

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 073**

51 Int. Cl.:

C12N 5/095

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2017 PCT/EP2017/053666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17140876**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2017 E 17708701 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 3417053**

54 Título: **Medio químicamente definido para el cultivo de células madre cancerosas (CSC) que contienen poblaciones de células**

30 Prioridad:

17.02.2016 EP 16156163

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

15.07.2021

73 Titular/es:

**PROMOCELL GMBH (100.0%)
Sickingenstraße 63/65
69126 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

WIELAND, HAGEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 843 073 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 químicamente definido para el cultivo de células madre cancerosas (CSC) que contienen poblaciones de células

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un medio químicamente definido para el cultivo de células eucariotas y al uso del medio para la proliferación y/o mantenimiento de células madre cancerosas.

Antecedentes de la invención

Todos los tipos de células madre comparten las características de la autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células terminales maduras. Dado que estos mecanismos están estrechamente controlados en las células madre normales, este potencial se pierde progresivamente durante el procedimiento de diferenciación gradual de múltiples etapas de las células madre hacia células maduras diferenciadas terminalmente [1].

En 1863, el patólogo Rudolf Virchow fue el primero en proponer el modelo de células madre cancerosas (CSC) afirmó que las "células inmaduras" representan el origen del cáncer [2]. En 1997 Bonnet describió una subpoblación específica de CSC como "células conductoras del cáncer" en la leucemia mieloide [3]. Recientemente, se identificaron CSC en varios cánceres, que incluyen las neoplasias malignas hematopoyéticas y un intervalo de tumores sólidos [4].

En el modelo de tumores de células madre cancerosas, las CSC se definen como un pequeño subconjunto de células malignas resistentes a anoikis con la capacidad exclusiva de autorrenovarse y mantener el tumor. Se pueden diferenciar en una masa heterogénea de tipos de células cancerosas no tumorigénicas, que normalmente constituyen la mayor parte del tumor [5]. En este contexto, está claro que las células madre cancerosas, a pesar de su fenotipo maligno, comparten características comunes de las células madre normales, lo que les asigna un potencial biológico extraordinario.

Los CSC se pueden separar del tumor primario, viajar y diseminarse por el cuerpo donde pueden formar tumores secundarios (metástasis) en órganos distantes. Las metástasis se pueden desarrollar rápidamente o durante varios años después de un tratamiento aparentemente exitoso del tumor primario. Los enfoques terapéuticos tradicionales tienen como objetivo eliminar la mayor cantidad posible de masa tumoral mediante cirugía, irradiación, quimioterapia y biológicos. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que estas medidas se dirigen a la masa de la célula más inofensiva y que se divide rápidamente del tumor y no erradican la raíz putativa de la enfermedad- las CSC.

Se cree que la recaída es causada por CSC inactivas que pueden evadir los regímenes terapéuticos actuales mediante el uso de mecanismos de protección mediados por sus propiedades de células madre. Por lo tanto, la investigación sobre el cáncer está ahora realineada, especialmente cuando se exploran nuevas estrategias clínicas para tratar neoplasias malignas. Las CSC se consideran un nuevo objetivo terapéutico y se cree que su eliminación podría conducir a una remisión permanente o incluso a la curación. Esto puede lograr mediante la erradicación directa de las CSC o mediante la adaptación específica de la división celular de las CSC de asimétrica a simétrica que conduzca a la eliminación de la población de CSC bloqueando sus capacidades de autorrenovación [5, 6]. Para lograr esto, se necesitan sistemas de cultivo biológicamente relevantes que permitan una caracterización detallada de las CSC.

Es común a todos los tipos de células madre de origen humano que la caracterización y evaluación de su funcionalidad por razones éticas debe basarse en procedimientos indirectos.

Hoy en día, varios tipos de células madre están bien caracterizados y se han desarrollado técnicas para identificar de manera confiable estas células. Como ejemplo, para las células madre pluripotentes el *en vivo* formación de teratomas en ratones inmunodeprimidos o el *in vitro* La generación de cuerpos embrioides con diferenciación en las tres capas germinales se usan como procedimientos alternativos de prueba de pluripotencia [7]. Las pruebas de patrones de expresión de marcadores de pluripotencia, por ejemplo Oct-3/4, Nanog, SSEA y antígenos Tra también se aceptan actualmente como una prueba indirecta de un estado pluripotente(ver [8] para una revisión). Gracias al reciente avance de los sistemas de cultivo altamente definidos y optimizados, hoy en día los científicos son capaces de una derivación completamente definida/humanizada y un crecimiento sin restricciones de células madre pluripotentes.

Por el contrario, los sistemas de cultivo biológicamente relevantes para el mantenimiento sostenido de las CSC, como herramienta para la exploración de la biología de las CSC y su caracterización confiable, aún están poco desarrollados. Por lo tanto, como se demostró con éxito para múltiples tipos de células madre normales, se emprendieron varios enfoques para caracterizar las CSC en base a la detección de marcadores. Estos incluyen la tinción de moléculas intra y extracelulares, así como la medición de la actividad de ciertas enzimas celulares, como la aldehído deshidrogenasa(ALDH1) o transportadores de moléculas pequeñas como el sistema de transporte ABC

