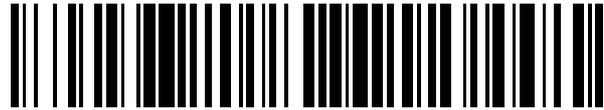


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 236**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010** **E 10779041 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2480655**

54 Título: **Medio de cultivo celular**

30 Prioridad:

**25.09.2009 HU 0900603**

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

**09.05.2016**

73 Titular/es:

**BIOMARKER LTD (100.0%)**  
**Rigó utca 20.**  
**2100 Gödöll, HU**

72 Inventor/es:

**SKRIBEK, HENRIETTE y**  
**SZÉKELY, LÁSZLÓ**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 569 236 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

## Medio de cultivo celular

La presente invención se refiere a un medio de cultivo celular para cultivar células humanas que comprende un material de sangre completa anti-coagulada en el que el nivel de hemoglobina es de alrededor de 8 a alrededor de 16 g/dl. Más en particular, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que se rompen las células presentes en la sangre y se eliminan los restos insolubles de las células lisadas. Además, la invención proporciona un método para la preparación de un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, según la invención.

**Antecedentes de la invención**

El cultivo de células humanas primarias de origen normal y maligno es una tarea sumamente deseable, pero difícil. La razón principal es que la mayoría de medios de cultivo definidos se seleccionaron para mantener un tipo celular específico bien definido. Estos medios, aunque son ricos en todos los compuestos de peso molecular bajo necesarios, a menudo carecen de factores de crecimiento y supervivencia cruciales. La formulación de los medios de cultivo celular a menudo requirió que fuera posible producir cantidades muy grandes por un precio relativamente bajo. Sin embargo, la introducción reciente de técnicas de microfluidica y de microscopía automatizada nuevas hace que estos requerimientos queden obsoletos.

Los cultivos primarios de células normales pueden servir como fuente de células madre, p.ej., para la terapia de reconstitución o como objetivo *ex vivo* para la administración de genes en intervenciones terapéuticas génicas. Los cultivos primarios de células tumorales se pueden usar para ensayos de sensibilidad a fármacos a gran escala para identificar fármacos antineoplásicos adecuados para un paciente determinado, ensayar la eficacia de candidatos farmacológicos nuevos para tipos de tumores sin ensayar previamente, e incluso en el cribado de bibliotecas de compuestos para identificar nuevos candidatos iniciales antineoplásicos.

Una característica importante de los tumores humanos es que están evolucionando continuamente, y la terapia ideal requeriría medidas individualizadas que coincidiesen perfectamente con las características biológicas del tumor. La manera más directa de alcanzar este objetivo es crear métodos sofisticados, aunque sumamente robustos y fiables, que puedan medir la tasa de respuesta del tumor a una gran diversidad de intervenciones terapéuticas. Estas medidas deberían proporcionar el apoyo teórico y la prueba práctica para la terapia guiada por ensayos.

Los protocolos de tratamiento modernos son el resultado de ensayos clínicos cuidadosamente controlados que implican a miles de pacientes a lo largo de muchos años. Durante las últimas décadas, se ha presenciado una mejora impresionante de la supervivencia de los pacientes en varias formas de leucemias y linfomas. El desarrollo más impresionante se dio en el caso de las leucemias pediátricas. Para estas enfermedades, se demostró que el agrupamiento cuidadoso de los pacientes según los diferentes marcadores biológicos y los indicadores de pronóstico fue crucial para la selección de los protocolos de tratamiento más eficaces. Estos protocolos dependen en gran medida del uso de fármacos relativamente antiguos desarrollados a finales de los años 70 y principios de los años 80. El factor clave para alcanzar la supervivencia enormemente mejorada fue la adhesión rigurosa al protocolo de tratamiento estandarizado. Esta estrategia, aunque de mucho éxito en cuanto a salvar las vidas de los pacientes pediátricos, dio como resultado un tratamiento muy agresivo con una toxicidad significativa. Además, esta estrategia dejó poca cabida para la introducción de fármacos nuevos. Esto es especialmente desafortunado al considerar que hay más de sesenta fármacos autorizados con efectos antineoplásicos potenciales, y que hay más de cien fármacos nuevos en el canal de desarrollo de la industria farmacéutica.

Por otra parte, en el caso de las leucemias en adultos, el principal avance se originó por la introducción de fármacos nuevos para tratar a pacientes casi terminales (p.ej. el inhibidor de ber-abl Gleevec contra LMC; el inhibidor de proteosomas Bortezomib contra mielomas múltiples, o anticuerpos monoclonales tales como anti CD20 - Rituximab contra una diversidad de tumores de células B). A pesar de todos los esfuerzos, una fracción considerable de pacientes pediátricos y adultos no responden a la terapia, o experimentan recidivas repetidas. En estos casos, estaría muy justificada la selección de protocolos de tratamiento diseñados individualmente y la aplicación de fármacos nuevos.

La idea de usar ensayos de sensibilidad a fármacos *in vitro* para determinar el perfil de sensibilidad de las células leucémicas ya se introdujo hace cuarenta años. Se desarrolló una diversidad de técnicas que se dirigían a determinar la viabilidad de las células tumorales tras el cultivo *in vitro* con fármacos relevantes [1]. Todos los ensayos implican las mismas cuatro etapas básicas: i) aislamiento de las células; ii) incubación de las células con fármacos en un medio de cultivo de tejidos; iii) determinación de la supervivencia celular; iv) interpretación de los resultados. Algunas de estas técnicas se usan de manera generalizada en la actualidad, tal como la conversión de ATP, la reducción de MTT (conversión de una sal de tetrazolio hasta formazano insoluble) o los ensayos FMCA (citotoxicidad en microcultivo con detección fluorométrica) [2, 3] y se ha demostrado que proporcionan una información clínicamente útil sobre la sensibilidad a fármacos de las células tumorales.

Los ensayos actuales, sin embargo, sufren varias limitaciones. Una de las limitaciones más graves es la dificultad de mantener las células tumorales humanas primarias vivas *in vitro* [4]. La mayoría de las células eucarióticas requieren dos tipos de señales simultáneamente para su expansión eficaz *ex vivo*: señales de estimulación del crecimiento

