

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 664**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/EP2010/059478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11009706**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10726999 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2456854**

54 Título: **Procedimiento de obtención de miofibroblastos**

30 Prioridad:

24.07.2009 FR 0955216

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

19.01.2018

73 Titular/es:

**ONCOBIOTEK (100.0%)
138 Allée des lucioles
06390 Chateaufort-Villeveuille, FR**

72 Inventor/es:

**ROUYER, NICOLAS JACQUES y
BARTHEL, ROBERT**

74 Agente/Representante:

POINDRON, Cyrille

ES 2 650 664 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

Procedimiento de obtención de miofibroblastos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de miofibroblastos, caracterizado por que se cultiva una muestra de células proveniente de un tumor, preferentemente un carcinoma, en un medio de cultivo sin suero, siendo dicho medio MEGM que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.

10 En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes ([]) remiten a la lista de referencias presentada al final del texto.

Los miofibroblastos representan un tipo particular de fibroblastos llamados CAF, del inglés "*carcinoma-associated fibroblasts*", dicho de otro modo, fibroblastos asociados a un carcinoma. También están implicados en diversos procesos biológicos tales como, por ejemplo, la remodelación tisular.

15 Expresan el marcador alfa-actina de músculo liso o SMA.

En lo sucesivo, el término fibroblasto se utiliza en sentido amplio. Agrupa no solamente los fibroblastos, llamados en el presente documento fibroblastos "en sentido estricto", sino también los derivados de fibroblastos tales como los fibroblastos activados, los CAF, los miofibroblastos. De este modo, se incluyen los fibroblastos implicados en los procesos tumorales pero también los implicados en cualquier otro proceso biológico en el que intervienen miofibroblastos.

25 Es conocida concretamente la obtención de fibroblastos a partir de un tumor, por digestión enzimática del tumor seguida o no de una o varias etapas de purificación (Orimo y col., Cell 2005, 121: 335-348 [1] o Allinen y col., Cancer Cell 2004, 6: 17-32 [2]).

30 Hasta ahora, los cultivos de fibroblastos se realizan en un medio que contiene suero, convencionalmente del 5 al 20 % de suero, y contienen un porcentaje variable de miofibroblastos.

Por ejemplo, en el mercado, encontramos CAF en un medio con el 5 % de suero (Asterand), que se determinan como tales mediante simple inspección visual.

35 Laboratorios académicos producen poblaciones de CAF en medio de cultivo con el 10 % de suero. El fenotipo de estas células se determina con ayuda de la medida del marcador alfa-actina de músculo liso. De este modo, estas poblaciones contienen un porcentaje variable de CAF, de media como máximo el 30 %.

40 También se encuentran en el mercado miofibroblastos hepáticos humanos (Dominion Pharmakine) en un medio con el 20 % de suero, de los que solamente del 50 % al 60 % expresan el marcador alfa-actina de músculo liso (SMA). En el hígado así como en el páncreas, la célula que da origen al miofibroblasto es la célula estrellada, "*stellate cell*" en inglés, que tiene la particularidad de presentar una activación espontánea con expresión del marcador SMA cuando se cultiva (Kinnman y col., Lab Invest 2001, 81: 1709-1716 [3]; Omary y col., JCI 2007, 117: 50-59 [4]).

45 La utilización de suero, por ejemplo fetal o de recién nacido de ternero, presenta, no obstante, los inconvenientes siguientes:

- problema ético asociado a la recogida del suero,
- el suero es un líquido biológico cuya composición es variable,
- la composición exacta del suero no es conocida y no es posible definir con precisión las necesidades de la célula,
- el suero contiene factores (factores de crecimiento, antagonistas...) que puede interferir en un ensayo utilizado en la industria farmacéutica en las células en cultivo,
- las células que tienen la costumbre de crecer en suero cambian de fenotipo o mueren cuando se suprime el suero en el medio de cultivo.

55 En resumen, las poblaciones de fibroblastos, aisladas a partir de tejidos patológicos, tal como se conocen y se estudian in vitro hoy en día:

- son heterogéneas,
- contienen un porcentaje variable de miofibroblastos, y
- crecen en un medio que contiene suero, cuya presencia presenta los inconvenientes mencionados anteriormente.

