человека, которые могут, но не обязательно, быть клональными, можно, как правило, индуцировать к дифференцировке путем подавления продукции и/или активности стимулирующего рост белка в условиях культивирования, которые способствуют дифференцировке. Например, если ген, кодирующий стимулирующий рост белок, находится под контролем регулируемого извне промотора, условия, например температуру или состав среды, могут быть изменены для подавления транскрипции стимулирующего рост гена. Для описанной выше системы экспрессии генов, контролируемой тетрациклином, дифференцировка может быть достигнута путем добавления тетрациклина для подавления транскрипции гена, стимулирующего рост. Как правило, 1 мкг/мл тетрациклина на протяжении 4–5 дней достаточно для инициации дифференцировки. Для стимуляции дальнейшей дифференцировки в среду для выращивания могут быть включены дополнительные агенты.

5.10 Наборы

В другом аспекте здесь предлагаются наборы, подходящие для лечения индивидуума, у которого есть заболевание или нарушение системы кровообращения, включающие, в контейнере, отдельном от оставшегося содержимого набора, прилипающие к пластику для культуры ткани мультипотентные плацентарные адгезивные клетки, например, плацентарные стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки, например клетки, описанные в разделе 5.3 выше (плацентарные адгезивные клетки), и инструкции по применению. Предпочтительно, когда плацентарные адгезивные клетки предоставляются в фармацевтически приемлемом растворе, например, в растворе, подходящем для введения внутрь повреждения, или растворе, подходящем для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления плацентарные

стволовые клетки или плацентарные мультипотентные клетки представляют собой любые из CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ плацентарных адгезивных клеток, описанных здесь, например, CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки или CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки.

В некоторых вариантах осуществления наборы включают один или более компонентов, которые облегчают доставку плацентарных адгезивных клеток индивидууму. Например, в некоторых вариантах осуществления набор включает компоненты, которые облегчают доставку плацентарных адгезивных клеток внутрь повреждения у индивидуума. В таких вариантах осуществления набор может включать, например, шприцы и иглы, подходящие для доставки клеток индивидууму, и т.п. В таких вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки могут содержаться в наборе в пакете или в одном или нескольких флаконах. В некоторых других вариантах осуществления набор включает компоненты, которые облегчают внутривенную или внутриартериальную доставку плацентарных адгезивных клеток индивидууму. В таких вариантах осуществления плацентарные адгезивные клетки могут содержаться, например, внутри бутылки или пакета (например, мешка для крови или аналогичного пакета, в котором может содержаться до приблизительно 1,5 л раствора, содержащего клетки), и набор, кроме того, включает трубки и иглы, подходящие для доставки клеток индивидууму.

Кроме того, набор может включать одно или более соединений, которые уменьшают боль или воспаление у индивидуума (например, анальгезирующее, стероидное или нестероидное противовоспалительное соединение или т.п.). Набор также может включать антибактериальное или противовирусное соединение (например, один или более антибиотиков), соединение для уменьшения беспокойства у индивидуума (например, алапразол), соединение, которое уменьшает иммунный ответ у индивидуума (например, циклоспорин А), антигистамин (дифенгидрамин, лоратадин, дезлоратадин, кветиапин, фексофенадин, цетиризин, прометазин, хлорфенирамин, левоцетиризин, циметидин, фамотидин, ранитидин, низатидин, роксатидин, лафутидин и т.п.).

Кроме того, набор может включать предметы одноразового использования, например, стерильные салфетки, бумажные салфетки одноразового использования, перчатки и т.п., которые облегчают подготовку индивидуума к доставке или уменьшают вероятность инфицирования индивидуума в результате введения плацентарных адгезивных клеток.

6. ПРИМЕРЫ

6.1 Пример 1: Фенотипическая характеристика адгезивных клеток, полученных из плаценты.

Этот пример демонстрирует секрецию ангиогенных факторов плацентарными адгезивными клетками (CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными стволовыми клетками, также называемыми плацентарными адгезивными клетками).

Анализ секретомных профилей для оценки ангиогенной активности адгезивных клеток, полученных из плаценты.

Анализ MuiltplexBead. Полученные из плаценты адгезивные клетки пассажа 6 высевали в равных количествах клеток в среду для выращивания, и кондиционированные среды собирали через 48 часов. Одновременный качественный анализ множества ангиогенных цитокинов/факторов роста в кондиционированных в результате культивирования клеток средах выполняли с использованием анализов Multiplex на основе магнитных шариков (Bio-Plex Pro™, Bio-Rad, CA), которые позволяют измерять ангиогенные биомаркеры в различных матриксах, включая сыворотки, плазмы и супернатанты клеточных/тканевых культур. Принцип этих анализов на основе шариков в 96-луночных планшетах аналогичен таковому сэндвич-иммуноанализа с захватом антигена или антитела. Антитело, направленное против желаемой мишени ангиогенеза, ковалентно связано с окрашенными внутри шариками. Связанным шарикам дают возможность взаимодействовать с образцом, содержащим мишень ангиогенеза. После ряда промывок для удаления несвязанного белка в реакцию добавляют детектирующее биотинилированное антитело, специфическое для другого эпитопа. В результате образуется сэндвич из антител вокруг мишени ангиогенеза. Затем добавляют стрептавидин-PE для связывания с детектирующими

биотинилированными антителами на поверхности шарика. Вкратце, анализы Multiplex выполняли в соответствии с инструкциями производителя, и оценивали количество соответствующих ангиогенных факторов роста в кондиционированных средах.

ELISA: Количественный анализ отдельных ангиогенных цитокинов/факторов роста в кондиционированных в результате культивирования клеток средах выполняли с использованием коммерчески доступных наборов от R&D Systems (Minneapolis, Minn.). Вкратце, ELISA-анализы проводили в соответствии с инструкциями производителя, и оценивали количество соответствующих ангиогенных факторов роста в кондиционированных средах.

Уровень секреции различных ангиогенных белков плацентарной адгезивной клеткой показан на фиг. 1.

Таблица 1			
Результаты анализов Multiplex и ELISA для ангиогенных маркеров			
Маркер плацентарных адгезивных клеток	Позитивная	Негативная	Анализ ELISA секрета, Multiplex
ANG	X		X
EGF	X		X
ENA-78	X		X
FGF2	X		X
Фоллистатин	X		X
G-CSF	X		X
GRO	X		X
HGF	X		X
IL-6	X		X
IL-8	X		X
Лептин	X		X
MCP-1	X		X
MCP-3	X		X
PDGFB	X		X
PLGF	X		X
Хемокин, выделяемый Т-клетками при активации	X		X
TGFB1	X		X
Тромбопоэтин	X		X
TIMP1	X		X
TIMP2	X		X

uPAR	X		X
VEGF	X		X
VEGFD	X		X

В отдельном эксперименте было подтверждено, что плацентарные адгезивные клетки также секретируют ангиопоэтин-1, ангиопоэтин-2, PECAM-1 (CD31; эндотелиальную молекулу адгезии тромбоцитов), ламинин и фибронектин.

6.2 Пример 2; Функциональная характеристика плацентарных клеток

Этот пример демонстрирует различные характеристики плацентарных адгезивных клеток (CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарных стволовых клеток, также называемых плацентарными адгезивными клетками), связанные с ангиогенезом и способностью к дифференцировке.

6.2.1 Формирование трубки из HUVEC для оценки ангиогенной активности плацентарных адгезивных клеток.

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) пассажа 3 или меньше субкультивировали в среде EGM-2 (Cambrex, East Rutherford, NJ) в течение 3 дней, и собирали при конfluэнтности, составляющей приблизительно 70%-80%. HUVEC один раз промывали основной питательной средой/антибиотиками (DMEM/F12 (Gibco)) и ресуспендировали в той же среде в желаемой концентрации. HUVEC использовали в пределах 1 часа от приготовления. Человеческий плацентарный коллаген (HPC) доводили до концентрации 1,5 мг/мл в 10 мМ HCl (pH 2,25), нейтрализовали буфером до pH 7,2 и хранили на льду до использования. HPC объединяли с суспензией HUVEC в конечной концентрации 4000 клеток/мкл. Полученную суспензию HUVEC/HPC немедленно пипетировали в 96-луночные планшеты по 3 мкл в каждую лунку (планшет по периметру должен быть предварительно заполнен стерильным PBS во избежание испарения, n=5 для каждого условия). Капли HUVEC инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 75-90 минут без добавления среды для обеспечения полимеризации коллагена. После завершения «сухой» инкубации каждую лунку осторожно заполняли 200 мкл кондиционированной в результате культивирования плацентарных адгезивных клеток среды (n=2

клеточные линии) или контрольной среды (например, DMEM/F12 в качестве отрицательного контроля и EGM-2 в качестве положительного контроля) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 20 часов. Кондиционированную среду готовили путем инкубации плацентарных адгезивных клеток пассажа 6 в среде для выращивания в течение 4–6 часов; после прикрепления и размножения среду меняли на DMEM/F12 в течение 24 часов. После инкубации среду удаляли из лунок, не нарушая каплю HUVEC, и лунки промывали один раз PBS. Затем капли HUVEC фиксировали в течение 10 секунд и окрашивали в течение 1 минуты, используя набор для окрашивания клеток Diff-Quik, и затем трижды промывали стерильной водой. Окрашенные капли оставляли высыхать на воздухе, и изображения каждой лунки получали с использованием микроскопа Zeiss SteReo Discovery V8. Затем изображения анализировали с использованием пакета компьютерных программ ImageJ и/или MatLab. Изображения преобразовывали из цветных в 8-битные изображения в градациях серого, и устанавливали порог для преобразования в черно-белое изображение. Затем изображение анализировали с использованием функций анализа частиц, которые предоставили данные о плотности пикселей, включая количество (количество отдельных частиц), общую площадь, средний размер (отдельных частиц) и долю площади, которая соответствует степени образования эндотелиальной трубки в анализе.

Кондиционированная среда оказывала ангиогенный эффект на эндотелиальные клетки, доказательством чего служит индукция образования трубок (смотрите фиг. 2).

6.2.2. Анализ миграции HUVEC.

Этот эксперимент продемонстрировал ангиогенную способность адгезивных клеток, полученных из плаценты. HUVEC выращивали до слияния монослоя в покрытом фибронектином (FN) 12-луночном планшете, и монослой «ранили» (разрезали) пластиковым наконечником пипетки объемом 1 мл для создания бесклеточной линии через лунку. Миграцию HUVEC исследовали путем инкубации «раненых» клеток с бессывороточной кондиционированной средой (EBM2; Cambrex), полученной от плацентарных адгезивных клеток

после 3 дней выращивания. В качестве контроля использовали среду EBM2 без клеток. Через 15 часов миграцию клеток в бесклеточную область регистрировали ($n=3$) с использованием инвертированного микроскопа. Затем изображения анализировали с использованием пакета компьютерных программ ImageJ и/или MatLab. Изображения преобразовывали из цветных в 8-битные изображения в градациях серого и устанавливали порог для преобразования в черно-белое изображение. Затем изображение анализировали с использованием функций анализа частиц, которые предоставили данные о плотности пикселей, включая количество (количество отдельных частиц), общую площадь, средний размер (отдельных частиц) и долю площади, которая соответствует степени миграции эндотелиальных клеток в анализе. Степень миграции клеток оценивали по сравнению с размером первоначально зарегистрированной линии раны, и результаты нормировали к 10×10^6 клеткам.

Трофические факторы, секретируемые адгезивными клетками, полученными из плаценты, оказывали ангиогенные эффекты на эндотелиальные клетки, доказательством чего служит индукция миграции клеток (фиг. 3).

В отдельном эксперименте HUVEC культивировали на дне 24-луночных планшетов для установления в течение ночи в EGM2 с последующим голоданием на протяжении половины дня в EBM. Одновременно культивированные в среде плацентарные адгезивные клетки оттаивали и культивировали в трансвеллах (8 мкл) в течение ночи. После голодания ЕС кондиционированную DMEM без сыворотки вместе с трансвеллом переносили в ЕС для пролиферации в течение ночи. В каждый эксперимент были включены 4 повтора, и пролиферацию через 24 часа оценивали с помощью анализа Cell Titer Glo от Promega. Среду EBM-2 использовали в качестве отрицательного контроля, а EGM-2 использовали в качестве положительного контроля. «Усы» обозначают среднеквадратические отклонения аналитических повторов ($n=3$).

Трофические факторы, секретируемые плацентарными адгезивными клетками, приводили к увеличению числа клеток HUVEC, что свидетельствует о пролиферации HUVEC. Смотрите фиг. 4.

6.2.3 Образование трубок для оценки ангиогенной активности адгезивных клеток, полученных из плаценты.

Плацентарные адгезивные клетки выращивали либо в среде для выращивания без VEGF или EGM2-MV с VEGF для оценки ангиогенной активности клеток в целом, а также эффекты VEGF на способность к дифференцировке клеток. HUVEC в качестве контрольных клеток для образования трубок выращивали в EGM2-MV. Клетки культивировали в соответствующих средах в течение 4-7 дней, пока они не достигли слияния на 70-80%. Холодный (4°C) раствор MATRIGEL™ (50A; BD Biosciences) распределяли по лункам 12-луночного планшета, и планшет инкубировали в течение 60 мин при 37°C, чтобы дать возможность раствору образовать гель. Плацентарные адгезивные клетки и клетки HUVEC трипсинизировали, ресуспендировали в соответствующей среде (с VEGF и без VEGF), и 100 мкл разведенных клеток ($1-3 \times 10^4$ клеток) добавляли в каждую лунку, содержащую MATRIGEL™. Клетки на полимеризованном MATRIGEL™, в присутствии или в отсутствие 0,5-100 нг VEGF, помещали на 4-24 часа в термостат с 5% CO₂ при 37°C. После инкубации клетки оценивали на наличие признаков образования трубок с помощью стандартной световой микроскопии.

Плацентарные адгезивные клетки демонстрировали минимальное образование трубок в отсутствие VEGF, но были индуцированы/дифференцированы для образования трубчатых структур путем стимуляции с помощью VEGF. Смотрите фиг. 5.

6.2.4 Чувствительность к гипоксии для оценки ангиогенной активности адгезивных клеток, полученных из плаценты.

Для оценки ангиогенной функциональности у эндотелиальных клеток и/или эндотелиальных клеток-предшественников можно оценить клетки с точки зрения их способности секретировать ангиогенные факторы роста в условиях гипоксии и нормоксических условиях. Культивирование в гипоксических условиях обычно индуцирует повышенную секрецию ангиогенных факторов роста либо эндотелиальными клетками, либо эндотелиальными клетками-предшественниками, что может быть измерено в кондиционированной среде. Адгезивные клетки, полученные из плаценты, высевали в

одинаковых количествах клеток в стандартную для них среду для выращивания и выращивали до приблизительно 70–80% конфлюэнтности. Затем клетки переводили на бессывороточную среду (EBM-2) и инкубировали в нормоксических (21% O₂) или гипоксических (1% O₂) условиях в течение 24 часов. Кондиционированные среды собирали, и секрецию ангиогенных факторов роста анализировали с использованием коммерчески доступных наборов ELISA от R&D Systems. Анализы ELISA выполняли в соответствии с инструкциями производителя, и количество соответствующих ангиогенных факторов роста (VEGF и IL-8) в кондиционированных средах нормировали к 10×10^6 клеток.