- (proliferación) y de supervivencia (anti-apoptóticas). Estas señales se confieren en forma de ligandos solubles, de manera alternativa ligandos que son parte de la matriz extracelular o que están asociados a la superficie de las células cercanas. Las moléculas de señalización seleccionan como objetivo receptores de las células que son específicos de cualquier tipo de célula y etapa de diferenciación determinados. Los medios clásicos de cultivo celular se tienen que complementar normalmente con suero o extractos de tejidos para mantener un crecimiento celular *in vitro* eficaz. El suero bovino fetal del 10% usado habitualmente proporciona una cantidad suficiente de PDGF y de factores de crecimiento similares a insulina para mantener la expansión de fibroblastos primarios y células madre mesenquimatosas. La mayoría de células primarias, sin embargo, requieren la adición de factores de crecimiento adicionales. La generación de líneas celulares adaptadas *in vitro* se consigue mediante la selección de variantes genéticas poco frecuentes que son capaces de expandirse únicamente con la ayuda de moléculas similares a PDGF e IGF. Las células normales y tumorales del linaje linfóide/mieloide requieren factores de crecimiento/supervivencia adicionales para la expansión *in vitro*. De manera importante, la escasez de factores de supervivencia sensibiliza a las células a los efectos de los fármacos citotóxicos, lo que crea una sobreestimación indeseable de la eficacia de los fármacos en los ensayos de supervivencia *in vitro* a corto plazo. Los ensayos actuales requieren a menudo una cantidad considerable de células tumorales, y a menudo son muy laboriosos. Debido al número limitado de medidas que se pueden llevar a cabo, la mayoría de ensayos no permiten ensayar un gran número de fármacos a concentraciones diferentes en series repetidas. La mayoría de ensayos tienen un bajo contenido de información, y con frecuencia se limitan a una única lectura de medida (p.ej., la estimación del número de células vivas por muestra).
- Además, no todos los fármacos son adecuados para los ensayos convencionales de supervivencia *in vitro*. Algunos de ellos, tales como las antraciclinas muy fluorescentes, son incompatibles con la tecnología de lectura de fluorescencia directa. A pesar de estas limitaciones, los ensayos de supervivencia a corto plazo ya han comenzado a proporcionar información clínicamente importante [1, 5-7].
- Hasta hace poco tiempo, los ensayos *in vitro* se consideraban como una aproximación poco fiable para predecir la respuesta a fármacos *in vivo*. Esta percepción se originó por los resultados mediocres de los ensayos clonogénicos *in vitro* de carcinomas de ovario. Sin embargo, la perspectiva de los ensayos *in vitro* está cambiando en la predicción de la respuesta a fármacos, como se demuestra en una revisión reciente [8] de la mayoría del trabajo relativo a los ensayos de sensibilidad a fármacos *ex vivo*, publicada a lo largo de la década de 1980 - "reflejó la visión predominante del cáncer como una enfermedad de proliferación celular desregulada. La descripción de la apoptosis y de la muerte celular programada, fundamental para la comprensión moderna de la biología de los tumores humanos, no se dio hasta bastante después del apogeo de los ensayos de quimiosensibilidad *in vitro*. Mediante la incorporación de los principios modernos de la carcinogénesis asociada a perturbaciones en la supervivencia celular, ahora se pueden reexaminar los ensayos de laboratorio de la respuesta a fármacos en el contexto de la muerte celular programada inducida por fármacos".
- La razón principal de los fracasos fue que la mayoría de medios de cultivo celular se desarrollaron partiendo de disoluciones simples químicamente definidas y añadiendo gradualmente diferentes sueros o extractos de tejidos hasta que las células de ensayo mostraron una supervivencia y proliferación satisfactorias. Actualmente está claro que son necesarias aproximaciones nuevas para recuperar los ensayos de quimiosensibilidad *in vitro*, para permitir el descubrimiento de un tratamiento para el cáncer óptimo, y preferiblemente personalizado.
- El desarrollo rápido de la formación digital de imágenes, los avances recientes en microscopía y óptica láser y los métodos nuevos de automatización de laboratorio y la microfluídica han posibilitado este método idealizado. Se ha demostrado que ahora es posible construir y programar microscopios confocales inteligentes automatizados que pueden ensayar el efecto de todos los fármacos antineoplásicos disponibles actualmente en células tumorales primarias aisladas de volúmenes tan pequeños como 1 ml de sangre, médula ósea, líquido ascítico y derrame pleural. La capacidad de fabricar placas para fármacos de 384 pocillos mediante el uso de aparatos robotizados preprogramados de dispensación de líquidos permite ensayar un gran número de fármacos a diferentes concentraciones, solos o en diferentes combinaciones. Las técnicas sofisticadas de marcaje de fluorescencia revelan múltiples parámetros vitales de las células tumorales tratadas con fármacos, tales como la viabilidad, la distribución del ciclo celular, la actividad metabólica y la motilidad.
- El único elemento ausente para el ensayo de fármacos *in vitro* completo es un medio de cultivo fiable, eficaz que conserve las condiciones *in vivo* originales tanto como sea posible para ayudar a identificar el mejor régimen de tratamiento posible.
- Para satisfacer esta necesidad, se han rediseñado completamente las condiciones de cultivo para las células tumorales primarias. En esta aproximación, se conservan las condiciones *in vivo* originales tanto como sea posible. La base teórica del medio de cultivo celular nuevo se basa en las siguientes observaciones previas: los linfocitos humanos primarios, sumamente propensos a la apoptosis cuando se explantan en medios de cultivo celular sin factores de crecimiento adicionales, pueden sobrevivir en sangre completa durante varios días [9-12] incluso si experimenta una hemólisis parcial [13]. Sin embargo, nada en esta técnica anterior describe o incluso sugiere la viabilidad de la sangre completa como base para un medio de cultivo para cultivar células humanas.
- Por lo tanto, la presente invención proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células humanas que

comprende un material de sangre completa anti-coagulada en el que el nivel de hemoglobina es de alrededor de 8 a alrededor de 16 g/dl.

En otra realización, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que se rompen las células presentes en la sangre y se eliminan los restos insolubles de las células lisadas.

- 5 En una realización adicional, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que la sangre es de origen mamífero. En una realización específica, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que la sangre es de origen humano.

En otra realización, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que el contenido de iones del medio se restablece para que coincida con el de la fracción extracelular del material de partida de sangre completa.

- 10 En una realización adicional, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) es básicamente igual que el de un medio de cultivo celular convencional seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, e IMDM.

En otra realización, la invención proporciona un medio de cultivo celular en el que la capacidad reductora del medio se restablece mediante la adición de glutatión reducido.

- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un medio de cultivo celular según la invención para cultivar células humanas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la preparación de un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, que comprende

(a) proporcionar sangre de mamífero anti-coagulada como material de partida;

- 20 (b) romper mecánicamente las células presentes en la sangre;

(c) eliminar los restos insolubles de las células lisadas.

En otra realización, la invención proporciona un método en el que la ruptura mecánica de las células se consigue congelando la sangre completa o mediante ultrasonidos, homogeneizador eléctrico de cuchillas o prensa de French.

- 25 En otra realización, la invención proporciona un método en el que la eliminación de los restos insolubles de las células lisadas se consigue mediante ultracentrifugación o filtración mecánica.

En otra realización, la invención proporciona un método en el que el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) del medio se ajusta mediante diálisis con un medio de cultivo celular convencional seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, e IMDM.

- 30 En otra realización, la invención proporciona un método en el que la capacidad reductora del medio se restablece mediante la adición de glutatión reducido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, obtenible mediante el método según la invención.

### Descripción detallada de la invención

- 35 Los métodos de establecimiento de cultivos celulares primarios a partir de tejidos humanos sufren varias limitaciones. Las células primarias explantadas *in vitro* requieren un medio que tenga propiedades fisico-químicas similares, así como una matriz de señales biológicas que sean similares al medio *in vivo*.