- [9-11]. Sin embargo, la investigación se ve obstaculizada por la heterogeneidad de la CSC en diferentes cánceres [5, 12], así como por la falta de especificidad, consistencia y correlación de los marcadores establecidos con características funcionales de la CSC, como la tumorigénesis [5, 13]. Por lo tanto, un procedimiento basado en marcadores robusto, confiable y notablemente holístico para la detección y caracterización de CSC parece una perspectiva lejana. Como resultado, actualmente el mayor obstáculo en la investigación de CSC es el aislamiento y purificación de un número suficiente de poblaciones de CSC funcionales y homogéneas. Estas dificultades se ven agravadas por la falta de sistemas de cultivo *in vitro* biológicamente significativos, lo que contrasta claramente con las posibilidades técnicas disponibles para la mayoría de los otros tipos de células madre.
- En la actualidad, las CSC sólo pueden definirse experimentalmente por su capacidad para recapitular la generación de un tumor en crecimiento de forma continua [5]. Hasta la fecha, las estrategias más aceptadas para el análisis de las CSC en base a generalmente la detección de sus características funcionales básicas. Estos incluyen las propiedades típicas de las células madre, como la autorrenovación y la pluripotencia, así como las características específicas del cáncer, como el potencial tumorigénico transferible en serie y la resistencia al anoikis. Sin embargo, una vez más la falta de un sistema de modelo primario significa que la investigación se ve obligada a depender de la lectura indirecta generada por sistemas y pruebas de modelos alternativos. El estándar de oro funcional *en vivo* El ensayo para CSC es el trasplante en serie en sitios ortotópicos de ratones inmunodeprimidos. Sin embargo, esto es laborioso y los resultados pueden ser difíciles de interpretar [5]. Uno de los más significativos *in vitro* los procedimientos que explotan selectivamente una combinación de características inherentes de las CSC sobre una base exclusivamente funcional es la formación de tumoresferas pasables en serie en un cultivo en suspensión 3D [5].
- Comparable a un tumor maligno, la masa celular principal de las líneas celulares de cáncer establecidas consiste en células diferenciadas terminalmente más o menos funcionales con una especificidad de tejido en función de tipo de cáncer y tejido del que se originan. Por lo tanto, las líneas de células cancerosas se usan ampliamente en la investigación como sistemas modelo bien definidos y ampliamente aceptados en lugar de células primarias por razones de costo y una fuente constante de células que evitan las limitaciones establecidas por la vida útil finita de las células primarias normales.
- De hecho, estas líneas celulares contienen una subpoblación pequeña pero estable de CSC(células conductoras) que confieren una vida útil infinita y un potencial de proliferación al cultivo. Así, hoy en día las líneas de células cancerosas también representan las más importantes *in vitro* modelo y una fuente celular bien definida para la investigación del cáncer, que incluyen enfoques dirigidos a CSC como dianas [14-19; 27-28].
- Las dos técnicas de cultivo más destacadas que se usan para estas líneas celulares son:
- 1) El cultivo 2D adherente, principalmente en medios basales estándar, por ejemplo, DMEM o mezcla de nutrientes F12 de DMEM-Ham suplementado con varias cantidades de suero de ternero fetal y eventualmente suplementos adicionales [16].
 - 2) El segundo procedimiento de cultivo importante es el cultivo en suspensión 3D en forma de esferas (tumoresferas) empleando medios no definidos pero en su mayoría libres de suero en base a la mezcla de nutrientes F12 de DMEM-Ham [18-20].
- La técnica de cultivo en 2D adherente que usa medios no definidos tiene varios inconvenientes con respecto a la CSC:
- a) Como se demostró para varios tipos de células madre, la naturaleza no definida de estos medios de cultivo puede interferir con las propiedades de las células madre y soportar preferentemente la diferenciación de las células madre, que incluye la CSC [21]. El cultivo 2D en medios no definidos es, por tanto, un procedimiento de cultivo apropiado para obtener células diferenciadas como reemplazo celular primario, pero es un procedimiento de cultivo inferior si la subpoblación de CSC, que suele ser <1 % en estas condiciones, es la diana de interés.
 - b) Los medios de cultivo no definidos son una potente fuente de variación experimental. Los medios mencionados anteriormente no permiten un entorno de cultivo definido y controlado. Los procedimientos experimentales como los aislamientos de células o las pruebas de detección de fármacos dirigidos a las CSC producen resultados falsos debido a los efectos de componentes no definidos de los medios de cultivo. Además, las células se pueden ver significativamente alteradas por tales condiciones de cultivo [22].
- La técnica de cultivo en suspensión 3D de tumoresferas se adoptó a partir de un procedimiento desarrollado originalmente para el cultivo de células neuronales primarias, así como células cancerosas de cerebro, por ejemplo, glioblastoma como los llamados "cultivos de neuroesferas" [23] que se podían pasar en serie y expandir mientras se mantenía su reserva de células madre(autorrenovación) y su potencial de diferenciación. Por lo tanto, este procedimiento de cultivo demostró ser un poderoso *in vitro* modelo para el cultivo de células neuronales multipotentes(cancerosas) que ayudó a acelerar significativamente la exploración de este tipo de células.

Los medios establecidos para estos cultivos de neuroesferas funcionaron bien en la presente solicitud en base a casi exclusivamente en la mezcla de nutrientes F12 de DMEM-Ham y sus variantes complementadas con el suplemento patentado B27® (Life Technologies), insulina, transferrina, selenito de sodio, factor de crecimiento epidérmico(EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico(bFGF, FGF-2) como medio central [23]. Finalmente, se produjo una suplementación adicional, por ejemplo, con albúmina, hidrocortisona y/o heparina. Desde que la técnica de cultivo de la neuroesfera 3D explotó selectivamente las características biológicas inherentes de las células madre neuronales(cancerosas), por ejemplo, la resistencia al anóikis y las capacidades de autorrenovación a un nivel meramente funcional, era obvio que este procedimiento de cultivo también podría resultar útil para el cultivo de CSC de otros tipos de cánceres que comparten las mismas propiedades biológicas.

Como resultado, se intentó adoptar el sistema de cultivo de neuroesferas para otros cultivos de células cancerosas como un sistema de modelo tumoral en 3D denominado "cultivo de tumoresfera" [18, 19]. Desde que las estructuras tumorales se asemejan estructuralmente a pequeñas estructuras tumorales y las propiedades de las células madre, así como las propiedades tumorigénicas pueden mejorarse en este tipo de cultivo [20], los investigadores se propusieron usar células cancerosas derivadas de las esferas tumorales en lugar de células del cultivo estándar 2D.

Sin embargo, mientras que el procedimiento de cultivo de esferas puede aprovechar todas las ventajas técnicas y biológicas mencionadas anteriormente en el cultivo de células madre neurales(cancerosas), el cultivo de tumores de esferas de otros tipos de células cancerosas aún adolece de varias deficiencias en este sistema de cultivo:

1) No todos los tipos de cultivos de células cancerosas pueden formar tumoresferas en estas "condiciones de cultivo de neuroesferas" [24].

2) En marcado contraste con el cultivo de la neuroesfera, la capacidad de pasaje en serie de los cultivos de tumoresfera a menudo solo se apoya en una extensión limitada(3-5 pasajes en serie) o incluso ausente [24].

Esto implica que, como efecto no deseado, las células impulsoras, es decir, las CSC, se pierden de alguna manera en estas condiciones de cultivo. A pesar de estas limitaciones existentes, la investigación solicita adoptar las ventajas únicas del cultivo tumoral con respecto a sus propiedades favorables como *in vitro* modelo de tumor. Por lo tanto, los científicos a menudo se ven obligados a usar células cancerosas derivadas de tumores esferas que se han establecido recientemente a partir de un cultivo 2D o que tienen un número de pases en serie muy bajo. Sin embargo, las células derivadas de tales tumoresferas en degeneración ya podrían estar agotadas de CSC funcionales. Además, es muy probable que las células de un cultivo de tumoresfera recién establecido no se puedan comparar con células de un cultivo de tumoresfera de 10 pases en serie, es decir, que las células tumorales recién establecidas en un paso bajo mostrarían características de las células del suero original 2D que contiene suero de cultivo estándar, mientras que las células de tumoresferas pasadas en serie en el pase 10 adquieren todas las características únicas mediadas por las poblaciones de células madre por esta técnica de cultivo sofisticada.

Dado que se remontan a las formulaciones de los medios de cultivo de neuroesferas clásicas, los medios de cultivo de CSC publicados y comercialmente disponibles todavía comparten estas fuertes limitaciones con respecto al apoyo al cultivo y mantenimiento de un amplio intervalo de tipos de células cancerosas/CSC.

Las CSC son un grupo heterogéneo y delicado de células potencialmente de ciclo lento [25]. Además de sus propiedades de células madre, las aberraciones genéticas y metabólicas inherentes a las células cancerosas que pueden ser en parte responsables de sus requisitos de medios extendidos. De hecho, es bien sabido que las células que se someten a transformación en células cancerosas adaptan ampliamente su metabolismo [26].

La mezcla de nutrientes F12 de DMEM-Ham, como se usa para los medios CSC establecidos, se usó tradicionalmente como base para el desarrollo de medios de cultivo sin suero e incluso algunas formulaciones definidas químicamente para varios tipos de células. Sin embargo, como se observó en cultivos de tumores de esferas, la mezcla de nutrientes F12 de DMEM-Ham no puede satisfacer de manera confiable los requisitos ampliamente variables del grupo heterogéneo de células cancerosas en formulaciones más definidas.