60 En este contexto, el objetivo principal pretendido por la invención es obtener una población de miofibroblastos, cuyas características facilitan cualquier estudio de estas células, y en particular una población lo más pura posible en miofibroblastos.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de miofibroblastos, caracterizado por que se cultiva una muestra de células proveniente de un tumor, preferentemente un carcinoma en un medio de cultivo sin suero, siendo dicho medio MEGM que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.

Se describe un procedimiento de obtención de miofibroblastos, caracterizado por que:

- (a) se prepara una muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos; y
- (b) se cultiva esta muestra de células en un medio de cultivo sin suero.

La muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos significa que al menos el 50 % de las células que contiene son fibroblastos, preferentemente al menos el 70 %. Sin embargo, el experto en la materia sabrá evaluar, mediante experimentos rutinarios, el porcentaje de fibroblastos que debe contener la muestra de células para la realización.

La invención presenta la ventaja de producir una población de miofibroblastos, más pura que las de la técnica anterior, y que crecen en un medio que no contiene suero.

De este modo, los miofibroblastos obtenidos mediante el procedimiento de acuerdo con la invención permiten, por ejemplo, estudiar con precisión y de manera reproducible la biología de estas células, e identificar dianas terapéuticas potenciales.

Debido a la ausencia de suero, permiten también estudiar las necesidades de las células y definir los factores que, por ejemplo, inducen su diferenciación, les permiten mantener su fenotipo, apoyan su multiplicación y/o están implicados en la senescencia prematura de estas células.

Al cabo de uno o dos pases en medio sin suero, la población de miofibroblastos obtenidos con el procedimiento de acuerdo con la invención puede llegar hasta más del 95 % de miofibroblastos.

El medio de cultivo sin suero comprende preferentemente un medio basal sin suero que es un medio de cultivo de células epiteliales. En efecto, el medio de cultivo obtenido a partir de dicho medio basal permite obtener un muy buen crecimiento de los miofibroblastos.

Este medio basal sin suero es un medio de cultivo de células epiteliales mamarias humanas. A modo de ejemplo, éste puede ser, por el contrario, un medio de cultivo sin suero conocido para el cultivo de células epiteliales bronquiales, placentarias o renales.

Este medio basal sin suero es suplementado con ayuda de uno o varios suplementos utilizados convencionalmente en cultivo celular. A modo de ejemplo de suplementos, se pueden mencionar hormonas, factores de crecimiento, mitógenos, antibióticos. El medio comprende insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico o EGF, un extracto hipofisario bovino o BPE y un antibiótico.

El antibiótico no es esencial para el correcto crecimiento de las células; pero su presencia previene la contaminación microbiana.

El antibiótico puede ser, por ejemplo, GA-1000 que incluye gentamicina y anfotericina-B o normocina. Cualquier antibiótico utilizado de forma rutinaria en cultivo celular puede utilizarse en la invención y, a modo de ejemplo, pueden mencionarse penicilina, estreptomycin, ampicilina, kanamicina y tilosina.

El medio de cultivo sin suero de acuerdo con la invención es el medio de cultivo de células epiteliales mamarias humanas tal como el medio disponible en el mercado con el nombre de MEGM, del inglés "*Mammary Epithelial Growth Medium*" (Cambrex) que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.

A modo de ejemplo, se describe un medio de cultivo sin suero conocido para el cultivo de células epiteliales bronquiales, placentarias o renales.

La formulación inicial de MEGM es la del medio MCDB 170 (Hammond y col., PNAS 1984, 81: 5435-5439 [5]). Este medio MCDB 170, a continuación MEGM, fue desarrollado y utilizado hasta ahora específicamente para el cultivo de células epiteliales mamarias humanas normales.

En la presente invención, la utilización de este medio es particularmente ventajosa para el cultivo de miofibroblastos.

Se compone de un medio basal, cuya formulación exacta es conocida con el nombre de medio MEBM, del inglés "*Mammary Epithelial Basal Medium*", y de cinco suplementos: insulina, hidrocortisona, EGF, extracto hipofisario bovino y un antibiótico, GA-1000.

La etanolamina y la fosfoetanolamina son precursores lipídicos incluidos en la formulación basal del MCDB 170 y en MEGM.