Адгезивные клетки, полученные из плаценты, демонстрировали повышенную секрецию различных ангиогенных факторов роста в условиях гипоксии. Смотрите фиг. 6.

6.2.5. Реакция HUVEC на среду, кондиционированную в результате культивирования плацентарных адгезивных клеток

Плацентарные адгезивные клетки культивировали в течение 48 часов в среде для выращивания, содержащей 60% DMEM-LG (Gibco); 40% MCBD-201 (Sigma); 2% FBS (Hyclone Labs), 1x инсулин-трансферрин-селен (ITS); 10 нг/мл линолевой кислоты и бычьего сывороточного альбумина (LA-BSA); 1 н-дексаметазон (Sigma); 100 мкМ 2-фосфат аскорбиновой кислоты (Sigma); 10 нг/мл эпидермального фактора роста (R&D Systems); и 10 нг/мл тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) (R&D Systems), а затем культивировали в течение еще 48 часов в бессывороточной среде. Кондиционированную в результате культивирования плацентарных адгезивных клеток среду собирали и использовали для стимуляции испытывающих необходимость в сыворотке HUVEC в течение 5, 15 и 30 мин. Впоследствии HUVEC лизировали и окрашивали с использованием набора Cell Signaling Flex (BD Biosciences) для BD™ CBA (Cytometric Bead Assay), поскольку было установлено, что фосфопротеины, которые, как известно, играют роль в передаче сигналов по ангиогенному пути, являются сильными активаторами АКТ-1 (который ингибирует процессы апоптоза), АКТ-2 (который является важным сигнальным белком в пути передачи сигналов от

инсулина, и путей пролиферации клеток ERK 1/2 в HUVEC. Эти результаты дополнительно демонстрируют ангиогенную способность плацентарных адгезивных клеток.

6.3 Пример 3; Индукция ангиогенеза плацентарными адгезивными клетками.

Этот пример демонстрирует, что CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки, описанные в примере 1 выше, стимулируют ангиогенез в анализе *in vivo* с использованием хориоаллантаисной оболочки (CAM) куриного эмбриона.

Проводили два отдельных анализа CAM. В первом анализе CAM оценивали осадки интактных клеток из различных препаратов плацентарных адгезивных клеток. Во втором анализе CAM оценивали супернатанты различных препаратов плацентарных адгезивных клеток. Фактор роста фибробластов (bFGF) использовали в качестве положительного контроля, а клетки рака молочной железы человека MDA-MB-231 в качестве эталона, контроли носителя и среды использовали в качестве отрицательных контролей. Конечным результатом исследования было определение плотности кровеносных сосудов во всех группах обработки и контроля.

6.3.1. Анализ CAM с использованием плацентарных адгезивных клеток

Использовали плацентарные адгезивные клетки, полученные, как описано в примере 1 выше, и подвергнутые криоконсервации. Плацентарные адгезивные клетки оттаивали для дозирования и определяли количество клеток, дозированное на CAM.

План исследования: Исследование включало 5 групп с 10 эмбрионами в каждой группе. План исследования представлен в таблице 2.

Таблица 2			
Группы исследования, анализ ангиогенеза с использованием хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона			
№ группы	# эмбрионов	Обработка	Конечный результат
1	10	Контроль носителя (40 мкл смеси PBS/MATRIGEL™, 1:1 по объему)	Оценка плотности кровеносных сосудов

2	10	Положительный контроль, с обработкой bFGF (100 нг/CAM в 40 мкл смеси DMEM/ MATRIGEL™, 1:1)	Такой же, как в случае группы 1
3	10	Контроль среды (40 мкл DMEM)	Такой же, как в случае группы 1
4	10	Плацентарные адгезивные клетки (40 мкл)	Такой же, как в случае группы 1
5	10	Клетки P34 MDA-MB-231, № серии 092608	Такой же, как в случае группы 1

Процедура анализа CAM: Свежие оплодотворенные яйца инкубировали в течение 3 дней в стандартном инкубаторе для яиц при 37°C. В день 3 яйца раскалывали в стерильных условиях, и эмбрионы помещали в двадцать 100-мм пластиковых чашек и культивировали при 37°C в инкубаторе для эмбрионов с емкостью для воды на нижней полке. Воздух непрерывно барботировали в емкость для воды с помощью небольшого насоса, так что влажность в инкубаторе поддерживалась постоянной. В день 6 стерильное кремниевое уплотнительное кольцо помещали на каждую CAM, и затем в каждое уплотнительное кольцо в стерильном вытяжном шкафу в каждое уплотнительное кольцо в стерильном вытяжном шкафу доставляли плацентарные адгезивные клетки с плотностью $7,69 \times 10^5$ клеток/40 мкл смеси среда/MATRIGEL™ (1:1). В таблице 2 представлено количество используемых клеток и количество среды, добавленной к каждому препарату клеток для дозирования. Эмбрионы группы контроля носителя получали 40 мкл носителя (PBS/MATRIGEL™, 1:1), положительные контроли получали 100 нг/мл bFGF в 40 мкл смеси среда DMEM/MATRIGEL™ (1:1), а контроли среды получали 40 мкл только среды DMEM. Эмбрионы возвращали в инкубатор после завершения каждого введения дозы. В день 8 эмбрионы извлекали из инкубатора и хранили при комнатной температуре, пока плотность кровеносных сосудов определяли под каждым уплотнительным кольцом с использованием системы захвата изображения при увеличении 100х.

Плотность кровеносных сосудов измеряли с помощью системы оценки ангиогенеза, в которой используются арифметические числа от 0 до 5 или экспоненциальные числа от 1 до 32 для указания

числа кровеносных сосудов, присутствующих в местах обработки САМ. Более высокие оценочные числа отображали более высокую плотность сосудов, в то время как 0 отображал отсутствие ангиогенеза. Процент ингибирования в каждом месте введения дозы рассчитывали, используя зарегистрированную для этого места оценку, деленную на среднюю оценку, полученную из контрольных образцов для каждого отдельного эксперимента. Процент ингибирования для каждой дозы данного соединения рассчитывали путем объединения всех результатов, полученных для этой дозы от 8-10 эмбрионов.

Таблица 3			
Количество среды, добавленное к каждому клеточному препарату для нормализации конечной клеточной суспензии для дозирования			
Клеточная линия	Размер осадка	Нормализация с помощью DMEM и MATRIGEL™	Конечный объем клеточной суспензии
Плацентарная адгезивная клетка		0 мкл+260 мкл MATRIGEL™	520 мкл
MDA-MB-231		220 мкл+260 мкл MATRIGEL™	520 мкл

Использовали плацентарные адгезивные клетки пассажа 6.

Результаты: Результаты оценок плотности кровеносных сосудов представлены на фиг. 7. Результаты ясно указывают на то, что оценки плотности кровеносных сосудов в хориоаллантаоисных оболочках куриных эмбрионов, обработанных суспензиями плацентарных адгезивных клеток, или 100 нг/мл bFGF, или суспензий клеток рака молочной железы MDAMB231, были статистически значимо выше по сравнению с оценками САМ группы контроля носителя ($P < 0,001$, t -критерий Стьюдента). Среда, используемая для культивирования плацентарных адгезивных клеток (отрицательный контроль), не оказывала какого-либо эффекта на плотность кровеносных сосудов. Кроме того, индукция плотности кровеносных сосудов препаратами плацентарных адгезивных клеток показала некоторые вариации, но эти вариации не были статистически значимыми.

6.3.2 Анализ САМ с использованием супернатантов плацентарных адгезивных клеток

Образцы супернатантов от клеток MDA-MB-231 и плацентарных

адгезивных клеток использовали во втором анализе CAM, как описано выше. bFGF и супернатанты от MDA-MB-231 использовали в качестве положительных контролей, среду и носитель использовали в качестве отрицательных контролей.

План исследования: Исследование включало пять групп по 10 эмбрионов в каждой группе. План исследования представлен в таблице 4.

Таблица 4			
План исследования – анализ CAM с использованием супернатантов клеток			
№ группы	# эмбрионов	Обработка	Конечный результат
1	10	Контроль носителя (40 мкл смеси PBS/MATRIGEL™, 1:1 по объему)	Оценка плотности кровеносных сосудов
2	10	Положительный контроль, с обработкой bFGF (100 нг/CAM в 40 мкл смеси DMEM/ MATRIGEL™, 1:1)	Такой же, как в случае группы 1
3	10	Контроль среды (40 мкл DMEM)	Такой же, как в случае группы 1
4	10	Супернатант от плацентарных адгезивных клеток	Такой же, как в случае группы 1
5	10	Супернатант от клеток MDAMB231 (P34)	Такой же, как в случае группы 1

Супернатанты плацентарных адгезивных клеток были получены от клеток пассажа 6.

Процедура анализа CAM: Процедура анализа была такой же, как описано в разделе 5.3.1., выше. Единственным отличием было то, что супернатант от каждого препарата стволовых клеток или от клеток MDA-MB-231 использовался в качестве исследуемого материала. Для дозирования каждый супернатант смешивали с MATRIGEL™ (1:1 по объему), и дозу, составляющую 40 мкл смеси, вводили в каждый эмбрион.

Результаты. Оценки плотности кровеносных сосудов (смотрите фиг. 8) указывают на то, что индукция образования кровеносных сосудов с помощью супернатанта каждого препарата стволовых клеток различалась. Образцы супернатантов от плацентарных адгезивных клеток продемонстрировали значительный эффект на индукцию кровеносных сосудов с $P < 0,01$, $P < 0,001$ и $P < 0,02$ (t-

критерий Стьюдента), соответственно. Как и ожидалось, положительный контроль bFGF также продемонстрировал сильную индукцию образования кровеносных сосудов, как показано выше в первом анализе САМ ($P < 0,001$, t-критерий Стьюдента). Однако супернатант от клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 не продемонстрировал значительную индукцию образования кровеносных сосудов по сравнению с контролями носителей. Как было показано ранее, культуральная среда сама по себе не оказывала какого-либо эффекта.

6.4 Пример 4; Системный эффект плацентарных адгезивных клеток на эндотелиальные и мышечные клетки

6.4.1. Материалы и методы

План исследования. Размер выборки не менее девяти мышей в каждой группе использовали для лазерного доплеровского анализа кровотока и для исследования поведения, от четырех до пяти мышей в каждой группе использовали для рентгеноангиографии, и от четырех до пяти мышей в каждой группе использовали для гистологической оценки. Животных случайным образом распределяли по экспериментальным группам, и экспериментаторы не знали о сущности экспериментальных групп при исследовании множества конечных результатов в этом исследовании. Никакие выпадающие значения не исключались, и все собранные данные были использованы в статистическом анализе.

Мыши: Мышей db/db (возрастом 10-11 недель) и мышей Balb/c, дикого типа и бестимусных голых мышей (возрастом 10-12 недель), приобретали у Charles Rivers (Boston, MA, США). Все эксперименты на животных соответствовали рекомендациям Национального института здоровья (NIH) и Ассоциации по оценке и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC).

Получение плацентарных адгезивных клеток и фибробластов кожи человека (HDF): CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки получали с помощью механического и ферментативного расщепления плацентарной ткани человека, полученной в случае нормальных родов при доношенной беременности, как описано в примере 1 и в Liu et al. 2014, Clin. Transl. Immunology 3(e14). Плацентарные адгезивные клетки

размножали до пассажа 6 в запатентованной среде и впоследствии использовали для исследований *in vitro*, как описано ранее (Francki et al. 2015. J. Vasc. Surg. 15:901-915). Клетки HDF получали от Lonza (Walkersville, MD, США) и размножали в культуре в соответствии с инструкциями производителя.

Модель ишемии задних конечностей (HLI) на мышах: В модели односторонней HLI у мышей db/db правую бедренную артерию перевязывали дважды (проксимально к глубокой бедренной артерии) и разрезали поперек между местами перевязок. Носитель, клетки HDF (3×10^4) или плацентарные адгезивные клетки (3×10^4 клеток) вводили внутримышечно через 24 часа после перевязки в двух местах: с проксимальной и дистальной стороны от хирургической раны (25 мкл в каждое место, всего 50 мкл на мышь). В модели двусторонней HLI у мышей db/db правую бедренную артерию перевязывали дважды (дистально от глубокой бедренной артерии) и разрезали поперек между местами перевязок. Животным вводили носитель, VEGF (3,3 мкг/животное; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) или плацентарные адгезивные клетки (5×10^4 клеток) через 48 часов после перевязки. Второе повреждение, перевязка бедренной артерии (проксимальнее глубокой бедренной артерии), было совершено на левой задней конечности через 23 дня после перевязки и разреза бедренной артерии правой задней конечности.

В экспериментах по восстановлению Т-клеток, $CD4^+$ Т-клетки выделяли из селезенки мышей Balb/c дикого типа, и 5×10^6 $CD4^+$ Т-клеток внутривенно трансплантировали бестимусным голым мышам Balb/c-реципиентам. Через две недели после трансплантации $CD4^+$ Т-клеток мыш-реципиенты были подвергнуты односторонней HLI с последующим введением носителя или плацентарных адгезивных клеток (5×10^4 клеток) через 24 часа.

Измерение кровотока: Повторные измерения кровотока в задних конечностях в интересующей области (области голени) были сделаны в начале исследования (на исходном уровне), сразу после хирургического вмешательства и последовательно в течение 6 недель с использованием бесконтактного лазерного доплеровского флоурометра. В модели односторонней HLI кровоток представляется

в виде отношения кровотока в правой (ишемической) к левой (нормальной) конечности в каждый момент времени. В модели двусторонней перевязки кровотоков представляется в виде отношения кровотока в задней конечности в конкретные моменты времени к кровотоку на исходном уровне до повреждения HLI.

Ангиография. Мышей анестезировали с использованием кетамина/ксилазина. Раствор сульфата бария (2,5 мл) вводили в инфраренальный отдел брюшной аорты после перевязки проксимальной аорты и нижней полой вены, и число заполненных контрастом кровеносных сосудов определяли с помощью рентгенологического анализа. Количественная оценка пересечений между заполненными контрастом сосудами и линиями координационной сетки ангиографа представлена в виде ангиографической оценки, определяемой как число блоков на сетке, заполненных рентгеноконтрастным красителем.