- La presente invención realiza un medio de cultivo celular nuevo que mantiene las condiciones iónicas, osmóticas y redox correctas de la sangre completa, junto con un conjunto de factores de crecimiento y de supervivencia completamente conservados. El medio de cultivo celular nuevo se basa en un extracto de sangre completa que contiene todos los componentes macromoleculares de la sangre, además de todos los nutrientes de pesos moleculares pequeños de un medio de cultivo de tejidos convencional, pero carece de la fracción de membranas de los eritrocitos. Se reivindica que el medio nuevo es superior a los medios convencionales para mantener la supervivencia de células humanas primarias de origen normal y maligno. Es especialmente adecuado para ensayar la sensibilidad a fármacos de células tumorales humanas recién explantadas, por lo que se crea la base de una plataforma tecnológica nueva para la determinación de perfiles de sensibilidad a fármacos citotóxicos de pacientes individuales. El ensayo de la sensibilidad a fármacos a corto plazo puede allanar el camino para la terapia del cáncer guiada por ensayos individualizados. Las propiedades ópticas del medio nuevo permiten la evaluación mediante un análisis de contenido elevado (HCA) de fluorescencia de las células tratadas. El medio también apaga la autofluorescencia de la mayoría de los fármacos usados habitualmente. El medio también es muy adecuado para el cribado de alto rendimiento de grandes bibliotecas de compuestos químicos o biológicos o para el ensayo toxicológico a gran escala en células humanas primarias.
- 50

Por lo tanto, se ha desarrollado, basándose en los datos empíricos, un medio de cultivo celular nuevo que une los componentes estimuladores de la supervivencia celular con los valores nutricionales de los medios de cultivo celular en el medio iónico y redox correcto. Se ha ensayado el medio con una gran serie de líneas celulares de diferente origen, así como con tumores primarios de líquidos ascíticos o derrames pleurales que acompañan a los carcinomas de ovario, mama, colon, recto, páncreas y vejiga, y con células tumorales aisladas de LMA, LLA, LLC, linfomas de cavidades corporales, linfomas de Hodgkin y post-trasplante. Al comparar el medio nuevo con los medios de cultivo celular convencionales, se ha hallado regularmente una supervivencia mejorada y una sensibilidad a fármacos citotóxicos disminuida de las células tumorales primarias. El medio de cultivo celular nuevo permite una supervivencia prolongada de las células tumorales humanas *in vitro*. Mediante el uso del medio de cultivo nuevo, ahora es posible llevar a cabo ensayos que pueden determinar el patrón de sensibilidad a fármacos de células tumorales primarias recién aisladas de pacientes que padecen leucemias, linfomas o carcinomas diseminados avanzados.

La presente invención comprende un procedimiento que convierte la sangre completa humana (o animal) en un medio de cultivo celular que mantiene la supervivencia *ex vivo* de las células humanas primarias y que es compatible con diversas técnicas de formación de imágenes de fluorescencia para la determinación de la viabilidad y la medida de diversas funciones fisiológicas. Se basa en la lisis mecánica de la sangre anti-coagulada sin diluir, la eliminación de los restos de membranas de eritrocitos, el restablecimiento del contenido correcto de iones, el equilibrado con nutrientes de peso molecular bajo y el restablecimiento de condiciones reductoras. El producto final se puede usar inmediatamente en ensayos a corto plazo o almacenarlo en forma congelada a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

Aunque los lisados de sangre completa son un aditivo frecuente de ciertos medios de cultivo bacterianos, tales como agar-sangre, no se usan en el cultivo de células humanas o de otros mamíferos. La presente invención se refiere al desarrollo de un medio de cultivo celular eucariótico, principalmente para el cultivo *ex vivo* de células tumorales/células madre humanas. La composición química de los medios bacterianos y eucarióticos es tan diferente que las células de mamífero no sobreviven en ese medio bacteriano. Debido a que la sangre completa es solamente un aditivo específico en esos medios, la concentración de hemoglobina está muy por debajo del nivel que caracteriza al presente medio de cultivo celular.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células humanas que comprende un material de sangre completa anti-coagulada en el que el nivel de hemoglobina es de alrededor de 8 a alrededor de 16 g/dl. Dado que el presente medio está compuesto básicamente del material de partida de sangre completa, el contenido elevado de hemoglobina es el resultado de la lisis de los eritrocitos durante el procesamiento del material de sangre completa. Más en particular, la concentración de hemoglobina del medio de cultivo celular según la invención es de alrededor de 10 a alrededor de 14 g/dl, preferiblemente de alrededor de 11 a alrededor de 12 g/dl, y aún más preferiblemente alrededor de 11 g/dl.

Otra característica ventajosa del cultivo celular según la invención es que, aunque el medio por sí mismo no es transparente, se puede llevar a cabo de manera eficaz la formación de imágenes microscópicas de alto rendimiento. Según el estado de la técnica, las medidas de fluorescencia de sensibilidad elevada de la viabilidad celular no son compatibles con varios fármacos antineoplásicos usados habitualmente (p.ej. epirrubicina, daunorrubicina, doxorubicina) con propiedades de autofluorescencia endógena elevada mediante el uso de los medios convencionales de cultivo celular. Se demostró que, mediante el uso de un medio de cultivo basado en un extracto de sangre, se apaga de manera eficaz la autofluorescencia contaminante. El presente medio de cultivo celular no es transparente, y tiene el color característico de la sangre, y se puede llevar a cabo dicha formación de imágenes microscópicas de alto rendimiento mediante el uso de sistemas de microscopía invertida en los que las células se recogen en el fondo de los recipientes de cultivo.

Una característica principal del medio de cultivo celular según la invención es que los componentes celulares de la sangre completa se eliminan como tales, pero los materiales contenidos en dichos componentes celulares se conservan en el medio de cultivo celular. Esto se consigue mediante la ruptura de las células presentes en la sangre y la eliminación de los restos insolubles de las células lisadas. Tal ruptura y eliminación se puede llevar a cabo mediante cualquier medio adecuado disponible para la persona experta en la técnica.

La presente invención también proporciona un método para la preparación de un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, que comprende

- (a) proporcionar sangre de mamífero anti-coagulada como material de partida;
- (b) romper mecánicamente las células presentes en la sangre;
- (c) eliminar los restos insolubles de las células lisadas.

Un protocolo ejemplar para el método de la invención se proporciona en el Ejemplo 1, sin embargo, la persona experta en la técnica será capaz de sustituir fácilmente los diferentes procedimientos para llevar a cabo básicamente los mismos resultados tal como se proporciona en las etapas anteriores. Por ejemplo, la ruptura mecánica de las células se puede conseguir, como ejemplos no limitantes, congelando la sangre completa o mediante ultrasonidos,

homogeneizador eléctrico de cuchillas o prensa de French. La optimización de los parámetros adecuados para cada uno de estos métodos también es evidente para la persona experta en la técnica. De forma similar, tras la ruptura celular, la eliminación de los restos de membranas celulares se puede realizar mediante el uso de uno o más de varios métodos diferentes del estado de la técnica. Los ejemplos no limitantes son la ultracentrifugación o la filtración mecánica.

Como se detalló anteriormente, uno de los objetivos principales a conseguir proporcionando el medio de cultivo celular según la invención es asegurar unas condiciones óptimas de cultivo para las células humanas *ex vivo*. Es evidente que la sangre humana proporcionará la mejor coincidencia posible para el cultivo de células humanas. Por lo tanto, hasta donde sea viable y posible, el material base de sangre para el presente medio de cultivo celular es de origen humano. De manera alternativa, cuando el protocolo de cultivo deseado lo permita o lo exija, el medio basado en sangre humana se puede sustituir por un medio de cultivo celular según la invención que se base en la sangre completa de otra especie de mamífero, preferiblemente de origen bovino o porcino.