5 Otro ejemplo de medio basal sin suero se presenta en la tabla 1. La columna de la izquierda enumera los productos que entran en la composición de este medio. La columna de la derecha indica, para cada producto, su concentración molar en el medio, en moles por litro de medio.

10 Este medio basal sin suero comprende, de hecho, una mezcla de los medios de cultivo DMEM y HamF12 (Invitrogen) en proporciones 1:1.

15 Este medio basal, mezclado con EGF (Peprotech), hidrocortisona (SIGMA), BPE (Invitrogen), ITS-X (Invitrogen) que incluye insulina, transferrina y selenio, y un antibiótico tal como normocina (Invivogen), da un medio de cultivo sin suero que puede utilizarse en la invención. Se denomina el medio de cultivo obtenido "medio de cultivo sin suero DMEM/HamF12".

Las composiciones de DMEM y de HamF12 son las indicadas por ejemplo en el documento R. Ian Freshney, "Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique", 2005 [6].

Tabla 1

Componente	Concentración molar
L-alanina	5×10^{-5}
L-arginina	7×10^{-4}
L-asparagina	5×10^{-5}
ácido L-aspartico	5×10^{-5}
L-cisteína	10^{-4}
L-cistina	10^{-4}
ácido L-glutámico	5×10^{-5}
L-glutamina	$2,5 \times 10^{-3}$
Glicina	$2,5 \times 10^{-4}$
L-histidina	$1,5 \times 10^{-4}$
L-isoleucina	$4,2 \times 10^{-4}$
L-leucina	$4,5 \times 10^{-4}$
L-lisina HCl	5×10^{-4}
L-metionina	$1,2 \times 10^{-4}$
L-fenilalanina	$2,2 \times 10^{-4}$
L-prolina	$1,5 \times 10^{-4}$
L-serina	$2,5 \times 10^{-4}$
L-treonina	$4,5 \times 10^{-4}$
L-triptófano	$4,4 \times 10^{-5}$
L-tirosina	$2,1 \times 10^{-4}$
L-valina	$4,5 \times 10^{-4}$
Biotina	$1,5 \times 10^{-8}$
Cloruro de colina	$6,4 \times 10^{-5}$
Ácido fólico	6×10^{-6}
Mioinositol	7×10^{-5}
Nicotinamida	$1,7 \times 10^{-5}$
Pantotenato D-Ca	$9,4 \times 10^{-6}$
Piridoxal HCl	10^{-5}
Piridoxina HCl	$1,5 \times 10^{-7}$

Componente	Concentración molar
Riboflavina	$5,8 \times 10^{-7}$
Tiamina	$6,4 \times 10^{-6}$
Vitamina B12	5×10^{-7}
CaCl_2	$1,1 \times 10^{-3}$
KCl	$4,2 \times 10^{-3}$
MgSO_4	4×10^{-4}
NaCl	$1,2 \times 10^{-1}$
NaHCO_3	$2,9 \times 10^{-2}$
NaH_2P_4	$4,5 \times 10^{-4}$
Na_2HPO_4	5×10^{-4}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$7,8 \times 10^{-9}$
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$1,2 \times 10^{-7}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \times 10^{-6}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Hipoxantina	$1,5 \times 10^{-5}$
Timidina	$1,5 \times 10^{-6}$
D-glucosa	$1,8 \times 10^{-2}$
Piruvato de sodio	10^{-3}
Ácido linoleico	$1,5 \times 10^{-7}$
Ácido lipoico	$5,1 \times 10^{-7}$
Rojo fenol	36×10^{-5}
Putrescina	5×10^{-7}

De acuerdo con una realización de la invención, la etapa (a) comprende una obtención de una suspensión celular a partir de una muestra biológica tal como un tejido biológico; que comprende un cultivo inicial de las células obtenidas en un medio de cultivo que favorece el crecimiento de fibroblastos, por ejemplo en un medio de cultivo que contiene suero.

De acuerdo con otra realización de la invención, la etapa (a) comprende una obtención de una suspensión celular a partir de una muestra biológica tal como un tejido biológico; a continuación una purificación de subpoblaciones celulares para obtener la muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos.

La obtención de una suspensión celular a partir de una muestra biológica puede realizarse por digestión enzimática o mediante cualquier otro método, tal como disociación mecánica o tamices celulares.