El documento US 2016/0022789 A1 describe las células madre cancerosas para su uso en la estimulación de la respuesta inmunitaria contra un cáncer como. carcinoma de columna. El documento describe las composiciones exactas de los medios de cultivo celular para el cultivo como DMEM/F12 o E de William.

El documento US 2008/0299540 A1 describe sistemas de cultivo de tejidos para células primarias, que incluye dicho sistema un medio de cultivo celular definido químicamente sin suero y procedimientos para el aislamiento y propagación *in vitro* a largo plazo de células primarias. El medio químicamente definido comprende, entre otros, EGF, transferrina, insulina, ácido selenioso, zinc, ácido linolénico, albúmina, triyodotirodina, hidrocortisona, toxina del cólera y HEPES.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un medio de cultivo celular definido químicamente para el cultivo de poblaciones de células que contienen CSC como tumoresferas que se pueden pasar en serie.

Resumen de la invención

Este objeto se resuelve mediante el objeto de la presente invención. La presente invención proporciona un medio químicamente definido para el cultivo de tumoresfera 3D, que se caracteriza porque comprende los elementos traza,

- 5
- aluminio (Al), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - bario (Ba), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - bromo (Br), en una concentración en el intervalo de 0,4 nM a 4 nM;
 - cadmio (Cd), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;
 - 10 – cobalto (Co), en una concentración en el intervalo de 1 nM a 10 nM;
 - cromo (Cr), en una concentración en el intervalo de 0,5 nM a 5 nM;
 - germanio (Ge), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 20 nM;
 - yodo (I), en una concentración en el intervalo de 0,25 nM a 2,5 nM;
 - flúor (F), en una concentración en el intervalo de 12 nM a 120 nM;
 - 15 – níquel (Ni), en una concentración en el intervalo de 0,2 nM a 2 nM;
 - manganeso (Mn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM;
 - molibdeno (Mo), en una concentración en el intervalo de 0,7 nM a 7 nM;
 - rubidio (Rb), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;
 - selenio (Se) en una concentración en el intervalo de 40 nM a 400 nM;
 - 20 – plata (Ag), en una concentración en el intervalo de 0,3 nM a 3 nM
 - silicio (Si), en una concentración en el intervalo de 130 nM a 1,3 μ M
 - estaño (Sn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM
 - vanadio (V), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 22 nM; y
- 25 circonio (Zr), en una concentración en el intervalo de 3,5 nM a 35 nM. El medio químicamente definido comprende uno o más factores de crecimiento. Alternativamente, el medio químicamente definido puede estar libre de factores de crecimiento.
- Los presentes inventores identificaron los componentes necesarios de un medio de cultivo definido químicamente que permite el cultivo de tumoresfera 3D de una amplia gama de líneas de células cancerosas que contienen CSC en un entorno de cultivo estandarizado. El medio químicamente definido de acuerdo con la invención comprende preferentemente una variedad de ácidos grasos y una variedad de elementos traza. El medio químicamente definido de acuerdo con la invención permite la proliferación de forma continua y el pasaje en serie de cultivos de tumores de esferas 3D indicativos de la autorrenovación de CSC. Una vez que se establece el cultivo de la tumoresfera completamente adaptado, las células pueden pasar de forma continua.
- 35 El medio químicamente definido permite explotar todo el potencial y la importancia biológica de la técnica de cultivo tumoral como un *in vitro* herramienta para el mantenimiento de CSC y como modelo de formación de tumores.
- 40 La presente invención proporciona además el uso del medio químicamente definido para el cultivo de células madre cancerosas.

Descripción de los dibujos

- 45 Figura 1 muestra un gráfico de duplicaciones de población acumulada de células de carcinoma mamario MCF-7 durante el paso en serie de cultivo de tumoresfera 3D en medio CSC 1 (triángulos) frente a un medio CSC comparativo para cultivo de tumoresfera (diamantes). Se sembraron cuarenta mil células MCF-7 por pocillo (10.000/ml) por triplicado en el medio respectivo mediante el uso de placas de cultivo en suspensión de 6 pocillos. El pase en serie por disociación enzimática de acuerdo con el protocolo se realizó cada 9 días. La formación y proliferación de tumoresfera se mantuvo durante el cultivo, que se interrumpió después del pase 10 sin signos de inhibición de la tasa de crecimiento.
- 50
- Figura 2 muestra la eficiencia de formación de tumoresferas (TFE) de las células MCF-7 en diferentes números de pases durante el paso en serie del cultivo de la tumoresfera en el medio químicamente definido. Las células MCF-7 se sembraron en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos con una sola célula por pocillo. Después de 10 días, se comprobó la presencia de tumores esféricos en todos los pocillos. Se calculó el porcentaje de todas las células en placa, que habían formado una tumoresfera (TFE en %). El TFE para las células MCF-7 cultivadas como tumores esféricos en el medio químicamente definido fue del 2 % en el pase 1(P1), pero aumentó al 14 % en P4 y al 28 % en P9(barras).
- 55
- 60
- Figura 3 muestra imágenes microscópicas de tumorales terciarios(paso 3) dentro de un cultivo 3D de células MCF-7 cultivadas en el medio PromoCell CSC 2. El aumento de las células es de 100 veces.

Descripción detallada de la invención

65

Con el objetivo de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, y del ámbito que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