Гистология и иммуногистохимия. Мышцы задних конечностей удаляли и фиксировали в фиксаторе с HOPE (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect, с защитным эффектом органического растворителя, опосредованным буфером Hepes-глутаминовая кислота) (Polysciences, Inc, Warrington, PA) и заключали в парафин. Парафиновые блоки охлаждали до 20°C в течение 30 мин, и делали срезы с использованием микротомы толщиной 5 мкм. Анатомию мышц визуализировали путем окрашивания двух последовательных срезов гематоксилином и эозином и микроскопически оценивали на предмет морфологических изменений. Для иммуноокрашивания срезы мышц бедра сначала блокировали с использованием 10% сыворотки крови гибрида коня и осла, 2х казеина в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре, затем инкубировали при 4°C в течение ночи с первыми антителами и вторыми антителами в течение 30 минут при комнатной температуре. Для первых антител использовали крысиное антитело против D31 (1:100, Abcam, Cambridge, MA, США), кроличье антитело против α SMA (1:100, Abcam), крысиное антитело против CD68 (1:100, ABD Serotec, Raleigh, NC, США) и козье антитело против аргиназы 1 (1:100, Santa Cruz, Dallas, TX, США). Подходящие вторые антитела

включали козье антитело против крысиного IgG, конъюгированное с Alexa Fluor 488, (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA, США), козье антитело против кроличьего IgG, конъюгированное с Alexa Fluor 594, (1:500, Invitrogen), куриное антитело против крысиного IgY, конъюгированное с Alexa Fluor 488, (1:500, Invitrogen) и ослиное антитело против козьего IgG, конъюгированное с Alexa Fluor 594, (1:500, Invitrogen). Для окрашивания ядер применяли 600 нМ раствор DAPI (Sigma, St. Louis, MO, США). Иммуногистохимические изображения получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse модели E800, оснащенного цифровой камерой высокого разрешения Nikon DXM1200F, подключенной к ПК, оснащенный программным обеспечением NIS Elements для получения и архивирования изображений. Для плотности сосудов и морфометрического анализа оценивались три среза от каждого из четырех-пяти репрезентативных животных на группу лечения. В каждом срезе три неперекрывающихся поля выбирались случайным образом и оцифровывались при 20-кратном увеличении. Средняя измеренная площадь поперечного сечения составила 0,35 мм² на поле.

Дифференцировка макрофагов человека *in vitro*. Моноциты человека выделяли из крови с использованием CD14⁺ магнитных шариков (Miltenyi, San Diego, CA, США). Моноциты высевали в чашки размером 100 см в среду RPMI 1640 с добавлением 100 нг/мл М-CSF и культивировали в течение 7-8 дней для получения М0-макрофагов. Впоследствии клетки собирали с использованием ACCUTASE® и высевали в 6-луночные планшеты по 5×10⁵ клеток на лунку. В качестве контроля анализа выбранные лунки обрабатывали 100 нг/мл LPS или 20 нг/мл IL-4 в течение 48 часов для поляризации макрофагов до М1 и М2, соответственно. Культивирование М0-макрофагов продолжали в среде RPMI 1640. Плацентарные адгезивные клетки сокультивировали с М0-макрофагами в трансвеллах в соотношении 1:1. После обработки в течение 48 часов макрофаги собирали с использованием ACCUTASE® и анализировали с помощью проточной цитометрии в отношении средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD206, CD80 и HLA-I.

Проточная цитометрия. Все антитела для окрашивания для

проточной цитометрии приобретали у BD Biosciences (Biosciences, San Jose, CA, США). Макрофаги промывали буфером для промывки FACS (PBS с 2% FBS) и метили антителами путем инкубации при 4°C в течение 30 минут. Анализ с помощью проточной цитометрии проводили на FACS Canto II (BD Biosciences). Данные получали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения для проточной цитометрии FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, США).

Статистический анализ: Данные представляли в виде среднего значения $\pm$ SEM (стандартная погрешность среднего значения). Статистическую значимость определяли с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента во всех исследованиях *ex vivo*. P-значения $<0,05$ считались статистически значимыми. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями использовали для анализа различий между группами мышей *in vivo*. Когда наблюдались значимые эффекты, связанные с обработкой (ANOVA; $P < 0,05$), проводились последующие анализы парных наименее значимых различий (LSD).

Подготовка и анализ клеток дренирующих лимфатических узлов (dLN): В экспериментах с односторонней HLI, выполненных на мышах db/db, паховые dLN собирали через 3, 7 или 14 дней после перевязки и разреза бедренной артерии. Суспензию отдельных клеток dLN получали путем механической диссоциации с использованием диссоциатора OctoMACS (Miltenyi, San Diego, CA, США) на основе инструкций производителя. Для измерения экспрессии генов и продукции цитокинов клетки dLN стимулировали в неполной RPMI с помощью PMA/иономицина (eBiosciences, San Diego, CA, США) в течение 2 и 24 часов, соответственно. Супернатанты анализировали с использованием панели магнитных шариков с цитокинами/хемокинами MAP мыши Millipore (MCCYTMAg-70K-PX32).

Количественный ПЦР-анализ. Для экспрессии генов, анализ экспрессии индивидуальных генов Taqman у мыши использовали для Gata3, Tbet (Applied Biosystems). Относительную экспрессию генов нормализовали с использованием экспрессии GAPDH, а кратное

изменение рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Трансплантация клеток дренирующих лимфатических узлов в случае модели HLI на мышях db/db. В экспериментах по трансплантации клеток dLN, HLI совершали путем односторонней перевязки и разреза бедренной артерии в правой задней конечности мышей db/db, и животным вводили носитель, HDF (5×10^4 клеток) или плацентарные адгезивные клетки (5×10^4 клеток) через 24 часа после HLI. Через четырнадцать дней после введения животных умерщвляли и у этих животных-доноров выделяли паховые dLN. Клетки dLN (1×10^6 клеток/животное) вводили внутримышечно мышам-реципиентам, подвергнутым односторонней HLI 24 часа назад. Кровоток измеряли с помощью лазерного доплеровского флоурометра, а плотность CD31+ или α SMA+ сосудов определяли с помощью иммуногистохимии.

6.4.2 Результаты

CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки улучшают перфузию крови и образование коллатеральных сосудов.

У мышей, которым вводили носитель, кровоток в поврежденной конечности резко падал ниже 10% после HLI и восстанавливался приблизительно до 20% и 35% к дню 14 и 42, соответственно. Лечение плацентарными адгезивными клетками значительно улучшило кровоток по сравнению с носителем к дню 28 (фиг. 9А). Клетки фибробластов кожи человека (HDF), используемые в качестве контроля линии клеток человека, не улучшали кровоток ни в одном из исследованных моментов времени по сравнению с носителем, что позволяет предположить, что индуцированный плацентарными адгезивными клетками ангиогенез не был вызван регенерацией, вызванной неспецифической реакцией на ксеногенный материал. Рентгенография также показала, что у животных, получавших плацентарные адгезивные клетки, было большее число кровеносных сосудов, чем у животных, которым вводили носитель или HDF (фиг. 9В).

Гистологический анализ мышц верхней конечности (четырехглавой мышцы и приводящих мышц) в день 42 показал, что плацентарные адгезивные клетки значительно увеличивали число позитивных по альфа-актину гладких мышц (α SMA) кровеносных

сосудов по сравнению с носителем и HDF (фиг. 9C)). Анализ распределения α SMA⁺ сосудов по размерам показал, что плацентарные адгезивные клетки увеличивали не только число мелких сосудов (<100 мкм), но и крупных сосудов (100–300 мкм и >300 мкм) (фиг. 9D). Чтобы лучше понять зависимость от времени лечения плацентарными адгезивными клетками и развития коллатеральных кровеносных сосудов, мышцы верхней конечности от дня 3, 14 и 42 были гистологически исследованы на α SMA и эндотелиальный маркер CD31. В день 3 не было различий в плотности CD31⁺ или α SMA⁺ сосудов между животными, которым вводили плацентарные адгезивные клетки, и животными, которым вводили носитель. Однако плацентарные адгезивные клетки увеличивали плотность CD31⁺ или α SMA⁺ сосудов приблизительно в три раза больше, чем у животных, получавших носитель, к дню 14 и 42 (фиг. 9E–F). Кроме того, плацентарные адгезивные клетки увеличивали количество мышечных волокон с расположенными в центре ядрами – отличительной чертой регенерирующего мышечного волокна – в поврежденной конечности, что позволяет предположить, что лечение плацентарными адгезивными клетками не только привело к улучшению перфузии крови, но и к усилению регенерации мышц.

CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки модулируют дифференцировку макрофагов в сторону фенотипа M2

Чтобы понять, может ли усиливаемый плацентарными адгезивными клетками ангиогенез быть связан с модуляцией компонентов иммунного ответа во время ишемического повреждения, анализировали фенотип и плотность в ткани всех инфильтрирующих макрофагов и M2-подобных макрофагов в ишемической ткани верхних конечностей мышей db/db по экспрессии в них CD68 и аргиназы 1 (Arg1), соответственно. Никаких значимых различий в количестве всех CD68⁺ макрофагов не было обнаружено у животных, которым вводили плацентарные адгезивные клетки или которым вводили носитель, в день 7. Количество CD68⁺ макрофагов резко уменьшалось с $104 \pm 20,4/\text{мм}^2$ в день 7 до $8 \pm 2,3/\text{мм}^2$ к дню 14 у животных, получавших носитель, тогда как значительно большее количество ($46 \pm 8,3/\text{мм}^2$) CD68⁺ макрофагов было сохранено в день 14 у

животных, получавших плацентарные адгезивные клетки (фиг. 10A). Более того, лечение плацентарными адгезивными клетками значительно увеличивало плотность CD68⁺ Arg1⁺ M2-подобных макрофагов к дню и 7, и 14 по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (фиг. 10B).

Была проанализирована способность плацентарных адгезивных клеток к стимуляции дифференцировки макрофагов человека в сторону фенотипа M2 *in vitro*. M0-макрофаги, полученные из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), культивировали с плацентарными адгезивными клетками в планшетах с трансвеллами в течение 48 часов. После сокультивирования с плацентарными адгезивными клетками M0-макрофаги продемонстрировали значительное увеличение экспрессии CD206, сходное с тем, что было обнаружено в IL-4-индуцированных M2-макрофагах (фиг. 10C). Кроме того, экспрессия HLA-I (фиг. 10D) и CD80 (фиг. 10E) также была схожа с таковой у IL-4-индуцированных M2-макрофагов, и значительно ниже уровней, чем те, которые были обнаружены в LPS-индуцированных M1-макрофагах (фиг. 10D-E).

T-клетки играют важную роль в опосредуемом CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными адгезивными клетками ангиогенезе и модуляции макрофагов в сторону фенотипа M2.

Для оценки роли T-клеток в результатах, наблюдаемых выше, исследовали ангиогенные эффекты плацентарных адгезивных клеток у мышей Balb/c дикого типа и голых мышей, подвергнутых односторонней HLI. Плацентарные адгезивные клетки значительно увеличивали кровоток у мышей дикого типа к дню 28; однако кровоток не был улучшен плацентарными адгезивными клетками у голых мышей (фиг. 11). Гистологический анализ подтвердил, что плацентарные адгезивные клетки были неспособны увеличить плотность CD31⁺ (фиг. 11B) или α SMA⁺ (фиг. 11C) кровеносных сосудов по сравнению с носителем у голых мышей. С целью дополнительного подтверждения потребности в T-клетках в опосредуемом плацентарными клетками ангиогенезе, была оценена эффективность плацентарных адгезивных клеток в модели HLI у мышей с восстановленными T-клетками. Лазерный доплеровский

анализ показал, что плацентарные адгезивные клетки значительно усиливали кровоток с дня 21 по день 35 у этих животных (фиг. 11D), что указывает на то, что восстановление Т-клеток восстанавливало эффективность плацентарных адгезивных клеток у голых мышей. Кроме того, лечение плацентарными адгезивными клетками значительно увеличивало количество CD68⁺ Arg1⁺ M2-подобных макрофагов через 7 дней после HLI по сравнению с носителем у мышей дикого типа и у голых мышей с восстановленными Т-клетками, но не оказывала эффект у голых мышей (фиг. 12A и 12B).

Дополнительные эксперименты были выполнены для идентификации соответствующих биомаркеров эффекты плацентарных адгезивных клеток на ответ функциональных Т-клеток путем анализа изменений в фенотипе функциональных Т-клеток в лимфатических узлах, дренирующих ишемическую ткань, после лечения плацентарными адгезивными клетками. Вкратце, данные продемонстрировали, что лечение плацентарными адгезивными клетками связано с индукцией цитокинов и характерной экспрессии генов ответа типа Th2, и результирующие клетки дренирующих лимфатических узлов повторяли проартериогенные эффекты плацентарных адгезивных клеток после внутримышечного введения в модели HLI.

В целом, эти данные указывают на то, что Т-клетки важны для артериогенеза, опосредуемого плацентарными адгезивными клетками, и индуцируемой плацентарными адгезивными клетками дифференцировки M2-макрофагов в ишемической ткани, что коррелирует с индукцией проартериогенного фенотипа у лимфоцитов и биомаркеров ответа типа Th2.

Лечение CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарными адгезивными клетками приводит в действие системный артериогенез

Эти данные показывают, что иммуномодуляция Т-клеток и макрофагов является ключевым механизмом, лежащим в основе опосредуемого плацентарными адгезивными клетками артериогенеза. Чтобы оценить, могут ли плацентарные адгезивные клетки оказывать системные артериогенные эффекты через сдвиг в сторону M2-макрофагов в ответ на ишемическое повреждение, была разработана

модель двусторонней HLI, в которой была вершена вторая HLI в контралатеральной задней конечности через 23 дня после первого повреждения HLI и через 21 день после инъекции клеток в первую поврежденную заднюю конечность. Выбор времени для второй HLI позволил обеспечить достаточное, но неполное восстановление первой поврежденной конечности и обеспечил то, что плацентарные адгезивные клетки больше не присутствовали у животного, исходя из ранее определенной продолжительности персистенции клеток *in vivo* (Francki et al. 2015).

В первой поврежденной конечности плацентарные адгезивные клетки, инъецированные через 48 часов после хирургического вмешательства, значительно увеличивали кровоток с дня 14 по день 64 по сравнению с носителем. Удивительно, но эти животные также продемонстрировали значительно улучшенный кровоток при втором контралатеральном повреждении с дня 35 (через 14 дней после второй HLI) до дня 64 дня, хотя степень восстановления кровотока была меньше, чем в первой поврежденной конечности (фиг. 13A). Ангиография подтвердила, что плацентарные адгезивные клетки увеличивали число кровеносных сосудов в обеих поврежденных конечностях (фиг. 13B-D). Гистологический анализ показал, что плацентарные адгезивные клетки увеличивали плотность CD31⁺, α SMA⁺ кровеносных сосудов и α SMA⁺ крупных сосудов (фиг. 13E-G соответственно) в ишемической ткани обеих поврежденных конечностей. Также сравнивалась артериогенная эффективность плацентарных адгезивных клеток по сравнению с VEGF в модели двусторонней HLI. Введение клеток значительно увеличивало кровоток и ангиографическую оценку в обеих поврежденных конечностях, тогда как эффект VEGF ограничивался первой поврежденной конечностью, в которую он был введен (фиг. 13H-I). Уровень CD68⁺ Arg1⁺ M2-подобных макрофагов был значительно выше во второй поврежденной конечности через 7 дней после HLI у животных, подвергнутых лечению плацентарными адгезивными клетками, по сравнению с животными, получавшими носитель или VEGF (фиг. 13 J), что указывает на то, что ангиогенез во второй поврежденной конечности имеет те же механизмы, что и в

первой поврежденной конечности.

