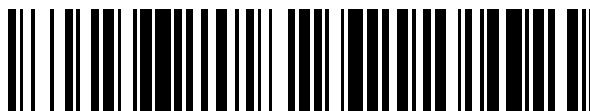


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 576**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013** **PCT/US2013/027288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013** **WO13126674**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13751855 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018** **EP 2816894**

54 Título: **Identificación de compuestos antitumorales usando placenta**

30 Prioridad:

23.02.2012 US 201261602524 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2018

73 Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
33 Technology Drive
Warren, NJ 07059, US

72 Inventor/es:

HARIRI, ROBERT J.;
BHATIA, MOHIT B. y
YE, QIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 576 T3

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

DESCRIPCIÓN

Identificación de compuestos antitumorales usando placenta

1. Campo

5 En la presente memoria se proporcionan métodos para evaluar compuestos antitumorales potenciales, y de este modo identificar compuestos antitumorales, usando placenta, o una porción de ella, y células tumorales, y composiciones para lograrlo.

2. Antecedentes

10 En la presente memoria se proporcionan métodos para evaluar compuestos antitumorales potenciales, y de este modo identificar compuestos antitumorales, usando placenta, o una porción de ella, y células tumorales, por ejemplo, para proporcionar un entorno natural para las células tumorales para una evaluación *in vitro* con mayor precisión de dichos compuestos. Gurski et al., 2010, describen métodos para determinar la eficacia de un compuesto antitumoral potencial que comprende introducir células tumorales en matrices 3D.

3. Sumario

15 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para determinar la eficacia de compuestos anticancerígenos potenciales, y de este modo identificar compuestos antitumorales, usando una placenta, o una porción de ella (por ejemplo, uno o más cotiledones), que comprende células tumorales contra las cuales se ensaya el compuesto anticancerígeno potencial. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para determinar si un compuesto antitumoral potencial es eficaz contra una pluralidad de células tumorales, que comprende introducir una pluralidad de células tumorales en o sobre, por ejemplo, una placenta de mamífero, o una porción de
20 ella; poner en contacto dicha pluralidad de células tumorales durante un período de tiempo con dicho compuesto antitumoral; y determinar si dicho compuesto antitumoral es eficaz contra dichas células tumorales, en donde dicho compuesto antitumoral es eficaz contra dichas células tumorales si dicho compuesto antitumoral durante dicho período de tiempo reduce el número de dichas células tumorales o reduce la tasa de crecimiento de dichas células tumorales. En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para determinar si un compuesto antitumoral potencial es eficaz contra una pluralidad de células tumorales, que comprende poner en contacto una pluralidad de células tumorales durante un período de tiempo con dicho compuesto antitumoral; y determinar si dicho compuesto antitumoral es eficaz contra dichas células tumorales, en donde dichas células tumorales están contenidas o comprendidas dentro de una placenta, o una porción de ella, y en donde dicho compuesto antitumoral es eficaz contra dichas células tumorales si dicho compuesto antitumoral durante dicho período de tiempo reduce el número de dichas células tumorales o reduce la tasa de crecimiento de dichas células tumorales. En ciertas realizaciones, al menos una pluralidad de las células tumorales está presente en dicha placenta, o una porción de ella, como agregados tridimensionales (por ejemplo, uno o más cotiledones). En una realización específica, el método comprende determinar un primer número de dichas células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y un segundo número de dichas células tumorales después de dicha puesta en contacto, en donde si dicho segundo número es
35 más pequeño que dicho primer número, dicho compuesto antitumoral reduce el número de células tumorales, y dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En otra realización específica, el método comprende determinar un primer número de células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y un segundo número de células tumorales después de dicha puesta en contacto; y determinar además un tercer número de células tumorales de control al mismo tiempo que dicho segundo número de células tumorales, en donde dichas células tumorales en dicho control no han sido puestas en contacto con dicho compuesto antitumoral; en donde si la diferencia entre dicho segundo número y dicho primer número es menor que la diferencia entre dicho tercer número y dicho primer número, dicho compuesto antitumoral reduce la tasa de crecimiento de dichas células tumorales, y dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

45 En ciertas realizaciones específicas del método, dicha placenta de mamífero, o una porción de ella, es una placenta descélularizada, por ejemplo, una placenta descélularizada, o una porción de ella, que comprende una vasculatura sustancialmente intacta. En ciertas realizaciones específicas del método, dicha placenta de mamífero, o una porción de ella, es un cotiledón descélularizado. En otras realizaciones específicas, dicha placenta de mamífero, o una porción de ella (por ejemplo, cotiledón), no está descélularizada, por ejemplo, y comprende una vasculatura sustancialmente intacta. En ciertas realizaciones, la placenta, o una porción de ella, está parcialmente descélularizada.

50 En ciertas realizaciones del método, dichas células tumorales son células tumorales primarias. En otras ciertas realizaciones, dichas células tumorales son células de líneas celulares tumorales. En otras realizaciones, las células tumorales son células madre tumorales o células madre cancerígenas. En realizaciones específicas, dichas células tumorales son células de mesotelioma, células de melanoma, células de adenoma, células de carcinoma, células de adenocarcinoma, células de carcinoma ductal, células de leucemia, células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia de linfocitos T aguda, células de leucemia linfoblástica aguda, células de tricoleucemia, células de leucemia promielocítica aguda, células de linfoma, células de linfoma de Burkitt, células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, células de linfoma no Hodgkin, células de linfoma de Hodgkin o células de mieloma múltiple, células de rhabdomyosarcoma, células de osteosarcoma, células de neuroblastoma, células de astrocitoma o células de glioblastoma. En realizaciones más específicas, dicha línea de células tumorales es 5637

(carcinoma), KHOS/NP (osteosarcoma), MNNG/HOS (osteosarcoma), Saos-2 (osteosarcoma), U-2 OS (osteosarcoma), SJSA-1 (osteosarcoma), CCF-STTG1 (astrocitoma), DBTRG-05MG (glioblastoma), U87 MG (glioblastoma), T98G (glioblastoma), SK-N-SH (neuroblastoma), SK-N-AS (neuroblastoma), MCF-7 (adenocarcinoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma, cáncer de mama), MDA-MB-436 (adenocarcinoma), SK-BR-3 (adenocarcinoma), BT-20 (carcinoma), BT-474 (carcinoma), CAMA-1 (carcinoma), HCC2218 (carcinoma), SW527 (carcinoma), MDA-MB-453 (carcinoma), MDA-MB-435S (carcinoma), T-47D (carcinoma), ZR-75-1 (carcinoma), UACC-812 (carcinoma), HCC1419 (carcinoma), HeLa (adenocarcinoma), Caco-2 (adenocarcinoma), COLO205 (adenocarcinoma), COLO320/DM (adenocarcinoma), DLD-1 (adenocarcinoma), HCT-15 (adenocarcinoma), SK-CO-1 (adenocarcinoma), SW48 (adenocarcinoma), SW480 (adenocarcinoma), HCT-8 (adenocarcinoma), HCT116 (carcinoma, cáncer colorrectal humano), RKO (carcinoma), LS411N (carcinoma), T84 (carcinoma), AGS (adenocarcinoma), KATO III (carcinoma), NCI-N87 (carcinoma), SNU-16 (carcinoma), 769-P (adenocarcinoma), 786-O (adenocarcinoma), ACHN (adenocarcinoma), A-498 (carcinoma), Caki-1 (carcinoma), G-402 (leiomioblastoma), CML-T1 (leucemia), CTV-1 (leucemia), JVM-2 (leucemia), K562 (leucemia), MHH-CALL2 (leucemia), NALM-6 (leucemia), 8E5 (leucemia), CCRF-SB (leucemia), CEM/C1 (leucemia), CEM/C2 (leucemia), CEM-CM3 (leucemia), CCRF-HSB-2 (leucemia), KG-1 (leucemia), KG-1a (leucemia), CCRF-CEM (leucemia), MOLT-3 (leucemia), SUP-B15 (leucemia), TALL-104 (leucemia), Loucy (leucemia), RS4;11 (leucemia), REH (leucemia), AML-193 (leucemia), THP-1 (leucemia), MOLM-13 (leucemia), Kasumi-1 (leucemia), Kasumi-3 (leucemia), BDCM (leucemia), HL-60 (leucemia), I 2.1 (leucemia), I 9.2 (leucemia), J.gam1.WT (leucemia), J.RT3-T3.5 (leucemia), P116 (leucemia), P116.c139 [P116.c39] (leucemia), D1.1 (leucemia), J45.01 (leucemia), MV-4-11 (leucemia), Kasumi-4 (leucemia), MEG-01 (leucemia), KU812 (leucemia), Mo (leucemia), JM1 (leucemia), GDM-1 (leucemia), CESS (leucemia), ARH-77 (leucemia), SK-HEP-1 (adenocarcinoma), Bel-7402 (carcinoma), Bel-7404 (carcinoma), HEP-3B (carcinoma), HepG2 (carcinoma), Calu-3 (adenocarcinoma), NCI-H1395 (adenocarcinoma), NCI-H1975 (adenocarcinoma), SK-LU-1 (adenocarcinoma), NCI-H2122 (adenocarcinoma), NCI-H727 (carcinoma), A-427 (carcinoma), A549 (carcinoma), SW1573 (carcinoma), NCI-H358 (carcinoma), NCI-H460 (carcinoma), NCI-H292 (carcinoma), NCI-H82 (carcinoma), NCI-H226 (carcinoma), NCI-H526 (carcinoma), CRL1803-TT (carcinoma de tiroides) o MSTO-211H (mesotelioma).

En ciertas realizaciones del método, dichas células tumorales se siembran sobre o en dicha placenta, o una porción de ella, en suspensión líquida, por ejemplo, por medio de vasculatura placentaria sustancialmente intacta, por ejemplo, matriz vascular sustancialmente intacta. En otras realizaciones específicas, la placenta, o una porción de ella, se coloca en un medio de cultivo que comprende células tumorales en suspensión líquida, y se deja que las células tumorales se unan a la placenta, o a una porción de ella. En otras realizaciones específicas, el método comprende adicionalmente hacer pasar medio de cultivo a través de dicha placenta, o una porción de ella, en condiciones tales que, en ausencia de dicho compuesto antitumoral, proliferen dichas células tumorales. En una realización más específica, dicho método comprende adicionalmente hacer pasar medio de cultivo a través de dicha placenta, o una porción de ella, en condiciones tales que, en ausencia de dicho compuesto antitumoral, proliferen dichas células tumorales, en donde dicho medio de cultivo se hace pasar a través de dicha vasculatura sustancialmente intacta.

En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente introducir una pluralidad de células no tumorales en dicha placenta o una porción de ella. En realizaciones específicas, dichas células no tumorales son células estromales, por ejemplo, células estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea. En ciertas realizaciones, dicha pluralidad de células no tumorales se introduce en dicha placenta, o una porción de ella, antes o después de dichas células tumorales; en otras realizaciones, dicha pluralidad de células no tumorales se introduce en dicha placenta, o una porción de ella, al mismo tiempo que dichas células tumorales.

En ciertas realizaciones, por ejemplo, para determinar el número o la cantidad de células tumorales, dichas células tumorales se marcan detectablemente. Dichos marcadores detectables pueden ser, por ejemplo, marcadores colorimétricos, marcadores fluorescentes o marcadores radiactivos. En una realización específica, el marcador está unido a un anticuerpo. Dicho anticuerpo se puede unir, por ejemplo, a un antígeno específico del tumor en dichas células tumorales, o se puede unir a un antígeno específico de dichas células tumorales. La determinación de la cantidad de un marcador se puede usar como un indicador para determinar el número, o la cantidad, de células tumorales presentes tanto antes como después de la puesta en contacto con el compuesto antitumoral potencial. En una realización específica, por ejemplo, cuando el compuesto antitumoral potencial elimina las células tumorales más rápidamente de lo que pueden proliferar las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales se determina marcando dichas células tumorales con un anticuerpo fluorescente; asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, y un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En otra realización, por ejemplo, dichas células tumorales se marcan con un anticuerpo fluorescente, y en donde si hay una disminución de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En otra realización específica, por ejemplo, en donde el compuesto antitumoral potencial ralentiza el crecimiento de las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, y entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, se determina marcando dichas células tumorales con un anticuerpo fluorescente; asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número

mero de células tumorales y un tercer valor de fluorescencia a dicho tercer número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de dichas células tumorales, y determinando la diferencia entre dicho tercer valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En ciertas realizaciones, las células tumorales se marcan con un anticuerpo fluorescente, y en donde si hay una disminución en la tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente a lo largo del tiempo después de dicha puesta en contacto, en comparación con una tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

En otras realizaciones específicas, el número, o cantidad, de células tumorales presentes en el ensayo se puede determinar usando un antígeno, por ejemplo, una proteína, producida y/o secretada por las células tumorales como un indicador. Por ejemplo, en una realización específica, se calcula un número de células tumorales en el método determinando una cantidad de un antígeno producido por dichas células tumorales. El antígeno puede ser un antígeno específico de un tumor o un antígeno específico de dichas células tumorales. En ciertas realizaciones específicas, el antígeno no es específico de dichas células tumorales, por ejemplo, el antígeno (por ejemplo, una proteína) es uno que se sabe que generalmente es producido por células de múltiples tipos. En una realización específica del método, por ejemplo, cuando el compuesto anticancerígeno potencial elimina las células tumorales más rápidamente de lo que pueden proliferar las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales se calcula determinando una primera cantidad de un antígeno producido por dicho primer número de células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y una segunda cantidad de dicho antígeno producido por dicho segundo número de células tumorales después de dicha puesta en contacto, y determinando la diferencia entre dicha segunda cantidad y dicha primera cantidad, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En otra realización específica, si hay, por ejemplo, una disminución de dicho antígeno después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En otra realización específica, por ejemplo, en la que el compuesto anticancerígeno potencial reduce la tasa de crecimiento de las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, y entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, se calcula determinando una primera cantidad de un antígeno producido por dicho primer número de células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y una segunda cantidad de dicho antígeno producido por dicho segundo número de células tumorales después de dicha puesta en contacto, y una tercera cantidad de dicho antígeno producido por dicho tercer número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicha segunda cantidad de antígeno y dicha primera cantidad de antígeno, donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de dichas células tumorales, y determinando la diferencia entre dicha tercera cantidad de antígeno y dicha primera cantidad de antígeno, donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En otra realización específica, si hay una disminución en la tasa de aumento de dicho antígeno producido por dichas células tumorales en comparación con una tasa de aumento de dicho antígeno producido por dichas células tumorales antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. Una proteína ilustrativa que se puede usar de acuerdo con estas realizaciones es calcitonina.

En otras realizaciones del método, las células tumorales se modifican genéticamente para que expresen un marcador, por ejemplo, una proteína fluorescente o luciferasa. En una realización específica, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde, por ejemplo, proteína fluorescente verde de tipo natural, proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), Emerald™, Superfolder GFP™, Azami Green™, mWasabi™, TagGFP™, TurboGFP™, AcGFP™, ZaGreen™ o T-Sapphire™. En otra realización específica, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente azul, por ejemplo, proteína fluorescente azul potenciada (EBFP), EBFP2™, Azurite™ o mTagBFP™. En otra realización específica, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente cian, por ejemplo, proteína fluorescente cian potenciada (ECFP), mECFP™, Cerulean™, mTurquoise™, CyPet™, AmCyan1™, Midori-Ishi Cyan™, TagCFP o mTFP1 (Teal)™. En otra realización, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente amarilla, por ejemplo, proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP), Topaz™, Venus™, mCitrine™, YPet™, TagYFP™, PhiYFP™, ZsYellow1™ o mBanana™. En otra realización específica, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente naranja, por ejemplo, Kusabira Orange™, Kusabira Orange2™, mOrange™, mOrange2™, dTomato™, dTomato-Tandem™, TagRFP™, TagRFP-T™, DsRed™, DsRed2™, DsRed-Express™, DsRed-Monomer™ o mTangerine™. En otra realización específica, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente roja, por ejemplo, mRuby™, mApple™, mStrawberry™, AsRed2™, mRFP1™, JRed™, mCherry™, HcRed1™, mRaspberry™, dKeima-Tandem™, HcRed-Tandem™, mPlum™ o AQ143™. En otro ejemplo específico, dicha proteína fluorescente es una proteína fluorescente fotoactivable o fotoconvertible, por ejemplo, PA-GFP™ (G), PS-CFP™ (C), PS-CFP (G), PA-mRFP1™ (R), CoralHue Kaede™ (G), CoralHue Kaede™ (R), WtKikGR™ (G), WtKikGR™ (R), mKikGR™ (G), mKikGR™ (R), dEosFP-Tandem™ (G), dEosFP-Tandem™ (R), mEos2FP™ (G), mEos2FP™ (R), Dendra2™ (G), Dendra2™ (R), CoralHue Dronpa™ (G) o Kindling™ (KFP1).