- 5** El término "ingrediente" se refiere en la presente memoria a cualquier compuesto, ya sea de origen químico o biológico, que se puede usar en medios de cultivo celular para mantener o promover el crecimiento o la proliferación de las células. Los términos "componente", "nutriente" e "ingrediente" se pueden usar indistintamente y se entiende que todos se refieren a tales compuestos. Los ingredientes típicos que se usan en los medios de cultivo celular incluyen aminoácidos, sales, metales, azúcares, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, vitaminas, ácidos grasos, proteínas y similares. Otros ingredientes que promueven o mantienen el cultivo de células *ex vivo* se pueden
- 10** seleccionar por aquellos con experiencia en la técnica, de acuerdo con la necesidad en particular.
- Los términos "medio", "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" y "formulación del medio" como se usan en la presente memoria se refieren a una solución nutritiva para cultivar o hacer crecer células.
- 15** "Cultivo celular", como se usa en la presente memoria, significa células o tejidos que se mantienen, cultivan o hacen crecer en un *in vitro* medio ambiente. Los términos "cultivando" y "cultivar" son sinónimos.
- Un "medio químicamente definido" como se usa en la presente memoria es un medio en el que se conocen todos los ingredientes y concentraciones. En particular, está "exento de suero", es decir, el medio no contiene suero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), suero humano, suero de caballo, suero de cabra, etc.).
- 20**
- Por "recipiente de cultivo" se entiende recipientes de vidrio, recipientes de plástico u otros recipientes de varios tamaños que proporcionan un entorno aséptico para el crecimiento de células. Por ejemplo, se pueden usar matraces, placas de uno o varios pocillos, platos de uno o varios pocillos o microplacas de varios pocillos.
- 25**
- Los términos "alimentación" y "cambio de medio", como se usan en la presente memoria, se refieren a reemplazar el medio en el que se cultivan las células. El término "pase" y "pase" como se usa en la presente memoria significa transferir algunas o todas las células de un cultivo anterior a un medio de cultivo celular nuevo.
- 30**
- El término "elemento traza", como se usa en la presente memoria, se refiere a un resto que está presente en un medio de cultivo celular sólo en cantidades mínimas. En la presente invención, este término en particular se refiere a los elementos tales como Se, Cu, Zn, Fe, Ag, Al, Ba, Cd, Co, Cr, Ge, Se, Br, I, Mn, F, Si, V, Mo, Ni, Rb, Sn o Zr pero también pueden referirse a las respectivas sales que comprenden estos elementos en diferentes estados de oxidación.
- 35**
- El término "sal" o "sal inorgánica", como se usa en la presente memoria, se refiere a la sal de elementos que están presentes en el medio de cultivo celular en más de cantidades traza.
- "Cantidades traza" como se usa en la presente memoria, en particular se refiere a una concentración por debajo de
- 40** 1 mg/L.
- Los términos "condiciones de cultivo sin suero" y "condiciones sin suero" se refieren a condiciones de cultivo celular que excluyen el suero de cualquier tipo.
- 45**
- De acuerdo con la definición en la técnica, según la invención el término "factor de crecimiento" se refiere a una sustancia natural capaz de estimular el crecimiento celular, la proliferación, la curación y la diferenciación celular, en particular clases de factores de crecimiento que llevan el término en el nombre como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o factor de crecimiento transformante (TGF), y citocinas como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8).
- 50**
- La presente invención proporciona un medio químicamente definido y para cultivo de tumoresfera 3D, caracterizado comprendiendo los elementos traza,
- aluminio (Al), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - 55** – bario (Ba), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - bromo (Br), en una concentración en el intervalo de 0,4 nM a 4 nM;
 - cadmio (Cd), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;
 - cobalto (Co), en una concentración en el intervalo de 1 nM a 10 nM;
 - cromo (Cr), en una concentración en el intervalo de 0,5 nM a 5 nM;
 - 60** – germanio (Ge), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 20 nM;
 - yodo (I), en una concentración en el intervalo de 0,25 nM a 2,5 nM;
 - flúor (F), en una concentración en el intervalo de 12 nM a 120 nM;
 - níquel (Ni), en una concentración en el intervalo de 0,2 nM a 2 nM;
 - manganeso (Mn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM;
 - 65** – molibdeno (Mo), en una concentración en el intervalo de 0,7 nM a 7 nM;
 - rubidio (Rb), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;

- selenio (Se) en una concentración en el intervalo de 40 nM a 400 nM;
- plata (Ag), en una concentración en el intervalo de 0,3 nM a 3 nM
- silicio (Si), en una concentración en el intervalo de 130 nM a 1,3 μ M
- estaño (Sn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM
- vanadio (V), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 22 nM; y

5 circonio (Zr), en una concentración en el intervalo de 3,5 nM a 35 nM.

10 El medio químicamente definido de acuerdo con la invención es una valiosa herramienta para el cultivo de tumoresferas. Como se muestra en los ejemplos, el medio químicamente definido de acuerdo con la invención soporta el paso en serie de cultivos de células cancerosas en forma de tumoresferas 3D. Además, es de aplicación universal para diferentes tipos de células cancerosas.

15 En la formación de un tumor, la heterogeneidad de eventos/mutaciones que potencialmente generan células aberrantes que finalmente conducen al desarrollo de neoplasias malignas se refleja en la misma heterogeneidad genética y fisiológica que se encuentra en las células cancerosas al comparar diferentes tipos de cánceres, e incluso en células dentro de un mismo grupo. tumor único. Las líneas celulares establecidas de todos los tipos principales de cánceres también exhiben requisitos de medio variables. Estas líneas celulares representan ampliamente aceptadas *in vitro* modelos de estos diferentes tipos de neoplasias. El medio químicamente definido cubre una gama de requisitos metabólicos variables en cánceres de diferente tipo y origen tisular (tabla 1).

20 Además, con el medio químicamente definido de acuerdo con la invención es posible hacer crecer los cultivos de células cancerosas en artículos de plástico de cultivo en suspensión regulares. No son necesarios los costosos artículos de plástico de bajo agarre.

25 De acuerdo con una realización, cada uno de los componentes del medio químicamente definido está presente en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas. La concentración de cualquier ingrediente en base al volumen total del medio químicamente definido.

30 Como todo medio de cultivo de células eucariotas, el medio químicamente definido de acuerdo con la invención contiene agua, al menos una fuente de carbono, una o más vitaminas, una o más sales y selenio. Estos componentes también se denominan en la presente memoria "ingredientes del medio básico". En la preparación del medio químicamente definido de acuerdo con la invención, los ingredientes del medio básico pueden ser proporcionados por un medio basal. El término "medio basal" se refiere a cualquier medio que apoye el crecimiento de células eucariotas y que, mediante el suplemento de ingredientes adicionales, se pueda usar para formar un medio para el cultivo celular de acuerdo con la invención. El medio basal aporta sales, por ejemplo sales de magnesio, calcio, sodio y potasio y opcionalmente sales de elementos traza, así como vitaminas, glucosa, un sistema tampón y aminoácidos esenciales. Los medios basales que se pueden usar en la presente invención incluyen, entre otros, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12 de Ham, Medio Esencial Mínimo α (α MEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM) y Medio de Dulbecco modificado de Iscove.

40 Por consiguiente, el medio químicamente definido que comprende al menos una fuente de carbono. La fuente de carbono es preferentemente un azúcar hexosa que se selecciona del grupo de glucosa, galactosa, manosa y fructosa. El azúcar es en particular D-glucosa. La concentración de la fuente de carbono está preferentemente en el intervalo de 0,45 g/L a 4,5 g/L.

45 Además, el medio químicamente definido comprende una o más sales. Las sales son seleccionadas de preferentemente los grupos que consisten en nitrato de calcio tetrahidratado, cloruro de calcio, dicloruro de magnesio hexahidratado, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, nitrato de potasio, cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, bicarbonato de sodio y acetato de sodio.

50 Las sales están presentes preferentemente en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de las células madre cancerosas. Las sales están, por ejemplo, contenidas en el medio en las siguientes concentraciones: Nitrato de calcio tetrahidratado en un intervalo de 12 mg/L a 120 mg/L, dicloruro de magnesio hexahidratado en un intervalo de 9 mg/L a 90 mg/L, sulfato de magnesio anhidro en un intervalo de 4 mg/L a 40 mg/L, cloruro de potasio en un intervalo de 80 mg/L a 800 mg/L, cloruro de sodio en un intervalo de 1 g/L a 10 g/L, fosfato de sodio dibásico anhidro en un intervalo de 50 mg/L a 500 mg/L y fosfato de sodio monobásico anhidro en un intervalo de 4 mg/L a 40 mg/L.

55 Otros ingredientes del medio básico son una o más vitaminas. La vitamina o más se selecciona de preferentemente de D-biotina, D-Ca pantotenato, ácido fólico, nicotinamida, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B12, acetato de tocoferol, retinol, colecalciferol, vitamina K1/2 y ascórbico. ácido, que incluye el fosfato de ácido ascórbico.