6.5 Пример 5: Плацентарные адгезивные клетки индуцируют лимфангиогенез

LYVE-1 (рецептор 1 гиалуронана эндотелия лимфатических сосудов) представляет собой белок, характерный для лимфатических сосудов, который можно использовать для различения лимфатических сосудов и кровеносных сосудов. Мышей db/db подвергали HLI, как описано выше, и через 24 часа им инъецировали в ипсилатеральную заднюю конечность приблизительно 50000 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ плацентарных адгезивных клеток или носитель. Паховые дренирующие лимфатические узлы собирали в дни 3 и 14 для иммуногистохимического исследования. У мышей, получавших плацентарные адгезивные клетки, наблюдалось увеличение экспрессии LYVE-1 в дренирующих лимфатических узлах по сравнению с мышами, получавшими носитель, что указывает на увеличение активности эндотелиальных клеток и лимфангиогенеза.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными здесь. Действительно, различные модификации объекта изобретения, представленного здесь, в дополнение к описанным, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих чертежей. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Здесь цитируются различные публикации, патенты и заявки на патенты, раскрытия которых включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивидуума, имеющего лимфедему или заболевание или нарушение, вызванное лимфедемой, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества плацентарных адгезивных клеток, причем указанное терапевтически эффективное количество является количеством, достаточным для ослабления или уменьшения интенсивности одного или более симптомов или осложнений указанной лимфедемы или заболевания или нарушения вызванного лимфедемой, у указанного индивидуума по сравнению с индивидуумом до указанного введения.

2. Способ по п. 1, в котором указанные один или более симптомов или осложнений указанной лимфедемы или заболевания или нарушения, вызванного лимфедемой, представляют собой: отек части или всей одной или обеих ног, отек части или всей одной или обеих рук, тяжесть или стеснение в руке или ноге, безболезненный отек ноги или руки с возникновением ямок при надавливании, ограниченное движение или ощущение ограниченного движения в руке или ноге, боль или дискомфорт в руке или ноге, инфекцию в коже или под ней, целлюлит, лимфангит, лимфорею, эритему кожи пораженной руки или ноги, положительный признак Капоши-Штеммера или затвердевание и/или утолщение кожи пораженной руки или ноги.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором указанная лимфедема не вызвана или не связана с венозной недостаточностью, сердечной недостаточностью, апноэ во сне или почечной недостаточностью.

4. Способ по п. 1, в котором указанный один или более симптомов или осложнений указанной лимфедемы, или заболевания или нарушения, вызванного лимфедемой, представляет собой инфекцию.

5. Способ по п. 4, в котором указанная инфекция сопровождается импетиго.

6. Способ по п. 1, в котором указанным одним или более симптомов или последствий указанной лимфедемы или заболевания или расстройства, вызванного лимфедемой, является лимфедема нижних конечностей (*elephantiasis nostra verrucosa*).

7. Способ по любому из п.п. 1-6, в котором указанная лимфедема является лимфедемой в дополнение к лимфедеме.

8. Способ по любому из п.п. 1-7, в котором указанная лимфедема частично или полностью вызвана хирургическим вмешательством по поводу рака молочной железы.

9. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором указанная лимфедема является лимфедемой стадии 0.

10. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором указанная лимфедема является лимфедемой стадии 1.

11. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором указанная лимфедема является лимфедемой стадии 2.

12. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором указанная лимфедема является лимфедемой стадии 3.

13. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии.

14. Способ по п. 13, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки обладают способностью к дифференцировке в клетки, имеющие одну или более характеристик остеогенных или хондрогенных клеток.

15. Способ по п. 13, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A, B, C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺ и/или OCT-4⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии и/или ОТ-ПЦР.

16. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии.

17. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии.

18. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, и имеют одну или более дополнительных характеристик из CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺

или SH4⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии.

19. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ и CD200⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии.

20. Способ по п. 13, в котором указанные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ и CD200⁺ плацентарные адгезивные клетки имеют одну или более дополнительных характеристик из CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ или PDL1⁺ (позитивности по лиганду программируемой гибели клеток), или любую их комбинацию.

21. Способ по любому из п.п. 1-12, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, CD133⁻, CD200⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, или PDL1⁺ (позитивными по лиганду программируемой гибели клеток), что можно определить с помощью проточной цитометрии.

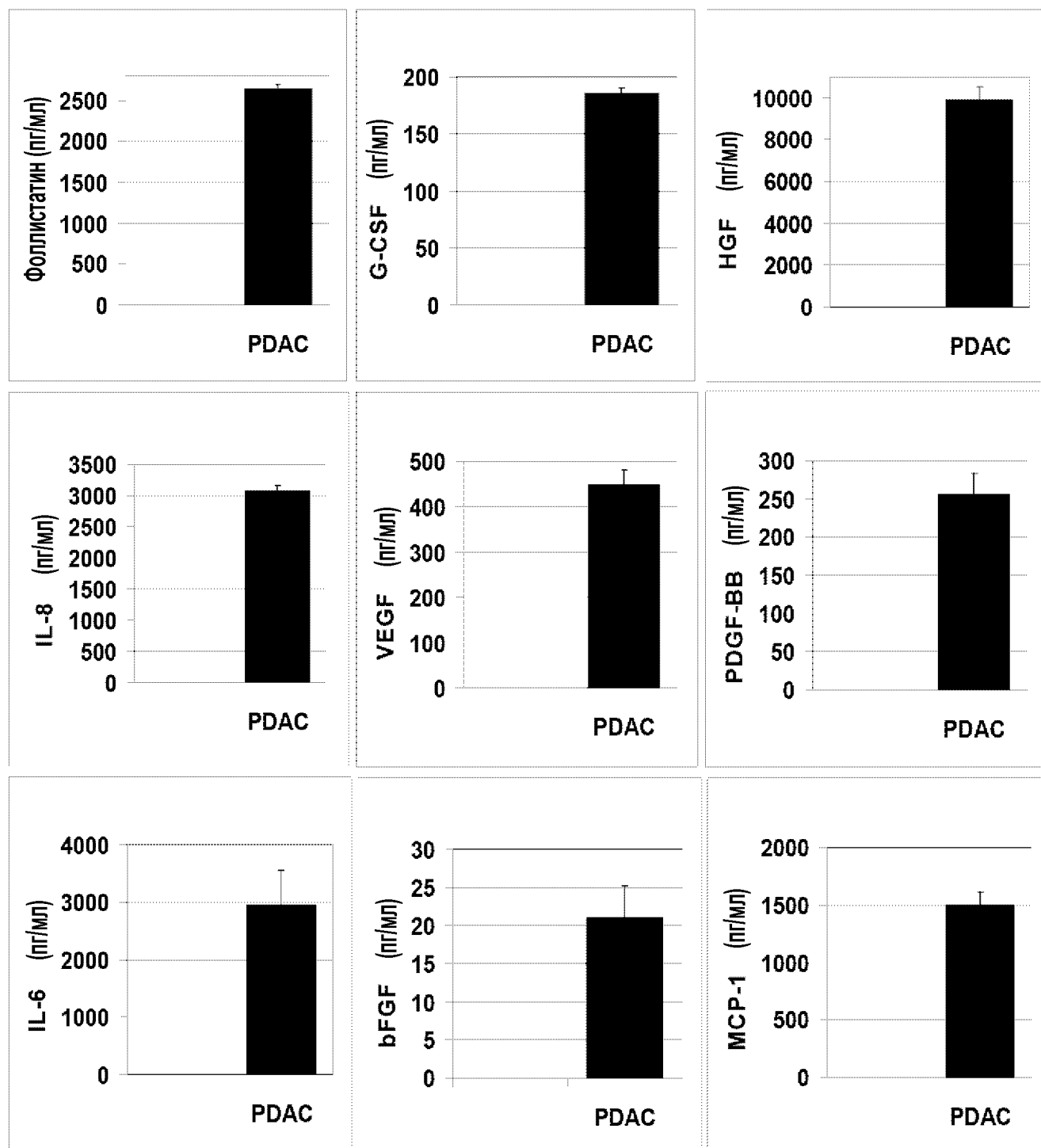
22. Способ по любому из п.п. 13-21, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, ABC-p⁺, что можно определить с помощью проточной цитометрии, или OCT-4⁺ (POU5F1⁺), что можно определить с помощью ОТ-ПЦР.

23. Способ по любому из п.п. 13-21, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки являются, кроме того, SSEA3⁻ или SSEA4⁻, что можно определить с помощью проточной цитометрии, где SSEA3 представляет собой стадиеспецифический эмбриональный антиген 3, а SSEA4 представляет собой стадиеспецифический эмбриональный антиген 4.

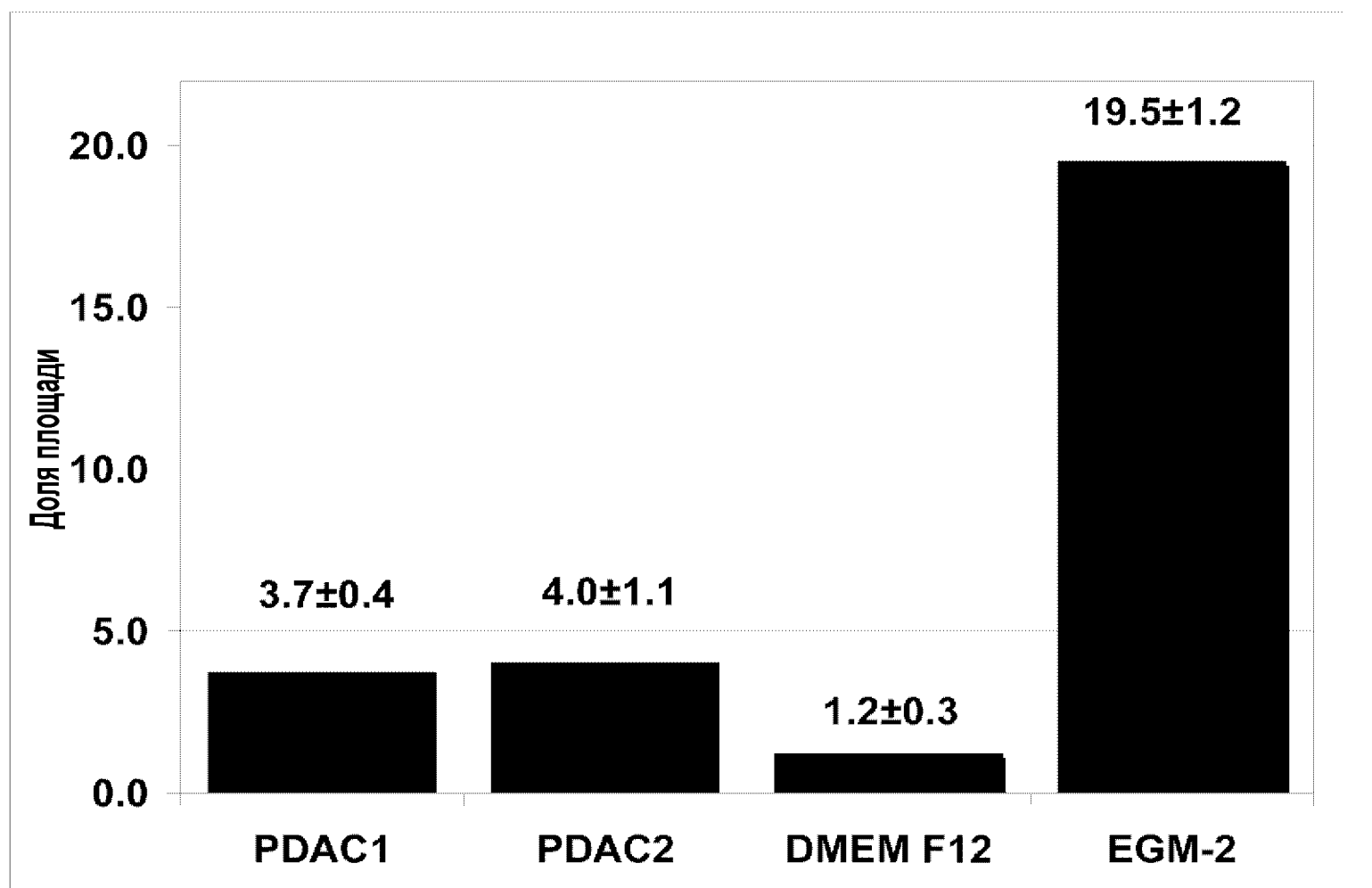
24. Способ по любому из п.п. 13-21, в котором указанные плацентарные адгезивные клетки экспрессируют один или более генов на заметно более высоком уровне, чем равное количество мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга, причем указанные один или более генов представляют собой один или более из ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5,

SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN и ZC3H12A, и причем указанные мезенхимные стволовые клетки, полученные из костного мозга, были подвергнуты числу пассажей в культуре, равному числу пассажей, которому были подвергнуты указанные выделенные плацентарные адгезивные клетки.