En otra realización específica, dicho marcador es luciferasa.

Cuando se usa en una realización como indicador la fluorescencia, por ejemplo, atribuible a una proteína fluorescente o a luciferasa, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, en donde dichas células tumorales están modificadas para expresar una proteína fluorescente, se determina asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, y un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En una realización específica, dichas células tumorales están modificadas genéticamente para expresar una proteína fluorescente, y en donde si hay una disminución de la fluorescencia de dichas células tumorales modificadas genéticamente después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En otra realización específica del método, en donde dichas células tumorales están modificadas genéticamente para expresar una proteína fluorescente, por ejemplo, donde el compuesto antitumoral potencial reduce la tasa de crecimiento de las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales se determina asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número de células tumorales y un tercer valor de fluorescencia a dicho tercer número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de dichas células tumorales, y determinando la diferencia entre dicho tercer valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En otra realización específica, en donde dichas células tumorales están modificadas genéticamente para expresar una proteína fluorescente, si hay una disminución en la tasa de aumento de la fluorescencia de dichas células tumorales modificadas genéticamente a lo largo del tiempo después de dicha puesta en contacto, en comparación con una tasa de aumento de la fluorescencia de dichas células tumorales genéticamente modificadas antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, dicha placenta puede ser una placenta completa o sustancialmente intacta. Cuando se usa una porción de la placenta, dicha porción de una placenta, en ciertas realizaciones, está conformada para que se ajuste a un recipiente. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, un plato de cultivo tisular o un pocillo de una placa de múltiples pocillos.

3.1. Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa la viabilidad de células tumorales cultivadas en cotiledones placentarios en presencia (barras de color claro, más a la izquierda) y en ausencia (barras de color oscuro, más a la derecha) de tricostatina A (TSA). Se contaron las células de veinte muestras del cotiledón y se presenta la viabilidad celular para cuatro grupos del total de veinte muestras como muestras 1-5, 6-10, 11-15 y 16-20.

La Fig. 2 representa niveles medidos de secreción de calcitonina por células tumorales cultivadas en cotiledones placentarios en presencia (barras de color claro, más a la izquierda) y en ausencia (barras de color oscuro, más a la derecha) de tricostatina A (TSA) durante un período de cultivo de 10 días.

4. Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan métodos para evaluar compuestos antitumorales potenciales y para identificar compuestos antitumorales, que comprenden poner en contacto células tumorales contenidas sobre o en una placenta, o una porción de ella, con el compuesto antitumoral potencial y evaluar el efecto del compuesto antitumoral potencial sobre las células tumorales, en donde si el compuesto antitumoral potencial tiene un mayor efecto sobre las células tumorales que el observado en los controles apropiados, por ejemplo, como se describe a continuación, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral. Sin desear estar vinculado a ninguna teoría, la placenta proporciona un entorno de crecimiento tridimensional para las células tumorales que se asemeja mucho al entorno de crecimiento natural *in vivo* de las células, proporcionando así un sistema más preciso para evaluar la eficacia de los compuestos antitumorales potenciales. Generalmente, en el contexto del presente método, si el compuesto antitumoral potencial ralentiza el crecimiento de las células tumorales, reduce la viabilidad de las células tumorales, reduce el número o la masa de las células tumorales, reduce el número de las células tumorales por debajo de la tasa de proliferación de células tumorales, o elimina las células tumorales, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral.

Un “compuesto antitumoral potencial”, como se usa en la presente memoria, abarca nuevos compuestos, compuestos conocidos que no se han ensayado frente a un tipo de células tumorales o línea de células tumorales particular, o compuestos que se sabe que tienen al menos algún efecto sobre un tipo de células tumorales o línea de células tumorales particular, pero no se han ensayado frente a otro tipo de células tumorales, o de acuerdo con los métodos presentes. Como se usa en la presente memoria, “tumor” incluye células tumorales, células madre tumorales, células madre cancerígenas o cualquier tipo de línea de células tumorales, e incluye tumores sólidos, cánceres hematológicos y similares.

La referencia en la presente memoria a una "placenta" incluye una placenta completa, o una porción de ella, e incluye una placenta descelularizada (por ejemplo, una matriz placentaria) salvo que se indique lo contrario. Una "porción" de una placenta indica una porción estructural de una placenta, por ejemplo, una sección o cuña de una placenta, un lóbulo o cotiledón placentario, el amnios, el corion o el cordón umbilical, o similar, ya sea celularizado o descelularizado. Las porciones de una placenta útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria pueden ser suficientemente pequeñas, por ejemplo, para ser ajustadas dentro de una placa de 12, 48 o 96 pocillos. El término no abarca, sin embargo, únicamente el colágeno placentario aislado.

4.1. Métodos de evaluación de compuestos antitumorales potenciales e identificación de compuestos antitumorales

Como se proporciona en la presente memoria, el método evalúa la eficacia de un compuesto antitumoral potencial contra células tumorales usando una construcción que comprende una placenta que contiene las células tumorales. Las células tumorales se ponen en contacto con el compuesto antitumoral potencial en el contexto de la construcción. Las células tumorales pueden estar contenidas sobre, o dentro de, o de ambas formas, la placenta. La placenta puede ser una placenta celularizada completa, por ejemplo, una placenta como se obtiene de un parto vaginal normal o de una operación de cesárea. El método puede usar una porción de una placenta, por ejemplo, una sección transversal de una placenta, una parte de una placenta diseccionada de otras partes, una estructura anatómica particular de una placenta, o similar. En ciertas realizaciones, la placenta, o una porción de ella, se descelulariza en parte o en su totalidad. En realizaciones preferidas de una placenta celularizada o descelularizada, o una porción de ella, la placenta, o una porción de ella, tiene una vasculatura sustancialmente intacta; es decir, una vasculatura a través de la cual un líquido se puede hacer pasar, y volver a salir, de la placenta, o de una porción de ella, con la pérdida de, por ejemplo, menos del 5%, 10%, 15%, 20% o 25% del volumen de entrada. A continuación, se presentan métodos de descelularización del tejido placentario, que incluyen métodos que dejan la vasculatura sustancialmente intacta.

En una realización, el método comprende la puesta en contacto del compuesto antitumoral potencial con células tumorales sobre o en la placenta, o una porción de ella. En ciertas realizaciones, las células tumorales pueden estar sembradas sobre o dentro de la placenta, por ejemplo, en suspensión líquida en cualquier fluido fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una solución salina, medio de cultivo o similar. En una realización preferida, la placenta, o una porción de ella, tiene una vasculatura sustancialmente intacta, y las células tumorales se introducen en la placenta, o una porción de ella, haciendo pasar el líquido fisiológicamente aceptable que comprende las células tumorales a través de la vasculatura de modo que al menos una parte de las células tumorales sea retenida dentro de la vasculatura. En realizaciones en las que se usa una placenta completa, o una porción sustancial de ella, la placenta puede estar contenida, por ejemplo, dentro de un recipiente abierto plano, por ejemplo, una bandeja o batea, o puede estar contenida dentro de un recipiente cerrado, por ejemplo, una bolsa.

Una porción de la placenta se puede usar en los métodos presentados en esta memoria. En ciertas realizaciones, la porción está conformada para poder ser alojada en un recipiente. El recipiente puede ser, por ejemplo, cualquier recipiente fisiológicamente aceptable utilizado, por ejemplo, para cultivo de células o tejidos, por ejemplo, placas de cultivo de plástico o vidrio, matraces o placas de multipocillos. En ciertas realizaciones, el recipiente permite el flujo periódico, o continuo, de fluido en y o alrededor de la placenta, o una porción de ella. En otras realizaciones, la placenta, o una porción de ella, está contenida dentro de un biorreactor, por ejemplo, un biorreactor comercialmente disponible.

En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, la placenta, o una porción de ella, está preferiblemente contenida dentro de un recipiente que permite la administración de células tumorales a la placenta y de un compuesto antitumoral potencial a las células tumorales, así como también permite una o más formas del análisis del número o masa de células tumorales, por ejemplo, antes, durante y/o después de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial.

Las células tumorales se pueden introducir en la placenta, o una porción de ella, y cultivar antes de ponerse en contacto con dicho compuesto antitumoral potencial, por ejemplo, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días o más. En otras ciertas realizaciones, las células tumorales se introducen en la placenta, o una porción de ella, al mismo tiempo que el compuesto antitumoral potencial.

En una realización específica, las células no tumorales se pueden introducir adicionalmente en la placenta, o una porción de ella. Por ejemplo, las células no tumorales pueden ser, por ejemplo, células estromales, por ejemplo, células estromales adiposas, células estromales derivadas de médula ósea, o similares. Ventajosamente, las células estromales se pueden introducir en la placenta, o una porción de ella, antes de la introducción de las células tumorales, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para permitir el establecimiento de las células estromales. La relación entre los números de células tumorales y los números de células estromales puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30 o más. Las células estromales se pueden cultivar, por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o más, antes de la introducción de las células tumorales en la placenta, o una porción de ella. Las células estromales y las células tumorales

rales se pueden introducir en la placenta, o una porción de ella, al mismo tiempo, por ejemplo, en administraciones de soluciones separadas, o como una suspensión conjunta de células.

En otras ciertas realizaciones, las células no tumorales pueden ser, por ejemplo, células madre, por ejemplo, células madre mesenquimatosas o células madre placentarias. Las células madre mesenquimatosas adecuadas para uso en los métodos proporcionados en la presente memoria están descritas, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.486.359. Las células madre placentarias adecuadas para uso en los métodos proporcionados en la presente memoria están descritas, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 7.468.276 y 8.057.788.

El método, en ciertas realizaciones, se puede usar para identificar nuevos compuestos antitumorales, es decir, compuestos antitumorales no identificados previamente como compuestos antitumorales en ningún contexto. En otras realizaciones, el método se puede usar para identificar nuevos tumores contra los que el compuesto, ya identificado como un compuesto antitumoral con respecto a un tipo de tumor, es un compuesto antitumoral. En otras realizaciones, el método se puede usar para identificar, o confirmar, compuestos que tienen un efecto antitumoral sobre células tumorales de un individuo particular.

4.2. Visualización de células tumorales y el efecto de compuestos antitumorales potenciales

El método para evaluar compuestos antitumorales potenciales, o para identificar compuestos antitumorales, descrito en la presente memoria se basa en la identificación de compuestos que reducen la tasa de proliferación de células tumorales en la placenta, o eliminan células tumorales, o ambas. El método, en ciertas realizaciones, comprende determinar al menos un primer número de células tumorales antes de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, y al menos un segundo número de células tumorales después de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, en donde si dicho segundo número es menor que dicho primer número, dicho compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral. Típicamente, se realiza en paralelo un control que comprende una placenta que contiene células tumorales, equivalente a las condiciones experimentales, excepto que las células tumorales no se ponen en contacto con el compuesto antitumoral potencial. Por ejemplo, se puede obtener un tercer número (control) de células tumorales a partir de dicha población de células tumorales al mismo tiempo que se obtiene el primer número de células tumorales, y se puede obtener un cuarto número, de control, de células tumorales al mismo tiempo que se obtiene dicho segundo número de células tumorales. En este caso, si la diferencia entre el segundo número de células tumorales y el primer número de células tumorales es mayor que la diferencia entre el cuarto número de células tumorales y el tercer número de células tumorales, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral. El número de células tumorales antes y después de la puesta en contacto puede, naturalmente, obtenerse múltiples veces, y se puede obtener en paralelo a partir de múltiples condiciones experimentales y, opcionalmente, condiciones de control.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, las células tumorales se etiquetan o marcan de alguna manera para hacerlas cuantificables durante la realización del método. La cantidad de etiquetaje o marcaje está de preferencia fuertemente correlacionada con el número de células tumorales. En ciertas realizaciones, las células tumorales se marcan con, por ejemplo, marcadores fluorescentes o marcadores radiactivos. En una realización específica, el marcador está unido a un anticuerpo. Dicho anticuerpo puede, por ejemplo, reconocer un antígeno específico de tumores en dichas células tumorales, o puede reconocer un antígeno específico de dichas células tumorales. La determinación de la cantidad de un marcador presente en el ensayo, en ciertas realizaciones, se usa como un indicador para determinar el número, o cantidad, de células tumorales presentes en cualquier punto durante la realización del método, por ejemplo, tanto antes como después, o en ambos casos, de la puesta en contacto con el compuesto antitumoral potencial.

Los valores de fluorescencia, por ejemplo, la fluorescencia agregada de una porción o de la totalidad de las células tumorales usadas en el método, se pueden usar como sustitutos del número de células tumorales, y se pueden usar para determinar si un compuesto antitumoral potencial reduce el número de células tumorales, o reduce la tasa de crecimiento de las células tumorales. En ciertas realizaciones, el método comprende obtener al menos un primer valor de fluorescencia de la placenta antes de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial y obtener al menos un segundo valor de fluorescencia de la placenta después de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial y comparar los valores de fluorescencia primero y segundo. Típicamente, se realiza en paralelo un control que comprende una placenta que contiene células tumorales, equivalente a las condiciones experimentales, excepto que las células tumorales no se ponen en contacto con el compuesto antitumoral potencial; por ejemplo, se puede obtener un tercer valor de fluorescencia de control de dicha población de células tumorales al mismo tiempo que se obtiene el primer valor de fluorescencia, y se puede obtener un cuarto valor de fluorescencia de control al mismo tiempo que se obtiene dicho segundo valor de fluorescencia. Naturalmente, se pueden obtener otros valores de fluorescencia de control. Si el segundo valor de fluorescencia es menor que el primer valor de fluorescencia, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral. Más específicamente, si la diferencia entre el segundo valor de fluorescencia y el primer valor de fluorescencia es mayor que la diferencia entre el cuarto valor de fluorescencia y el tercer valor de fluorescencia, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral.