Como es evidente para la persona experta en la técnica, la ruptura de los componentes celulares de la sangre completa liberará su contenido en el medio, alterando la composición original de la sangre completa. En las realizaciones preferidas, por lo tanto, también se puede desear modificar la composición del medio resultante para que coincida mejor con la composición del material de partida, es decir, la sangre completa. O, de manera alternativa, para hacer su composición similar a la composición de los medios de cultivo celular usados de manera convencional en este campo. La persona experta en la técnica será capaz fácilmente de determinar qué tipo de ajuste es el más adecuado para el uso deseado del medio de cultivo celular según la invención.

Por lo tanto, en una realización específica, el contenido de iones del medio se restablece para que coincida con el de la fracción extracelular del material de partida de sangre completa. En otra realización específica, la capacidad reductora del medio se restablece mediante la adición de glutatión reducido. Además, en otra realización específica, el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) es básicamente la misma que la de un medio de cultivo celular convencional seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, e IMDM. La persona experta en la técnica será capaz de seleccionar del estado de la técnica disponible los métodos para llevar a cabo cualquiera de estas modificaciones, o cualquier otra modificación que considere adecuada. Más adelante se proporcionan ejemplos no limitantes en los Ejemplos.

### Descripción de las figuras

Fig. 1: Vista esquemática de la producción de un medio de cultivo celular basado en un extracto de sangre.

Fig. 2: A: Diseño de una placa de 384 pocillos básica para ensayar 30 fármacos. B: Células de carcinoma ovárico humanas primarias después de 7 días de cultivo en medio basado en extracto de sangre (contraste de fases - tinción nuclear con Hoechst 33342 compatible con células vivas). C: Sensibilidad de células DLBL a 30 fármacos diferentes tal como se analiza mediante la formación de imágenes individuales de 500.000 células de 7680 cortes confocales. D: Concentraciones máximas de los fármacos usados.

Fig. 3: Patrón de sensibilidad a fármacos de 38 células de carcinoma humanas primarias diferentes aisladas directamente de derrame pleural o líquidos ascíticos y ensayadas en un ensayo de supervivencia de tres días en medio basado en extracto de sangre humana como se muestra en la Figura 2. (La escala de intensidad de 5 etapas del mapa térmico corresponde a una tasa de supervivencia del 50% a la dilución de fármaco proporcionada. Negro: más del 50% de supervivencia a la concentración de fármaco más alta, rojo de intensidad más alta menor del 50% de supervivencia a la dilución de fármaco más alta).

Fig. 4: Patrón de sensibilidad a fármacos de 42 células de Leucemia Mieloide Aguda primarias diferentes aisladas directamente a partir de la sangre periférica de pacientes, y ensayadas en un ensayo de supervivencia de tres días en un medio basado en extracto de sangre humana como se muestra en la Figura 2. (La escala de intensidad de 5 etapas del mapa térmico corresponde a una tasa de supervivencia del 50% a la dilución de fármaco proporcionada. Negro: más del 50% de supervivencia a la concentración de fármaco más alta, rojo de intensidad más alta menor del 50% de supervivencia a la dilución de fármaco más alta).

Fig. 5: Patrón de sensibilidad a fármacos de 74 células de Leucemia Linfóide Crónica primarias diferentes aisladas directamente a partir de la sangre periférica de pacientes, y ensayadas en un ensayo de supervivencia de tres días en un medio basado en extracto de sangre humana como se muestra en la Figura 2. (La escala de intensidad de 5 etapas del mapa térmico corresponde a una tasa de supervivencia del 50% a la dilución de fármaco proporcionada. Negro: más del 50% de supervivencia a la concentración de fármaco más alta, rojo de intensidad más alta menor del 50% de supervivencia a la dilución de fármaco más alta).

Fig. 6: Patrón de sensibilidad a fármacos de 216 células tumorales primarias humanas ensayadas en un ensayo de supervivencia de tres días en un medio basado en extracto de sangre humana como se muestra en la Figura 2. (La escala de intensidad de 5 etapas del mapa térmico corresponde a una tasa de supervivencia del 50% a la dilución de fármaco proporcionada. Negro: más del 50% de supervivencia a la concentración de fármaco más alta, rojo de intensidad más alta menor del 50% de supervivencia a la dilución de fármaco más alta).

Fig. 7: Patrón de sensibilidad a fármacos de células de carcinoma de ovario primarias muy resistentes que muestran una sensibilidad significativa solamente para dos fármacos antineoplásicos de 29 ensayados. El ensayo de sensibilidad a fármacos a corto plazo automatizado basado en extracto de sangre permite la identificación de fármacos potencialmente eficaces incluso en casos aparentemente sin esperanza de cáncer en estadio tardío.

5 Fig. 8: La figura muestra el resultado de un ensayo de supervivencia celular de tres días. Las células tumorales se aislaron a partir de un paciente de leucemia mieloide aguda (LMA) y se trataron con diferentes fármacos, a diferentes concentraciones en medio basado en extracto de sangre o en un medio de cultivo celular tradicional, rico -  
10 IMDM. El número de células supervivientes al final de la incubación se representa respecto de la concentración relativa de fármaco representada aquí como la proporción de valores de Área Bajo la Curva\* *in vivo* / *in vitro*. El valor pABC = 1 representa la concentración de fármaco alcanzada normalmente en el suero de un paciente durante la quimioterapia. \*ABC, el Área Bajo la Curva es una integración dependiente del tiempo de la curva de concentración de fármaco expresada como (microgramo/ml)\*horas

15 Fig. 9: Perfil de sensibilidad a fármacos similar de células de carcinoma humanas primarias en medio de cultivo celular basado en extracto de sangre producido a partir de sangre humana, bovina o porcina. Ensayo de supervivencia de tres días como se describió en la Figura 2.