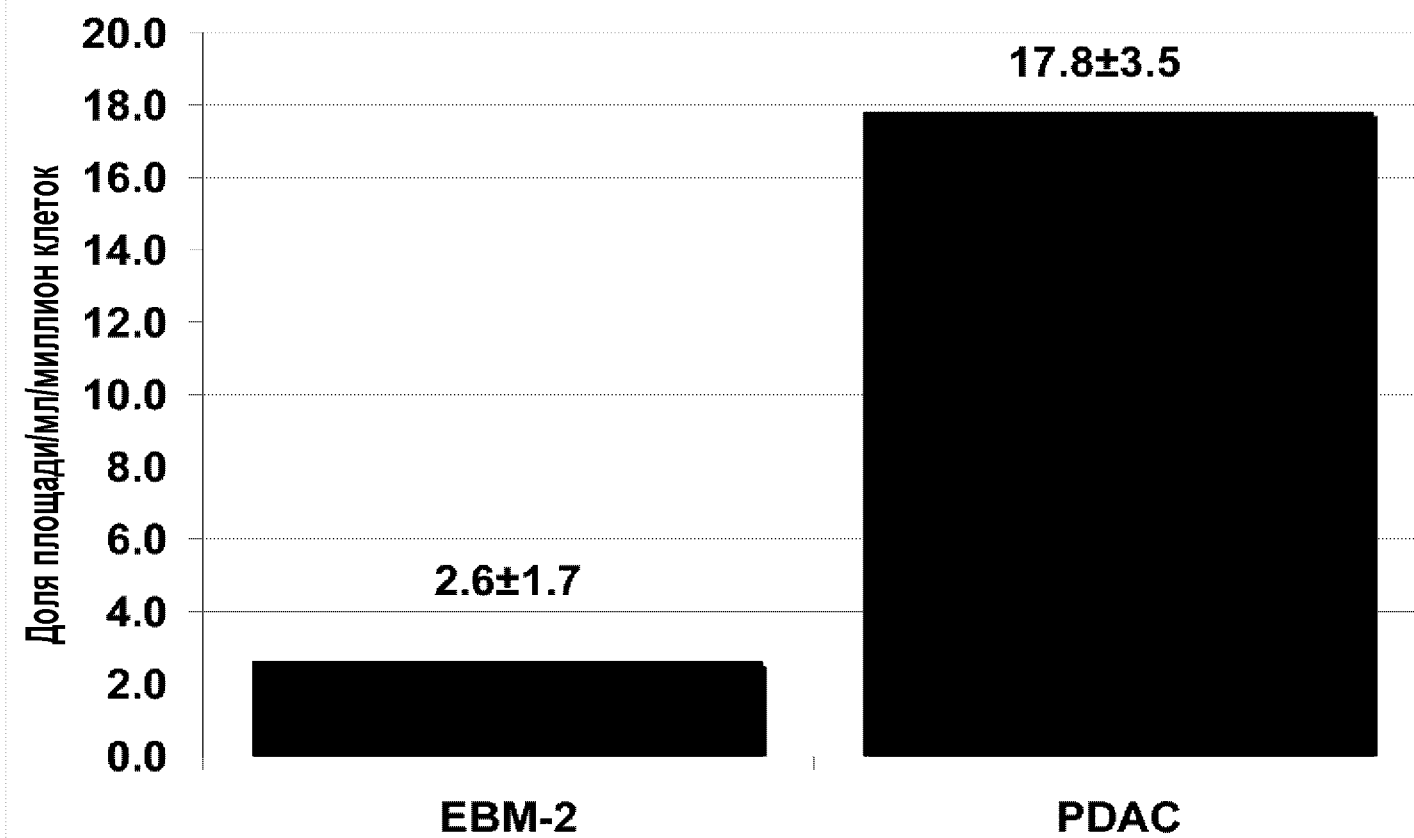
По доверенности



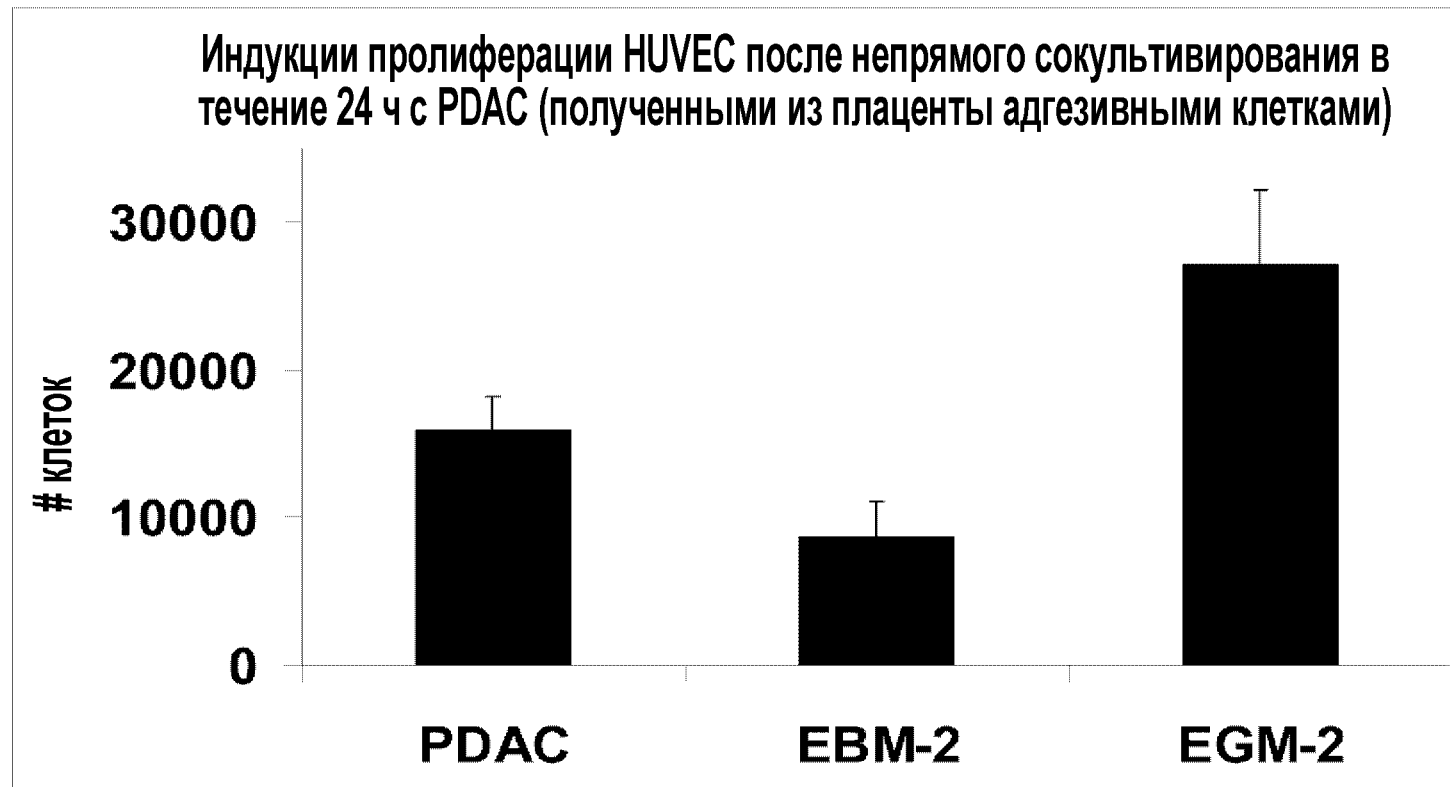
ФИГ. 1



ФИГ.2



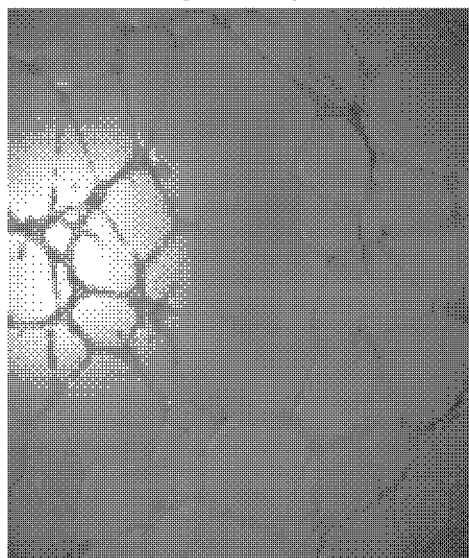
ФИГ.3



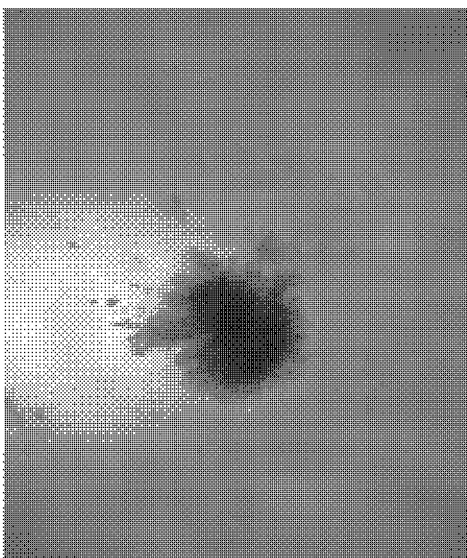
4/20

ФИГ. 4

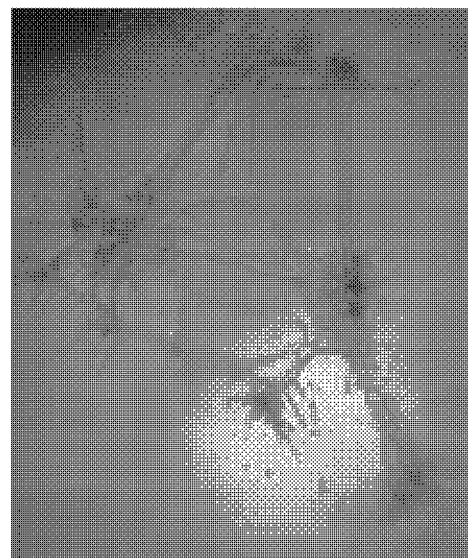
HUVEC



PDAC без VEGF