En ciertas realizaciones, el compuesto antitumoral potencial reduce la tasa de proliferación o crecimiento de las células tumorales. En este caso, la tasa de aumento de la fluorescencia después de que las células tumorales se pongan en contacto con el compuesto antitumoral potencial sería menor que la tasa de aumento de la fluorescencia de las

células de control. En una realización específica, por ejemplo, cuando el compuesto antitumoral potencial elimina las células tumorales más rápidamente de lo que pueden proliferar las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales se determina marcando dichas células tumorales con un anticuerpo fluorescente; asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, y un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En otra realización, por ejemplo, dichas células tumorales se marcan con un anticuerpo fluorescente, y en donde si hay una disminución de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En otra realización específica, por ejemplo, en donde el compuesto antitumoral potencial ralentiza el crecimiento de las células tumorales, la diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, y entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales, se determina marcando dichas células tumorales con un anticuerpo fluorescente; asignando un primer valor de fluorescencia a dicho primer número de células tumorales, un segundo valor de fluorescencia a dicho segundo número de células tumorales y un tercer valor de fluorescencia a dicho tercer número de células tumorales; y determinando la diferencia entre dicho segundo valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, donde dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho segundo número de células tumorales y dicho primer número de dichas células tumorales, y determinando la diferencia entre dicho tercer valor de fluorescencia y dicho primer valor de fluorescencia, en el que dicha diferencia está correlacionada con dicha diferencia entre dicho tercer número de células tumorales y dicho primer número de células tumorales. En ciertas realizaciones, las células tumorales se marcan con un anticuerpo fluorescente, y en donde si hay una disminución en la tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente a lo largo del tiempo después de dicha puesta en contacto, en comparación con una tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente antes de dicha puesta en contacto, dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

En otras realizaciones, las células tumorales se pueden visualizar, y por tanto cuantificar, usando, por ejemplo, un ensayo colorimétrico, por ejemplo, un ensayo colorimétrico que mida la actividad mitocondrial. Los colorantes útiles para dicho ensayo incluyen, aunque sin limitación, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), WST-1 (disulfonato de 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno), WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, o similares. Los ensayos estándares que usan los colorantes son bien conocidos en la técnica. En el contexto de los métodos proporcionados en la presente memoria, el número de células tumorales o el tamaño de la(s) masa(s) tumoral(es) en la placenta se puede extrapolar a partir de la cantidad de color cuantificable obtenida usando los colorantes. Típicamente, la cantidad de color resultante de dichos colorantes está correlacionada positivamente con el número, o la cantidad, de células tumorales en la placenta. Típicamente, dicho ensayo colorimétrico se realiza haciendo pasar el colorante, y en ciertas realizaciones, moléculas accesorias, a través de la placenta en la que residen las células tumorales como parte del método de identificación de compuestos antitumorales, o evaluando los compuestos antitumorales potenciales, por ejemplo, en un volumen de medio de cultivo celular. Se obtiene una muestra del medio que ha sido pasado a través de la placenta, y se analiza usando el colorante.

El método puede comprender la obtención de al menos una lectura colorimétrica antes de la puesta en contacto de las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, y al menos una lectura colorimétrica después de dicha puesta en contacto, donde una lectura colorimétrica es un valor de absorbancia a una longitud de onda designada para el colorante particular que se use. Típicamente, se realizará en paralelo un control que omita el compuesto antitumoral potencial en las condiciones experimentales de ensayo del compuesto antitumoral potencial, en cuyo caso se obtiene un tercer valor de absorbancia antes de la puesta en contacto de dichas células tumorales con dicho compuesto antitumoral potencial, y un cuarto valor de absorbancia después de la puesta en contacto de las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial. En realizaciones en las que el compuesto antitumoral potencial elimine las células tumorales, se obtiene al menos un primer valor de absorbancia antes de la puesta en contacto de las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, y se obtiene al menos un segundo valor de absorbancia después de la puesta en contacto de las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, en donde si el segundo valor de absorbancia es menor que el primer valor de absorbancia, el compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En realizaciones en las que el compuesto antitumoral potencial elimine las células, o reduzca la tasa de crecimiento o proliferación de las células tumorales, si la diferencia entre dicho segundo y dicho primer valores de absorbancia es mayor que la diferencia entre dicho cuarto valor de absorbancia y dicho tercer valor de absorbancia, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral.

En otras realizaciones, las células tumorales se pueden visualizar, y por tanto cuantificar, usando, por ejemplo, un ensayo de síntesis de DNA. En dicho ensayo, por ejemplo, se puede introducir BrdU en las células tumorales en la placenta, o una porción de ella, y visualizarla usando, por ejemplo, anticuerpos fluorescentes como se describió anteriormente. La cantidad de BrdU está correlacionada positivamente con la cantidad de proliferación de células tumorales; por tanto, una reducción en la cantidad de BrdU incorporada, o una reducción en la tasa de aumento de BrdU por las células tumorales, en comparación con un control apropiado, como resultado de poner en contacto las célu-

las tumorales con un compuesto anticancerígeno potencial, indica que el compuesto anticancerígeno potencial es un compuesto anticancerígeno.

En otras realizaciones, el número o cantidad de células tumorales en el método se puede determinar, por ejemplo, usando un ensayo de permeabilidad, y determinando el número de células que absorben un colorante, o el número de células que excluyen un colorante, por ejemplo, azul tripán, lactato-deshidrogenasa, homodímero-1 de etidio o similares.

En otras realizaciones, el número o cantidad de células tumorales en el método se puede determinar, por ejemplo, usando un ensayo de apoptosis. Los ensayos de apoptosis, que se pueden usar, por ejemplo, muestras de medio de cultivo pasadas a través de la placenta que contiene células tumorales, son muy conocidos en la técnica. Se han desarrollado muchos kits para el ensayo en esta categoría y se pueden realizar en placas de multipocillos con gran sensibilidad. Los ensayos de apoptosis útiles en los presentes métodos incluyen, por ejemplo, ensayos con caspasa bioluminiscente que incluyen la detección de actividades de caspasa-3/7, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-2 y caspasa-6; ensayos de marcaje de final de muesca de dUTP de desoxinucleotidil-transferasa terminal (TUNEL); ensayos de anexina V/PI; ensayo de apoptosis mitocondrial (JC-1) y similares.

El método puede comprender la obtención de al menos una cantidad de apoptosis en la población de células tumorales en la placenta ("valor de apoptosis") antes de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, y al menos un valor de apoptosis después de dicha puesta en contacto. Típicamente, se realizará en paralelo un control que omita el compuesto antitumoral potencial en las condiciones experimentales de ensayo del compuesto antitumoral potencial, en cuyo caso se obtiene un tercer valor de apoptosis antes de la puesta en contacto de dichas células tumorales con dicho compuesto antitumoral potencial, y un cuarto valor de apoptosis después de la puesta en contacto de las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial. En realizaciones en las que el compuesto antitumoral potencial elimina células tumorales, se obtiene al menos un primer valor de apoptosis antes de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, y se obtiene al menos un segundo valor de apoptosis después de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial, en donde si el segundo valor de apoptosis es menor que el primer valor de apoptosis, el compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral. En realizaciones en donde el compuesto antitumoral potencial elimina las células, o reduce la tasa de crecimiento o proliferación de las células tumorales, si la diferencia entre dicho segundo y dicho primer valores de apoptosis es mayor que la diferencia entre dicho cuarto valor de apoptosis y dicho tercer valor de apoptosis, el compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral.

En realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones anteriores, se puede usar como control separado otro tipo de células, por ejemplo, células endoteliales vasculares, fibroblastos, o similares, para determinar si el efecto del compuesto antitumoral es específico o no de las células tumorales. En dichas realizaciones, se obtiene un quinto parámetro (valor de fluorescencia, valor de absorbancia, valor de apoptosis o similar) antes de poner en contacto dicha célula tumoral con dicho compuesto antitumoral potencial, y se obtiene un sexto parámetro después de poner en contacto dicha célula tumoral con dicho compuesto antitumoral potencial, en donde dicho compuesto antitumoral potencial se identifica como un compuesto antitumoral si (a) (i) dicho segundo parámetro es mayor que dicho primer parámetro, y (ii) la diferencia entre dicho segundo parámetro y dicho primer parámetro es mayor que la diferencia entre dicho sexto parámetro y dicho quinto parámetro; o (b) (i) la diferencia entre dicho cuarto parámetro y dicho tercer parámetro es menor que la diferencia entre el segundo parámetro y el primer parámetro, y (ii) la diferencia entre dicho segundo parámetro y dicho primer parámetro es mayor que la diferencia entre dicho sexto parámetro y dicho quinto parámetro.

4.3. Métodos de obtención de la placenta

En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después de un parto normal o después de una operación de cesárea. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente después del consentimiento informado y después de que se obtenga un historial médico completo de la paciente y se asocie con la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Dicho historial médico se puede usar para coordinar el uso posterior de la placenta o las células madre recogidas de ella. Por ejemplo, las células madre placentarias humanas se pueden utilizar, teniendo en cuenta el historial médico, para la medicina personalizada del recién nacido asociado a la placenta, o para los padres, hermanos u otros familiares del recién nacido.

Se extraen la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta que pueden usarse para otros fines o desecharse. En ciertas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre del cordón en la placenta. La placenta se puede someter a un proceso convencional de recuperación de la sangre del cordón. Típicamente, se usa una aguja o cánula, con ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véanse, por ejemplo, Anderson, Patente de EE.UU. Nº 5.372.581; Hessel et al., Patente de EE.UU. Nº 5.415.665). La aguja o cánula se coloca generalmente en la vena umbilical y la placenta se puede masajear suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede ser realizada comercialmente, por ejemplo, por Life-Bank USA, Cedar Knolls, N.J. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la rotura del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón.

Típicamente, una placenta se transporta desde la sala de alumbramiento o parto a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de las células madre, por ejemplo, por perfu-

si3n o disociaci3n tisular. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte est3ril aislado t3rmicamente (manteniendo la temperatura de la placenta entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 28°C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cord3n umbilical proximal pinzado, en una bolsa de pl3stico con cierre de cremallera est3ril, que se coloca luego en un recipiente aislado. En otra realizaci3n, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cord3n, como se ha descrito sustancialmente en la solicitud de Patente de EE.UU. N3 7.147.626. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio cuatro a veinticuatro horas despu3s del parto. En ciertas realizaciones, el cord3n umbilical proximal se pinza, preferiblemente a 4-5 cm (cent3metro) de la inserci3n en el disco placentario antes de la recuperaci3n de la sangre del cord3n. En otras realizaciones, el cord3n umbilical proximal se pinza despu3s de la recuperaci3n de la sangre del cord3n, pero antes del tratamiento adicional de la placenta.

La placenta se puede conservar en condiciones est3riles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5°C a 25°C. La placenta se puede conservar durante un per3odo de cuatro a veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas o m3s de cuarenta y ocho horas, antes de perfundir la placenta para eliminar cualquier resto de sangre del cord3n. En una realizaci3n, la placenta se recoge desde aproximadamente cero horas hasta aproximadamente dos horas despu3s de la expuls3n. La placenta se conserva preferiblemente en una soluci3n anticoagulante a una temperatura de 5°C a 25°C. Las soluciones anticoagulantes adecuadas son muy conocidas en la t3cnica, por ejemplo, una soluci3n de heparina o warfarina s3dica. En una realizaci3n preferida, la soluci3n anticoagulante comprende una soluci3n de heparina (por ejemplo, 1% p/p en soluci3n 1:1000). La placenta desangrada se conserva preferiblemente durante no m3s de 36 horas antes de recoger las c3lulas madre placentarias.

T3picamente, la placenta se perfunde antes de su uso en los presentes m3todos, por ejemplo, antes de la descelularizaci3n. La perfusi3n puede, por ejemplo, no tener otro fin m3s que extraer la sangre de la placenta. Sin embargo, la placenta se puede perfundir, por ejemplo, para recoger c3lulas madre placentarias y/o c3lulas perfundidas placentarias, por ejemplo, como se ha descrito en la Patente de EE.UU. N3 7.468.276.

4.4. M3todos de descelularizaci3n de la placenta

Una vez que la placenta se prepara como anteriormente, y se perfunde opcionalmente, se descelulariza opcionalmente, por ejemplo, de tal manera que conserve la estructura natural de la vasculatura placentaria, por ejemplo, de modo que quede la vasculatura placentaria sustancialmente intacta. Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente intacta" significa que la vasculatura placentaria (por ejemplo, el almac3n placentario descelularizado) que queda despu3s de la descelularizaci3n retiene toda, o la mayor parte, de la estructura macrosc3pica de la vasculatura placentaria antes de la descelularizaci3n, de modo que un fluido se pueda hacer entrar y salir de la placenta, o de una porci3n de ella, con la p3rdida de, por ejemplo, menos del 5%, 10%, 15%, 20% o 25% del volumen de entrada. En ciertas realizaciones, la vasculatura placentaria es capaz de ser sembrada de nuevo, por ejemplo, con c3lulas endoteliales vasculares u otras c3lulas, para recrear la vasculatura placentaria.

El tejido placentario se puede esterilizar, por ejemplo, por incubaci3n en una soluci3n nutritiva tamponada est3ril que contenga agentes antimicrobianos, por ejemplo, un agente antibacteriano, antif3ngico y/o esterilizante compatible con el tejido de trasplante. El tejido placentario esterilizado se puede crioconservar para un tratamiento posterior en un momento posterior o se puede tratar inmediatamente de acuerdo con las siguientes etapas de este proceso, incluyendo una crioconservaci3n posterior de la matriz tisular o de otros productos tisulares del proceso.

Se conocen varios m3todos para reducir la viabilidad de las c3lulas naturales en tejidos y3rganos, que incluyen m3todos f3sicos, qu3micos y bioqu3micos. V3ase, por ejemplo la Patente de EE.UU. N3 5.192.312 (Orton). Dichos m3todos se pueden emplear de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria. Sin embargo, la t3cnica de descelularizaci3n empleada preferiblemente no da como resultado una interrupci3n importante de la anatom3a del tejido placentario ni altera sustancialmente las propiedades biomec3nicas de sus elementos estructurales, y preferiblemente deja la vasculatura placentaria sustancialmente intacta. En ciertas realizaciones, el tratamiento del tejido placentario para producir una matriz tisular descelularizada no deja un entorno citot3xico que mitigue la posterior repoblaci3n de la matriz con c3lulas que sean alog3nicas o aut3logas para el receptor. Como se usa en la presente memoria, las c3lulas y tejidos que son "alog3nicos" para el receptor son los que se originan o proceden de un donante de la misma especie como receptor de la matriz placentaria, y las c3lulas o tejidos "aut3logos" son los que se originan o proceden de un receptor de la matriz placentaria.

Las fuerzas f3sicas, por ejemplo la formaci3n de hielo intracelular, se pueden usar para descelularizar tejidos de trasplante. Por tanto, en cierta realizaci3n, la placenta se crioconserva en primer lugar como parte de la descelularizaci3n. Por ejemplo, se puede realizar la congelaci3n en fase de vapor (velocidad lenta de la disminuci3n de la temperatura) del tejido placentario. Opcionalmente, el tejido placentario se crioconserva en presencia de uno o m3s crio-protectores. Se pueden a3adir materiales formadores de coloides durante los ciclos de congelaci3n-descongelaci3n para alterar los patrones de formaci3n de hielo en el tejido. Por ejemplo, se puede a3adir polivinilpirrolidona (10% p/v) e hidroxietil-almid3n dializado (10% p/v) a soluciones de crioconservaci3n est3ndares (DMEM, DMSO al 10%, suero fetal bovino al 10%) para reducir la formaci3n de hielo extracelular, permitiendo mientras la formaci3n de hielo intracelular.

En ciertas realizaciones, se pueden usar diversos tratamientos enzimáticos u otros tratamientos químicos para eliminar células naturales viables de tejidos u órganos de implantes. Por ejemplo, la exposición prolongada de células a proteasas, tal como la tripsina, da como resultado la muerte celular.

En otras ciertas realizaciones, el tejido placentario se descelulariza usando detergentes o sus combinaciones, por ejemplo, un detergente no iónico, por ejemplo, Triton X-100, y un detergente aniónico, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, pueden romper las membranas celulares y ayudar a la eliminación de residuos celulares del tejido. Preferiblemente, el detergente residual en la matriz tisular descelularizada es eliminado, por ejemplo, por lavado con una solución tampón, para evitar la interferencia con la posterior repoblación de la matriz tisular con células viables.

La descelularización del tejido placentario se realiza preferiblemente por la administración de una solución eficaz para lisar las células placentarias naturales. Preferiblemente, la solución es una solución hipotónica acuosa, o de baja concentración iónica, formulada para lisar eficazmente las células. En ciertas realizaciones, la solución hipotónica acuosa es, por ejemplo, agua desionizada o un tampón hipotónico acuoso. En realizaciones específicas, el tampón hipotónico acuoso contiene uno o más aditivos que proporcionan condiciones subóptimas para la actividad de una o más proteasas, por ejemplo colagenasa, que pueden ser liberadas como resultado de la lisis celular. Aditivos tales como quelantes de iones metálicos, por ejemplo 1,10-fenantrolina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), crean un ambiente desfavorable para muchas enzimas proteolíticas. En otras realizaciones, la solución de lisis hipotónica se formula para eliminar o limitar la cantidad de cationes divalentes, por ejemplo, iones de calcio y/o zinc, disponibles en solución, lo que reduciría, a su vez, la actividad de proteasas dependientes de dichos iones.

