

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 874**

51 Int. Cl.:

C12N 5/095 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/EP2013/066325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13745085 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2880152**

54 Título: **Procedimiento para el cultivo de una subpoblación de células tumorales epiteliales circulantes de un líquido corporal**

30 Prioridad:

03.08.2012 DE 102012213838

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

26.06.2018

73 Titular/es:

PACHMANN, ULRICH (50.0%)

Brandenburger Strasse 30

95448 Bayreuth, DE y

PACHMANN, KATHARINA (50.0%)

72 Inventor/es:

PACHMANN, ULRICH y

PACHMANN, KATHARINA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 673 874 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 para el cultivo de una subpoblación de células tumorales epiteliales circulantes de un líquido corporal

5 La invención se refiere a un procedimiento para el cultivo una subpoblación de células tumorales epiteliales circulantes de un líquido corporal de un ser humano o animal. En el caso del animal se puede tratar de un mamífero.

10 Por Dontu, G. *et al.*, Genes & Development 17, 2003, páginas 1253 a 1270 se conoce un procedimiento para el cultivo *in vitro* de células epiteliales humanas de tejido de mama. Para la generación de las células se prepararon suspensiones de una sola célula de células epiteliales de mama humanas mediante disociación mecánica y enzimática de tejido de mama y se cultivaron en condiciones que no permiten adhesión alguna a un sustrato. A este respecto solo proliferó una pequeña población de las células en suspensión como las denominadas mamoesferas.

15 Por Lu, J. *et al.*, Int. J. Cancer 126, 2010, páginas 669-683 se sabe cómo concentrar células de sangre periférica de pacientes femeninas con cáncer de mama en primer lugar mediante una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y sembrar las células mononucleares obtenidas por ello sobre una matriz de adhesión de colágeno e incubar las mismas durante 12 horas en un medio de cultivo celular en un incubador de células de CO₂. A continuación, solo se siguen cultivando las células que se pudieron adherir en este periodo, mientras que se retiraron las células no adherentes y el medio usado. Para el cultivo de las células adherentes se añade medio fresco de cultivo celular, que se sustituye entonces cada 3 días por medio fresco de cultivo celular. A este respecto, la cantidad y el tamaño de las células aumentaron con el tiempo de cultivo.

Después de 20 días se encontraron células propagadas grandes con morfología epitelial.

25 Por Chen, T. *et al.*, Cell Research (2012), tomo 22, páginas 248 - 258 se sabe cómo aislar células madre cancerosas de la sangre de pacientes con adenocarcinoma de estómago y cultivar, a partir de esto, esferas de tumor en un medio asérico. Estas están en disposición de inducir tumores en ratones desnudos, mientras que las células de esfera cultivadas en medio que contiene suero no generaron tumores detectables en ratones.

30 El documento DE 10 2009 047 146 A1 desvela un procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral, causada por un tumor epitelial sólido, de un paciente a una medida terapéutica. A este respecto se recogen células tumorales epiteliales de un líquido corporal del paciente en cada caso en un medio de cultivo celular. Preferentemente, el medio de cultivo celular no contiene añadido ningún factor de crecimiento ni ningún suero que contenga factores de crecimiento añadido. Las células tumorales de una muestra del medio de cultivo
35 celular que contiene las células tumorales se exponen a la medida terapéutica, mientras que las células tumorales de una muestra de control del mismo tipo del medio de cultivo celular que contiene las células tumorales quedan sin tratar. A continuación, para la muestra y la muestra de control se determinó en cada caso la proporción de las células tumorales epiteliales que estaban muriendo y muertas en la cantidad total de las células tumorales epiteliales y, a partir de esto, un índice de mortalidad causado por la medida terapéutica de las células tumorales epiteliales
40 como medida de la respuesta. Entre la medida terapéutica y la determinación de la proporción de las células tumorales epiteliales que estaban muriendo y muertas en la cantidad total de las células tumorales epiteliales puede encontrarse un periodo de algunas horas a días. En este periodo, las células tumorales se mantienen en condiciones habituales de cultivo celular, que permiten una supervivencia de las células tumorales en el medio de cultivo celular sin una medida terapéutica. No se desvela que en estas condiciones se produce una proliferación de las células
45 tumorales.