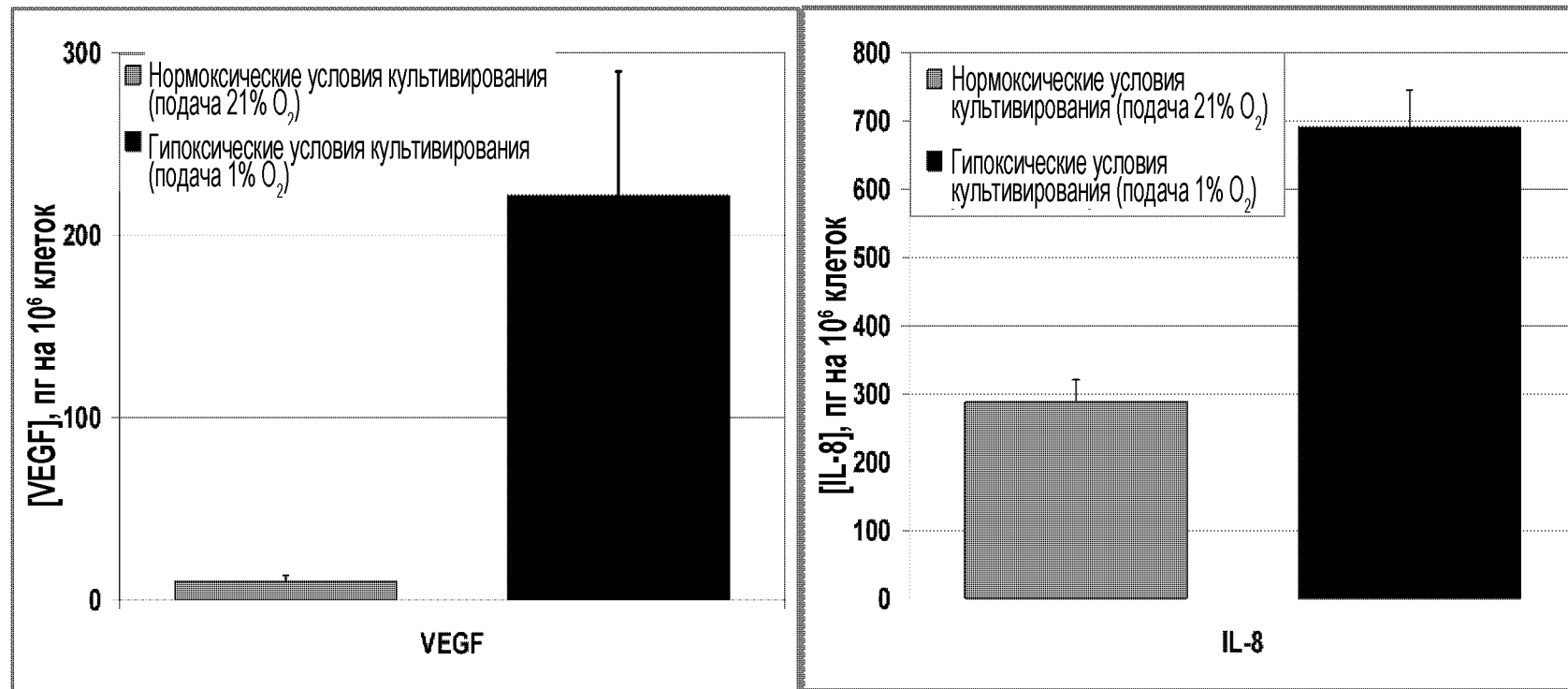


PDAC с VEGF

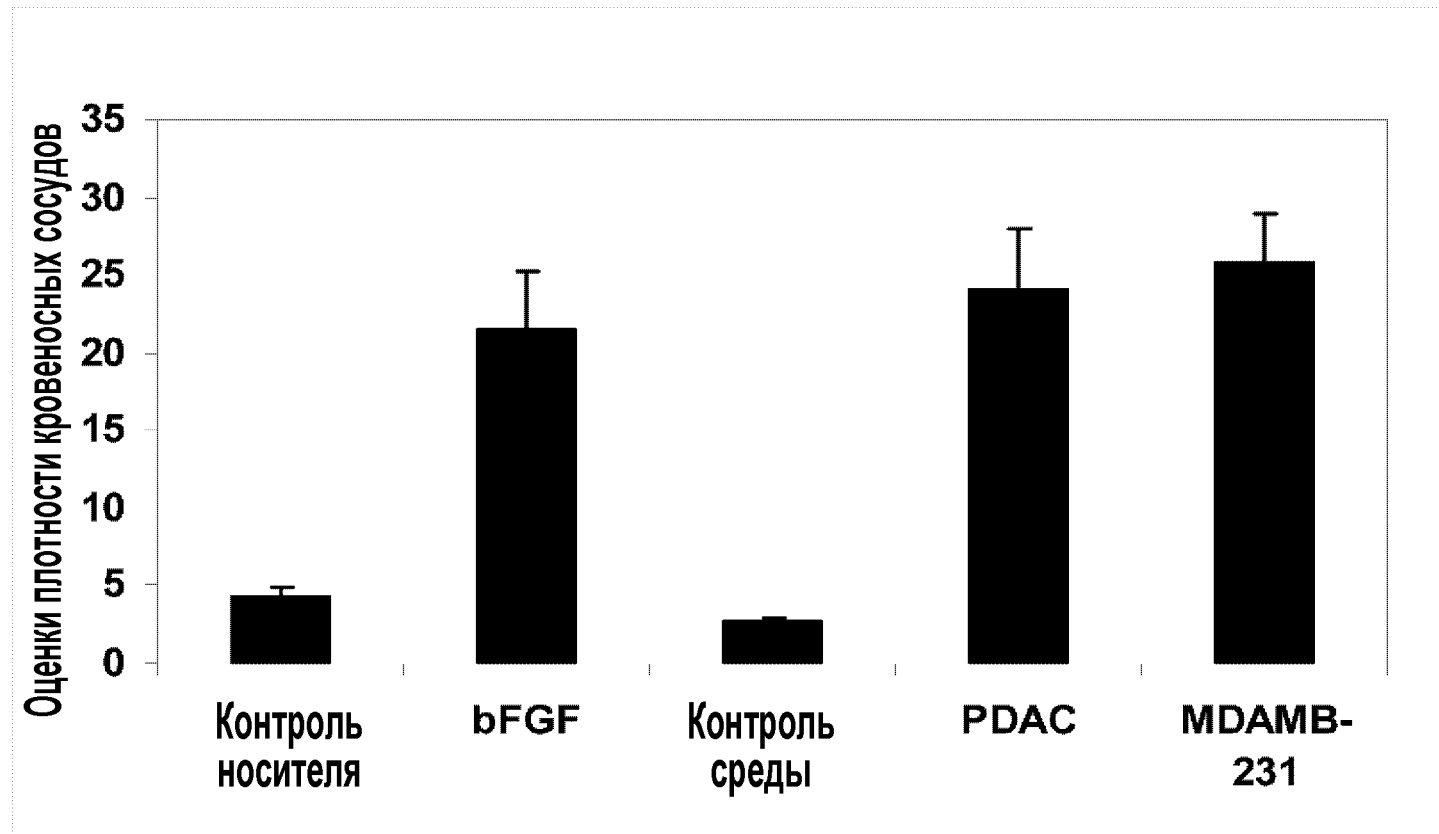


ФИГ. 5

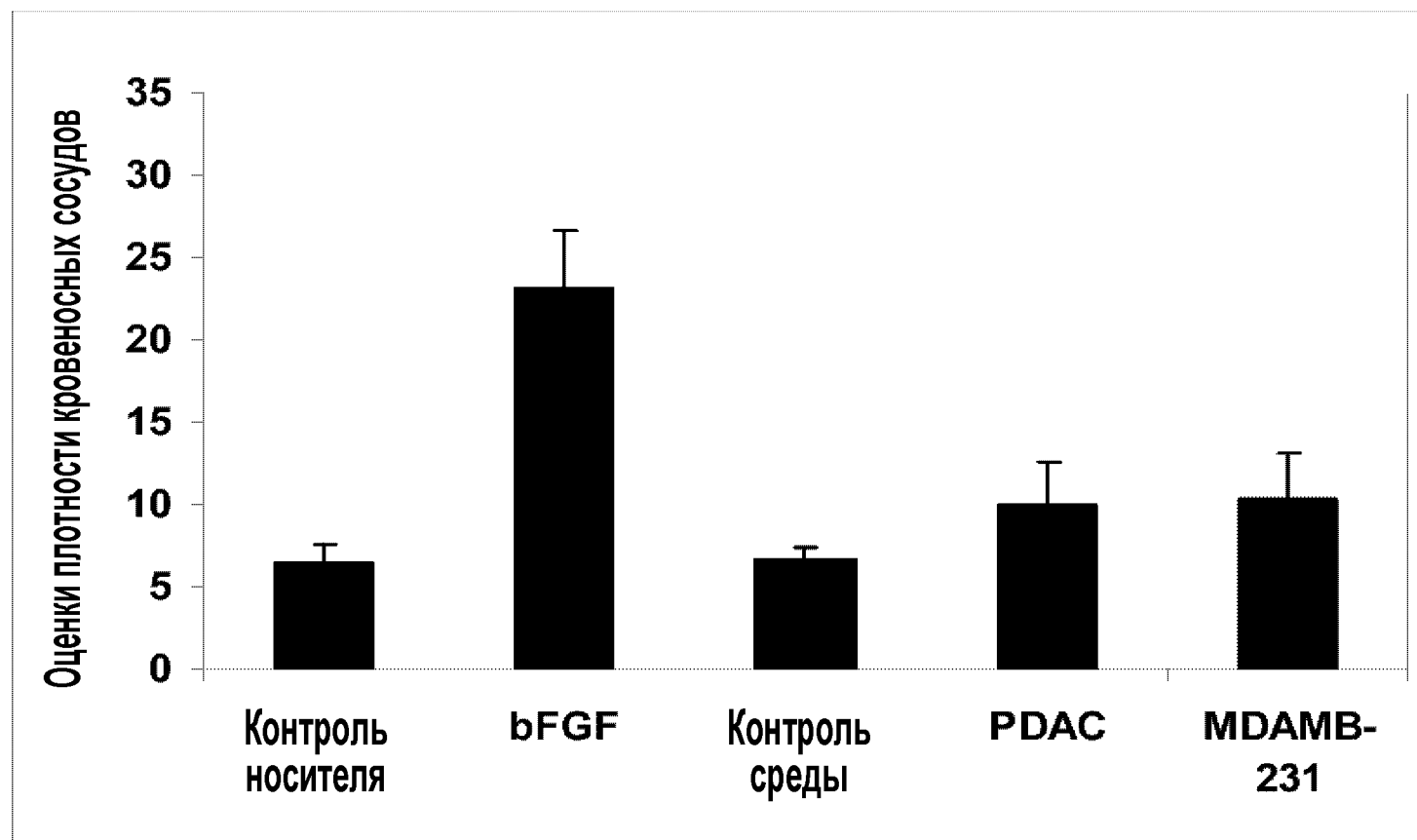
Профиль секреции в PDAC в условиях гипоксии PDAC



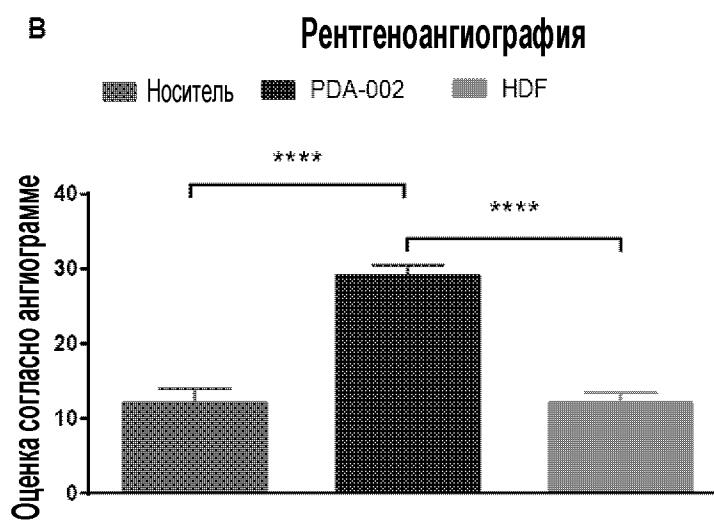
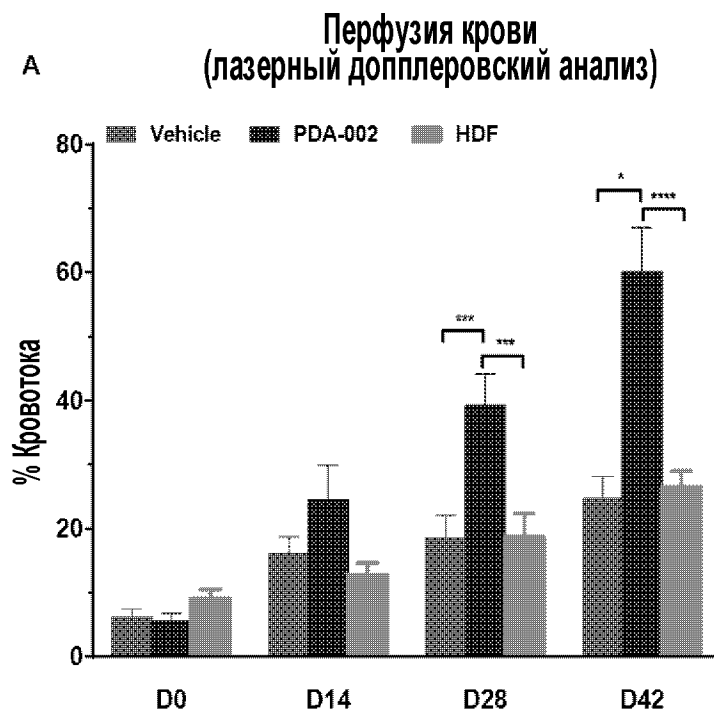
ФИГ. 6