Se prefiere la digestión enzimática porque este método es sencillo y eficaz.

La muestra biológica puede ser de cualquier origen que le permita incluir esencialmente fibroblastos.

De este modo, puede provenir de cualquier especie de mamífero.

Concretamente, la muestra biológica es proveniente de un tumor, preferentemente un carcinoma. Se describe cualquier otro tejido patológico, tal como cualquier tejido en remodelación.

Para la invención, lo esencial es que la muestra biológica contiene fibroblastos y en particular miofibroblastos.

El porcentaje de miofibroblastos en la muestra biológica es evaluado en un corte histológico con un marcado inmunohistoquímico para alfa-actina de músculo liso.

A modo de ejemplo, es preferible partir de una muestra biológica de la que al menos el 30 % o más, preferentemente al menos el 50 %, de los fibroblastos tienen el fenotipo de miofibroblasto.

El material de partida para el cultivo puede ser cualquier tejido de mamífero que contiene miofibroblastos: un tumor, por ejemplo un carcinoma. Se describe un tejido que es objeto de remodelación o de reparación tisular, tal como en caso de fibrosis, cirrosis, cicatriz o herida. Los miofibroblastos juegan, en efecto, un papel clave en todos estos procesos.

El medio de cultivo que favorece el crecimiento de fibroblastos es, más convencionalmente, un medio que contiene suero. Puede tratarse, por ejemplo, de un medio de cultivo a base de RPMI, de DMEM o de HAMF12.

Para purificar subpoblaciones celulares para obtener la muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos, se puede implementar, por ejemplo, el protocolo descrito por Allinen y col [2] o el descrito por Orimo y col [1].

En la invención, es posible partir de una mezcla compleja de células epiteliales y estromales, sin purificación previa. Sin embargo, un cultivo inicial en un medio que contiene suero permite enriquecer el cultivo en células fibroblásticas.

La invención también se refiere a un cultivo celular de miofibroblastos obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado por que al menos el 80 %, o preferentemente al menos el 95 %, de las células que contiene son miofibroblastos.

Este cultivo celular de acuerdo con la invención está, de manera ventajosa, desprovisto de suero.

Dicho cultivo celular permite estudiar los efectos de una estimulación de la actividad de las células, como por ejemplo en caso de heridas que no se curan, o de déficit de angiogénesis, o al contrario los efectos de una inhibición de la actividad de las células, como concretamente en caso de cáncer, fibrosis o cirrosis.

La invención también se refiere a la utilización del procedimiento de acuerdo con la invención, para obtener un cultivo de células en el que las células incluyen al menos el 80 %, o preferentemente al menos el 95 %, de miofibroblastos.

Este cultivo de células es, de manera ventajosa, en un medio sin suero, siendo dicho medio MEGM que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.

Se describe la utilización de un medio de cultivo sin suero, desarrollado para el cultivo de células epiteliales mamarias humanas, para la obtención de miofibroblastos a partir de una muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos.

Este medio de cultivo sin suero puede comprender al menos un suplemento seleccionado, por ejemplo, entre insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.

En la invención, los cultivos de células pueden realizarse con ayuda de cualquier medio apropiado, en suspensión o sobre un soporte, en placa o en matraz, etc. El experto en la materia es capaz de seleccionar estos medios recurriendo a sus conocimientos generales.

De este modo, algunos ejemplos de aplicación de la invención son: identificación de biomarcadores de miofibroblastos, identificación de dianas terapéuticas, identificación y validación de compuestos anticancerosos, modelo in vitro para el cribado de compuestos farmacéuticos o cosméticos, toxicología in vitro.

Otras características y ventajas de la invención surgirán claramente de la descripción detallada que se realiza a continuación, a título indicativo y en absoluto limitante, en referencia a la figura 1, que representa un diagrama de barras verticales de la cantidad de VEGF producido por los miofibroblastos obtenidos de acuerdo con la invención, en picogramos por mililitro de medio.

Ejemplo de procedimiento de obtención de miofibroblastos de acuerdo con la invención:

Se parte de un tumor extraído de un mamífero, en el presente caso un carcinoma extraído de un perro.

A modo de ejemplo, una variante sería partir de un hígado cirrótico para obtener una población de miofibroblastos implicados en este proceso patológico.