El objetivo de la presente invención es indicar un procedimiento alternativo para el cultivo de células a partir de un líquido corporal de pacientes masculinos/femeninos con una enfermedad tumoral que se debe a un tumor epitelial. Las células cultivadas deben permitir una caracterización de la enfermedad tumoral.

50 El objetivo se resuelve mediante las características de la reivindicación 1. Se desprenden configuraciones apropiadas de las características de las reivindicaciones 2 a 6.

De acuerdo con la invención está previsto un procedimiento para el cultivo de células tumorales epiteliales circulantes de un líquido corporal de un ser humano o un animal, en particular un mamífero, que padece un tumor epitelial. A este respecto se separan las células contenidas en el líquido corporal, que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular, del líquido corporal y se cultivan a lo largo de al menos 24 horas, en particular al menos 2 días, en particular al menos 3 días, en particular al menos 4 días, en particular al menos 5 días, en particular al menos 6 días, en particular al menos 7 días en suspensión, es decir, evitando una adhesión celular a un sustrato,
60 con formación de esferoides. En el cultivo con formación de esferoides, las células se cultivan al menos hasta que hayan formado esferoides mediante proliferación con adición de al menos el factor de crecimiento EGF. Por células tumorales epiteliales se entiende en el presente documento en particular células tumorales que llevan la molécula de adhesión celular epitelial (EpcAM, CD326) o la correspondiente molécula animal. A este respecto se puede tratar, por ejemplo, de células de carcinomas o sarcomas.

65

Las células que no contienen ningún núcleo celular son en general eritrocitos contenidos dado el caso en el líquido corporal. Estos pueden estar contenidos también en las células separadas. Cuando en el líquido corporal están contenidos eritrocitos intactos, se pueden separar las células que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular de los eritrocitos intactos, en particular mediante lisado de los eritrocitos intactos. Esto se puede realizar antes, durante o después de la separación de las células que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular del líquido corporal.

El cultivo en suspensión es un cultivo en condiciones que no permiten adhesión alguna a un sustrato. Un cultivo de este tipo se puede realizar al no usarse para el cultivo ningún recipiente de cultivo celular revestido con colágeno o que favorezca de otro modo una adhesión celular y/o al moverse una suspensión que contiene las células tumorales a intervalos regulares o de forma constante. Un recipiente de cultivo celular que favorezca la adhesión celular puede estar compuesto, por ejemplo, de un plástico que lleve cargas superficiales. Una adhesión celular se puede evitar también al ser el recipiente de cultivo celular un recipiente de cultivo celular revestido con una silicona o un silano.

A diferencia del cultivo conocido por Lu *et al.*, con el cultivo en suspensión se induce o posibilita una proliferación de una subpoblación de células tumorales epiteliales circulantes contenidas en el líquido corporal que para la proliferación no necesitan adherencia alguna a una superficie.

De acuerdo con Lu, J. *et al.*, página 671, columna derecha, 2º párrafo, las células no adherentes se retiran después de 12 horas y, por tanto, no se siguen cultivando. Por tanto, las células tumorales epiteliales circulantes que se desarrollan específicamente adheridas a una superficie se cultivan en una superficie revestida de un recipiente de cultivo celular y se seleccionan por la adhesión a esta superficie. Sin embargo, los inventores del presente procedimiento han reconocido que las células tumorales epiteliales circulantes no solo comprenden células que se cultivan de forma adherente, sino también aquellas células que pueden proliferar de forma clonal sin adhesión. Además, han reconocido que precisamente el cultivo de estas células que se desarrollan de forma no adherente conduce a clones celulares, cuyas células son características de la enfermedad tumoral y, por tanto, permiten una buena caracterización de la enfermedad tumoral, incluso después de la eliminación de un tumor primario que subyace a la enfermedad tumoral. En el caso de la enfermedad tumoral se puede tratar de un carcinoma de mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas o colon.