#### Ejemplo 1: Producción de un extracto de sangre humana completa

Se obtiene sangre humana de un donante sano mediante venopunción. De manera alternativa, se recoge sangre animal (preferentemente de origen bovino o porcino) reciente en condiciones estériles durante el momento del sacrificio. La coagulación se impide añadiendo 100 UI de Heparina por ml a la bolsa de recogida. Posteriormente, los eritrocitos se lisan para liberar el contenido intracelular de los eritrocitos en el plasma. En una realización óptima de la formulación, la lisis se lleva a cabo congelando la sangre anti-coagulada a -20 °C en alícuotas de 50 ml, en un dispositivo de congelación de temperatura controlada para conseguir la ruptura óptima y uniforme de las membranas de los eritrocitos con la ayuda de la formación de cristales de hielo microscópicos. Posteriormente, la sangre congelada se almacena a -80 °C hasta el procesamiento posterior. Para corregir los cambios del contenido de iones, resultado de la hemólisis, y para suministrar nutrientes de peso molecular bajo, la sangre lisada se dializa con un volumen en exceso de un medio de cultivo celular tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - D6546, Sigma-Aldrich Company) o DMEM modificado por Iscove (IMDM). En una realización óptima de la formulación, los 50 ml de sangre congelada, mantenidos en un tubo de plástico Falcon, se descongelan en un baño de agua a 37 °C. El lisado de sangre descongelado se transfiere a una bolsa de diálisis Cellu SepH1 rehidratada (0310-46, M.S.E. Micron Separation Europe, Bélgica - límite de exclusión por tamaño 3500 D). La bolsa se cierra bajo una presión adicional suave (1,2-1,4 bares) sobre la presión atmosférica normal para eliminar burbujas de aire y para impedir la expansión adicional del volumen. La diálisis se lleva a cabo en la oscuridad, durante 24 horas, a 4 °C con un fluido en exceso de veinte veces con agitación magnética constante. Los restos de las membranas de eritrocitos se eliminan mediante centrifugación. En una realización óptima de la formulación, la centrifugación se lleva a cabo a través de una matriz de sílice microporosa equilibrada con el medio que se usó para la diálisis. La extracción adecuada de los restos de membranas se monitoriza y se documenta tomando muestras de 10 microlitros de cada 50 ml de lisado filtrado, y se comprueba mediante el uso de microscopía de contraste de fases digital automatizada. Para crear un medio redox adecuado, el lisado de sangre sin partículas se complementa con un agente reductor adicional. En una realización óptima de la formulación, el agente es glutatión reducido 0,5 mM (G6013, Sigma-Aldrich Company). Posteriormente, el lisado se filtra a vacío a través de una membrana de nitrocelulosa (Corning 431153, Corning Inc.) con un tamaño de poro de 0,22 micrómetros y, inmediatamente tras la última etapa de filtración, se congela rápidamente en nitrógeno líquido, en alícuotas de 3 ml. Las alícuotas congeladas se almacenan a -80 °C hasta el uso en los ensayos biológicos. Véase la Figura 1 para el resumen esquemático del procedimiento.

#### 45 Ejemplo 2: Ensayo de viabilidad de células tumorales humanas primarias tratadas con fármacos

El medio de cultivo celular basado en un lisado de sangre completa es especialmente adecuado para ensayar la sensibilidad a fármacos de células humanas primarias que crecen en forma de suspensión, mediante el uso de ensayos de supervivencia *in vitro* a corto plazo. Para estos ensayos, las células se purifican a partir de sangre periférica, médula ósea o derrames en cavidades corporales (peritoneal o pleural) mediante el uso de centrifugación en gradiente de Ficoll. En la configuración normal del ensayo, se tratan diez ml de fluido corporal con 100 UI/ml de heparina para impedir la coagulación. El fluido se extiende sobre 5 ml de una capa de LymphoprepR (Frezenius Kabi Norge AS) y se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm.

Las células se recogen de la interfase del gradiente y se lavan con medio de cultivo celular precalentado que contiene un 20% de suero humano. Se comprueba y se documenta la calidad y el contenido de células tumorales de la muestra mediante el uso de microscopía de contraste de fases. Si el recuento de células tumorales está por debajo del 70%, las células se purifican adicionalmente mediante selección negativa con el uso de cócteles Dynabead adecuados que reaccionan con las células normales contaminantes (p.ej., inflamatorias). La identidad de las células tumorales se verifica en ensayos independientes mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos. Por ejemplo, se identifican las células de carcinoma en derrames en cavidades corporales en portaobjetos de Cytospin con tinción de inmunofluorescencia para anticuerpos hacia pancitoqueratina. La presencia de células T, B,

plasmáticas, NK, granulocitos y macrófagos/monocitos se ensaya de manera rutinaria mediante el uso, por ejemplo, de anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, CD19, Ig, CD56, Mac1. La sensibilidad al fármaco de las células tumorales se ensaya en placas de 384 pocillos.

5 Las placas de fármacos de 384 pocillos preimpresas se producen mediante el uso de un aparato de laboratorio robotizado Biomek 2000 equipado con varillas metálicas de acero inoxidable de fondo plano con volúmenes replicados de 50 nanolitros. Las placas maestras se crean diluyendo en serie las disoluciones de reserva de fármacos mediante el uso de la combinación del modo de punta simple y el modo de 8 puntas del aparato robotizado. En una configuración típica, se manejan 30 fármacos diferentes en 4 series de diluciones diferentes (diluidas 1x 5x 25x 125x regularmente a partir de la reserva, en un 50% de DMSO/PBS) por triplicado junto con 24 pocillos de control. Un ejemplo de una serie de fármacos con las concentraciones más altas de los fármacos empleados se muestra en la tabla de la Figura 2. Las concentraciones de fármacos se seleccionan considerando los valores de ABC farmacocinéticos para sujetos humanos como se establece en los estudios clínicos [14, 15]. Cuando es necesario, se usan metabolitos activos en vez de los pro-fármacos inactivos originales (p.ej., 4-OH ciclofosfamida).

15 Para el ensayo de supervivencia a corto plazo, se diluyen  $2 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$  células tumorales (aprox. 500 - 4000 células por pocillo) en 12 ml de medio de cultivo celular basado en un lisado de sangre completa recién descongelado. Se distribuyen muestras de treinta microlitros en los pocillos de la placa de fármacos de 384 pocillos preimpresa. Las células se incuban durante 72 horas en un incubador a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Al final de la incubación, las células se tiñen de manera diferencial con mezclas de tinción de fluorescencia que distinguen entre las células vivas y las muertas (p.ej. VitalDye - Biomarker, Hungría) (Figura 2). El contenido de los pocillos individuales se fotografía mediante el uso de un microscopio de fluorescencia invertido automatizado a dos longitudes de onda de excitación diferentes [16]. Las fotografías capturadas se analizan mediante el uso de programas de cuantificación de imágenes digitales que cuentan el número de células vivas y muertas a partir de imágenes binarizadas a nivel de células individuales. El índice de viabilidad después de 3 días de incubación con la dilución de fármaco indicada se representó como mapas térmicos creados mediante agrupamiento jerárquico por pares para diferentes tumores primarios tales como carcinomas de pulmón, ovario y mama (Figura 3), leucemias mieloides agudas (Figura 4), leucemias linfoides crónicas (Figura 5). El mapa resumen de la sensibilidad a fármacos de 216 tumores primarios creado como un mapa auto-organizado se muestra en la Figura 6. Estos datos indican claramente que incluso los tumores muy resistentes (p.ej., células de ascitis de carcinoma de ovario en estadio tardío, como se muestra en la Figura 7) pueden ser sensibles a al menos unos cuantos fármacos cuando se ensayan en el medio de cultivo celular basado en extracto de sangre.

Se registra la intensidad total de fluorescencia, el tamaño celular, la circunferencia de la superficie celular, así como parámetros morfológicos tales como la circularidad, el diámetro de Feret, para el análisis de contenido elevado (HCA) posterior. Si las medidas de la distribución del ciclo celular son necesarias, las células se someten a una combinación de tratamiento de permeabilización y de fijación, tal como el tratamiento con detergente combinado con reticulación con aldehído. En la práctica, se añade una mezcla de formaldehído y Nonidet P-40 a las placas de fármacos teñidas de manera fluorescente que produce una concentración del 1 y 0,1%, respectivamente. Las placas se someten a formación de imágenes de nuevo mediante el uso de los parámetros que se emplearon previamente para el registro de las células muertas. El colorante fluorescente que en la primera ronda detectó las células muertas basándose en la tinción del ADN en células con una permeabilidad de membrana comprometida se usa en la segunda ronda para medir el contenido de ADN total en todas las células. La combinación de la distribución del ciclo celular, la viabilidad celular y los datos de la morfología celular detallada proporcionan un grupo valioso de información para caracterizar el efecto de un fármaco particular sobre las células tumorales primarias. Por ejemplo, la parada del ciclo celular, o el redondeo de las células adherentes, proporcionan criterios de valoración de la toxicidad alternativos, más sutiles, en una población de células tumorales en la que el ensayo de viabilidad simple no mostraría ninguna diferencia.