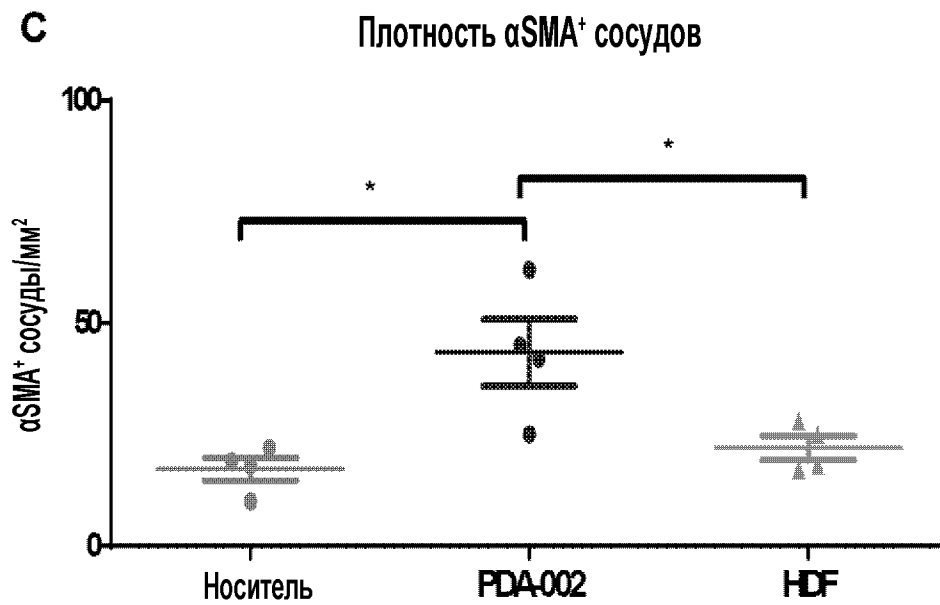
ФИГ.7



ФИГ. 8

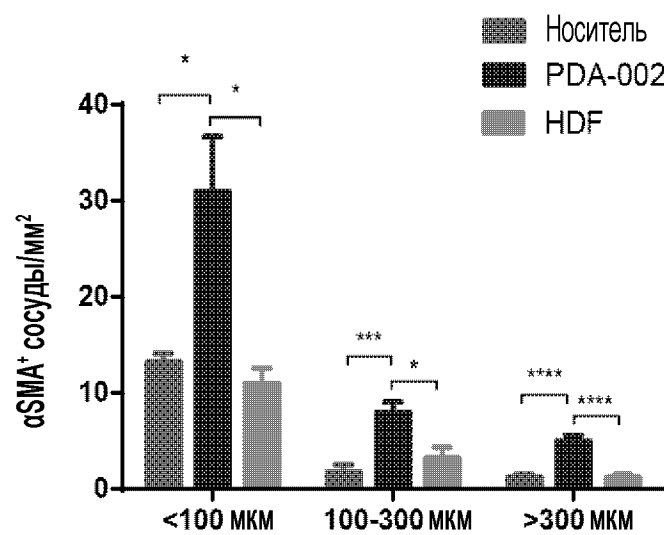


ФИГ. 9А-9В

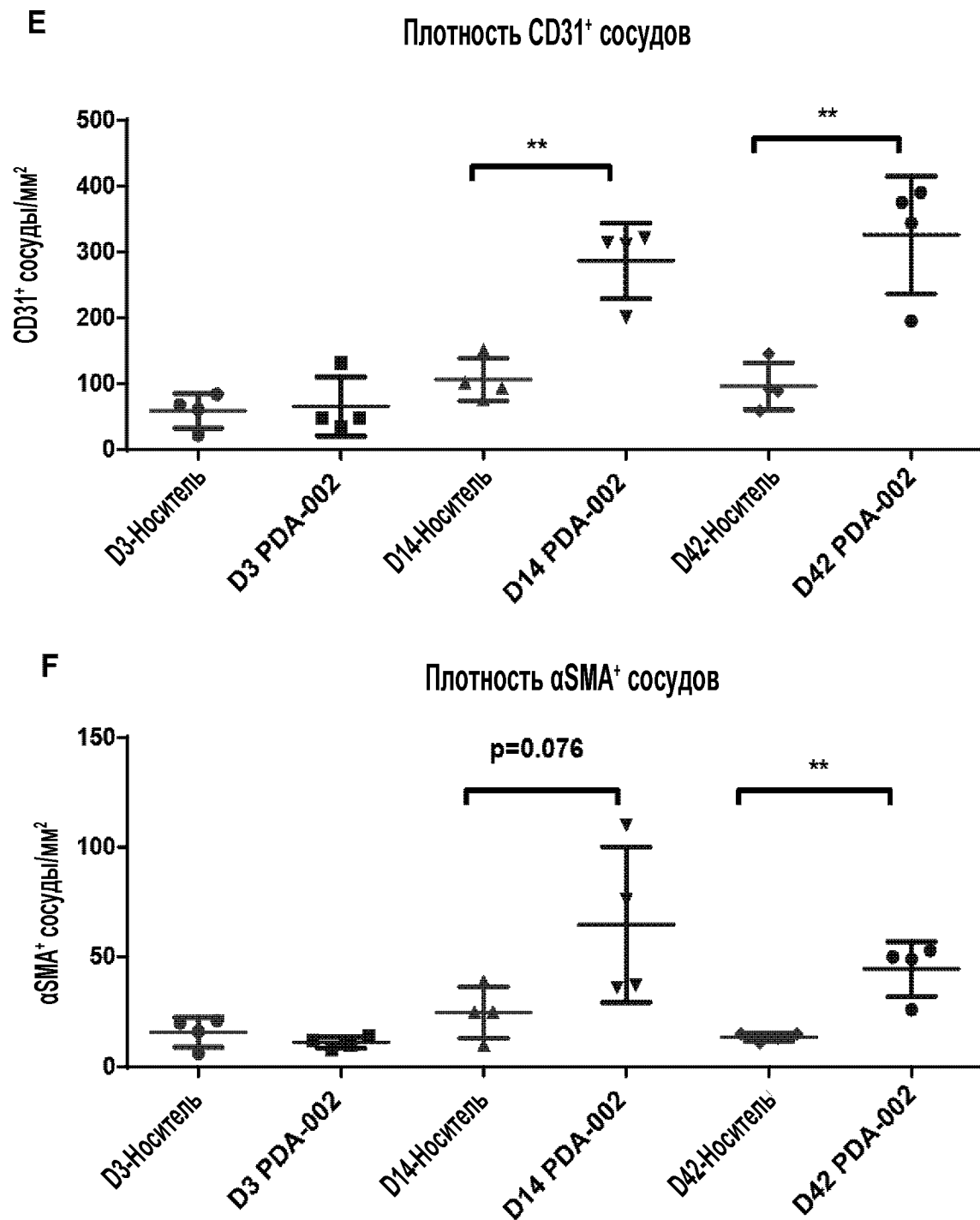


D

Распределение по размерам α SMA⁺ сосудов

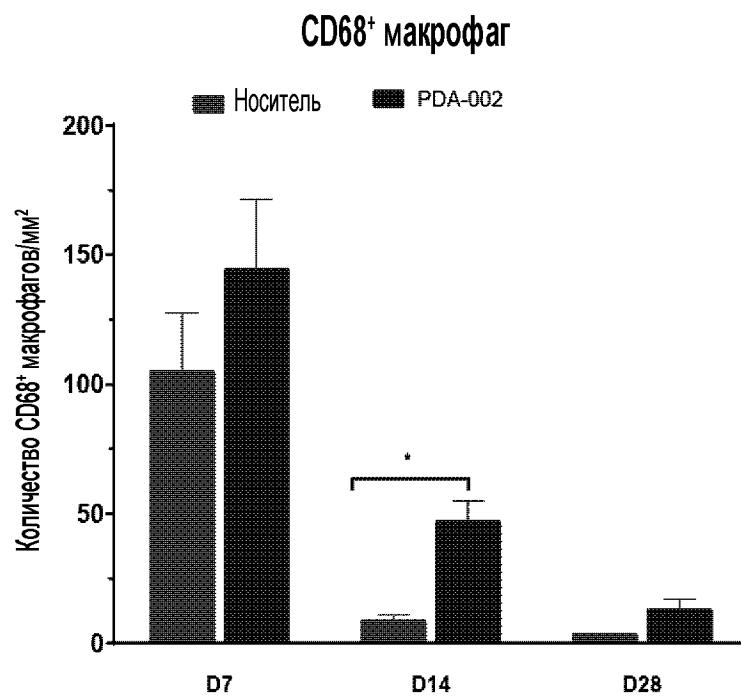


ФИГ. 9C-9D

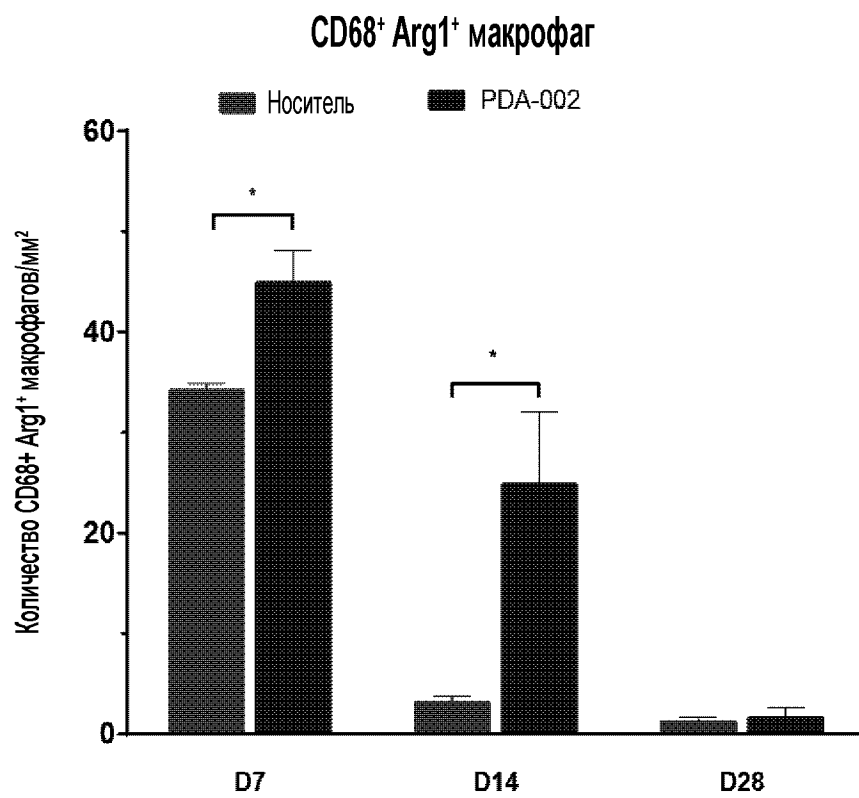


ФИГ. 9Е-9F

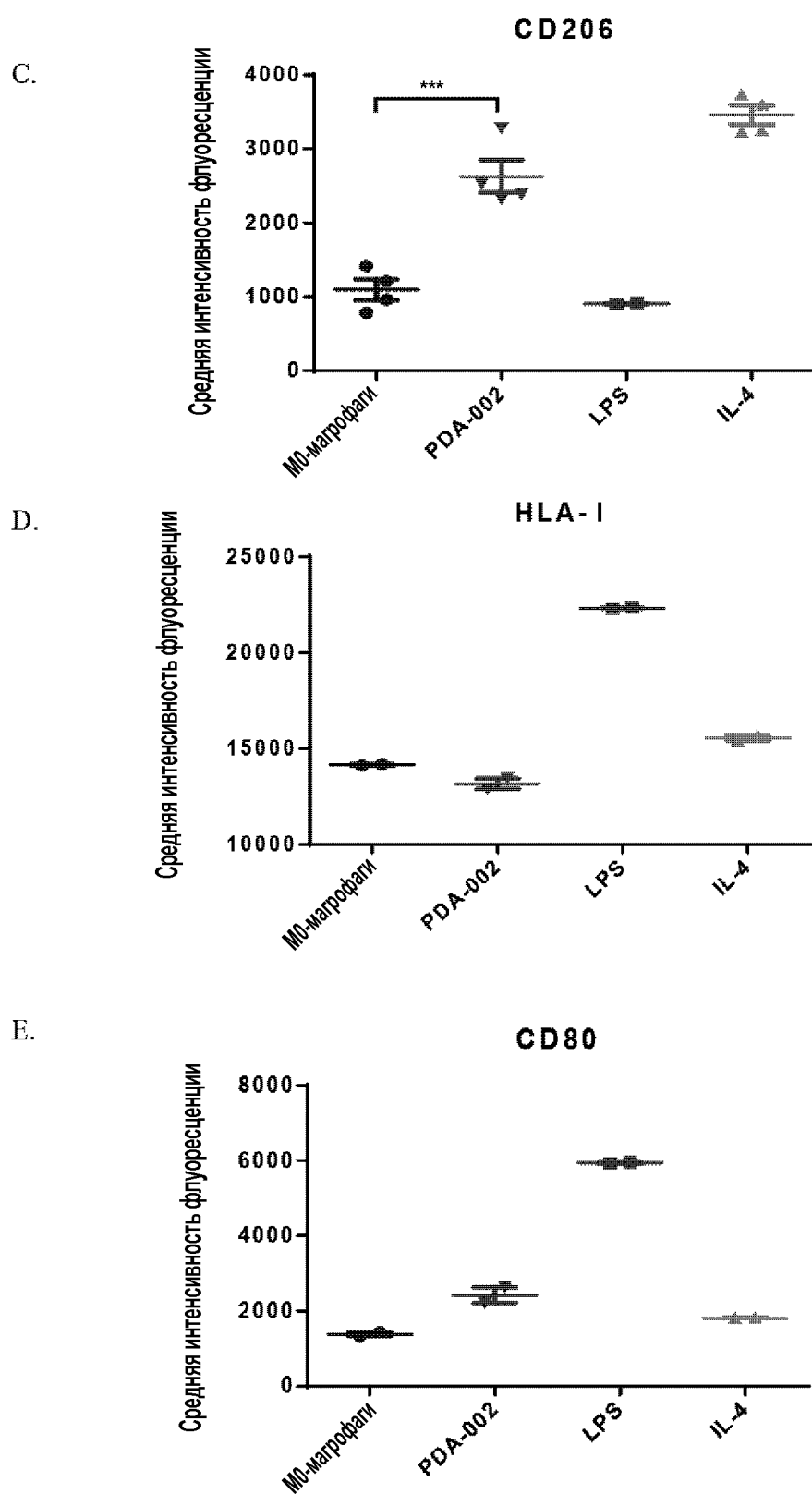
A.



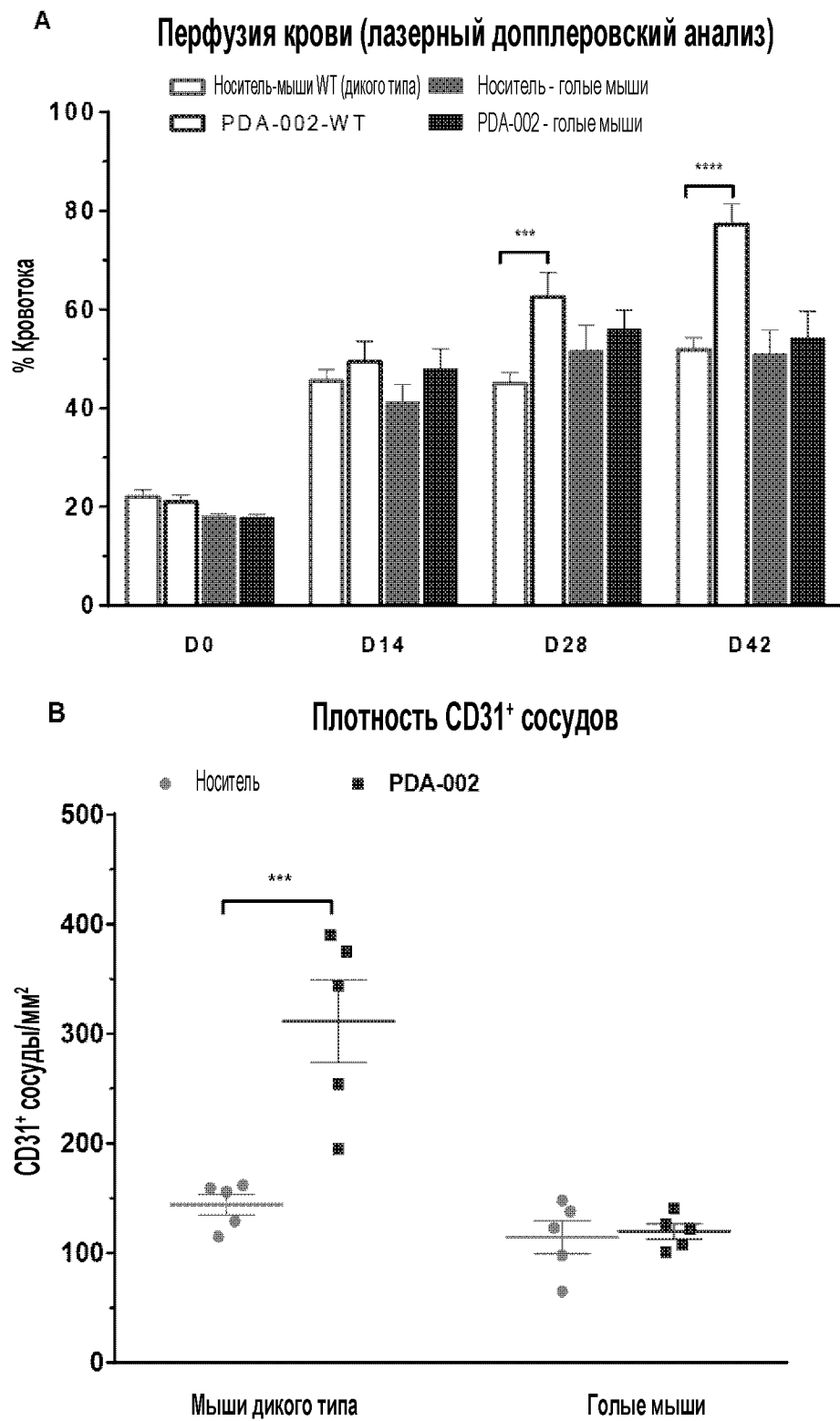
B.