Preferiblemente, la solución de lisis hipotónica se prepara seleccionando condiciones de pH, disponibilidad reducida de iones calcio y zinc, presencia de quelantes de iones metálicos y el uso de inhibidores proteolíticos específicos para la colagenasa de manera que la solución lisara óptimamente las células naturales mientras protege la matriz tisular subyacente de la degradación proteolítica. En ciertas realizaciones, una solución de lisis hipotónica puede incluir una solución tamponada de agua, a pH 5,5 a 8, preferiblemente a pH 7 a 8, libre o sustancialmente libre de iones de calcio y zinc, y/o incluyendo un quelante de iones metálicos, tal como EDTA. Adicionalmente, también se puede emplear el control de los parámetros de temperatura y tiempo durante el tratamiento de la matriz tisular con la solución de lisis hipotónica para limitar la actividad de las proteasas.

En algunas realizaciones, la descelularización del tejido placentario incluye el tratamiento del tejido con una o más nucleasas, por ejemplo, eficaz para inhibir el metabolismo celular, la producción de proteínas y la división celular sin degradar la matriz de colágeno subyacente. Las nucleasas que se pueden usar para la digestión de DNA y RNA de las células naturales incluyen una o ambas exonucleasas o endonucleasas. Las nucleasas adecuadas para la descelularización están disponibles comercialmente. Por ejemplo, las exonucleasas que inhiben eficazmente la actividad celular incluyen DNasa I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) y RNasa A (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) y las endonucleasas que inhiben eficazmente la actividad celular incluyen EcoRI (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo) y Hind III (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo).

Las nucleasas seleccionadas pueden estar contenidas en una solución tampón fisiológica que contenga iones que sean óptimos para la actividad de la nucleasa, por ejemplo, sales de magnesio o sales de calcio. También se prefiere que la concentración iónica de la solución tamponada, la temperatura de tratamiento y la duración del tratamiento se seleccionen para asegurar el nivel deseado de actividad eficaz de las nucleasas. El tampón es preferiblemente hipotónico para promover el acceso de las nucleasas al interior de las células. En ciertas realizaciones, la una o más nucleasas comprenden DNasa I y RNasa A. Preferiblemente, la solución de degradación de nucleasas contiene de aproximadamente 0,1 microgramos/mL a aproximadamente 50 microgramos/mL, o aproximadamente 10 microgramos/mL, de la nucleasa DNasa I, y aproximadamente 0,1 microgramos/mL a aproximadamente 10 microgramos/mL, preferiblemente aproximadamente 1,0 microgramos/mL, de RNasa A. El tejido placentario se puede descelularizar por aplicación de las enzimas anteriores a una temperatura de aproximadamente 20°C a 38°C, de preferencia aproximadamente 37°C, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas.

En otras realizaciones, la solución de descelularización comprende una o más fosfolipasas, por ejemplo fosfolipasa A y/o fosfolipasa C, por ejemplo, en una solución tamponada. Preferiblemente, la fosfolipasa como se usa no debe tener un efecto perjudicial sobre la proteína de la matriz tisular. El pH del vehículo, así como la composición del vehículo, también se ajustarán con respecto al perfil de actividad de pH de la enzima elegida para su uso. Además, en diversas realizaciones se ajusta la temperatura usada durante la aplicación de la enzima al tejido con el fin de optimizar la actividad enzimática.

Después de la descelularización, en ciertas realizaciones la matriz tisular se lava en una solución de lavado para asegurar la eliminación de los residuos celulares que pueden incluir proteína celular, lípidos celulares y ácido nucleico celular, así como cualquier residuo extracelular. La eliminación de estos residuos celulares y extracelulares reduce la probabilidad de que la matriz tisular de trasplante provoque una respuesta inmunitaria adversa del receptor en el momento del implante. Por ejemplo, el tejido se puede lavar una o más veces con una solución de lavado, en donde la solución de lavado es, por ejemplo, PBS o solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). La composición de la solución salina equilibrada de lavado y las condiciones bajo las cuales se aplica a la matriz tisular de trasplante se pueden seleccionar para disminuir o eliminar la actividad de las proteasas o nucleasas utilizadas durante el proceso de descelularización. En realizaciones específicas, la solución de lavado no contiene magnesio o calcio, por ejemplo sales de magnesio o sales de calcio, y el proceso de lavado tiene lugar a una temperatura entre aproximadamente

2°C y 42°C, por ejemplo, más preferiblemente 4°C. La matriz tisular de trasplante se puede lavar, por ejemplo, incubándola en la solución salina equilibrada de lavado durante hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 días, por ejemplo, cambiando la solución de lavado cada 13 días. Opcionalmente, se puede incluir en la solución de lavado un agente antibacteriano, antifúngico o esterilizante, o una de sus combinaciones, para proteger la matriz tisular de trasplante de la contaminación por patógenos medioambientales. El lavado se puede realizar empapando el tejido placentario con o sin agitación suave.

La matriz tisular, una vez descelularizada, se puede conservar por crioconservación. Los métodos de crioconservación de tejidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Brockbank, K. G. M., "*Basic Principles of Viable Tissue Preservation*", en: *Transplantation Techniques and Use of Cryopreserved Allograft Cardiac Valves and Vascular Tissue*, D. R. Clarke (ed.), Adams Publishing Group, Ltd., Boston, pp. 9-23 (estudio de la crioconservación de tejidos y órganos).

La matriz tisular, haya sido o no crioconservada, en ciertas realizaciones se trata para potenciar la adhesión y la migración interior de las células alogénicas o autólogas, *in vitro*, que se usarán para repoblar el tejido de trasplante.

En ciertas realizaciones, la fijación de las células autólogas o alogénicas a la matriz placentaria descelularizada puede aumentarse, por ejemplo, poniendo en contacto la matriz placentaria con suero (humano o bovino fetal, unión máxima con suero al 1%) y/o fibronectina purificada, por ejemplo, en medio de cultivo en el que se coloca la matriz placentaria descelularizada, por ejemplo, en preparación para la repoblación con células alogénicas o autólogas. Cada una de las dos subunidades homólogas de fibronectina tiene dos regiones de reconocimiento celular, que incluyen una que comprende la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Un segundo sitio, de unión a glicosaminoglicanos, actúa sinérgicamente y parece que estabiliza las interacciones fibronectina-células mediadas por la secuencia RGD.

Por tanto, en una realización específica, la matriz placentaria descelularizada se pone en contacto tanto con fibronectina como con un glicosaminoglicano, por ejemplo, heparina, durante un período eficaz para la unión de la fibronectina a las superficies de la matriz placentaria para que sea repoblada con células autólogas o alogénicas. La fibronectina, y opcionalmente el glicosaminoglicano, se pueden incluir dentro de un tampón o medio de cultivo fisiológicamente aceptable, por ejemplo, fosfato de sodio/glicerina/seroalbúmina bovina y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (por ejemplo, GIBCO). El tampón o medio de cultivo se mantiene preferiblemente a un pH fisiológicamente aceptable, por ejemplo, de aproximadamente 6,8 a 7,6. La fibronectina se puede obtener de sangre humana, ser tratada para limitar la contaminación por virus o se puede obtener de fuentes comerciales. La concentración de fibronectina y/o glicoproteína puede variar desde aproximadamente 1 microgramo/mL hasta aproximadamente 100 microgramos/mL, por ejemplo, aproximadamente 10 microgramos/mL. La relación en peso preferida entre fibronectina y heparina es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100, o aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, por ejemplo, fibronectina:glicosaminoglicano 10:1, por ejemplo heparina.

La matriz placentaria descelularizada se puede poner en contacto, por ejemplo, ser tratada, con una o más composiciones que actúan, por ejemplo, para potenciar la quimiotaxis celular, aumentando la velocidad del movimiento direccional a lo largo de un gradiente de concentración de la sustancia en solución. Con respecto a las células fibroblastos, son quimiotácticos el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los colágenos fibrilares, los fragmentos de colágeno y la fibronectina.

En una realización preferida específica, la placenta se descelulariza de la siguiente manera. El tejido placentario del que se ha extraído la sangre se congela primero a una temperatura de -20°C a -180°C, por ejemplo, aproximadamente -80°C. El tejido se descongela luego a aproximadamente 4°C durante la noche. El tejido descongelado se digiere luego con tripsina al 0,1% a temperatura ambiente durante 2 horas para producir tejido placentario digerido. El tejido digerido se trata secuencialmente con Triton-X100 al 1%, 2% y 3% durante 24 horas cada uno. Los tratamientos con Triton-X100 son seguidos a continuación por el tratamiento del tejido con SDS-PBS al 0,1% durante 24 horas, después de lo cual se retira sustancialmente el material celular. A continuación, el tejido se lava extensamente con 1-10 cambios de solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido por tratamiento con DNasa I (150 U/mL) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la matriz placentaria descelularizada restante se lava de nuevo extensamente con PBS + antibióticos al 1% (penicilina + estreptomycin), opcionalmente se seca y se conserva a 4°C.

4.5. Métodos de siembra de células sobre o en la matriz

Las células se pueden cargar sobre la matriz placentaria descelularizada por cualquier método fisiológicamente aceptable. En ciertas realizaciones, las células se ponen en suspensión en, por ejemplo, un medio de cultivo líquido, una solución salina o una solución tampón, y el líquido que contiene las células se perfunde en la matriz placentaria a través de una o más de las matrices vasculares, por ejemplo, por el paso del líquido que contiene las células a través de la vasculatura placentaria o, en realizaciones en las que la placenta está descelularizada, el armazón vascular sustancialmente intacto. El paso del líquido que contiene las células se puede facilitar, por ejemplo, por el uso de una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, para empujar el líquido en la vasculatura de la placenta, opcionalmente con una segunda bomba para extraer el líquido de la placenta. La matriz placentaria también se puede cultivar en dicho medio de cultivo líquido, solución salina o solución tampón que contiene las células durante un tiempo suficiente para que una pluralidad de las células se fije a dicha matriz placentaria. En otras ciertas realizacio-

nes, las células, por ejemplo, en suspensión en un líquido, se siembran y/o se inyectan directamente en la placenta o en el almacén placentario descelularizado.

4.6. Células que se ha de usar

4.6.1. Células tumorales

En el contexto del presente método se puede usar cualquier célula tumoral para evaluar compuestos antitumorales potenciales e identificar compuestos antitumorales. La selección de células tumorales para uso en el método puede depender del cáncer particular para el que se busca un compuesto antitumoral. El método se puede usar para identificar compuestos antitumorales generalmente aplicables para células tumorales de un tipo particular de cáncer, o se puede usar para identificar compuestos antitumorales que serían particularmente eficaces en el tratamiento del cáncer de un individuo en particular.

En ciertas realizaciones, las células que se han de usar son células tumorales primarias. Las células tumorales primarias pueden ser, por ejemplo, células de una muestra de sangre o biopsia de tejido. Las células tumorales pueden ser alogénicas de un individuo particular que se va a tratar, o autólogas de un individuo particular que se va a tratar. En otra cierta realización, dichas células tumorales son células de líneas de células tumorales. En otras realizaciones, las células tumorales son células madre tumorales o células madre cancerígenas. En realizaciones específicas, dichas células tumorales son células de mesotelioma, células de melanoma, células de adenoma, células de carcinoma, células de adenocarcinoma, células de carcinoma ductal, células de leucemia, células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia de linfocitos T aguda, células de leucemia linfoblástica aguda, células de tricoleucemia, células de leucemia promielocítica aguda, células de linfoma, células de linfoma de Burkitt, células de linfoma no Hodgkin, células de linfoma de Hodgkin o células de mieloma múltiple, células de rhabdoidosarcoma, células de osteosarcoma, células de neuroblastoma, células de astrocitoma o células de glioblastoma. En realizaciones más específicas, dicha línea de células tumorales es 5637 (carcinoma), KHOS/NP (osteosarcoma), MNNG/HOS (osteosarcoma), Saos-2 (osteosarcoma), U-2 OS (osteosarcoma), SJSA-1 (osteosarcoma), CCF-STTG1 (astrocitoma), DBTRG-05MG (glioblastoma), U87 MG (glioblastoma), T98G (glioblastoma), SK-N-SH (neuroblastoma), SK-N-AS (neuroblastoma), MCF-7 (adenocarcinoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma), MDA-MB-436 (adenocarcinoma), SK-BR-3 (adenocarcinoma), BT-20 (carcinoma), BT-474 (carcinoma), CAMA-1 (carcinoma), HCC2218 (carcinoma), SW527 (carcinoma), MDA-MB-453 (carcinoma), MDA-MB-435S (carcinoma), T-47D (carcinoma), ZR-75-1 (carcinoma), UACC-812 (carcinoma), HCC1419 (carcinoma), HeLa (adenocarcinoma), Caco-2 (adenocarcinoma), COLO205 (adenocarcinoma), COLO320DM (adenocarcinoma), DLD-1 (adenocarcinoma), HCT-15 (adenocarcinoma), SK-CO-1 (adenocarcinoma), SW48 (adenocarcinoma), SW480 (adenocarcinoma), HCT-8 (adenocarcinoma), RKO (carcinoma), LS411N (carcinoma), T84 (carcinoma), AGS (adenocarcinoma), KATO III (carcinoma), NCI-N87 (carcinoma), SNU-16 (carcinoma), 769-P (adenocarcinoma), 786-O (adenocarcinoma), ACHN (adenocarcinoma), A-498 (carcinoma), Caki-1 (carcinoma), G-402 (leiomioblastoma), CML-T1 (leucemia), CTV-1 (leucemia), JVM-2 (leucemia), K562 (leucemia), MHH-CALL2 (leucemia), NALM-6 (leucemia), 8E5 (leucemia), CCRF-SB (leucemia), CEM/C1 (leucemia), CEM/C2 (leucemia), CEM-CM3 (leucemia), CCRF-HSB-2 (leucemia), KG-1 (leucemia), KG-1a (leucemia), CCRF-CEM (leucemia), MOLT-3 (leucemia), SUP-B15 (leucemia), TALL-104 (leucemia), Loucy (leucemia), RS4;11 (leucemia), REH (leucemia), AML-193 (leucemia), THP-1 (leucemia), MOLM-13 (leucemia), Kasumi-1 (leucemia), Kasumi-3 (leucemia), BDCM (leucemia), HL-60 (leucemia), I 2.1 (leucemia), I 9.2 (leucemia), J.gam1a.WT (leucemia), J.RT3-T3.5 (leucemia), P116 (leucemia), P116.c139 [P116.c39] (leucemia), D1.1 (leucemia), J45.01 (leucemia), MV-4-11 (leucemia), Kasumi-4 (leucemia), MEG-01 (leucemia), KU812 (leucemia), Mo (leucemia), JM1 (leucemia), GDM-1 (leucemia), CESS (leucemia), ARH-77 (leucemia), SK-HEP-1 (adenocarcinoma), Bel-7402 (carcinoma), Bel-7404 (carcinoma), HEP-3B (carcinoma), HepG2 (carcinoma), Calu-3 (adenocarcinoma), NCI-H1395 (adenocarcinoma), NCI-H1975 (adenocarcinoma), SK-LU-1 (adenocarcinoma), NCI-H2122 (adenocarcinoma), NCI-H727 (carcinoma), A-427 (carcinoma), A549 (carcinoma), SW1573 (carcinoma), NCI-H358 (carcinoma), NCI-H460 (carcinoma), NCI-H292 (carcinoma), NCI-H82 (carcinoma), NCI-H226 (carcinoma), NCI-H526 (carcinoma) o MSTO-211H (mesotelioma).