Se ha mostrado que la totalidad de las células tumorales circulantes para una supervisión de una terapia antitumoral tiene un significado clínico importante en particular cuando no se han formado aún metástasis detectables. La respuesta de las células tumorales circulantes a una terapia está muy correlacionada con una supervivencia exenta de recidivas. Pero de una gran cantidad de las células tumorales emitidas de un tejido tumoral de un tumor epitelial al torrente sanguíneo, solo una fracción está en disposición de formar metástasis en el tejido secundario.

Los inventores del procedimiento de acuerdo con la invención además han reconocido que en el caso de la subpoblación de las células tumorales circulantes, que pueden proliferar sin adhesión, se trata de las denominadas células madre de tumor o células iniciadoras de tumor. También han reconocido que estas células se desarrollan en forma de esferoides, es decir, pueden configurar una estructura tridimensional de tipo bola con la proliferación. El cultivo de las células tumorales epiteliales en suspensión permite la formación de tales esferoides y, por ello, una detección de la presencia de células madre de tumor como subpoblación en la población de las células tumorales circulantes. En estos esferoides, las células madre forman células progenitoras en diferentes estadios de diferenciación. Hasta ahora no se sabía que las células tumorales epiteliales circulantes comprenden células madre de tumor, que se pueden cultivar en forma de esferoides. Se asume que estas células madre de tumor son de importancia decisiva para una formación de metástasis.

En el caso del líquido corporal se puede tratar de linfa o sangre, en particular de sangre periférica. A este respecto, la sangre periférica presenta la ventaja de la buena accesibilidad y la fácil disponibilidad.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, las células contenidas en el líquido corporal, que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular, se separan del líquido corporal sin selección de ciertas de estas células, se traspasan a un medio de cultivo celular y se mantienen en condiciones de cultivo celular en un medio de cultivo celular. A este respecto, las condiciones de cultivo celular en general son aquellas que son adecuadas para el cultivo de células epiteliales. El medio de cultivo celular contiene en general un suero animal, tal como por ejemplo suero fetal bovino, L-glutamina, un estimulador del crecimiento, tal como por ejemplo insulina, hidrocortisona y el factor de crecimiento EGF, en un medio de cultivo, tal como por ejemplo RPMI 1640, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o una mezcla de DMEM y RPMI 1640. En general, las condiciones de cultivo celular comprenden una temperatura en el intervalo de 35,5 °C a 37,5 °C, en particular una temperatura en el intervalo de 36,8 °C a 37,1 °C, en particular una temperatura de 37 °C, y una atmósfera que contiene del 4,5 % al 5,5 % de CO₂, en particular el 5 % de CO₂. Las condiciones de cultivo celular adecuadas para células epiteliales y un medio de cultivo celular adecuado para células epiteliales son conocidos por el experto en la materia de cultivo de células de mamífero, por ejemplo, por Lu *et al.* Las adaptaciones requeridas dado el caso a las respectivas células tumorales, por ejemplo en la selección del medio de cultivo subyacente o la proporción de suero fetal bovino, se encuentran dentro del marco del conocimiento del experto en la materia y no requieren de ninguna complejidad experimental inadmisibles.

5 El cultivo de las células separadas del líquido corporal sin selección de determinadas células en suspensión provoca que ciertamente una pluralidad de células diferentes, entre las mismas por ejemplo también leucocitos, se traspasen al medio de cultivo celular, pero de las mismas solo proliferan las células que están en disposición para ello en suspensión. En este sentido, el cultivo causa una propagación específica precisamente de estas células. Por la separación de las células del líquido corporal sin selección de determinadas células se evita que se pierdan las células que pueden proliferar en suspensión y que con frecuencia forman solo una proporción pequeña de las células tumorales epiteliales circulantes.