Puede realizarse un examen microscópico del tumor para evaluar el porcentaje de miofibroblastos en el tumor, por ejemplo con ayuda de un marcado inmunohistoquímico del tejido fijado previamente en formol.

Idealmente, se parte de un tumor que contiene un porcentaje elevado de miofibroblastos, es decir preferentemente al menos el 30 % de los fibroblastos son miofibroblastos.

Se realiza una digestión enzimática del tumor, seguida o no de una purificación de subpoblaciones celulares.

Para la digestión enzimática, que puede sustituirse por cualquier otro procedimiento que permita obtener una suspensión celular, se puede proceder de tres formas diferentes:

- 5 1) se conserva en primer lugar el tejido a 4 °C durante el examen microscópico del tumor, en espera de los resultados de este examen; un inconveniente es que el tejido es susceptible de degradarse.
- 2) se procede a la digestión enzimática del tejido, con o sin purificación de subpoblaciones celulares, a continuación se congelan las células en espera del resultado del examen microscópico.
- 3) se procede a la digestión enzimática del tejido y se inicia el cultivo el mismo día.

10 Después de la digestión enzimática, se puede no llevar a cabo ninguna purificación de subpoblaciones celulares. En este caso, se inicia el cultivo en un medio para favorecer el crecimiento de los fibroblastos. En el primer pase, se transfieren las células al medio sin suero MEGM.

15 Después de la digestión enzimática, se puede realizar, por el contrario, una purificación de subpoblaciones celulares. En este caso, después de esta purificación, se hace crecer directamente la fracción que contiene los fibroblastos y derivados en el medio sin suero MEGM.

En cada pase, se puede realizar una inmunocitoquímica para determinar el porcentaje de células positivas para el marcador SMA.

20 El medio MEGM se desarrolló específicamente para el cultivo de células epiteliales mamarias humanas normales.

Al cabo de uno o dos pases, se obtiene un cultivo de miofibroblastos que son, como máximo del 95 % y hasta el 100 %, positivos para el marcador SMA.

25 Las células obtenidas de este modo presentan concretamente las ventajas de mantener su fenotipo en cultivo y de crecer de manera activa en aproximadamente 4 pases. Únicamente en el quinto pase, muestran signos de muerte celular o senescencia.

30 Siguiendo el mismo procedimiento que en el ejemplo anteriormente, con la única diferencia de que el medio de cultivo MEGM es reemplazado por el medio de cultivo sin suero DMEM/HamF12 descrito anteriormente, se obtienen resultados similares a los obtenidos con el medio de cultivo MEGM: al cabo de uno o dos pases, se obtiene un cultivo de miofibroblastos que son, como máximo del 95 % y hasta el 100 %, positivos para el marcador SMA. Sin embargo, con este medio de cultivo sin suero DMEM/HamF12, las células crecen peor desde el cuarto pase.

35 Ejemplo de protocolo experimental a seguir para la implementación del procedimiento de obtención de miofibroblastos de acuerdo con la invención:

40 Se parte de un tumor mamario, conservado por ejemplo en un medio de transporte adaptado.

Se aclara la extracción en una solución salina tamponada con fosfato o PBS.

45 Se transfieren trozos de tejido a una placa de cultivo que contiene un cóctel enzimático: colagenasa e hialuronidasa en un medio de cultivo DMEM.

Se dilacera el tejido en pequeños fragmentos con ayuda de dos bisturíes, y se mezcla íntimamente con una pipeta.

Se colocan los fragmentos obtenidos en una incubadora a 37 °C durante como mínimo 2 horas.

50 Se añade DMEM a la mezcla de tejido-cóctel enzimático, y se mezcla íntimamente.

Se hace pasar la mezcla de tejido-cóctel enzimático-DMEM por un filtro de nylon de 40 micrómetros.

55 Se centrifuga para obtener un sedimento de células.

Se lavan las células obtenidas con PBS, y se centrifuga de nuevo.

60 Se eliminan los glóbulos rojos, si fuera necesario, con una solución de lisis de los glóbulos rojos, se lava con PBS y se centrifuga de nuevo para obtener un sedimento de células.

Se recogen las células del sedimento en un pequeño volumen de PBS.

65 En esta fase, se puede estimar la viabilidad de las células, mediante coloración con azul de tripano, por ejemplo, y contar las células.