4.6.2. Células no tumorales

En ciertas realizaciones, el método comprende introducir en la placenta uno o más tipos de células no tumorales, por ejemplo, antes de poner en contacto las células tumorales con el compuesto antitumoral potencial. Las células no tumorales se pueden introducir en la placenta antes de la introducción de las células tumorales, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para que al menos una porción de las células no tumorales, o sustancialmente todas, se unan a la placenta; o se pueden introducir al mismo tiempo que la introducción de las células tumorales, por ejemplo, en forma de una suspensión conjunta de células tumorales y células no tumorales, o como lotes separados de células tumorales y no tumorales. La relación entre los números de células tumorales y los números de células no tumorales puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30 o más. Las células estromales se pueden cultivar, por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o más, antes de la introducción de las células tumorales en la placenta, o en una porción de ella.

Por ejemplo, las células no tumorales pueden ser, por ejemplo, células estromales, por ejemplo, células estromales adiposas, células estromales derivadas de la médula ósea, médula ósea no tratada o similares. Ventajosamente, las células estromales se pueden introducir en la placenta, o una porción de ella, antes de la introducción de las células

tumorales, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para permitir el establecimiento de las células estromales. La relación entre los números de células tumorales y los números de células estromales puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30 o más. Las células estromales se pueden cultivar, por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o más, antes de la introducción de las células tumorales en la placenta, o en una porción de ella. Las células estromales y las células tumorales se pueden introducir en la placenta, o en una porción de ella, al mismo tiempo, por ejemplo, en administraciones separadas de soluciones, o como una suspensión conjunta de las células.

En otras ciertas realizaciones, las células no tumorales comprenden uno o más tipos de células del sistema inmunitario, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células precursoras hematopoyéticas, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y/o células asesinas naturales (NK). En una realización específica, dichas células NK comprenden, o son, células asesinas naturales intermedias placentarias (PiNK), CD56⁺ CD16⁻, por ejemplo, las células NK placentarias descritas en el documento US 2009/0252710.

En otras ciertas realizaciones, las células no tumorales comprenden células madre o células progenitoras aisladas. En realizaciones específicas, dichas células madre o células progenitoras aisladas son células madre embrionarias aisladas, células germinales embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimatosas, células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, células estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea, células madre placentarias adherentes a plástico del tejido (PDACTM, por ejemplo, las células madre placentarias descritas en las Patentes de EE.UU. N° 7.468.276 y 8.057.788), células madre del cordón umbilical, células madre del líquido amniótico, células adherentes derivadas de amnios (AMDAC), células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC, por ejemplo, las células descritas en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N° 2010/0047214), células madre adiposas, células madre limbales, células madre de la pulpa dental, mioblastos, células progenitoras endoteliales, células madre neuronales, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre del folículo piloso, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogenéticamente, células madre reprogramadas, células adherentes derivadas de amnios o células madre de poblaciones secundarias. En otras realizaciones específicas, las células no tumorales son células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas aisladas. En otras realizaciones específicas, las células no tumorales son células madre placentarias CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ adherentes a plástico de un cultivo tisular, por ejemplo, células madre placentarias descritas en los documentos US 7.468.276 y US 8.057.788. En una realización específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente una o más de CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻ o CD90⁺. En una realización más específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻ y CD90⁺. Dichas células madre placentarias, en ciertas realizaciones, son inmunomoduladoras. Véanse, por ejemplo, los documentos US 7.682.803 y US 2008/0226595.

En otras diversas realizaciones específicas, las células no tumorales son células diferenciadas, por ejemplo, una o más de células endoteliales, células epiteliales, células dérmicas, células endodérmicas, células mesodérmicas, fibroblastos, osteocitos, condrocitos, células asesinas naturales, células dendríticas, células hepáticas, células pancreáticas o células estromales. En diversas realizaciones más específicas, dichas células diferenciadas son, o comprenden, células de las mucosas de las glándulas salivales, células serosas de las glándulas salivales, células de las glándulas de von Ebner, células de las glándulas mamarias, células de las glándulas lagrimales, células de las glándulas ceruminosas, células oscuras de las glándulas sudoríparas ecninas, células claras de las glándulas sudoríparas ecninas, células de las glándulas sudoríparas apocrinas, células de la glándula de Moll, células de las glándulas sebáceas, células de las glándulas de Bowman, células de las glándulas de Brunner, células de las vesículas seminales, células de las glándulas prostáticas, células de las glándulas bulbouretrales, células de la glándula de Bartholin, células de la glándula de Littre, células del endometrio uterino, células caliciformes aisladas, células de la mucosa del revestimiento del estómago, células zimogénicas de las glándulas gástricas, células oxínticas de las glándulas gástricas, células acinares pancreáticas, células de Paneth, neumocitos tipo II, células de Clara, somatotropas, lactotropas, tirotropas, gonadotropas, corticotropas, células pituitarias intermedias, células neurosecretoras magnocelulares, células intestinales, células del tracto respiratorio, células epiteliales tiroideas, células parafooliculares, células de las glándulas paratiroides, células principales paratiroides, células oxífilas, células de las glándulas suprarrenales, células cromafines, células de Leydig, células de la teca interna, células del cuerpo lúteo, células luteínicas de la granulosa, células luteínicas de la teca, células yuxtglomerulares, células de la mácula densa, células peripolares, células mesangiales, células fenestradas endoteliales vasculares linfáticas y de los vasos sanguíneos, células continuas endoteliales vasculares linfáticas y de los vasos sanguíneos, células esplénicas endoteliales vasculares linfáticas y de los vasos sanguíneos, células sinoviales, célula serosa (revestimiento de cavidades peritoneales, pleurales y pericárdicas), células escamosas, células columnares, células oscuras, célula de la membrana vestibular (revestimiento del espacio endolinfático del oído), células basales de la estría vascular, células marginales de la estría vascular (revestimiento del espacio endolinfático del oído), células de Claudius, células de Boettcher, células del plexo coroideo, células escamosas pia-aracnoideas, células del epitelio ciliar pigmentadas, células del epitelio ciliar no pigmentadas, células endoteliales corneales, células peg, células ciliadas del tracto respiratorio, células ciliadas del oviducto, células ciliadas del endometrio uterino, células ciliadas de la red testicular, células ciliadas de los conductos eferentes, espermocitos ciliados, queratinocitos epidérmicos, células basales epidérmicas, queratinocitos de uñas de manos y pies, células basales del lecho ungueal, células medulares del tallo del pelo, células corticales del tallo del pelo, células cuticulares del tallo del pelo, células cuticulares de la vaina de la raíz del pelo, células de la

vaina de la raíz del pelo de la capa de Huxley, células de la vaina de la raíz del pelo de la capa de Henle, células de la vaina externa de la raíz del pelo, células de la matriz del pelo, células epiteliales superficiales del epitelio escamoso estratificado, célula basal del epitelio, células del epitelio urinario, células pilosas internas auditivas del órgano de Corti, células pilosas externas auditivas del órgano de Corti, células basales del epitelio olfatorio, neuronas sensoriales primarias sensibles al frío, neuronas sensoriales primarias sensibles al calor, células de Merkel de la epidermis, neuronas receptoras olfativas, neuronas sensoriales primarias sensibles al dolor, bastones fotorreceptores, conos fotorreceptores sensibles al azul, conos fotorreceptores sensibles al verde, conos fotorreceptores sensibles al rojo, neuronas sensoriales primarias propioceptoras, neuronas sensoriales primarias sensibles al tacto, células del cuerpo carotídeo tipo I, células del cuerpo carotídeo tipo II (sensor del pH sanguíneo), célula pilosa tipo I del aparato vestibular del oído (aceleración y gravedad), células pilosas tipo II del aparato vestibular del oído, células de los botones gustativos tipo I, células neuronales colinérgicas, células neuronales adrenérgicas, células neurales peptidérgicas, células columnares internas del órgano de Corti, células columnares externas del órgano de Corti, células falángicas internas del órgano de Corti, células falángicas externas del órgano de Corti, células del límite del órgano de Corti, células de Hensen del órgano de Corti, células que soportan el aparato vestibular, células que soportan los botones gustativos, células que soportan el epitelio olfativo, células de Schwann, células satélite, células gliales entéricas, astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, neuronas fusiformes, células epiteliales de la lente anterior, células de fibra de la lente que contiene el cristalino, hepatocitos, adipocitos, células de la grasa blanca, células de la grasa parda, lipocitos hepáticos, células parietales del glomérulo renal, podocitos del glomérulo renal, células del borde en cepillo del túbulo proximal renal, células del segmento delgado del asa de Henle, células del túbulo distal del riñón, células del conducto colector renal, neumocitos de tipo I, células del conducto pancreático, células del conducto no estriado, células conductuales, células del borde en cepillo intestinal, células del conducto estriado de la glándula exocrina, células epiteliales de la vesícula biliar, células no cilindadas del conducto eferente, células epididimarias principales, células epididimarias basales, células epiteliales ameloblásticas, células epiteliales del plano semilunar, células epiteliales interdentes del órgano de Corti, fibroblastos de tejido conjuntivo laxo, queratocitos corneales, fibroblastos tendinosos, fibroblastos del tejido reticular de la médula ósea, fibroblastos no epiteliales, pericitos, células del núcleo pulposo, cementoblastos/cementocitos, odontoblastos, odontocitos, condrocitos del cartílago hialino, condrocitos del fibrocartílago, condrocitos del cartílago elástico, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células osteoprogenitoras, hialocitos, células estrelladas (oído), células estrelladas hepáticas (células Ito), células estrelladas pancreáticas, células del músculo esquelético rojo, células del músculo esquelético blanco, células del músculo esquelético intermedio, células del saco nuclear del huso muscular, células de la cadena nuclear del huso muscular, células satélite, células del músculo cardíaco normal, células del músculo cardíaco nodal, células de fibras de Purkinje, células de la musculatura lisa, células mioepiteliales del iris, células mioepiteliales de las glándulas exocrinas, reticulocitos, megacariocitos, monocitos, macrófagos del tejido conjuntivo, células epidérmicas de Langerhans, células dendríticas, células microgliales, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, linfocitos T cooperadores, linfocitos T supresores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T asesinos naturales, linfocitos B, células asesinas naturales, melanocitos, células epiteliales pigmentadas de la retina, ovogonia/ovocitos, espermatidas, espermatocitos, células del espermatozoonio, espermatozoides, células del folículo ovárico, células de Sertoli, células epiteliales del timo y/o células renales intersticiales.

En ciertas realizaciones, las células no tumorales son células de cultivo primarias, células que se han obtenido directamente de un tejido u órgano sin cultivar, células que se han cultivado *in vitro*, o células de una línea celular, por ejemplo, células parcial, condicional o completamente inmortalizadas.

Dichas células no tumorales se pueden aislar de tejido u órganos relevantes, por ejemplo, de glándulas particulares, usando una o más proteasas conocidas en la técnica, por ejemplo, colagenasa, tripsina, liberasa o similares. El tejido se puede dispersar físicamente antes, durante o después del tratamiento del tejido con una proteasa, por ejemplo, por troceado, maceración, filtración o similares. Las células se pueden cultivar usando métodos de cultivo celular estándares conocidos en la técnica antes de su uso en los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, con el fin de producir poblaciones celulares homogéneas o sustancialmente homogéneas, para seleccionar tipos de células particulares, o similares.

El aislamiento, cultivo e identificación de las células de la glándula pituitaria se puede realizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando lipocortina 1 (LC1) como marcador, de acuerdo con los procedimientos descritos por Christian et al., "Characterization and localization of lipocortin 1-binding sites on rat anterior pituitary cells by fluorescence-activated cell analysis/sorting and electron microscopy", *Endocrinology* 138(12):5341-5351 (1997); véanse también Kim et al., "Isolation, culture and cell-type identification of adult human pituitary cells", *Acta Neuropathol.* 68(3):205-208 (1985); Baranowska et al., "Direct effect of cortistatin on GH release from cultured pituitary cells in the rat", *Neuro Endocrinol Lett.* 27(1-2):153-156 (2006).

El aislamiento, cultivo e identificación de las células de la glándula tiroides se pueden realizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pavlov et al., "Isolation of cells for cytological and cytogenetic studies of the thyroid epithelium", *Morfologija* 130(6):81-83 (2006); Fayet et al., "Isolation of a normal human thyroid cell line: hormonal requirement for thyroglobulin regulation", *Thyroid* 12(7):539-546 (2002).

El aislamiento, cultivo e identificación de las células de glándulas suprarrenales se pueden realizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Creutz, "Isolation of chromaffin granules", *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3: Unit 3.39.1-10 (Sept. 2010); Caroccia et al., "Isolation of human adrenocortical aldosterone-

producing cells by a novel immunomagnetic beads method", *Endocrinology* 151(3):1375-80 (2010); Fawcett et al., "Isolation and properties in culture of human adrenal capillary endothelial cells", *Biochem Biophys Res Commun.* 174(2):903-8 (1991); Notter et al., "Rodent and primate adrenal medullary cells in vitro: phenotypic plasticity in response to coculture with C6 glioma cells or NGF", *Exp Brain Res.* 76(1):38-46 (1989).

- 5 En ciertas realizaciones, las células no tumorales producen una proteína o polipéptido biológicamente relevante. En ciertas realizaciones, dicha proteína o polipéptido es una citoquina o un péptido que comprende una de sus partes activas. En realizaciones más específicas, dicha citoquina es adrenomedulina (AM), angiopoyetina (Ang), proteína morfogenética ósea (BMP), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina (Epo), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de diferenciación del crecimiento (GDF-9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado del hepatoma (HDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor estimulante de migraciones, miostatina (GDF-8), factor de crecimiento mielomonocítico (MGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoyetina (Tpo), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), TGF- β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o proteína Wnt.

En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es un receptor soluble para AM, Ang, BMP, BDNF, EGF, Epo, FGF, GDNF, G-CSF, GM-CSF, GDF-9, HGF, HDGF, IGF, factor estimulante de migraciones, GDF-8, MGF, NGF, P1GF, PDGF, Tpo, TGF- α , TGF- β , TNF- α , VEGF o una proteína Wnt.

- 20 En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es una interleuquina, por ejemplo, interleuquina-1 alfa (IL-1 α), IL-1 β , IL-1F1, IL-1F2, IL-1F3, IL-1F4, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, subunidad alfa de 35 kDa de IL-12, subunidad beta de 40 kDa de IL-12, ambas subunidades alfa y beta de IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, isoforma 1 de IL-17F, isoforma 2 de IL-17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, subunidad p19 de IL-23, subunidad p40 de IL-23, subunidad p19 de IL-23 y subunidad p40 de IL-23 juntas, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27B, IL-27-p28, IL-27B e IL-27-p28 juntas, IL-28A, IL-28B, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ .

- 30 En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es un receptor soluble para IL-1 α , IL-1 β , IL-1F1, IL-1F2, IL-1F3, IL-1F4, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, subunidad alfa de 35 kDa de IL-12, subunidad beta de 40 kDa de IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, isoforma 1 de IL-17F, isoforma 2 de IL-17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, subunidad p19 de IL-23, subunidad p40 de IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27B, IL-27-p28, IL-28A, IL-28B, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ .

En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es un interferón (IFN), por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, IFN-K, IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ , IFN- δ , IFN- ζ , IFN- ω o IFN-v.

- 35 En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es un receptor soluble para IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, IFN-K, IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ , IFN- δ , IFN- ζ , IFN- ω o IFN-v.

En otras realizaciones específicas, dicha proteína o polipéptido es insulina o proinsulina. En otras realizaciones específicas, dicha proteína es un receptor para la insulina. En una realización más específica, dichas células producen una o más de prohormona convertasa 1, prohormona convertasa 2 o carboxipeptidasa E.

- 40 En otra realización específica, dicha proteína o polipéptido es leptina (LEP).