10 Se puede añadir medio fresco de cultivo celular al medio de cultivo celular varias veces o de forma regular, por ejemplo cada 5 días. Como alternativa, las células se pueden traspasar varias veces o de forma regular a medio fresco de cultivo celular. Para esto, las células se pueden centrifugar cuidadosamente, es decir, con velocidades de giro relativamente bajas, y resuspenderse en medio fresco de cultivo celular.

15 En una configuración del procedimiento, de las células tumorales cultivadas, en particular para un cultivo adicional, un análisis o una prueba en cuanto a su sensibilidad frente a una medida terapéutica, se separan aquellas células tumorales que han formado esferoides durante el cultivo. En lo sucesivo, los esferoides formados por las células tumorales se denominan también esferoides de tumor. La separación se puede realizar a causa de las mayores dimensiones de los esferoides de tumor en comparación con las células individuales de forma sencilla, por ejemplo mediante centrifugación con una baja velocidad de giro o mediante sedimentación o mediante aspiración de los esferoides de tumor en un capilar con observación mediante un microscopio.

20 Las células tumorales cultivadas de acuerdo con la invención y presentes en esferoides se pueden usar para examinar una capacidad de autorrenovación de las células tumorales contenidas en los esferoides y/o de células precursoras generadas en los esferoides y/o para probar la sensibilidad de las células tumorales en los esferoides frente a un medicamento o una medida terapéutica para el tratamiento de una enfermedad tumoral subyacente a la presencia de las células tumorales epiteliales circulantes en el ser humano o el animal, en particular el mamífero. Los inventores han reconocido que las células tumorales presentes en los esferoides se corresponden con las células que en el ser humano o en el animal mantienen activo un crecimiento tumoral, incluso después de una resección completa de un tumor primario epitelial sólido, al formar una base para la formación de metástasis. 25 Mediante estas células tumorales se puede caracterizar por tanto de forma particularmente adecuada la enfermedad tumoral. La capacidad de autorrenovación que aparece también en los esferoides y la generación de células precursoras es una característica especial de las células madre de tumor. La prueba de la sensibilidad de las células que forman los esferoides frente a un medicamento o una medida terapéutica para el tratamiento de una enfermedad tumoral subyacente a la presencia de las células tumorales epiteliales circulantes en el ser humano o el animal 30 permite una buena predicción completamente novedosa acerca de la eficacia del medicamento o de la medida terapéutica al evitar una formación de metástasis en la enfermedad tumoral.

35 En el caso de la medida terapéutica se puede tratar de una medida física, en particular de una irradiación o tratamiento con hipertermia, o de una medida farmacéutica, en particular una quimioterapia, un tratamiento hormonal o un tratamiento con anticuerpos. Además se pueden probar en los esferoides de tumor medicamentos nuevos y conocidos en cuanto a su eficacia.

40 Las células tumorales contenidas en los esferoides se pueden marcar fluorescentemente mediante anticuerpos dirigidos contra el antígeno epitelial humano EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial) y analizarse a continuación mediante un procedimiento de análisis de imágenes, por ejemplo mediante radiación láser. Para esto no se requiere una individualización de las células tumorales. Los anticuerpos permiten una caracterización de las células como células epiteliales. Adicionalmente, las células tumorales contenidas en los esferoides se pueden teñir con una sustancia detectable por fluorescencia, que tiñe específica o preferentemente células muertas, en particular yoduro de propidio. Esto permite la detección de células muertas, tal como aparecen por ejemplo con frecuencia en el interior de los esferoides. Para el análisis de imágenes se puede usar por ejemplo un citómetro de barrido láser o un microscopio de fluorescencia, en particular con una unidad de registro de imágenes/cámara y un software de análisis, tal como por ejemplo la estación de examen Olympus SCAN^R.