Las vitaminas están presentes en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de las células madre cancerosas. Las vitaminas están, por ejemplo, contenidas en el medio en las siguientes concentraciones: D-biotina en un intervalo de 0,04 mg/L a 0,4 mg/L, pantotenato D-Ca en un intervalo de 0,3 mg/L a 3 mg/L, ácido fólico en un intervalo de 0,3 mg/L a 3 mg/L, nicotinamida en un intervalo de 0,3 mg/L a 3 mg/L, clorhidrato de piridoxal en un intervalo de 0,1 mg/L a 1 mg/L, clorhidrato de piridoxina en un intervalo de 0,09 mg/L a 0,9 mg/L, riboflavina en un intervalo de 0,07 mg/L a 0,7 mg/L, clorhidrato de tiamina en un intervalo de 0,6 mg/L a 6 mg/L, acetato de tocoferol en un intervalo de 8 µg/L a 80 µg/L, vitamina B12 en un intervalo de 0,1 mg/L a 1 mg/L.

El medio químicamente definido comprende uno o más de los aminoácidos. El uno o más "aminoácidos" se refiere a aminoácidos o sus derivados (por ejemplo, análogos de aminoácidos), así como a sus formas D y L. El uno o más de los aminoácidos son seleccionados de preferentemente glicina, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-histidina, L-prolina, L-hidroxi-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina. Con mayor preferencia, el medio químicamente definido contiene todos estos aminoácidos.

Los aminoácidos preferentemente están contenidos en el medio en los intervalos de concentración definidos a continuación: Glicina en un intervalo de 2 mg/L a 20 mg/L, L-alanina en un intervalo de 0,5 mg/L a 5 mg/L, L-alanil-L-glutamina en un intervalo de 230 mg/L a 2,3 g/L, monoclóhidrato de L-arginina en un intervalo de 13 mg/L a 130 mg/L, base libre de L-arginina en un intervalo de 15 mg/L a 150 mg/L, L-asparagina monohidratada en un intervalo de 1,2 mg/L a 12 mg/L, L-asparagina anhidra en un intervalo de 6 mg/L a 60 mg/L, Ácido L-aspartico 3 mg/L a 30 mg/L, Monoclóhidrato de L-cisteína monohidratada en un intervalo de 1,2 mg/L a 12 mg/L, diclorhidrato de L-cistina en un intervalo de 5,5 mg/L a 55 mg/L, Ácido L-glutámico en un intervalo de 2 mg/L a 20 mg/L, Monoclóhidrato de L-histidina monohidratada en un intervalo de 2,5 mg/L a 25 mg/L, L-hidroxi-L-prolina en un intervalo de 3,5 mg/L a 35 mg/L, L-isoleucina en un intervalo de 16 mg/L a 160 mg/L, L-leucina en un intervalo de 7 mg/L a 70 mg/L, Monoclóhidrato de L-lisina en un intervalo de 11 mg/L a 110 mg/L, L-metionina en un intervalo de 1,8 mg/L a 18 mg/L, L-fenilalanina en un intervalo de 7 mg/L a 70 mg/L, L-prolina en un intervalo de 6 mg/L a 60 mg/L, L-serina en un intervalo de 4 mg/L a 40 mg/L, L-treonina en un intervalo de 5 mg/L a 50 mg/L, L-triptófano en un intervalo de 2 mg/L a 20 mg/L, Sal disódica de L-tirosina dihidrato en un intervalo de 10 mg/L a 100 mg/L, L-valina en un intervalo de 6 mg/L a 60 mg/L.

De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido comprende además uno o más dipéptidos que son seleccionados de un grupo que consiste en L-alanil-L-glutamina y glicil-L-glutamina y N-acetil-L-glutamina.

La una o más vitaminas seleccionadas de D-biotina, D-Ca pantotenato, ácido fólico, nicotinamida, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, acetato de tocoferol, vitamina B12.

El elemento traza selenio es un componente básico de acuerdo con la invención. Preferentemente, la sal que contiene selenio está presente en una concentración en el intervalo de 40 nM a 400 nM. El medio químicamente definido comprende adicionalmente un elemento traza estándar seleccionado de cobre(Cu), hierro(Fe), zinc(Zn). El medio químicamente definido comprende preferentemente Fe. El medio químicamente definido comprende, por ejemplo, los elementos traza estándar Cu y Fe. Alternativamente, el medio químicamente definido puede comprender Fe y Zn. Con mayor preferencia, el medio químicamente definido comprende Cu, Fe y Zn.

Los elementos traza estándar están presentes preferentemente en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas. El Zn está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 80 nM a 800 nM. El Cu está preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,3 nM a 3,0 nM. El Fe está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 150 nM a 1,5 µM.

Los inventores observaron que la presencia de elementos traza adicionales además de los elementos traza estándar es necesaria para el crecimiento de tumores esféricos 3D en cultivo. Estos otros elementos traza son aluminio (Al), bario (Ba), bromo (Br), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), germanio (Ge), yodo (I), manganeso (Mn), níquel (Ni), flúor (F), molibdeno (Mo), rubidio (Rb), silicio(Si), plata (Ag), estaño (Sn), vanadio (V) y circonio (Zr).

Los inventores identificaron además que la presencia del elemento traza adicional conduce a un crecimiento mejorado de las esferas tumorales 3D. Se obtienen resultados aún mejores con al menos 5 elementos traza adicionales. Los mejores resultados para el cultivo de tumorosfera 3D se observaron con un medio que contenía todos los siguientes elementos traza adicionales: Al, Ba, Br, Cd, Cr, Co, Ge, I, Mn, Ni, F, Mo, Rb, Ag, Si, Sn, V and Zr. Por tanto, de acuerdo con una realización, comprende los elementos traza adicionales Al, Ba, Br, Cd, Cr, Co, Ge, I, Mn, Ni, F, Mo, Rb, Ag, Si, Sn, V y Zr.

Los elementos traza se introducen preferentemente en el medio químicamente definido como sus sales solubles en agua de referencia. Por ejemplo, aluminio como cloruro de aluminio, nitrato de aluminio o sulfato de aluminio. Bario como carbonato de bario, cloruro de bario o acetato de bario. Bromo como bromuro de magnesio, bromuro de potasio o bromuro de sodio. Cadmio como cloruro de cadmio, nitrato de cadmio o sulfato de cadmio. Cromo como cloruro de cromo, nitrato de cromo o sulfato de cromo. Cobalto como cloruro de cobalto, nitrato de cobalto o sulfato

de cobalto. Cobre como cloruro de cobre, nitrato de cobre o sulfato de cobre. Flúor como fluoruro de magnesio, fluoruro de potasio o fluoruro de sodio. Germanio como óxido de germanio. Yodo como yoduro de magnesio, yoduro de potasio o yoduro de sodio. Hierro como cloruro de hierro, citrato de hierro, nitrato de hierro o sulfato de hierro. Manganeso como cloruro de manganeso, nitrato de manganeso o sulfato de manganeso. Molibdeno como cloruro de molibdeno, molibdato de amonio o molibdato de sodio. Níquel como cloruro de níquel, nitrato de níquel o sulfato de níquel. Rubidio como cloruro de rubidio, nitrato de rubidio o sulfato de rubidio. Plata como carbonato de plata, nitrato de plata o sulfato de plata. Selenio como selenito de sodio, selenato de sodio o selenometionina. Silicio como silicato de potasio o silicato de sodio. Estaño como cloruro de estaño o pirofosfato de estaño. Vanadio como cloruro de vanadio, sulfato de vanadilo o vanadato de amonio. Zinc como cloruro de zinc, nitrato de zinc o sulfato de zinc.