En otras realizaciones específicas, dicha proteína es eritropoyetina (Epo).

En otra realización específica, dicha proteína es trombopoyetina (Tpo).

- 45 Las células no tumorales, en ciertas realizaciones, comprenden células que producen dopamina, o un precursor de dopamina. En una realización específica, dicha proteína es tirosina-3-monooxigenasa. En una realización más específica, dichas células expresan L-aminoácido aromático descarboxilasa.

- 50 En otra realización específica, dicha proteína o polipéptido es una hormona o prohormona. En realizaciones más específicas, dicha hormona es hormona antimülleriana (AMH), adiponectina (Acrp30), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), angiotensina (AGT), angiotensinógeno (AGT), hormona antidiurética (ADH), vasopresina, péptido atrial-natriurético (ANP), calcitonina (CT), colecistoquinina (CCK), hormona liberadora de corticotropina (CRH), eritropoyetina (Epo), hormona foliculoestimulante (FSH), testosterona, estrógeno, gastrina (GRP), grelina, glucagón (GCG), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona del crecimiento (GH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario humano (HPL), inhibina, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de melanocitos (MSH), orexina, oxitocina (OXT), hormona paratiroidea (PTH), prolactina (PRL), relaxina (RLN), secretina (SCT), somatostatina (SRIF), trombopoyetina (Tpo), hormona estimulante del tiroides (Tsh) y/o hormona liberadora de la tirotropina (TRH).

En otra realización específica, dicha proteína o polipéptido es la enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450 (P450SCC).

En otras realizaciones específicas, dicha proteína es una proteína que falta o que funciona mal en un individuo que tiene un trastorno o enfermedad genética. En realizaciones específicas, dicha enfermedad genética es hipercolesterolemia familiar y dicha proteína es receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR); dicha enfermedad genética es enfermedad renal poliquística y dicha proteína es poliquistina-1 (PKD1), PKD-2 o PKD3; o dicha enfermedad genética es fenilcetonuria y dicha proteína es fenilalanina-hidroxilasa.

5. Ejemplos

5.1. Ejemplo 1: Conductividad de la vasculatura placentaria descelularizada

Este ejemplo demuestra un método para descelularizar eficaz y suavemente placenta de tal manera que conserve la matriz vascular de la placenta sustancialmente intacta, y la repoblación satisfactoria de la matriz vascular con células no placentarias.

Materiales y métodos

Placentas: Todas las placentas utilizadas fueron perfundidas previamente para eliminar la sangre del cordón placentario y umbilical. El tubo de perfusión en las dos arterias del cordón umbilical se mantuvo y se utilizó para la descelularización por perfusión. Las placentas se usaron para la descelularización por perfusión inmediatamente o se congelaron en un congelador a -80°C en un envase de plástico sellado.

Descelularización por perfusión: Las soluciones de descelularización que comprendían solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Triton X-100 al 1%, SDS al 0,5% y PBS, respectivamente, se infundieron secuencialmente en la placenta a través de las arterias del cordón umbilical. El detergente residual después de la descelularización se retiró por lavado usando una solución de PBS. El progreso de la descelularización se controló por inspección visual de los cambios morfológicos de la placenta, por análisis del contenido de DNA y por tinción con H&E de los tejidos descelularizados.

La descelularización por perfusión se ajustó utilizando una bomba peristáltica (VWR) con un caudal controlado entre 8 y 16 mL/min, con una segunda bomba peristáltica conectada para descargar el flujo pasante de la solución en un cubo de basura. Cada etapa de perfusión utilizó aproximadamente de 10 a 20 L de medio en el transcurso entre 8 y 24 horas. Después de completar la última perfusión con PBS, el armazón vascular placentario descelularizado se conservó en PBS con antibióticos (1% de penicilina + estreptomycin) a 4°C en, por ejemplo, una bandeja o desecador de acero inoxidable (VWR). En una modificación del protocolo, las placentas se congelaron a -80°C durante más de 24 horas y se descongelaron a temperatura ambiente durante 24 horas antes de la descelularización como anteriormente.

Análisis del contenido de DNA: El contenido de DNA en los tejidos placentarios se evaluó extrayendo y midiendo la cantidad de DNA de los tejidos durante el tratamiento, (expresándola en µg de DNA/mg de peso del tejido húmedo) utilizando un kit de aislamiento de DNA tisular (OMEGA Bio-Tek, N° de Cat. D3396-01). Para cada etapa de tratamiento, se usaron para extraer el DNA de 4 a 6 muestras individuales diferentes.

Soluciones de perfusión: Se compraron soluciones madre de Triton X-100 al 10%, SDS al 20% y 10X PBS de AMRESCO, VWR o Sigma y se diluyeron con agua destilada hasta las concentraciones deseadas.

Conductividad de fluidos: Se estableció un ensayo de conductividad de fluidos en vasos superficiales (SVFC) para acceder a la conductividad de fluidos del armazón vascular placentario descelularizado. Brevemente, se infundió una solución de azul tripán al 0,4% (100 mL a 200 mL) en las dos arterias del cordón umbilical. Se midieron la distancia del colorante en la ubicación del disco placentario y el radio del disco placentario. La conductividad se determinó por la distancia (D) recorrida por el colorante y el radio (R) del disco placentario en la misma posición y se calculó por la siguiente fórmula $(D/R) \times 100\%$. Para cada placenta, se recogieron 8 puntos de datos diferentes y se tomó la media.

Conductividad celular: La conductividad celular del armazón vascular de la placenta descelularizada se investigó por la distribución de las células que expresan luciferasa después de la infusión de células marcadas con luciferasa. La distribución de las células se visualizó con imágenes usando un Xenogen IVIS Spectrum, y los datos digitales bioluminiscentes se analizaron con el programa informático Living Image 3.0.

Resultados

Descelularización por perfusión: Desarrollo del método

Tras la descelularización por perfusión, como se ha descrito anteriormente, el árbol vascular descelularizado mostró una apariencia translúcida o transparente, lo que indicaba una descelularización sustancialmente completa. Esta apariencia translúcida o transparente fue reproducible a través de varias placentas diferentes, y no se alteró congelando la placenta, o no, antes de la descelularización.

Los inventores simplificamos el método de descelularización usando dos etapas de perfusión con detergente (Triton X-100 al 1% seguido de SDS al 0,5%) en lugar de múltiples etapas y múltiples detergentes como se describió anteriormente. La inspección morfológica (la placenta humana descelularizada aparecía como un tejido blanco y opaco desde la parte superior hasta la inferior del disco de la placenta). El análisis del contenido de DNA confirmó que di-

cho método simplificado de dos etapas puede ser eficaz y suficiente para lograr una reducción significativa del DNA y la descelularización.

Caracterización del almacén vascular placentario descelularizado: Análisis del contenido de DNA

El contenido de DNA de los tejidos se usó para examinar el grado de descelularización de cinco placentas experimentales. Se demostró que la primera perfusión con Triton X-100 aumentó significativamente el contenido de DNA en el tejido en comparación con el tejido placentario no tratado con Triton X-100 ($p = 0,02$), posiblemente porque el Triton X-100 mejoró la recuperación de DNA de los tejidos. La posterior perfusión con SDS al 0,5% redujo el contenido total medio de DNA en 69% ($N = 5$, varía desde 81% hasta 50%) significativamente diferente en comparación con la etapa de tratamiento con Triton X-100 ($p = 0,01$). El segundo ciclo de perfusión con Triton X-100 y SDS pareció aumentar el contenido de DNA, probablemente por la liberación adicional de más DNA de los tejidos. El lavado final con PBS también redujo la cantidad de DNA en el tejido placentario. La tinción con DAPI y H&E confirmó que, después de dos rondas de descelularización con perfusión, quedaban pocos núcleos intactos en la matriz de placenta descelularizada. El DNA residual era muy probablemente DNA genómico liberado durante la descelularización, que es eliminable usando, por ejemplo, tratamiento con DNasa I. Es necesario señalar que el DNA residual está presente en la matriz descelularizada, y no en el sistema vascular, puesto que los vasos aislados de la matriz de placenta descelularizada tienen poco contenido de DNA.

Caracterización del almacén vascular placentario descelularizado: Conductividad de fluidos

Para demostrar la integridad del sistema vascular placentario después de la descelularización, se infundió colorante azul tripán en el sistema vascular después de la descelularización. El colorante azul tripán se distribuyó desde el centro de la vena hasta el borde del disco de la placenta, lo que indica que tanto el sistema vascular principal como el pequeño conservaron la conductividad después de la descelularización. Para caracterizar cuantitativamente la conductividad de fluidos, se estableció un método llamado "conductividad de fluidos en los vasos superficiales" (SVFC) como se describe en "Métodos" anteriormente. La SVFC de cada placenta después de la infusión con colorante azul tripán se midió en ocho posiciones alrededor de la placenta, dividiendo radialmente la placenta en porciones aproximadamente iguales. Se determinó que la conductividad media de fluidos en los vasos superficiales de tres placentas era 93%.

Caracterización del almacén vascular placentario descelularizado: Conductividad y distribución celular

Para investigar la conductividad celular del almacén vascular placentario humano descelularizado, se perfundieron células marcadas con luciferasa en la vasculatura placentaria descelularizada, y se determinó la distribución de las células dentro de la matriz descelularizada por imágenes de luminiscencia y análisis digital. Se realizaron cuatro experimentos individuales (Estudio 1 a Estudio 4).

El Estudio 1 fue un estudio de viabilidad dirigido al establecimiento de métodos utilizando 300 millones de células de carcinoma de mama de ratón 4T1-luc como población celular infundida. Las placentas se congelaron a -80°C durante la noche y se descongelaron. Las placentas se descelularizaron usando 0,1X PBS. Antes de la infusión de las células, la placenta se pre-acondicionó perfundiendo 500 mL de FCS-PBS al 5%. Las células puestas de nuevo en suspensión en 300 mL de medio de cultivo celular se infundieron primero, seguido de una infusión de luciferina a 1,2 mg/mL. Se tomaron imágenes en tres ajustes diferentes y a las 0 horas y 2 horas después de la infusión celular. Se realizó un análisis de imagen cuantitativo (zona circular y zona de sectores) para la distribución de las células. Los resultados mostraron que las células marcadas con luciferasa infundidas en el almacén placentario podían formar imágenes y ser visualizadas en este nuevo método de estudio. Se encontró que las células se distribuían tanto en los vasos mayores como en los pequeños a lo largo de la mayor parte de la vasculatura placentaria.

El Estudio 2 confirmó los resultados del Estudio 1 usando el almacén vascular placentario humano procedente de descelularización con detergente. En particular, se evaluaron los efectos de cualquier detergente residual sobre la actividad de luciferasa y las señales de distribución celular utilizando 300 millones de células de carcinoma de mama de ratón 4T1-luc como población celular infundida. La descelularización se realizó por congelación y descongelación, tal como se describió anteriormente, seguido por descelularización con dos rondas de descelularización secuencial usando Triton X-100 al 1% y SDS al 0,5%, seguido por un lavado con PBS. La matriz placentaria también se pre-acondicionó con FCS al 5% en PBS antes de la infusión celular. En este estudio, las células y luciferina se premezclaron y se infundieron. Confirmando los resultados del Estudio 1, la actividad de luciferasa de las células se mantuvo 2 horas después de la infusión, lo que indica que la descelularización basada en detergente del almacén placentario no tiene toxicidad para las células.

El Estudio 3 fue diseñado para demostrar la distribución de células humanas en el almacén vascular placentario descelularizado. En contraste con el Estudio 1 y el Estudio 2, 300 millones de células de carcinoma de mama humano MDA-231-Luc, puestas de nuevo en suspensión en 300 mL de medio de crecimiento, se infundieron en una placenta descelularizada, preparada como en el Estudio 1 y el Estudio 2. Las células humanas se distribuyeron a lo largo de la vasculatura placentaria tan eficazmente como lo hicieron las células de ratón.

El Estudio 4 se diseñó para demostrar que el almacén vascular placentario humano descelularizado se puede usar para cultivar células para ingeniería tisular por repoblación celular. Se estableció un sistema de biorreactor prototipo cultivando una matriz de vasculatura placentaria intacta en una bandeja de acero inoxidable estéril de 22,86 x 5,08

cm (9x2 pulgadas). La circulación a través de la matriz se estableció por inserción de un tubo de entrada en las dos matrices de la arteria del cordón, e inserción de un tubo de salida en la matriz de la vena placentaria para recoger el medio/células de flujo pasante. La placenta se cultivó en una incubadora a 37°C durante la perfusión de las células. La circulación se mantuvo por una bomba peristáltica con un caudal controlado de aproximadamente 6 a 12 mL/min.

5 Se volvieron a poner en suspensión 200 millones de células de carcinoma de mama humano MDA-231-Luc en 500 mL de medio de crecimiento, y se infundieron/re-infundieron continuamente en la vasculatura placentaria humana descclularizada usando el sistema descrito anteriormente. La circulación se mantuvo durante la noche, después de lo cual se interrumpió el cultivo y la vasculatura placentaria se infundió con luciferina como en los Estudios 1-3.

Después de la incubación durante la noche en este sistema, no hubo contaminación en el cultivo. El análisis del medio de flujo pasante en la bandeja no encontró células, lo que sugería que sustancialmente todas las células infundidas estaban retenidas en el almacén vascular placentario, probablemente debido a la circulación repetida. El análisis de imágenes reveló que la distribución celular en el sistema vascular era similar a la de estudios previos. Había una mejora en la distribución uniforme como se muestra en el análisis de sectores. También se encontraron señales fuertes en la cara materna de la placenta, lo que demuestra que las células se distribuyeron por todo el grosor de la placenta, desde la cara fetal de la placenta (es decir, el lado con el cordón umbilical) hasta la cara materna (es decir, el lado opuesto).

Conclusiones

Este conjunto de experimentos demostró un método para descclularizar una placenta humana completa, mientras que retiene un almacén vascular sustancialmente intacto, y que el almacén vascular puede conducir el fluido eficazmente con una pérdida mínima. Estos resultados también indican que el almacén placentario se puede repoblar y usar en los métodos recogidos en la presente memoria.

5.2. Ejemplo 2: Cultivo celular usando el almacén vascular placentario descclularizado

Este ejemplo demuestra que tipos de células humanas adicionales pueden ser infundidas en el almacén vascular placentario descclularizado y cultivadas en su interior.

25 Materiales y métodos

Se usaron en este estudio los almacenes placentarios descclularizados humanos, preparados como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

30 Esterilización del almacén placentario: El almacén placentario descclularizado se esterilizó en ácido peracético (PAA) al 0,1% en PBS durante 3 horas, con cambio de solución cada 1 hora, a temperatura ambiente. Se hicieron lavados con agitación 6 veces en la misma cantidad de PBS durante una hora de cada cambio.

Preparación del almacén placentario: El tejido placentario descclularizado se cortó en microbloques de ~2 a 3 milímetros cúbicos con una cuchilla quirúrgica en condiciones estériles. Los bloques se lavaron con medio de cultivo celular.

35 Células para recelularización en cultivo: Se usaron en el estudio de recelularización PDAC™ que expresa la proteína verde fluorescente (GFP-PDAC), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células 293/GFP (Cell Biolabs, Inc.) y células HepaRG. Las células 293/GFP son una línea celular permanente establecida a partir de riñón humano embrionario primario transformadas con DNA de adenovirus humano tipo 5, modificada genéticamente para expresar establemente la proteína fluorescente verde.

40 Marcaje con punto cuántico de células adherentes derivadas de placenta (PDAC™): Los puntos cuánticos (QD) son nanopartículas semiconductoras fluorescentes, recientemente adoptadas para su uso en formación de imágenes biológicas *in vitro* e *in vivo*. En este estudio, se usaron puntos cuánticos Q605 (Invitrogen) para marcar las PDAC de acuerdo con el protocolo del vendedor.