#### Ejemplo 3: Comparación con medios de cultivo celular clásicos (sensibilidad a fármacos disminuida)

La incubación de células de carcinoma y de leucemia humanas primarias en medio basado en extracto de sangre y medio convencional produjo sistemáticamente una tasa de supervivencia global mayor y una sensibilidad disminuida a los efectos citotóxicos de los diferentes fármacos antineoplásicos. (Figura 8).

#### Ejemplo 4: Comparación de extractos de sangre de origen humano, bovino y porcino

Se generaron extractos de sangre a partir de sangre recién recogida de cerdos o terneros recién sacrificados. La sangre se recogió en condiciones estériles y se procesaron como se describió en el Ejemplo 1.

55 Los ensayos paralelos mediante el uso de células de carcinoma humanas primarias recién aisladas mostraron patrones de sensibilidad a fármacos comparables. Las células de leucemia humanas primarias mostraron una supervivencia un poco mejor en los extractos de sangre humana para algunos de los fármacos. Estos datos sugieren que se pueden llevar a cabo de manera eficaz ensayos de cribado de fármacos de alto rendimiento con células de carcinoma humanas primarias de ascitis o derrame pleural mediante el uso de un extracto de sangre de origen animal, mientras el ensayo del patrón de sensibilidad a fármacos de las células de pacientes humanos de leucemia

se debería llevar a cabo en un extracto de sangre de origen humano. (Figura 9).

### Referencias

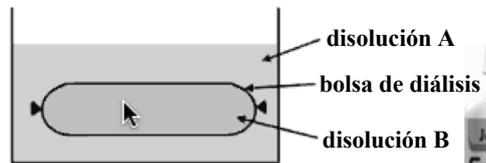
1. Samson DJ, Seidenfeld J, Ziegler K, Aronson N: Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review. *J Clin Oncol* 2004, 22:3618-3630.
- 5 2. Larsson R, Nygren P: A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res* 1989, 9:1111-1119.
3. Larsson R, Fridborg H, Kristensen J, Sundstrom C, Nygren P: In vitro testing of chemotherapeutic drug combinations in acute myelocytic leukaemia using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Br J Cancer* 1993, 67:969-974.
- 10 4. Shay JW, Wright WE: Tissue culture as a hostile environment: identifying conditions for breast cancer progression studies. *Cancer Cell* 2007, 12:100-101.
5. Nygren P, Fridborg H, Csoka K, Sundstrom C, de la Torre M, Kristensen J, Bergh J, Hagberg H, Glimelius B, Rastad J, et al.: Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity in vitro using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients. *Int J Cancer* 1994, 56:715-720.
- 15 6. Nygren P, Hagberg H, Glimelius B, Sundstrom C, Kristensen J, Christiansen I, Larsson R: In vitro drug sensitivity testing of tumor cells from patients with non-Hodgkin's lymphoma using the fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Ann Oncol* 1994, 5 Supl. 1:127-131.
7. Villman K, Blomqvist C, Larsson R, Nygren P: Predictive value of in vitro assessment of cytotoxic drug activity in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs* 2005, 16:609-615.
- 20 8. Nagourney RA: Ex vivo programmed cell death and the prediction of response to chemotherapy. *Curr Treat Options Oncol* 2006, 7:103-110.
9. Arosa FA, Pereira CF, Fonseca AM: Red blood cells as modulators of T cell growth and survival. *Curr Pharm Des* 2004, 10:191-201.
- 25 10. Fonseca AM, Pereira CF, Porto G, Arosa FA: Red blood cells upregulate cytoprotective proteins and the labile iron pool in dividing human T cells despite a reduction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:1404-1416.
11. Fonseca AM, Pereira CF, Porto G, Arosa FA: Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds. *Cell Immunol* 2003, 224:17-28.
12. Fonseca AM, Porto G, Uchida K, Arosa FA: Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 2001, 97:3152-3160.
- 30 13. Porto B, Fonseca AM, Godinho I, Arosa FA, Porto G: Human red blood cells have an enhancing effect on the relative expansion of CD8+ T lymphocytes in vitro. *Cell Prolif* 2001, 34:359-367.
14. Markasz L, Stuber G, Flaberg E, Jernberg AG, Eksborg S, Olah E, Skribek H, Szekely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells. *BMC Cancer* 2006, 6:265.
- 35 15. Markasz L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Olah E, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Szekely L: Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Mol Cancer Ther* 2007, 6:644-654.
16. Flaberg E, Sabelstrom P, Strandh C, Szekely L: Extended Field Laser Confocal Microscopy (EFLCM): combining automated Gigapixel image capture with in silico virtual microscopy. *BMC Med Imaging* 2008, 8:13.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un medio de cultivo celular para cultivar células humanas que comprende un material de sangre completa anti-coagulada de origen mamífero, en el que las células presentes en la sangre se rompen y los restos insolubles de las células lisadas se eliminan, el contenido de iones del medio se restablece para que coincida con el de la fracción extracelular del material de partida de sangre completa, el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) es básicamente el mismo que el de un medio de cultivo celular convencional, se restablece la capacidad reductora del medio, y en el que el nivel de hemoglobina es de 8 a 16 g/dl.
2. El medio de cultivo celular según la reivindicación 2, en el que la sangre es de origen humano.
- 10 3. El medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) es básicamente el mismo que el de un medio de cultivo celular convencional seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, e IMDM.
4. El medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la capacidad reductora del medio se restablece mediante la adición de glutatión reducido.
- 15 5. El uso de un medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para cultivar células humanas.
6. Un método para la preparación de un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, que comprende
  - (a) proporcionar sangre de mamífero anti-coagulada como material de partida de una muestra de sangre;
  - (b) romper mecánicamente las células presentes en la sangre;
  - (c) eliminar los restos insolubles de las células lisadas;
  - 20 (d) el contenido de iones del medio se restablece para que coincida con el de la fracción extracelular del material de partida de sangre completa;
  - (e) el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo (< 3000 Dalton) del medio se ajusta respecto de un medio de cultivo celular convencional; y
  - (f) se restablece la capacidad reductora del medio.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en el que la ruptura mecánica de las células se consigue congelando la sangre completa o mediante ultrasonidos, homogeneizador eléctrico de cuchillas o prensa de French.
8. El método según la reivindicación 6 ó 7, en el que la eliminación de los restos insolubles de las células lisadas se consigue mediante ultracentrifugación o filtración mecánica.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el contenido y/o la composición de nutrientes de peso molecular bajo se ajusta mediante diálisis, y el medio de cultivo celular convencional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, e IMDM.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la capacidad reductora del medio se restablece mediante la adición de glutatión reducido.
- 35 11. Un medio de cultivo celular para cultivar células humanas, obtenido mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.