10 Circonio como oxiclururo de circonio.

Los elementos traza están presentes en el medio químicamente definido en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de las células madre cancerosas.

15 El Se está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 40 nM a 400 nM. El Mn está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM. El Si está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 130 nM a 1,3 µM. El Mo está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,7 nM a 7 nM. V está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 2 nM a 22 nM. El Ni está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,2 nM a 2 nM. El Sn está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM. El Al está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM. Ag está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,3 nM a 3 nM. El Ba está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM. Br está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,4 nM a 4 nM. El Cd está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 4 nM a 40 nM. El Co está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 1 nM a 10 nM. El Cr está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,5 nM a 5 nM. F está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 12 nM a 120 nM. Ge está presente en medio químicamente definido en el intervalo de 2 nM a 20 nM. I está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,25 nM a 2,5 nM. Rb está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 4 nM a 40 nM. El Zr está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 3,5 nM a 35 nM.

30 Sin estar ligado a la teoría, el uno o más ácidos grasos deberían tener un efecto sobre el cultivo de la tumoración al facilitar la generación de componentes celulares asociados a lípidos en células cancerosas de crecimiento fastidioso. En medios no definidos, estos compuestos se proporcionan tradicionalmente en abundancia mediante la adición de suero.

35 El medio de acuerdo con la invención puede comprender uno o más ácidos grasos. El uno o más ácidos grasos de acuerdo con la invención son seleccionados de entre ácidos grasos saturados e insaturados. El uno o más ácidos grasos se seleccionan de, por ejemplo, del grupo que consiste en ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido elaídico, ácido vaccénico, ácido linoelaídico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcido, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico. Con cualquiera de estos ácidos grasos en el medio químicamente definido, se logra un cultivo tumoral 3D.

45 Los inventores encontraron que se obtienen buenos resultados para el crecimiento de tumoresferas en 3D con un medio químicamente definido que contiene los ácidos grasos ácido araquidónico, ácido linolénico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido palmítico o ácido esteárico. Por tanto, de acuerdo con una realización, el uno o más ácidos grasos seleccionados de del grupo que consiste en ácido araquidónico, ácido linolénico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico.

50 Como se muestra en los ejemplos, se obtienen resultados superiores para el cultivo de tumores de esferas 3D con más de uno de los ácidos grasos. De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido comprende al menos dos de los ácidos grasos. Preferentemente, comprende al menos tres de los ácidos grasos, con mayor preferencia al menos cuatro de los ácidos grasos.

55 De acuerdo con una realización, que comprende ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico.

60 Los ácidos grasos están presentes preferentemente en el medio químicamente definido en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas. La concentración total de ácidos grasos está preferentemente en el intervalo de 1 a 100 µg/L. Los intervalos de concentraciones adecuados de los ácidos grasos individuales se dan a continuación. El ácido araquidónico está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,8 µg/L a 8 µg/L, el ácido linoleico está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 3 µg/L a 30 µg/L, el ácido linolénico es preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 1,2 µg/L a 12 µg/L, el ácido mirístico está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 2,5 µg/L a 25 µg/L, el ácido oleico está preferentemente presente en medio en el intervalo de 3 µg/L a 30 µg/L, el ácido palmítico está presente

preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 2,5 µg/L a 25 µg/L, el ácido esteárico está preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 3,8 µg/L a 38 µg/L.

5 El medio químicamente definido de acuerdo con la invención contiene en particular los otros elementos traza Al, Ba, Br, Cd, Cr, Co, Ge, I, Mn, Ni, F, Mo, Rb, Si, Ag, Sn, V y Zr y los ácidos grasos ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico.

10 El medio químicamente definido de acuerdo con la invención comprende uno o más agentes adecuados para reducir la fuerza de cizallamiento en cultivo en suspensión 3D. Tales agentes son, por ejemplo, tensioactivos como Poloxámero 188 o macromoléculas como polivinilpirrolidona (PVP) o polietilenglicol (PEG).

15 De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de la invención comprende además al menos un tensioactivo. El tensioactivo mejora la solubilidad de los ácidos grasos. El tensioactivo reduce aún más la fuerza de corte en el cultivo en suspensión 3D. Preferentemente, el tensioactivo es no iónico. Los tensioactivos no iónicos tienen la ventaja de que permiten la solubilización de sustancias lipofílicas en soluciones a base de agua, por ejemplo, medios de cultivo celular, y se proporciona de esta forma sustancias lipofílicas en una forma biodisponible para las células.

20 La concentración total de tensioactivos, en particular tensioactivos no iónicos, está preferentemente en el intervalo de 1 mg/L a 1 g/L, más con mayor preferencia en el intervalo de 50 mg/L a 500 mg/L, más con mayor preferencia en el intervalo de 100 a 300 mg/L.

25 Del grupo que consiste en polisorbatos, se selecciona un tensioactivo no iónico, Poloxámero 188. De acuerdo con una realización, el tensioactivo es Poloxámero 188. Este tensioactivo no es tóxico para las células y tiene el efecto ventajoso de ser capaz de reducir eficazmente el esfuerzo cortante y la inhibición de la unión celular a las superficies de los recipientes de cultivo en cultivos en suspensión. El poloxámero 188 está presente preferentemente en una concentración en el intervalo de 40 a 400 mg/L.

30 De acuerdo con una realización, el tensioactivo es polisorbato 80. Este tensioactivo tiene el efecto ventajoso de que no es tóxico para las células en las concentraciones aplicadas y posee un fuerte efecto emulsionante/dispersante para sustancias lipofílicas en soluciones a base de agua, por ejemplo, medios de cultivo celular. El polisorbato 80 está presente preferentemente en una concentración en el intervalo de 1 a 10 mg/L.

35 De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido comprende los dos tensioactivos no iónicos polisorbato 80 y Poloxámero 188.

40 De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido puede estar libre de factor de crecimiento. Es decir, no contiene ningún componente que actúe como factor de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico(EGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos(bFGF), o el factor de crecimiento transformante(TGF), o una citocina como la interleucina 6(IL-6), interleucina 8(IL-8).

45 Como se muestra en los ejemplos, la composición del medio químicamente definido de acuerdo con la invención, en particular debido a la presencia de elementos traza y ácidos grasos, está fisiológicamente tan bien equilibrada que sostiene el crecimiento de tumores esféricos 3D incluso sin factores de crecimiento. La ausencia de factores de crecimiento puede ser beneficiosa para cuestiones experimentales específicas con respecto al cultivo de tumoresfera.

50 De acuerdo con una realización alternativa, el medio químicamente definido comprende uno o más factores de crecimiento. La presencia de uno o más factores de crecimiento en el medio conduce a una mayor proliferación(ver Ejemplos). El uno o más factores de crecimiento en el medio químicamente definido se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico(EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico(bFGF), factor de crecimiento transformante(TGF), interleucina 6(IL-6), interleucina 8(IL-8), factor inhibidor de la leucemia(LIF). De acuerdo con una realización, el uno o más factores de crecimiento del medio de cultivo de células definido químicamente son EGF y bFGF.