45 Ensayo de crecimiento celular: Se determinó el crecimiento de las células usando un ensayo basado en el protocolo Promega MTS que usa el kit de ensayo CellTiter 96® AQueous. En resumen, se añadieron 20 µL de solución de MTS en cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos que contenía 100 µL de células en medio de cultivo por pocillo. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, seguido del registro de la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas ELISA.

50 Ensayo cuantitativo de GFP: Se sembraron células 293/GFP en el almacén vascular placentario descclularizado (~2 x 2 x 2 mm³) a 2 x 10⁴ por 96 pocillos. La fijación de células se midió en un ensayo ELISA cuantitativo de GFP con un kit GFP ELISA (AKR-121) (Cell Biolabs, Inc.) de acuerdo con el protocolo del vendedor.

Determinación de células vivas/muertas: Las células vivas y muertas se determinaron por el kit de tinción CytoSelect 96 well Anoikis Assay (CBA-081) (Cell Biolabs, Inc.).

Evaluación histológica: La evaluación histológica de descclularización y recelularización se realizó por tinción con H&E y tinción tricrómica de Masson (Histoserv). Los cortes de tejido se analizaron y registraron bajo microscopio.

Ensayos funcionales de hepatocitos: Las funciones de los hepatocitos se determinaron por la producción de albúmina (*Albumin, Blue Fluorescent Assay Kit; Active Motif*, Carlsbad, CA); ensayo de urea (*Quantichrom Urea Assay NC9283832 Bioassay Systems No. DIUR-500*, Fisher Scientific Co.); y ensayo P450 (*P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell Based/Biochemical Assay*, Promega)

5 Resultados:

El almacén vascular placentario humano descelularizado (DHPVS) mantiene la arquitectura y los componentes del ECM

La placenta descelularizada se presenta como un tejido transparente con extensión de árbol microvascular, que tiene una matriz rica similar a algodón.

- 10 Para determinar el efecto del proceso de descelularización sobre la morfología y la arquitectura placentarias, el almacén vascular descelularizado se fijó en paraformaldehído al 4% y se seccionó para el análisis histológico después de tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La descelularización eliminó sustancialmente todas las células, como se pone de manifiesto por la falta de tinción con hematoxilina de los núcleos celulares. Las estructuras placentarias fácilmente visibles al microscopio después de la tinción con H&E incluyen vasos grandes rodeados por tejido veloso, y la matriz esponjosa característica de la placenta, las ramas más pequeñas de las velosidades coriónicas. En contraste con las imágenes de después de la descelularización, el tejido placentario de control no descelularizado mostró una distribución celular rica con tinción positiva de células azules nucleares para hematoxilina.

- 15 Para determinar si el proceso de descelularización tenía un efecto adverso sobre los componentes y la disposición de la matriz extracelular (ECM), el mismo bloque de tejido de la placenta descelularizada se fijó y se tiñó con H&E o tricromo de Masson. La inspección visual al microscopio reveló que el tejido placentario descelularizado era de hecho acelular y que la matriz de la placenta estaba intacta. La estructura de la matriz y el colágeno (ECM) (color verde por tinción de Masson) permanecieron.

El almacén vascular placentario humano descelularizado (DHPVS) se puede recelularizar con células en cultivo

- 25 Para determinar si el almacén placentario descelularizado podría soportar el crecimiento celular en cultivo, se sembraron PDAC™ y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) sobre un bloque de DHPVS, y se inyectaron en el bloque, y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 14 días. Los bloques de tejido de DHPVS resultantes se seccionaron y se tiñeron por H&E para el análisis de recelularización. La inspección visual al microscopio reveló que las PDAC™ podrían crecer a lo largo de la superficie del almacén descelularizado y mantener la morfología viva en el espacio del almacén, y que las HUVEC habían repoblado al menos una porción del almacén vascular.

Evaluación cuantitativa de la fijación y el crecimiento celular en el almacén vascular placentario humano descelularizado (DHPVS)

- 35 Para determinar la fijación celular en el DHPVS en cultivo, este estudio utilizó un ensayo de cuantificación con proteína fluorescente verde (GFP), puesto que la mayoría de los estudios de imagen de células marcadas con GFP son cualitativos. Los ensayos actuales basados en ELISA permiten la detección de tan solo 30 pg/mL de GFP en el cultivo. Las células 293/GFP sembradas sobre DHPVS mostraron ~1,4 veces ($p = 0,004$) mejor crecimiento, por ELISA, que el crecimiento de las mismas células en 96 pocillos después de 24 horas.

Las PDAC™ pueden adherirse y proliferar en el almacén vascular placentario humano descelularizado (DHPVS)

- 40 Para determinar si el DHPVS es capaz de soportar el crecimiento de las células, se sembraron células PDAC™-GFP en bloques de DHPVS y se cultivaron. Las células proliferaron durante el cultivo y se integraron bien en el DHPVS durante su crecimiento, como se visualiza por imágenes fluorescentes. La proliferación de células PDAC™-GFP en DHPVS también se demostró por un ensayo con MTS. Las PDAC™-GFP se sembraron en bloques de DHPVS (~2 x 2 x 2 mm³) a 2×10^4 por 96 pocillos en medio de crecimiento. Los armazones se pasaron el día 1 y el día 3 a 96 pocillos nuevos para el ensayo con MTS para evaluar la proliferación celular. Los resultados indicaron que DHPVS es un almacén adecuado para la adherencia y proliferación de las PDAC™.

Las PDAC™-GFP se adhieren y crecen en vasos placentarios descelularizados

- 50 Para evaluar la fijación y el crecimiento de las PDAC™ en vasos placentarios descelularizados aislados, el cordón umbilical descelularizado (~2 mm de grosor), incluyendo los vasos, se sembró con las PDAC™-GFP ($0,5 \times 10^6$ en 2 mL de medio) y se cultivaron durante 3 días, y se visualizaron como se describe en Métodos, anteriormente. La imagen fluorescente resultante mostró que las células PDAC™-GFP se adhieren y crecen preferiblemente alrededor de vasos descelularizados.

- 55 Como un enfoque adicional para evaluar la fijación y el crecimiento celular en vasos placentarios pequeños descelularizados, células PDAC™-GFP y PDAC™ marcadas con Q605 se mezclaron por igual a un total de 1×10^6 /mL y se inyectaron en vasos pequeños dentro del DHPVS y se cultivaron a 37°C en medio de crecimiento durante 3 días. Se tomaron fotografías de las dos poblaciones de células en la misma área del vaso bajo un microscopio fluorescente. Las imágenes fluorescentes representativas tanto de las células que expresaban GFP como de las células marcadas

con Qdot mostraban que las PDAC™ pueden fijarse y crecer dentro de vasos placentarios pequeños descelularizados.

La fijación y el crecimiento celular de células específicas de tejido también se demostraron en microvasos placentarios descelularizados. Para lograr este objetivo, 300 µL de células 293/GFP a una concentración de 1×10^6 /mL se infundieron en un bloque del DHPVS ($\sim 3 \times 3 \times 5$ mm³) y se cultivaron en placas de 24 pocillos. Después de 7 días, las células se visualizaron y fotografiaron. Los resultados demostraron que las células 293/GFP pueden crecer fácilmente y están bien distribuidas en el DHPVS a lo largo de los 7 días.

Los hepatocitos pueden mantener el crecimiento funcional en el almacén vascular placentario humano descelularizado

Para establecer el crecimiento de hepatocitos en DHPVS, se sembraron células HepaRG a 2×10^4 /96 pocillos sobre DHPVS, o se inyectaron en DHPVS, y se cultivaron en medio 620. Las células se visualizaron y fotografiaron el día 4 y el día 7 bajo microscopía de contraste de fases. Los resultados indicaron que las células HepaRG mostraban un patrón de crecimiento agregado y una morfología de crecimiento de hepatocitos en presencia de DHPVS. El análisis funcional de los hepatocitos usando un ensayo de secreción de albúmina se realizó el día 3, el día 6 y el día 8 de cultivo. Las muestras del medio de cultivo se recogieron y analizaron con el kit de ensayo de fluorescencia azul de albúmina (Active Motif). Se generaron curvas patrones usando albúmina humana purificada. Los hepatocitos cultivados solos se usaron como control. Se encontró que los hepatocitos cultivados en DHPVS producían significativamente más albúmina que las células cultivadas en ausencia de DHPVS ($p < 0,02$). Los resultados indican que los hepatocitos mantienen funciones importantes cuando se cultivan en DHPVS.

5.3. Ejemplo 3: Ensayo de fármacos usando almacén vascular placentario descelularizado

Este ejemplo demuestra que las composiciones que comprenden un almacén vascular placentario descelularizado y células se pueden usar para analizar fármacos anticancerígenos

Bloques de almacén vascular placentario descelularizado (DPVS) en placas de 24 pocillos se sembraron con células HCT116 (1×10^5 células/por pocillo), una línea de células de cáncer colorrectal humano. Como control, las células HCT116 se cultivaron solas en pocillos, es decir, en ausencia de DPVS. Se añadió tricostatina A (TSA), un fármaco contemplado para uso en el tratamiento del cáncer, a DPVS/células o células solas a concentraciones de 20 µM y 100 µM, o no se añadió en absoluto (como control). Después de 48 horas de cultivo, la viabilidad celular se midió por el ensayo con MTS. Como se muestra en la Tabla 1, ambas concentraciones de TSA inhibieron la proliferación de las células HCT116 solas, así como de las células HCT116 cultivadas en DPVS, mostrando esta última diferente sensibilidad al fármaco. Por lo tanto, DPVS puede usarse como una plataforma para evaluar la eliminación de células cancerígenas por compuestos antitumorales potenciales.

TABLA 1:

	HCT116			HCT116 + DPVS		
	Control	TSA 20 µM	TSA 100 µM	Control	TSA 20 µM	TSA 100 µM
Inhibición	100,00%	11,21%	10,36%	100,00%	97,00%	73,32%

5.4. Ejemplo 4: Ensayo de fármacos usando almacén vascular placentario descelularizado.

Este ejemplo demuestra que las composiciones que comprenden almacén vascular placentario descelularizado y células se pueden usar para analizar fármacos anticancerígenos.

Se detectaron visual y cuantitativamente células que expresan luciferasa, usando el Xenogen IVIS Spectrum, midiendo la actividad de luciferasa de las células, lo que es indicativo del número de células.

Para examinar el efecto del fármaco anticancerígeno sobre las células cancerosas cultivadas en DPVS, se sembraron en DPVS en placas de 6 pocillos $1,5 \times 10^5$ células MDA-MB231/luciferasa (una línea de células de cáncer de mama humano (adenocarcinoma)) que expresa luciferasa; Cell Biolabs). Un conjunto de células/DPVS se trató con tricostatina A (TSA, 100 ng/mL) durante 24 horas. La expresión de luciferasa por las células tratadas con TSA cultivadas en DPVS se comparó con cultivos de control que comprendían células/DPVS que no habían sido tratadas con TSA. Las señales de luciferasa de los pocillos tratados con TSA fueron mucho menores que las señales de las células no tratadas/DPVS ($8,22 \times 10^6$ frente a $25,63 \times 10^6$, respectivamente), lo que indica que el tratamiento con TSA dio como resultado un número menor de células totales. Por lo tanto, DPVS se puede usar para estudiar la capacidad de los fármacos anticancerígenos, por ejemplo, TSA, para afectar el crecimiento de células cancerígenas en un contexto tridimensional.

5.5. Ejemplo 5: Los cotiledones placentarios se pueden usar como DPVS para ensayos de fármacos

Este ejemplo demuestra que los cotiledones placentarios se pueden usar como plataformas para analizar fármacos.

Cotiledones placentarios se aislaron de la placenta y se descclularizaron como se describió anteriormente. Se determinó que el área media de un solo cotiledón representaba alrededor del 10% de una placenta completa. Los cotiledones de placenta descclularizados comprendían la vasculatura y se demostró que por ellos podían circular fluido. Se evaluaron los caudales de circulación de fluidos (volumen de flujo entrante/volumen de flujo saliente) de cotiledones individuales aislados de siete placentas diferentes y se determinó que, por término medio era 28,92%. Por lo tanto, los cotiledones placentarios representan las unidades físicas más pequeñas que se pueden usar como DPVS de acuerdo con los usos descritos anteriormente en la presente memoria.

Para demostrar que se pueden usar cotiledones placentarios individuales aislados para evaluar posibles compuestos antitumorales, se infundieron dos tipos de células cancerosas, MDA-MB231/Luc y CRL1803-TT (carcinoma de tejido tiroideo), en la vasculatura de un solo cotiledón aislado (3×10^6 células/cotiledón). Se añadió tricostatina A (TSA, 100 ng/mL) al medio de crecimiento (300 mL) y las células se cultivaron durante 10 días en un biorreactor. Como control, se infundieron MDA-MB231/Luc y CRL1803-TT en la vasculatura de un solo cotiledón aislado (3×10^6 células/cotiledón) y se cultivaron en medio de crecimiento solo durante 10 días en un biorreactor.

El medio de cultivo se recogió durante todo el período de cultivo y se midió para determinar los niveles de calcitonina por ELISA. Además, al final del cultivo (día 10), se determinaron los números de células viables en los cotiledones tratados tanto con TSA como de control por el ensayo con MTS. Como se muestra en la Figura 1A, el cotiledón/células tratados con TSA demostraron una supervivencia celular reducida en comparación con el medio de cultivo de control. Además, como se muestra en la Figura 1B, la producción de calcitonina por las células se redujo en el grupo cotiledón/células tratados con TSA. Estos datos confirman además que los cotiledones placentarios se pueden usar para analizar fármacos antitumorales.

5.6. Ejemplo 6: Ensayos de fármacos usando cotiledones placentarios

Este ejemplo demuestra que los cotiledones placentarios se pueden usar para analizar fármacos anticancerígenos, como se analizó usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS.

Se infundieron células MDA-MB231/luciferasa en la vasculatura de un cotiledón único aislado (40×10^6 células/cotiledón). Se añadió tricostatina A (TSA, 100 ng/mL) al medio de crecimiento (300 mL) y las células se cultivaron durante 4 días en un biorreactor. Como control, se infundió un número equivalente (40×10^6 células/cotiledón) de células MDA-MB231/Luc en la vasculatura de un solo cotiledón aislado y se cultivaron en medio de crecimiento solo durante 4 días en un biorreactor. Después de 4 días de cultivo, cada cotiledón se transfirió a un medio de crecimiento que comprendía luciferina (150 ng/mL) durante 10 minutos. Ambos cotiledones se analizaron luego utilizando el sistema de imagen IVIS. El cotiledón tratado con TSA demostró una marcada disminución en la expresión de luciferasa en comparación con el cotiledón cultivado en ausencia de TSA, lo que indica que la viabilidad y proliferación de las células se vio afectada por el cáncer terapéutico y confirmando que los cotiledones placentarios se pueden usar como plataforma para análisis de fármacos antitumorales.