### Vista esquemática de la producción de un medio de cultivo celular basado en extracto de sangre



**Fig. 1**



Adenocarc. de pulmón

Carc. de mama

Carc. de ovario

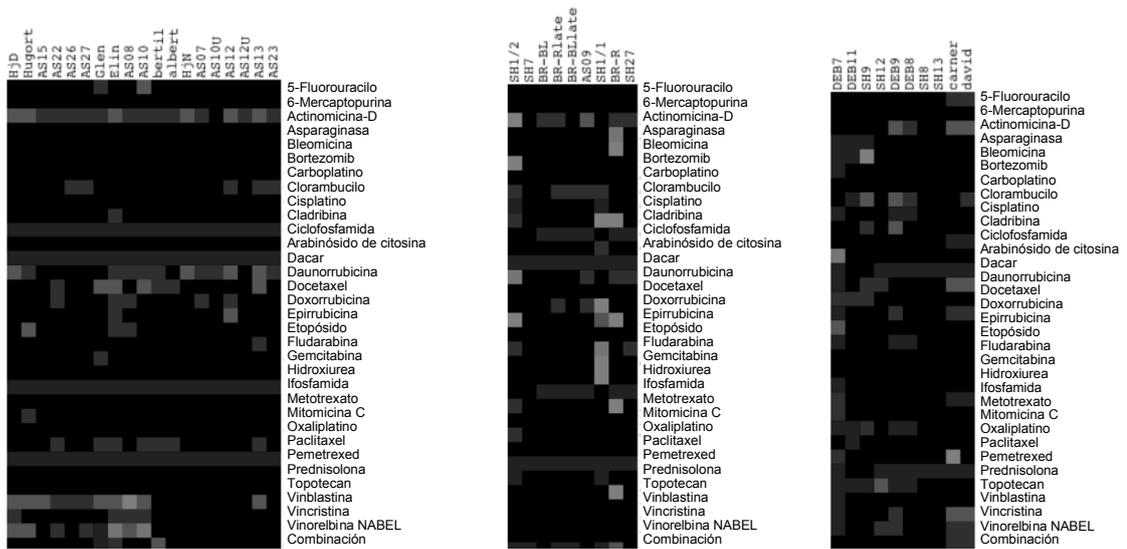


Fig. 3

### Leucemia mieloide aguda

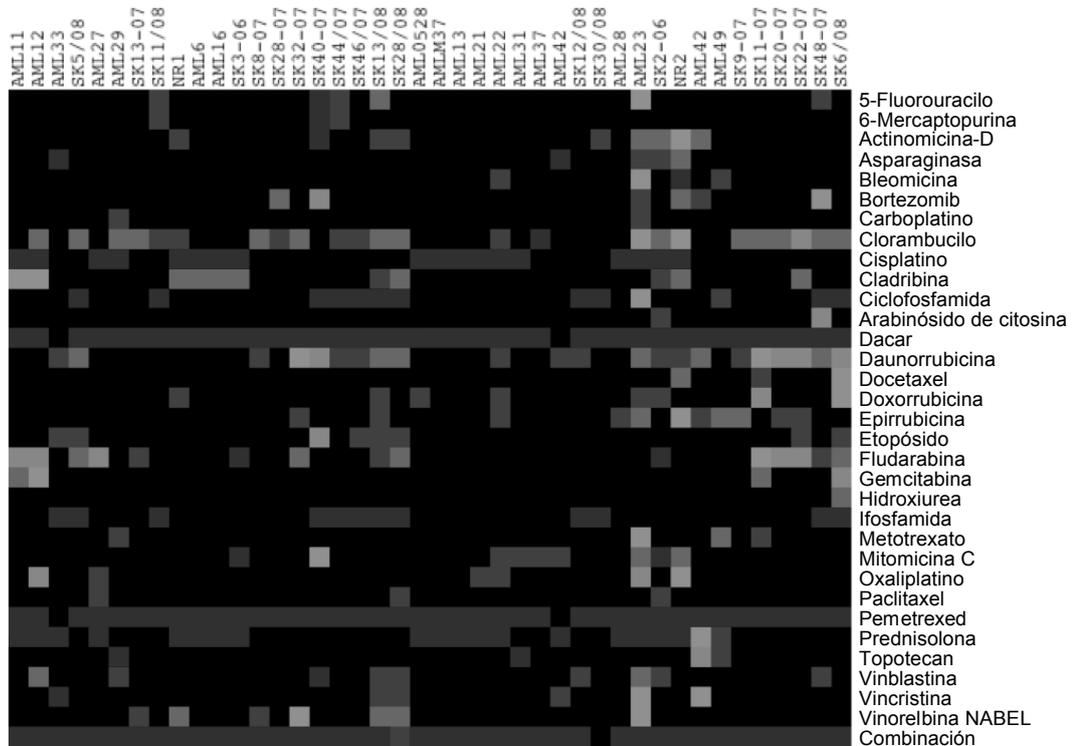


Fig. 4

Leucemia linfóide crónica

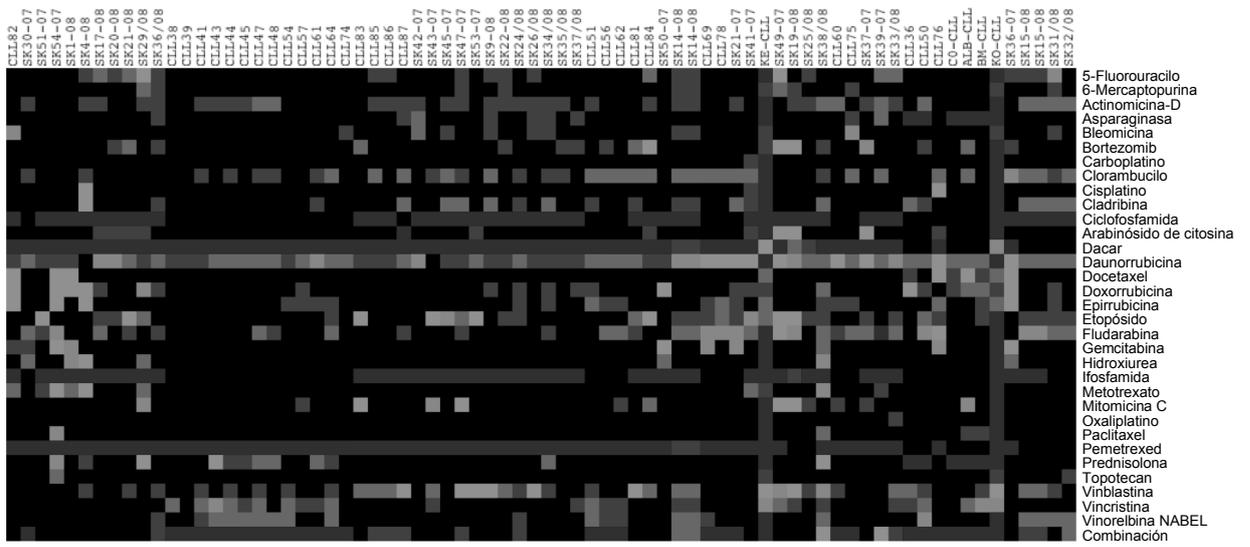


Fig. 5

Mapa auto-organizado del patrón de sensibilidad a fármacos de 216 tumores humanos primarios frente a 34 fármacos citostáticos