55 De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido comprende además insulina o un sustituto de insulina, transferrina o un sustituto de transferrina y/o albúmina o un sustituto de albúmina. Cada uno de estos componentes está preferentemente presente en el medio químicamente definido en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas.

60 El término "sustituto de albúmina" se refiere a cualquier equivalente funcional de albúmina. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, extracto de pituitaria bovina, hidrolizado de plantas (por ejemplo, Hidrolizado de arroz/soja), fetuina, albúmina de huevo, albúmina de suero humano (HSA) u otras albúmina de origen animal, extracto de pollo, extracto de embrión bovino, AlbuMAX® I y AlbuMAX® II. Otros ejemplos de sustitutos de albúmina son polímeros tales como polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG).

65

- El término "sustituto de transferrina" se refiere a cualquier equivalente funcional de transferrina en el suplemento. Los ejemplos de sustitutos de transferrina incluyen, pero no se limitan a, cualquier compuesto quelato de hierro. Los compuestos de quelato de hierro que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, quelatos de hierro de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), deferoxamina mesilato, dimercaptopropanol, ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA) y ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA), ácido aurintricarboxílico, así como un quelato de citrato férrico y un ácido ferroso quelato de sulfato o Proxiferin®.
- El término "sustituto de la insulina" se refiere al equivalente funcional de la insulina. Los ejemplos de sustitutos de la insulina incluyen, entre otros, factores de crecimiento del grupo de factores de crecimiento similares a la insulina(IGF), por ejemplo, IGF-1, IGF-2, LONG®R3IGF-I, así como miméticos de insulina de metales traza, por ejemplo, Zn²⁺.
- Otros componentes del medio de cultivo celular químicamente definido se usan preferentemente en los siguientes intervalos de concentración: El diclorhidrato de putrescina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,015 mg/L a 0,15 mg/L, el piruvato de sodio preferentemente está presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 3,14 mg/L a 31,4 mg/L, el ácido tióctico es preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,015 mg/L a 0,15 mg/L, la timidina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,025 mg/L a 0,25 mg/L, la albúmina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 1,2 g/L a 12 g/L, la insulina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,1 mg/L a 1,0 mg/L, la transferrina está preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 9 mg/L a 90 mg/L, la hipoxantina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,16 mg/L a 1,6 mg/L, el ácido para-aminobenzoico está preferentemente presente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,05 mg/L a 0,5 mg/L, el mioinositol está presente preferentemente en la química en un medio definido químicamente en el intervalo de 7,5 mg/L a 75 mg/L, el cloruro de colina está presente preferentemente en un medio químicamente definido en el intervalo de 0,7 mg/L a 7,0 mg/L.
- Preferentemente, el medio químicamente definido de acuerdo con la invención comprende albúmina, insulina y transferrina.
- De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido comprende un elemento tampón seleccionado de HEPES, bicarbonato inorgánico, fosfato inorgánico, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS).
- De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido contiene al menos tres elementos tampón. Los tres elementos tampón son preferentemente HEPES, bicarbonato inorgánico y fosfato inorgánico. Se encontró que la combinación de estos componentes tampón conducen a una estabilidad mejorada del pH (en términos de inhibición de la acidificación del medio por metabolitos celulares) y permite omitir los cambios del medio entre pasajes mientras se mantiene la salud de la célula. Esta es una ventaja técnica significativa para el mantenimiento eficiente de cultivos de suspensión 3D y también facilita el escalado y la automatización.
- El medio químicamente definido de acuerdo con la invención comprende preferentemente además uno o más captadores de radicales. Ejemplos de tales captadores de radicales son glutatión, acetato de tocoferol, β-mercaptoetanol, ditioneitol(DTT), N-acetil-L-cisteína(NAC), la vitamina L-ácido ascórbico o su forma estable de fosfato.
- De acuerdo con una realización, un ingrediente adicional del medio químicamente definido es acetato de tocoferol, preferentemente en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas. El acetato de tocoferol está presente preferentemente en el medio químicamente definido en una concentración en el intervalo de 0,0084 mg/L a 0,084 mg/L. El acetato de tocoferol como eliminador de radicales tiene la ventaja de minimizar la peroxidación lipídica dañina. De acuerdo con una realización, el medio químicamente definido contiene glutatión en una concentración de 2,14 mg/L a 21,42 mg/L.
- De acuerdo con una realización, un ingrediente adicional del medio químicamente definido es colesterol, preferentemente en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas. En función de la tasa de crecimiento y las capacidades biosintéticas de un tipo especial de célula, el colesterol puede ser un nutriente que limita el crecimiento. Las células de crecimiento especialmente fastidioso, por ejemplo, las células cancerosas, pueden beneficiarse de la suplementación con colesterol, lo que permite una producción de masa celular rápida mediante una síntesis eficiente de la membrana de la célula. En los medios tradicionales no definidos, el suplemento de suero proporciona colesterol adicional. El colesterol está presente preferentemente en el medio químicamente definido en una concentración en el intervalo de 0,07 mg/L a 0,75 mg/L.
- El medio químicamente definido de acuerdo con la invención preferentemente no contiene suplementos patentados complejos no definidos tales como B27®. Además, de acuerdo con una realización, el medio químicamente definido de acuerdo con la invención no contiene hidrocortisona. Se sugiere que la hidrocortisona puede promover la

diferenciación de las células madre. De acuerdo con una realización, el medio de cultivo celular no contiene heparina, que es una sustancia derivada de animales mal definida.

Una realización preferente de la invención es un medio químicamente definido que comprende los componentes enumerados a continuación. Nitrato de calcio tetrahidratado, dicloruro de magnesio hexahidratado, sulfato de magnesio anhidro, cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico anhidro, fosfato de sodio monobásico anhidro, Zn, Cu, Fe, Se, Mn, Si, Mo, V, Ni, Sn, Al, Ag, Ba, Br, Cd, Co, Cr, F, Ge, I, Rb, Zr, glicina, L-alanina, L-alanil-L-glutamina, L-arginina monohidratado, L-arginina base libre, L-asparagina monohidratado, L-asparagina anhidra, ácido L-aspártico, monohidratado de L-cisteína monohidratado, diclorhidrato de L-cistina, ácido L-glutámico, monohidratado de L-histidina monohidratado, L-hidroxi-L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, Monohidratado de L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina sal disódica dihidrato, L-valina, D-biotina, D-Ca pantotenato, ácido fólico, nicotinamida, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, acetato de tocoferol, vitamina B12, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, diclorhidrato de putrescina, piruvato de sodio, ácido tióctico, timidina, albúmina, insulina, transferrina, hipoxantina, ácido para-aminobenzoico, mioinositol, cloruro de colina, HEPES, L-glutación reducida, D-glucosa anhidra, colesterol, polisorbato 80, poloxámero 188, sal sódica de rojo fenol, bicarbonato sódico, agua hasta el volumen final.

Otra realización preferente contiene los mismos componentes pero adicionalmente factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos básico.