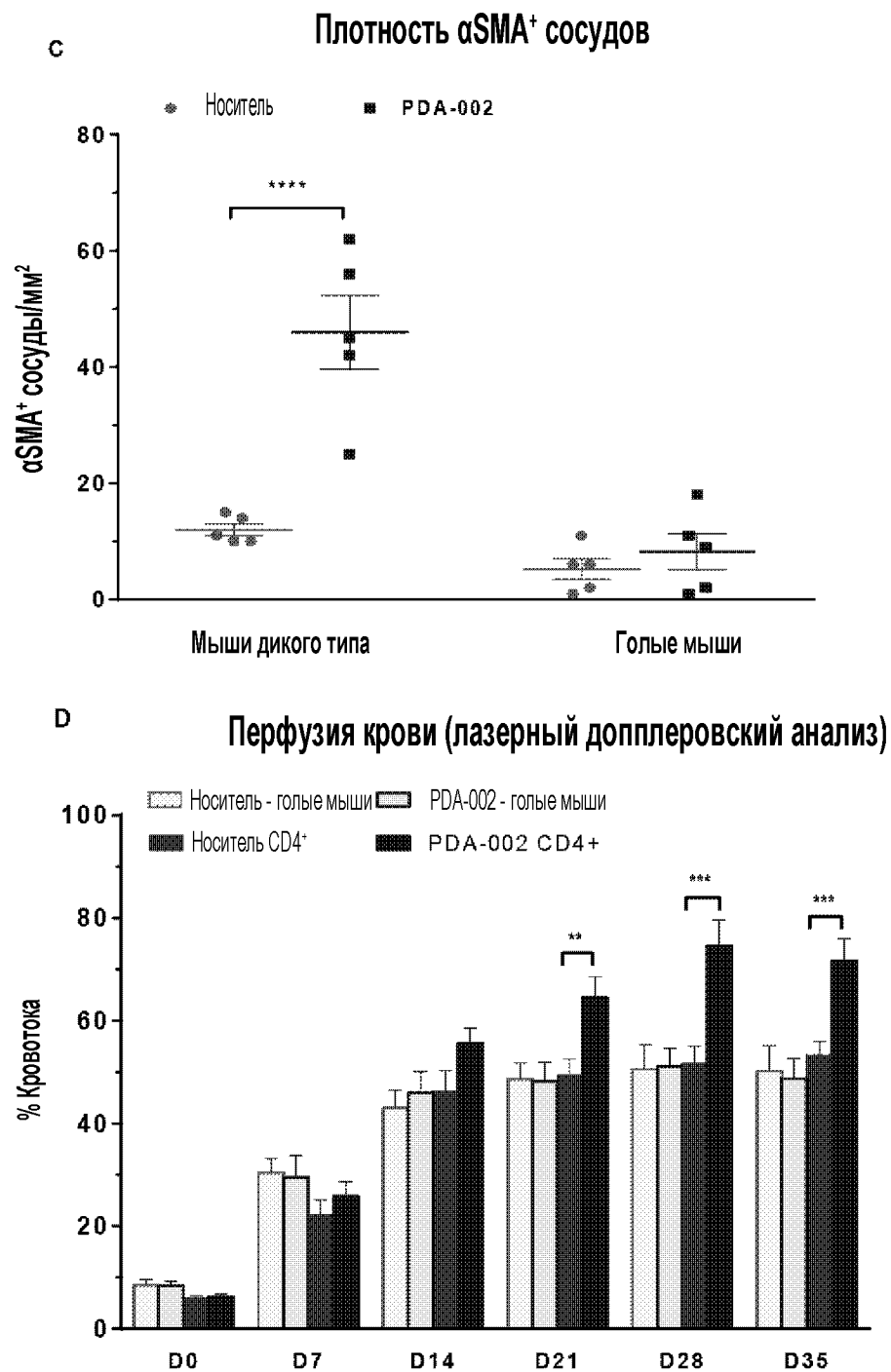
ФИГ. 10А-10В



ФИГ. 10С-10Е

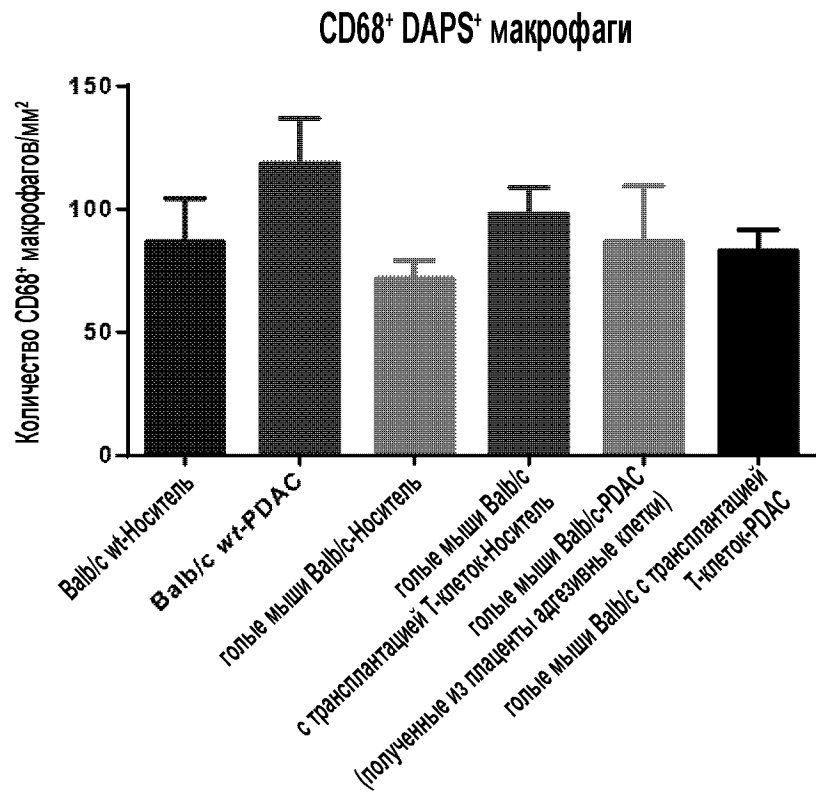


ФИГ. 11А-11В

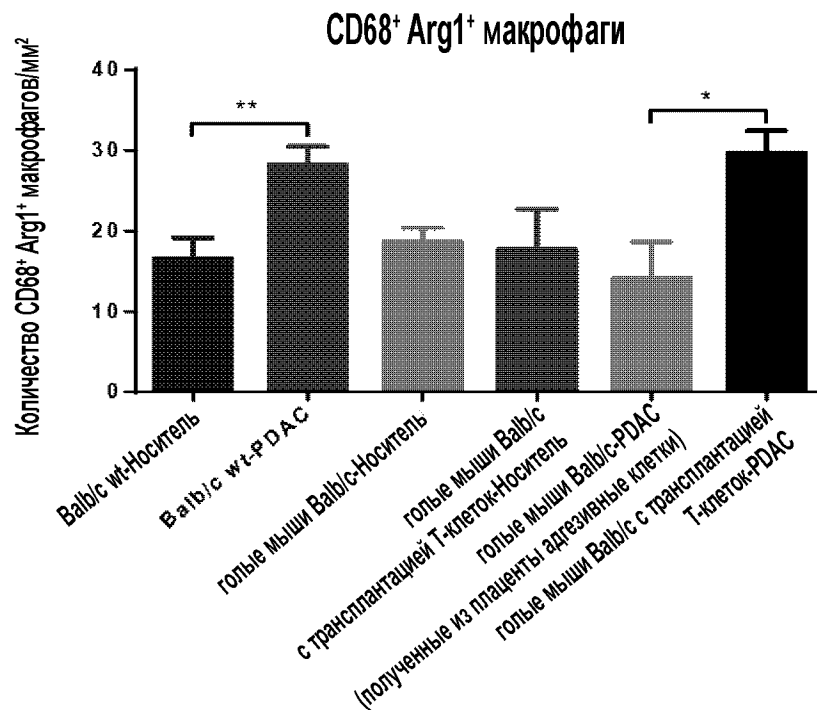


ФИГ. 11С-11D

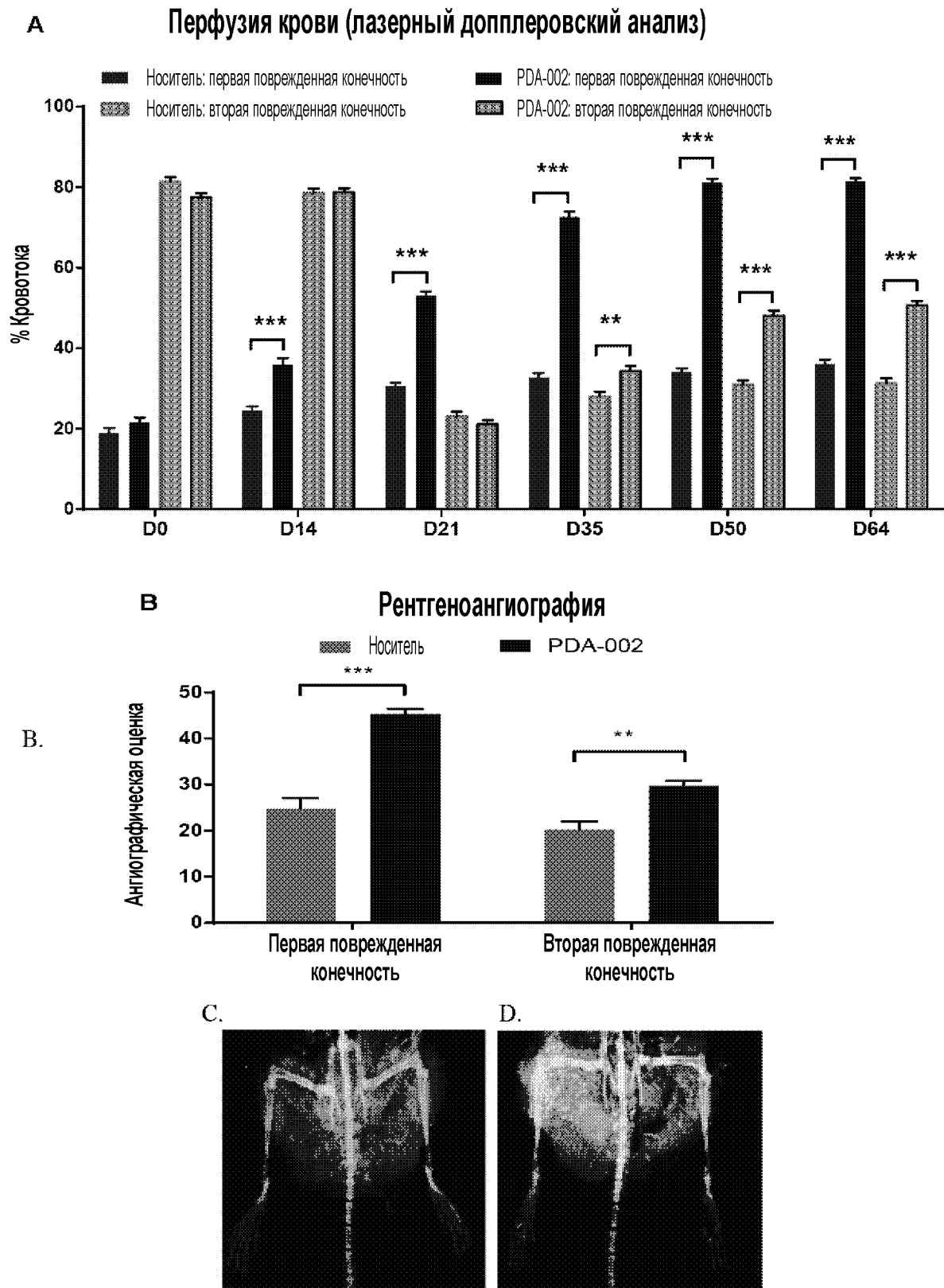
A.



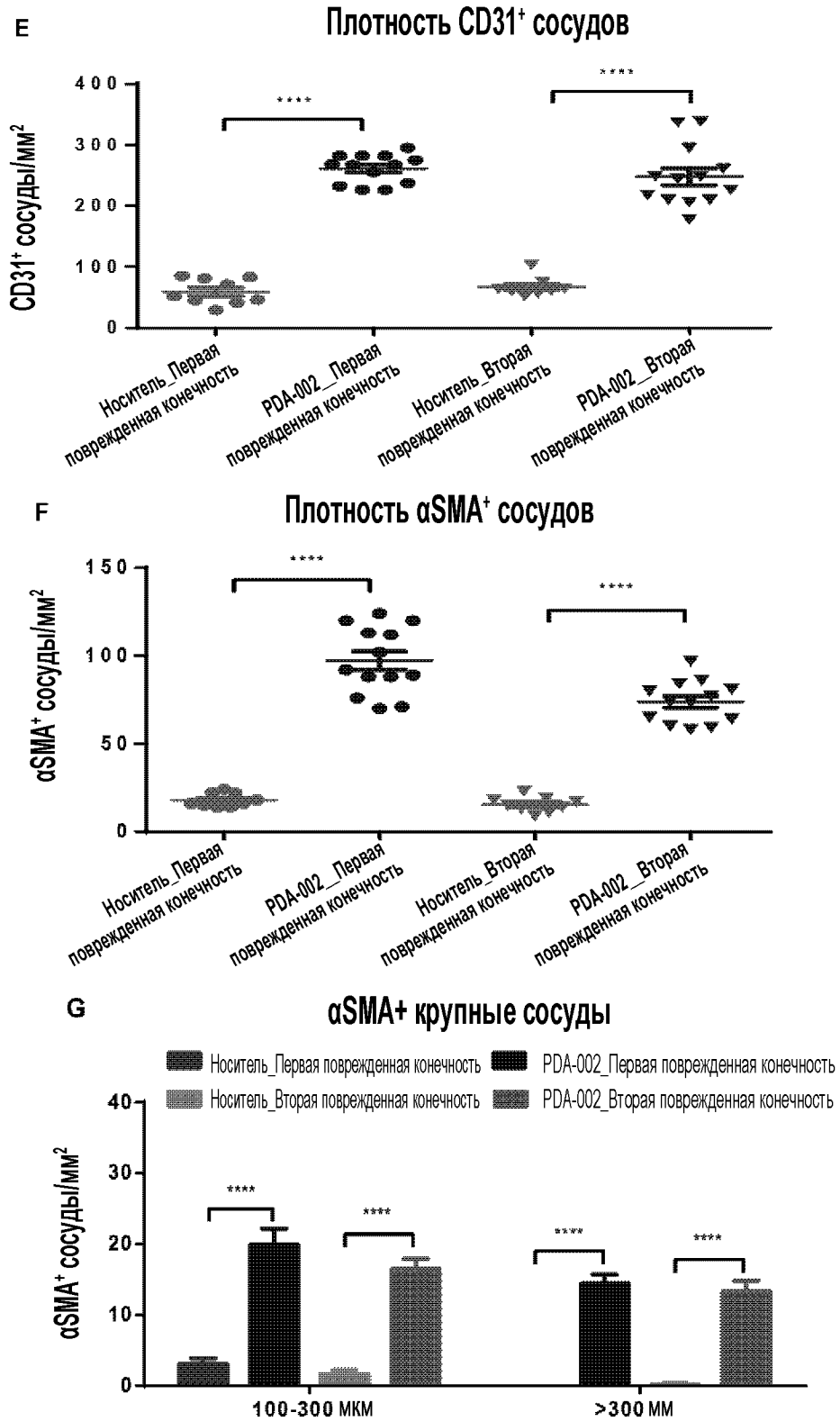
B.



ФИГ. 12А-12В

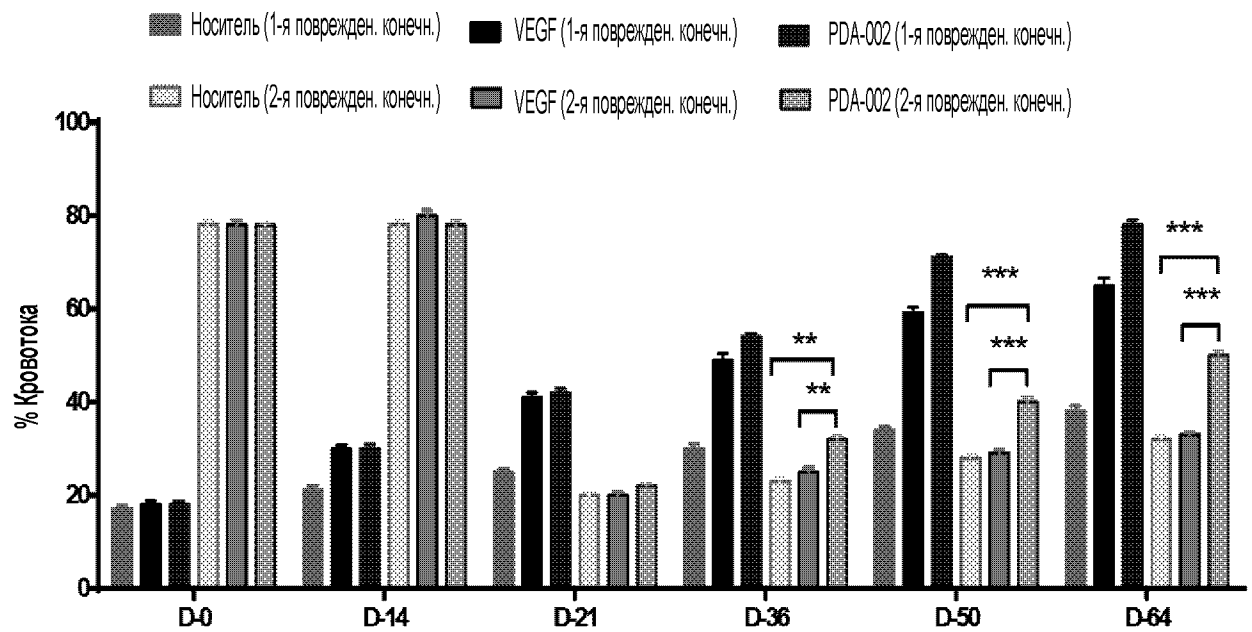


ФИГ. 13А-13Д

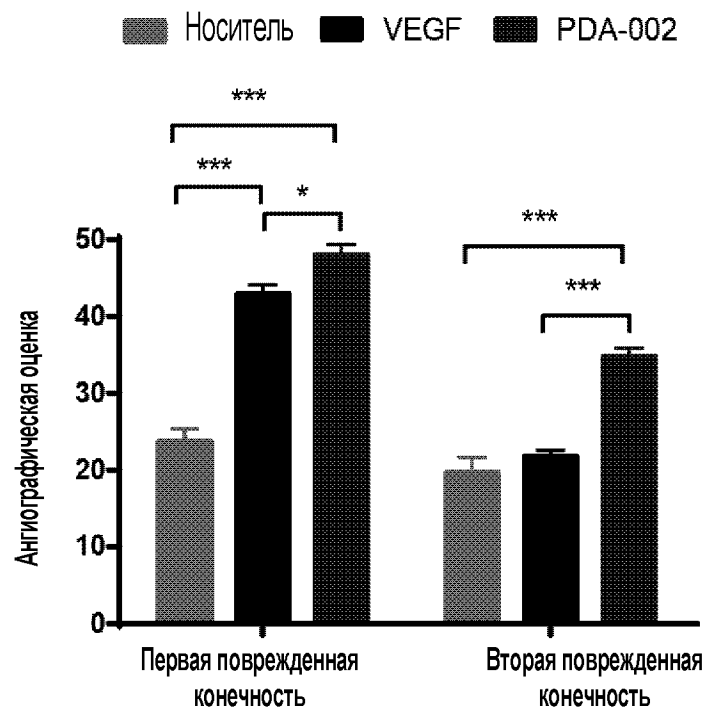


ФИГ. 13Е-13G

Н

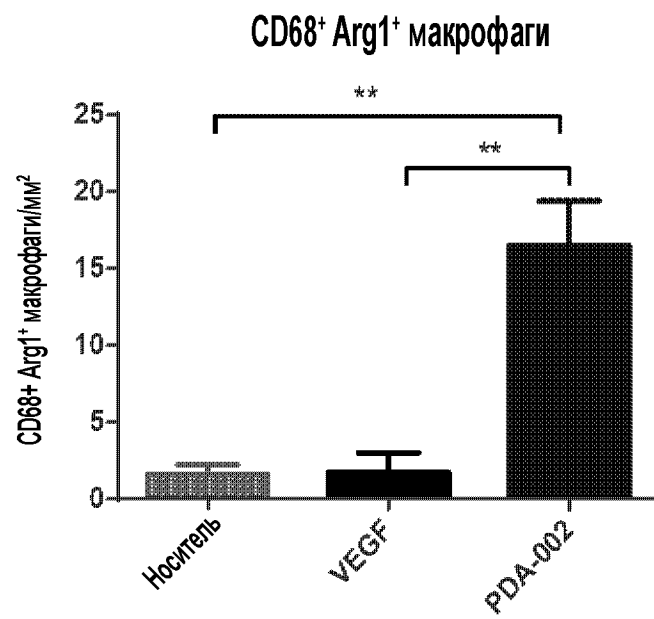


I



ФИГ. 13Н-13I

J



ФИГ. 13J