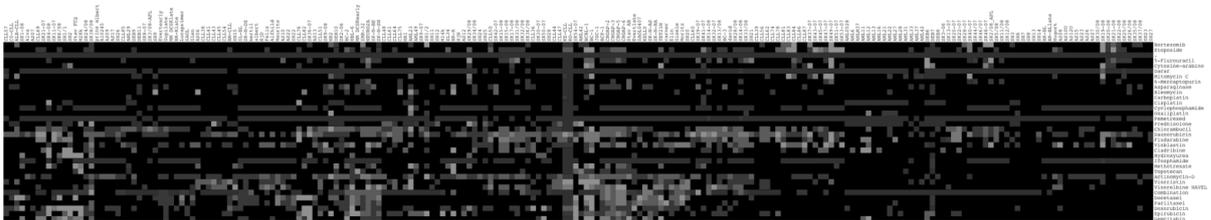
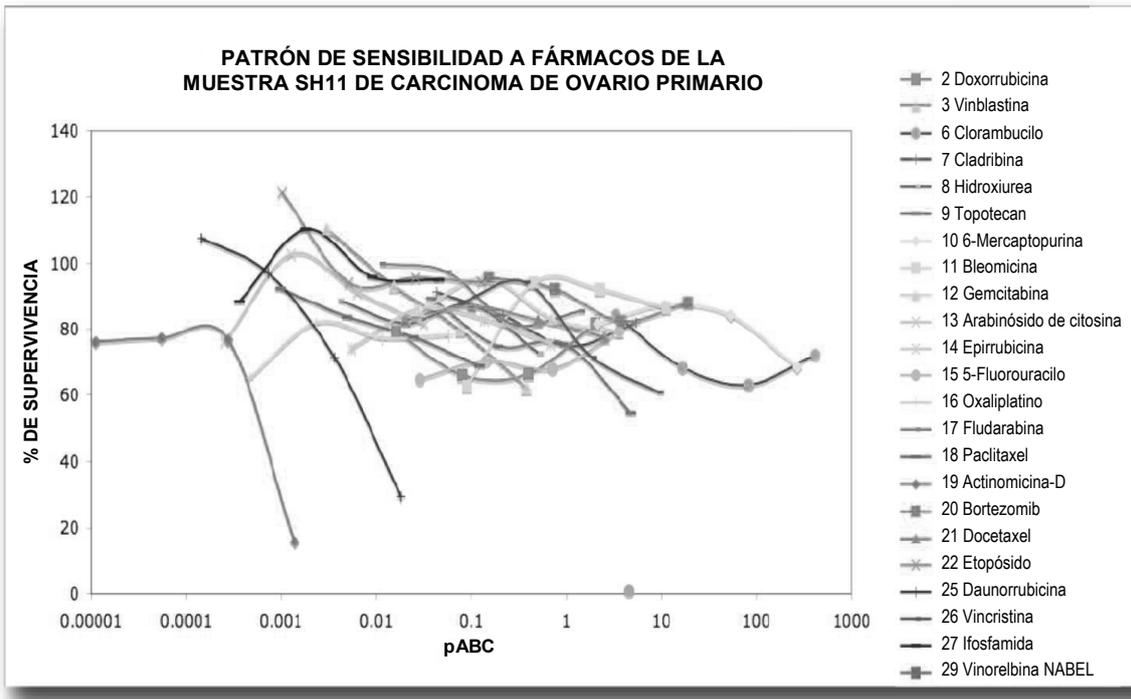
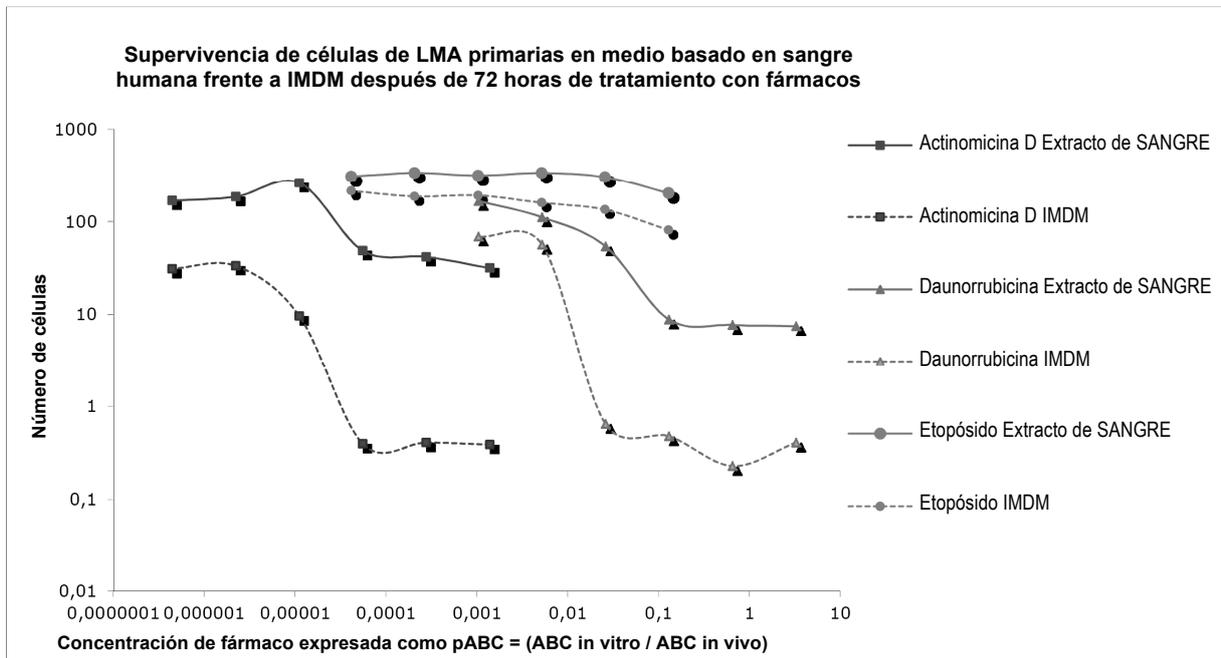


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 8**

FÁRMACO	SH27 carcinoma de mama			SH28 adenocarcinoma de pulmón			AS30 adenocarcinoma de pulmón		
	ternero	humano	cerdo	ternero	humano	cerdo	humano	cerdo	ternero
5-Fluorouracilo	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6-Mercaptopurina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Actinomicina-D	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asparaginasa	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Bleomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Bortezomib	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Carboplatino	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Clorambucilo	R	R	R	R	+	+	+	+	+
Cisplatino	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cladribina	R	R	R	+	+	R	R	R	R
Arabinósido de citosina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Daunorrubicina	R	+	+	+	+	+	+	+	+
Docetaxel	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Doxorrubicina	+	R	R	+	+	+	+	+	+
Epirubicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Etoposido	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fludarabina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gemcitabina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Hidroxiurea	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Metotrexato	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Mitomicina C	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxaliplatino	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Paclitaxel	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Prednisolona	R	R	R	R	+	R	R	R	R
Topotecan	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Vinblastina	R	R	R	R	R	R	R	R	+
Vincristina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Vinorelbina	R	R	R	R	+	R	+	R	++
Mezcla	R	R	R	+	+	R	+	R	+

FIG. 9