45 El marcaje, la medición y/o la tinción se pueden realizar en presencia de un quelante de Ca²⁺, en particular EDTA o EGTA. Mediante el quelante de Ca²⁺ se puede evitar una aglomeración de los esferoides.

50 Las células tumorales que forman esferoides, que se han cultivado según un procedimiento de acuerdo con la invención, se pueden usar para el tratamiento inmunológico de una enfermedad tumoral de un ser humano o un animal, en particular un mamífero. Para esto se pueden destruir, o al menos tratar de tal modo que ya no puedan proliferar, las células tumorales contenidas en los esferoides, por ejemplo mediante radiación. A continuación, las células tumorales se pueden suspender en un adyuvante y administrarse a continuación al ser humano o al animal, por ejemplo por vía subcutánea. Por ello se desencadena la formación de anticuerpos contra las células tumorales que se desarrollan en forma de esferoides en el ser humano o en el animal. Los anticuerpos formados por ello pueden atacar entonces también las demás células tumorales en el ser humano o en el animal y contribuir con ello a la regresión del tumor. 55

A continuación se describe con más detalle la invención mediante un ejemplo de realización y las figuras. Muestran: la Figura 1a, b, c, esferoides de células tumorales de sangre periférica de un paciente con carcinoma de colon después de 7 días (Figura 1a), 14 días (Figura 1b) y 21 días (Figura 1c) de cultivo y

- 5 la Figura 2 una toma de microscopía de fluorescencia de un esferoide de tumor teñido fluorescentemente con anticuerpos y yoduro de propidio.

Para la realización de los procedimientos descritos a continuación se usaron los siguientes agentes químicos, reactivos, tampones, soluciones, anticuerpos, aparatos y materiales consumibles así como el medio indicado:

10

Agentes químicos y reactivos

Agentes químicos y reactivos	Empresa
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl) (155 mM)	Sigma-Aldrich, EE.UU.
Hidrogenocarbonato de potasio (KHCO ₃) (10 mM)	Sigma-Aldrich, EE.UU.
Tetraacetato de etilendiamina (EDTA) (0,5 M)	Sigma-Aldrich, EE.UU.
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS)	GIBCO, EE.UU.
Fluoroesferas Flow-Check 770	Beckman Coulter, Irlanda
Solución de yoduro de propidio (1 mg)	Sigma-Aldrich, EE.UU.
RPMI 1640 (1X) 500 ml	Invitrogen GmbH, Alemania
Solución de tampón Hepes (1 M)	Invitrogen GmbH, Alemania
Penicilina/estreptomicina (10000 U/ 10000 µg)	Invitrogen GmbH, Alemania
L-glutamina (200 mM)	Biochrom AG, Alemania
Suero bovino fetal (FBS)	Invitrogen GmbH, Alemania
Insulina (100 U/ml)	Sanofi-Aventis, EE.UU.
Hidrocortisona 100 mg	Pfizer, EE.UU.
EGF	Sigma-Aldrich, EE.UU.

Tampones y soluciones

15

Tampones y soluciones	Componentes	Cantidad
D-PBS	CaCl ₂	0,901 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,493 mM
	KCl	2,67 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	NaCl	137,93 mM
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	8,06 mM
D-PBS-EDTA	D-PBS	500 ml
	EDTA	2 ml
Tampón de lisis de eritrocitos (disolver en 1 l de agua destilada)	NH ₄ Cl	8,3 g
	KHCO ₃	1 g
	EDTA	2 ml
Solución de yoduro de propidio (en 1 ml de agua destilada)	PI	3,5 µl

Anticuerpos

Anticuerpo	Empresa	Número de artículo
CD 326 (EpCAM) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Miltenyi Biotec GmbH, Alemania	130-080-301

20 Aparatos

Aparatos	Empresa
Centrífuga 5810 R	Eppendorf, Alemania
Microscopio de barrido láser iCys™	CompuCyte Corporation, EE.UU.
Agitador vorticial	Bender und Hobein GmbH, Alemania