Se inicia a continuación el cultivo de estas células en matraces de cultivo convencionales, a 10^5 células por mililitro, en un medio que contiene suero: medio de cultivo RPMI + 10 % de suero fetal de ternero (FBS) inactivado con calor;

Al día siguiente, se cambia el medio de cultivo para retirar las células no adherentes.

Puede efectuarse una transferencia a medio sin suero desde el primer pase, cuando las células están al 80 % de confluencia.

El antibiótico contenido convencionalmente en el medio MEGM es el GA-1000 que incluye los antibióticos gentamicina y anfotericina-B. Estos antibióticos pueden ser reemplazados concretamente por normocina (Invivogen).

A continuación se reemplaza el medio sin suero aproximadamente cada 3 a 4 días.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención permite obtener una población celular que incluye un porcentaje elevado (hasta más del 95 %) de miofibroblastos y que crecen en un medio que no contiene suero.

Las células obtenidas de este modo presentan concretamente las ventajas de mantener su fenotipo en cultivo y de crecer de manera activa en aproximadamente 4 pases.

Además, estas células producen en abundancia factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF, siendo VEGF la principal molécula pro-angiogénica.

La figura 1 ilustra la producción importante de VEGF por los miofibroblastos obtenidos con la invención.

Ésta muestra la concentración de VEGF canino en el sobrenadante de miofibroblastos en el quinto pase en el medio MEGM, el primer día (columna de la izquierda; parte derecha "MIOFIBROBLASTO") y el segundo día (columna de la derecha; parte derecha "MIOFIBROBLASTO"). La parte izquierda de la figura ("CONTROL") sirve de control: se efectuaron medidas en el medio de cultivo en solitario.

Las medidas se realizaron con ayuda de un kit ELISA VEGF canino (R&D Systems).

Esta figura confirma en primer lugar que los miofibroblastos son una fuente importante de VEGF, la principal molécula pro-angiogénica. Un tumor necesita, en efecto, reclutar vasos sanguíneos para establecerse y crecer más allá de cierto tamaño. Se ha demostrado que células del estroma son alteradas por el tumor con este fin. Por otro lado, el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos es una etapa clave de la reparación tisular.

La figura 1 muestra, además, que las células obtenidas por la invención pueden utilizarse para cribar compuestos farmacéuticos con actividad anti-angiogénica.

Lista de referencias

- [1] Orimo y col., Cell 2005, 121: 335-348
- [2] Allinen y col., Cancer Cell 2004, 6: 17-32
- [3] Kinnman y col., Lab Invest 2001, 81: 1709-1716
- [4] Omary y col., JCI 2007, 117: 50-59
- [5] Hammond y col., PNAS 1984, 81: 5435-5439
- [6] R. Ian Freshney, "Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique", 2005

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de miofibroblastos, caracterizado por que se cultiva una muestra de células proveniente de un tumor, preferentemente un carcinoma en un medio de cultivo sin suero, siendo dicho medio MEGM que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una etapa (a) comprende:
- una obtención de una suspensión celular a partir de una muestra biológica tal como un tejido biológico; a continuación
 - un cultivo inicial de las células obtenidas en un medio de cultivo que favorece el crecimiento de fibroblastos, por ejemplo en un medio de cultivo que contiene suero.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa (a) comprende:
- una obtención de una suspensión celular a partir de una muestra biológica tal como un tejido biológico; a continuación
 - una purificación de subpoblaciones celulares para obtener la muestra de células que incluyen esencialmente fibroblastos.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que la muestra biológica contiene miofibroblastos.
- 25 5. Cultivo celular de miofibroblastos obtenido mediante el procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que al menos el 80 % de las células que contiene son miofibroblastos.
- 30 6. Cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 5, que está libre de suero.
7. Cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que al menos el 95 % de las células que contiene son miofibroblastos.
- 35 8. Utilización del procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para obtener un cultivo de células en el que las células incluyen al menos el 80 % de miofibroblastos en el que las células están en un medio sin suero, siendo dicho medio MEGM que comprende insulina, hidrocortisona, EGF, un extracto hipofisario bovino y un antibiótico.
9. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en la que las células incluyen al menos un 95 % de miofibroblastos.

FIG. 1