Equivalentes:

Las composiciones y métodos descritos en esta memoria no están limitados en su alcance a las realizaciones específicas descritas. De hecho, para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas serán evidentes además de las descritas diversas modificaciones de las composiciones y métodos.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la eficacia de un compuesto antitumoral potencial contra una pluralidad de células tumorales, que comprende introducir una pluralidad de células tumorales en una placenta de mamífero, o una porción de ella, poner en contacto dicha pluralidad de células tumorales durante un período de tiempo con dicho compuesto antitumoral, y determinar si dicho compuesto antitumoral es eficaz contra dichas células tumorales si dicho compuesto antitumoral durante dicho período de tiempo reduce el número de dichas células tumorales o reduce la tasa de crecimiento de dichas células tumorales.
2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, que comprende determinar un primer número de células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y un segundo número de células tumorales después de dicha puesta en contacto, en donde si dicho segundo número es menor que dicho primer número, dicho compuesto antitumoral reduce el número de células tumorales, y dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.
3. El método *in vitro* de la reivindicación 1, que comprende determinar un primer número de células tumorales antes de dicha puesta en contacto, y un segundo número de células tumorales después de dicha puesta en contacto; y determinar además un tercer número de control de células tumorales al mismo tiempo que dicho segundo número de células tumorales, en donde dichas células tumorales en dicho control no han sido puestas en contacto con dicho compuesto antitumoral; en donde si la diferencia entre dicho segundo número y dicho primer número es menor que la diferencia entre dicho tercer número y dicho primer número, dicho compuesto antitumoral reduce la tasa de crecimiento de dichas células tumorales, y dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.
4. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en donde dicha placenta de mamífero, o una porción de ella, es:
 - (i) descelularizada;
 - (ii) no descelularizada; o
 - (iii) una placenta completa o sustancialmente intacta.
5. El método *in vitro* de la reivindicación 4, en donde dicha placenta de mamífero, o una porción de ella, comprende una vasculatura sustancialmente intacta.
6. El método *in vitro* de la reivindicación 5, en donde dichas células tumorales se siembran sobre o dentro de dicha placenta, o una porción de ella, en suspensión líquida a través de dicha vasculatura sustancialmente intacta.
7. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha porción de placenta está conformada para ajustarse a un recipiente, en donde dicho recipiente es preferiblemente una placa de cultivo de tejido o un pocillo de una placa de múltiples pocillos.
8. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son:
 - (i) células tumorales primarias;
 - (ii) células de mesotelioma, células de melanoma, células de adenoma, células de carcinoma, células de adenocarcinoma, células de carcinoma ductal, células de leucemia, células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia de linfocitos T aguda, células de leucemia linfoblástica aguda, células de tricoleucemia, células de leucemia promielocítica aguda, células de linfoma, células de linfoma de Burkitt, células de linfoma no Hodgkin, células de linfoma de Hodgkin o células de mieloma múltiple, células de rhabdomyosarcoma, células de osteosarcoma, células de neuroblastoma, células de astrocitoma o células de glioblastoma;
 - (iii) células de línea celular tumoral, en donde dicha línea celular tumoral es opcionalmente 5637 (carcinoma), KHOS/NP (osteosarcoma), MNNG/HOS (osteosarcoma), Saos-2 (osteosarcoma), U-2 OS (osteosarcoma), SJSA-1 (osteosarcoma), CCF-STTG1 (astrocitoma), DBTRG-05MG (glioblastoma), U87 MG (glioblastoma), T98G (glioblastoma), SK-N-SH (neuroblastoma), SK-N-AS (neuroblastoma), MCF-7 (adenocarcinoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma), MDA-MB-436 (adenocarcinoma), SK-BR-3 (adenocarcinoma), BT-20 (carcinoma), BT-474 (carcinoma), CAMA-1 (carcinoma), HCC2218 (carcinoma), SW527 (carcinoma), MDA-MB-453 (carcinoma), MDA-MB-435S (carcinoma), T-47D (carcinoma), ZR-75-1 (carcinoma), UACC-812 (carcinoma), HCC1419 (carcinoma), HeLa (adenocarcinoma), Caco-2 (adenocarcinoma), COLO205 (adenocarcinoma), COLO320/DM (adenocarcinoma), DLD-1 (adenocarcinoma), HCT-15 (adenocarcinoma), SK-CO-1 (adenocarcinoma), SW48 (adenocarcinoma), SW480 (adenocarcinoma), HCT-8 (adenocarcinoma), RKO (carcinoma), LS411N (carcinoma), T84 (carcinoma), AGS (adenocarcinoma), KATO III (carcinoma), NCI-N87 (carcinoma), SNU-16 (carcinoma), 769-P (adenocarcinoma), 786-O (adenocarcinoma), ACHN (adenocarcinoma), A-498 (carcinoma), Caki-1 (carcinoma), G-402 (leiomioblastoma), CML-T1 (leucemia), CTV-1 (leucemia), JVM-2 (leucemia), K562 (leucemia), MHH-CALL2 (leucemia), NALM-6 (leucemia), 8E5 (leucemia), CCRF-SB (leucemia), CEM/C1 (leucemia), CEM/C2 (leucemia), CEM-CM3 (leucemia), CCRF-HSB-2 (leucemia), KG-1 (leucemia), KG-1a leucemia), CCRF-CEM (leucemia), MOLT-3 (leucemia), SUP-B15 (leucemia), TALL-104 (leucemia), Loucy (leucemia), RS4;11 (leuce-

mia), REH (leucemia), AML-193 (leucemia), THP-1 (leucemia), MOLM-13 (leucemia), Kasumi-1 (leucemia), Kasumi-3 (leucemia), BDCM (leucemia), HL-60 (leucemia), I 2.1 (leucemia), I 9.2 (leucemia), J.gam1a1.WT (leucemia), J.RT3-T3.5 (leucemia), P116 (leucemia), P116.c139 [P116.c39] (leucemia), D1.1 (leucemia), J45.01 (leucemia), MV-4-11 (leucemia), Kasumi-4 (leucemia), MEG-01 (leucemia), KU812 (leucemia), Mo (leucemia), JM1 (leucemia), GDM-1 (leucemia), CESS (leucemia), ARH-77 (leucemia), SK-HEP-1 (adenocarcinoma), Bel-7402 (carcinoma), Bel-7404 (carcinoma), HEP-3B (carcinoma), HepG2 (carcinoma), Calu-3 (adenocarcinoma), NCI-H1395 (adenocarcinoma), NCI-H1975 (adenocarcinoma), SK-LU-1 (adenocarcinoma), NCI-H2122 (adenocarcinoma), NCI-H727 (carcinoma), A-427 (carcinoma), A549 (carcinoma), SW1573 (carcinoma), NCI-H358 (carcinoma), NCI-H460 (carcinoma), NCI-H292 (carcinoma), NCI-H82 (carcinoma), NCI-H226 (carcinoma), NCI-H526 (carcinoma) o MSTO-211H (mesotelioma).

9. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho método comprende adicionalmente hacer pasar medio de cultivo a través de dicha placenta, o una porción de ella, en condiciones tales que, en ausencia de dicho compuesto antitumoral, proliferan dichas células tumorales.

10. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho método comprende adicionalmente introducir una pluralidad de células no tumorales en dicha placenta, o una porción de ella, en donde dichas células no tumorales son preferiblemente células estromales, en donde dichas células estromales son preferiblemente células estromales mesenquimatosas derivadas de la médula ósea; y en donde opcionalmente dicha pluralidad de células no tumorales se introduce en dicha placenta, o una porción de ella, antes de dichas células tumorales, o al mismo tiempo que dichas células tumorales.

11. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende marcar dichas células tumorales con un marcador, en donde dicho marcador es preferiblemente un marcador fluorescente o un marcador radiactivo.

12. El método *in vitro* de la reivindicación 11, en donde dicho marcador está unido a un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo reconoce preferiblemente un antígeno en dichas células tumorales, en donde dicho antígeno es preferiblemente específico del tumor.

13. El método *in vitro* de la reivindicación 12, en donde dichas células tumorales están marcadas con un anticuerpo fluorescente, y en donde:

- (i) una disminución de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto; o
- (ii) una disminución de la tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente a lo largo del tiempo después de dicha puesta en contacto, en comparación con una tasa de aumento de la fluorescencia de dicho anticuerpo fluorescente antes de dicha puesta en contacto,

indica que dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

14. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde se calcula un número de células tumorales determinando una cantidad de un antígeno producido por dichas células tumorales, en donde dicho antígeno es preferiblemente un antígeno específico del tumor.

15. El método *in vitro* de la reivindicación 14, en donde:

- (i) una disminución en dicho antígeno después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto; o
- (ii) una disminución en la tasa de aumento de dicho antígeno producido por dichas células tumorales en comparación con una tasa de aumento de dicho antígeno producido por dichas células tumorales antes de dicha puesta en contacto,

indica que dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

16. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dichas células tumorales están genéticamente modificadas para expresar un marcador, en donde dicho marcador es preferiblemente luciferasa, o una proteína fluorescente, en donde dicha proteína fluorescente es preferiblemente:

- (i) una proteína fluorescente verde, preferiblemente la proteína fluorescente verde de tipo natural, o la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP);
- (ii) una proteína fluorescente azul, preferiblemente la proteína fluorescente azul potenciada (EBFP);
- (iii) una proteína fluorescente cian, preferiblemente la proteína fluorescente cian potenciada (ECFP);
- (iv) una proteína fluorescente amarilla, preferiblemente la proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP);

- (v) una proteína fluorescente naranja;
- (vi) una proteína fluorescente roja; o
- (vii) una proteína fluorescente fotoactivable o fotoconvertible.

17. El método *in vitro* de la reivindicación 16, en donde:

- 5 (i) una disminución de la fluorescencia de dichas células tumorales modificadas genéticamente después de dicha puesta en contacto en comparación con antes de dicha puesta en contacto; o
 - (ii) una disminución en la tasa de aumento de la fluorescencia de dichas células tumorales modificadas genéticamente a lo largo del tiempo después de dicha puesta en contacto, en comparación con una tasa de aumento de la fluorescencia de dichas células tumorales genéticamente modificadas antes de dicha puesta en contacto,
- 10 indica que dicho compuesto antitumoral potencial es un compuesto antitumoral.

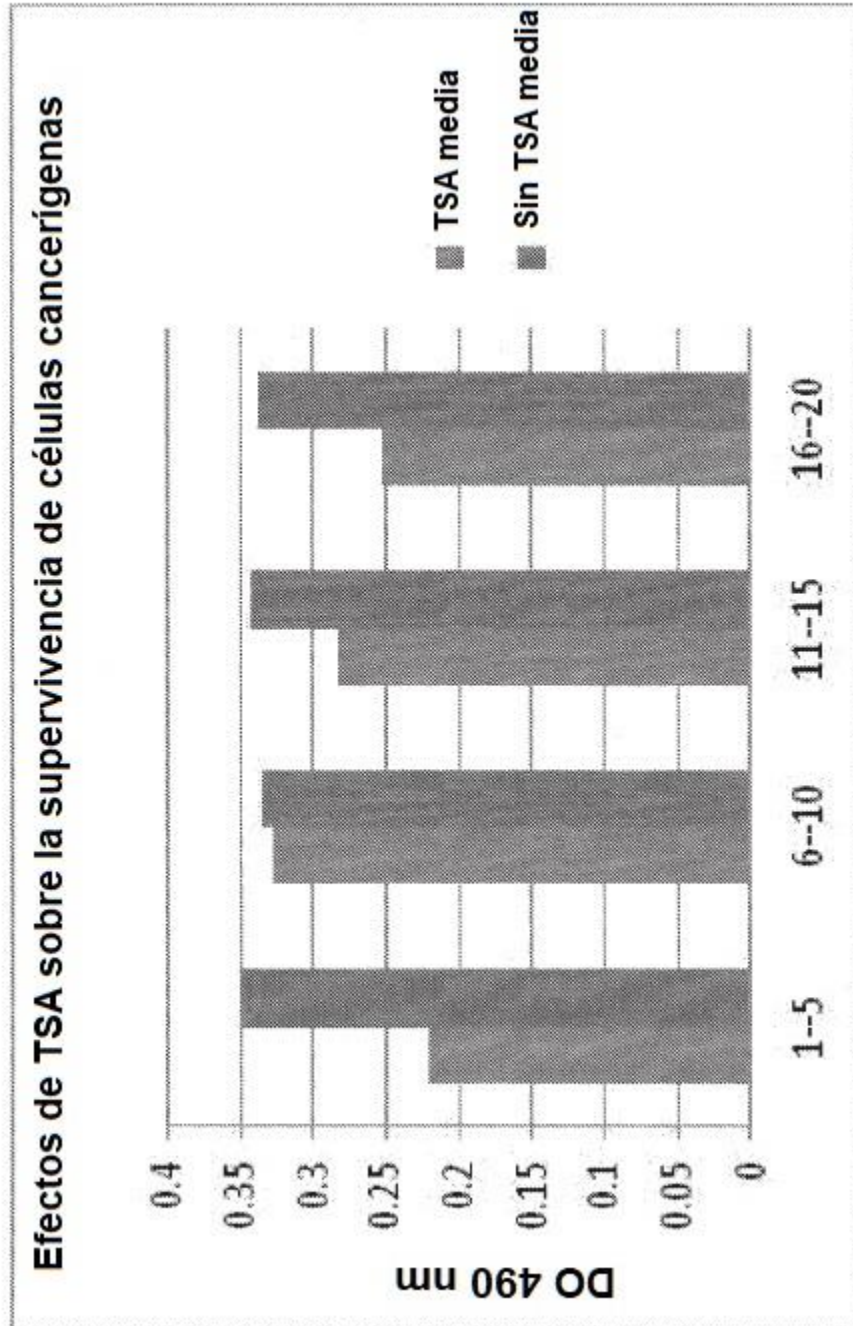


FIG. 1A

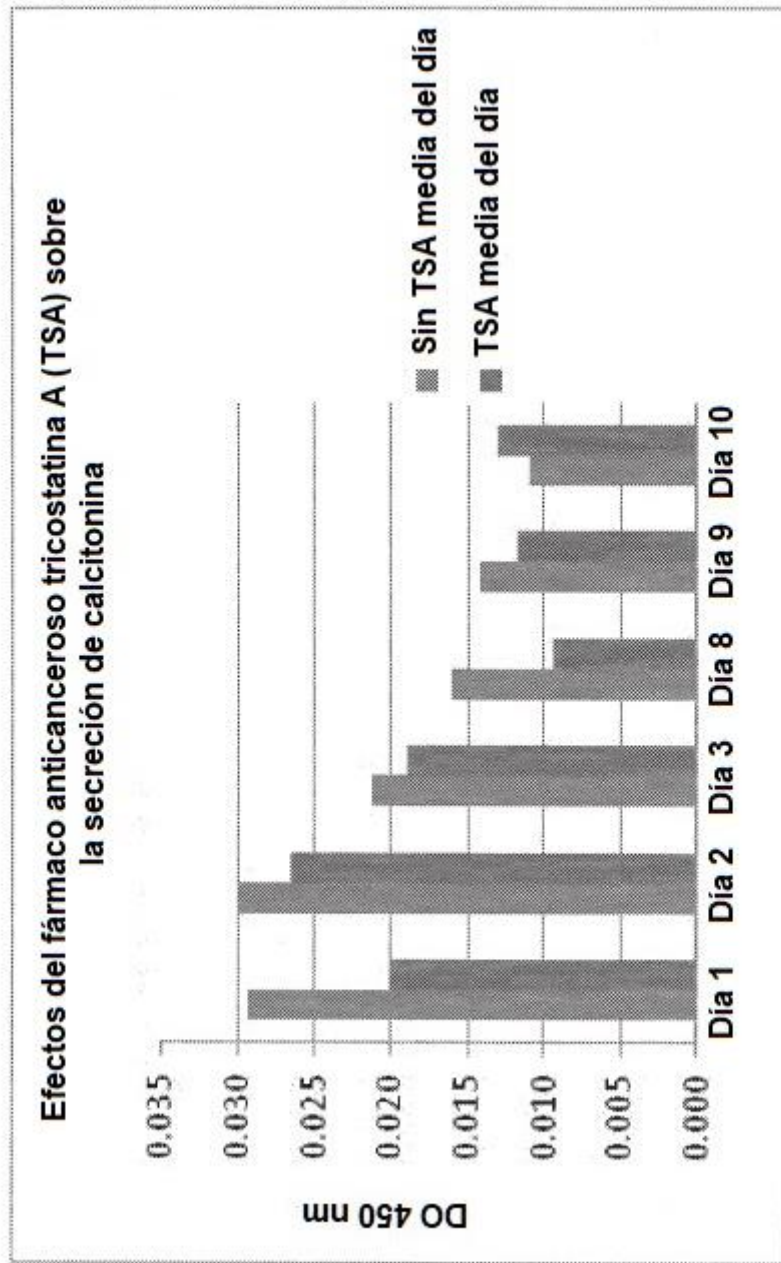


FIG. 1B