Materiales consumibles

Materiales consumibles	Empresa
Tubos Falcon de 15 ml	Labor Schubert, Alemania
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	Labor Schubert, Alemania
Micropipetas	Eppendorf, Alemania
Pipetas Pasteur desechables, graduadas (3,2 ml)	ROTH, Alemania
Placas de microtitulación (MTP) con fondo de vidrio	Greiner bio-one, Alemania
Matraces de cultivo (25 cm ² , 65 ml)	neoLab, Alemania

Composición del medio

5

Agentes químicos	Concentración final
un medio de cultivo preferentemente RPMI 1640	
una adición de suero preferentemente suero fetal bovino	5 %
L-glutamina	4 mM
Hepes	15 mM
Estimulador de crecimiento preferentemente insulina	5 µg/ml
Hidrocortisona	0,5 µg/ml
Antibióticos preferentemente Pen/Estrep	100 U/ml; 100 µg/ml
Factores de crecimiento preferentemente EGF	40 ng/ml

Se extrajeron muestras de sangre por vía venosa periférica en tubos que contenían 2-7 ml de EDTA como anticoagulante. La vitalidad de las células tumorales epiteliales circulantes ascendió, como promedio, al 95 %.

- 10 En un tubo de muestra se rellenó 1 ml de la respectiva muestra de sangre con el tampón de lisis de eritrocitos a 15 ml de volumen total y se incubó durante 15 min a una temperatura de 4 °C en el refrigerador. A continuación se centrifugó la muestra a 2.000 rpm durante 7 min y una temperatura de 18 °C. El sobrenadante se desechó en la siguiente etapa. Después, el sedimento se resuspendió con 2 ml de medio y se traspasó en 3 ml de medio dispuesto a un matraz de cultivo (dependiendo del número de leucocitos: 5 ml de medio por 10.000 leucocitos). Estos se incubaron durante 21 días al 5 % de CO₂ y 37 °C. Cada 5 días se añadieron 2 ml de medio fresco. Cada 7 días, es decir, el día 7, 14, 21 y 28, se observaron los esferoides de tumor bajo el microscopio. Para el análisis se recogieron los esferoides de tumor mediante una centrifugación suave y a continuación se resuspendió el sedimento con 500 µl de D-PBS-EDTA. 50 µl de esta mezcla se traspasaron a continuación a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A continuación se pipetearon a esto 5 µl de un anticuerpo monoclonal (de FITC) frente al antígeno epitelial humano (EpCAM).
- 15
- 20 Siguió una nueva refrigeración de 15 minutos a 4 °C. Finalmente se añadieron 430 µl de D-PBS-EDTA y las muestras ahora terminadas se almacenaron durante una noche a 4 °C en el refrigerador.

- Al día siguiente se pipetearon en cada caso 100 µl de suspensión celular de la muestra que se iba a medir y 5 µl de yoduro de propidio (PI) en una cavidad de una placa ELISA. Después se cubrió la placa y se dejó reposar durante aproximadamente 20 min para que se pudieran sedimentar en el fondo las células. A continuación se midieron las células con el citómetro de barrido láser y se evaluaron los resultados de la medición.
- 25

- Se obtuvieron esferoides tridimensionales no adherentes, que son típicos de la presencia de células madre de tumor. La Figura 1a muestra los esferoides después de 7 días, la Figura 1b después de 14 días y la Figura 1c después de 21 días de cultivo. La Figura 2 muestra una célula tumoral necrótica teñida de rojo en el centro de una totalidad de células de un esferoide de tumor. La destrucción de esta célula tumoral se debe posiblemente a una falta de difusión de factores de crecimiento a través de la envoltura celular densa que rodea a esta célula.
- 30

- Se pudo cultivar una subpoblación de las células tumorales epiteliales circulantes, que forma esferoides y que posee una elevada capacidad de proliferación.
- 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el cultivo de células tumorales epiteliales circulantes de un líquido corporal de un ser humano o un animal que padece un tumor epitelial, separándose las células contenidas en el líquido corporal, que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular, del líquido corporal sin selección de ciertas de estas células, traspasándose a un medio de cultivo celular y manteniéndose en condiciones de cultivo celular en un medio de cultivo celular con adición de al menos un factor de crecimiento, cultivándose las células a lo largo de al menos 24 horas en suspensión al menos hasta que una subpoblación de las células tumorales, que no necesita adherencia alguna a una superficie para la proliferación, haya formado esferoides mediante proliferación, siendo el factor de crecimiento EGF, no comprendiendo el procedimiento ningún tratamiento quirúrgico del cuerpo humano o animal.
- 10
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el líquido corporal linfa o sangre, en particular sangre periférica.
- 15
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, conteniendo el líquido corporal eritrocitos intactos y separándose las células que contienen, en cada caso, al menos un núcleo celular de los eritrocitos intactos, en particular mediante lisado de los eritrocitos intactos.
- 20
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo las condiciones de cultivo celular una temperatura en el intervalo de 35,5 °C a 37,5 °C, en particular una temperatura en el intervalo de 36,8 °C a 37,1 °C, en particular una temperatura de 37 °C, y una atmósfera que contiene del 4,5 % al 5,5 % de CO₂, en particular el 5 % de CO₂.
- 25
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, añadiéndose al medio de cultivo celular varias veces o de forma regular medio fresco de cultivo celular o traspasándose las células varias veces o de forma regular a medio fresco de cultivo celular.
- 30
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, separándose de las células tumorales cultivadas aquellas células tumorales que han formado durante el cultivo los esferoides, al separarse los esferoides formados durante el cultivo.

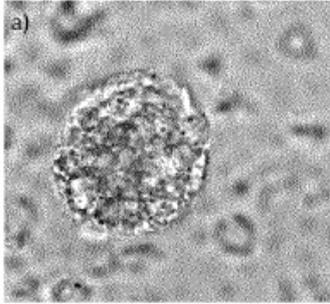


Fig. 1a

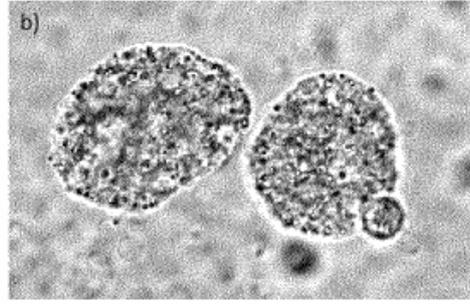


Fig. 1b

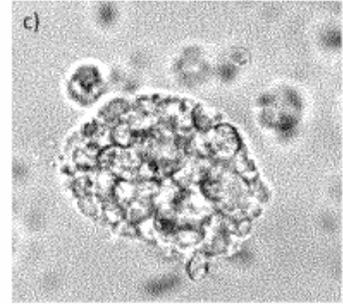


Fig. 1c

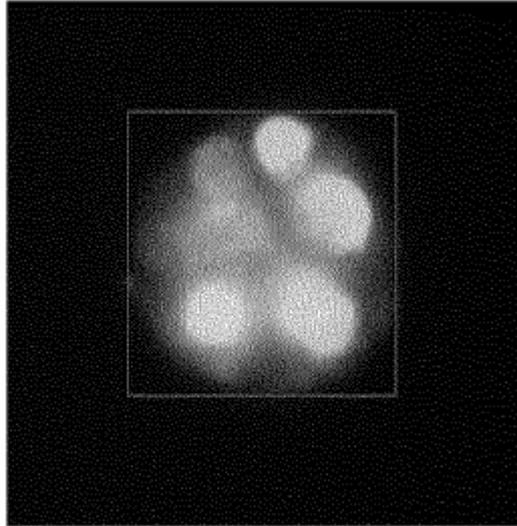


Fig. 2