Preferentemente, los componentes están presentes en las siguientes concentraciones: nitrato de calcio tetrahidratado $6,18 \cdot 10^1$ mg/L, dicloro hexahidratado de magnesio $4,18 \cdot 10^1$ mg/L, sulfato de magnesio $2,09 \cdot 10^1$ mg/L, cloruro de potasio $4,06 \cdot 10^2$ mg/L, cloruro de sodio $5,56 \cdot 10^3$ mg/L, fosfato de sodio dibásico anhidro $2,48 \cdot 10^2$ mg/L, fosfato de sodio monobásico anhidro $2,06 \cdot 10^1$ mg/L, Zn $4,13 \cdot 10^2$ nM, Cu $1,56$ nM, Fe $7,31 \cdot 10^2$ nM, Se $1,95 \cdot 10^2$ nM, Mn $5,53 \cdot 10^{-1}$ nM, Si $6,4 \cdot 10^2$ nM, Mo $3,48$ nM, V $1,08 \cdot 10^1$ nM, Ni $9,64 \cdot 10^{-1}$ nM, Sn $5,70 \cdot 10^{-1}$ nM, Al $7,46$ nM, Ag $1,40$ nM, Ba $7,99$ nM, Br $1,82$ nM, Cd $2,11 \cdot 10^1$ nM, Co $5,50$ nM, Cr $2,83$ nM, F $6,00 \cdot 10^1$ nM, Ge $9,88$ nM, I $1,33$ nM, Rb $1,90 \cdot 10^1$ nM, Zr $1,80 \cdot 10^1$ nM, glicina $9,56$ mg/L, L-alanina $2,54$ mg/L, L-alanil-L-glutamina $1,14 \cdot 10^3$ mg/L, L-arginina monohidratado $6,31 \cdot 10^1$ mg/L, L-arginina base libre $7,60 \cdot 10^1$ mg/L, L-asparagina monohidratada $6,06$ mg/L, L-asparagina anhidra $2,85 \cdot 10^1$ mg/L, ácido L-aspártico $1,65 \cdot 10^1$ mg/L, monohidratado de L-cisteína monohidratado $5,84$ mg/L, L-cistina diclorhidrato $2,75 \cdot 10^1$ mg/L, ácido L-glutámico $1,04 \cdot 10^1$ mg/L, L-histidina monohidratado $1,32 \cdot 10^1$ mg/L, L-hidroxi-L-prolina $1,85 \cdot 10^1$ mg/L, L-isoleucina $7,94 \cdot 10^1$ mg/L, L-leucina $3,36 \cdot 10^1$ mg/L, L-lisina monohidratado $5,61 \cdot 10^1$ mg/L, L-metionina $9,19$ mg/L, L-fenilalanina $3,36 \cdot 10^1$ mg/L, L-prolina $3,01 \cdot 10^1$ mg/L, L-serina $2,14 \cdot 10^1$ mg/L, L-treonina $2,44 \cdot 10^1$ mg/L, L-triptófano $9,32$ mg/L, sal dihidrato de disodio L-tirosina $5,23 \cdot 10^1$ mg/L, L-valina $3,11 \cdot 10^1$ mg/L, D-biotina $1,88 \cdot 10^{-1}$ mg/L, D-Ca pantotenato $1,42$ mg/L, ácido fólico $1,56$ mg/L, nicotinamida $1,58$ mg/L, clorhidrato de piridoxal $5,70 \cdot 10^{-1}$ mg/L, clorhidrato de piridoxina $4,41 \cdot 10^{-1}$ mg/L, riboflavina $3,58 \cdot 10^{-1}$ mg/L, clorhidrato tiamina $2,86$ mg/L, acetato tocoferol $4,20 \cdot 10^{-2}$ mg/L, vitamina B12 $5,21 \cdot 10^{-1}$ mg/L, ácido araquidónico $3,80 \cdot 10^{-3}$ mg/L, ácido linoleico $1,62 \cdot 10^{-2}$ mg/L, ácido linolénico $6,00 \cdot 10^{-3}$ mg/L, ácido mirístico $1,30 \cdot 10^{-2}$ mg/L, ácido oleico $1,60 \cdot 10^{-2}$ mg/L, ácido palmítico $1,20 \cdot 10^{-2}$ mg/L, ácido esteárico $1,90 \cdot 10^{-2}$ mg/L, diclorhidrato de putrescina $7,50 \cdot 10^{-2}$ mg/L, piruvato de sodio $1,57 \cdot 10^1$ mg/L, ácido tióctico $7,48 \cdot 10^{-2}$ mg/L, timidina $1,21 \cdot 10^{-1}$ mg/L, albúmina $6,00 \cdot 10^3$ mg/L, insulina $4,97 \cdot 10^{-1}$ mg/L, transferrina $4,45 \cdot 10^1$ mg/L, hipoxantina $7,98 \cdot 10^{-1}$ mg/L, ácido para-aminobenzoico $2,61 \cdot 10^{-1}$ mg/L, mioinositol $3,84 \cdot 10^1$ mg/L, cloruro de colina $3,41$ mg/L, HEPES $4,56 \cdot 10^3$ mg/L, L-glutación reducida $1,07 \cdot 10^1$ mg/L, D-glucosa anhidra $2,25 \cdot 10^3$ mg/L, colesterol $3,74 \cdot 10^{-1}$ mg/L, polisorbato 80 $3,96$ mg/L, Poloxámero 188 $1,90 \cdot 10^2$ mg/L, sal de rojo fenol de sodio $5,93$ mg/L, bicarbonato de sodio $2,39 \cdot 10^3$ mg/L, agua hasta un volumen final. La realización del medio de cultivo celular con factores de crecimiento contiene factor de crecimiento epidérmico en una concentración de $1,10 \cdot 10^{-2}$ mg/L y el factor de crecimiento de fibroblastos básico en una concentración de $3,60 \cdot 10^{-2}$ mg/L.

Los ingredientes del medio químicamente definido se pueden combinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

El medio químicamente definido de acuerdo con la invención puede prepararse de acuerdo con el siguiente protocolo. Primero, el 90 % del volumen final de agua de grado de cultivo celular se coloca en un recipiente de mezcla. Las cantidades pesadas o las cantidades apropiadas de soluciones madre de la sustancia de referencia se agregan posteriormente bajo agitación permanente. Finalmente, se ajusta el volumen y el medio se esteriliza por filtración mediante el uso de una unidad de filtrado de $0,22 \mu\text{m}$.

La presente invención proporciona además el uso del medio químicamente definido para el cultivo de CSC, en particular cultivos de células cancerosas que incluyen CSC. Ejemplos de líneas de células cancerosas que se pueden cultivar con el medio químicamente definido de acuerdo con la invención son U-87 MG, MCF-7, HT-29, HT 1080, HepG2, A-549, Panc-1, LNCaP y A-431.

De acuerdo con una realización, el cultivo de CSC se realiza como un cultivo en suspensión 3D.

El cultivo de CSC emplea el uso de un factor de crecimiento que contenga medio de cultivo celular definido químicamente y un medio de cultivo celular definido químicamente libre de factor de crecimiento.

La invención se refiere además a un sistema de cultivo celular que comprende células cancerosas, en particular que incluyen células madre cancerosas y el medio químicamente definido de acuerdo con la invención. De acuerdo con una realización del sistema de cultivo celular, las células cancerosas son células tumorales primarias. De acuerdo con una realización adicional del sistema de cultivo celular, las células cancerosas son una línea celular cancerosa derivada de un tejido seleccionado de cerebro, mama, colon, tejido conectivo, hígado, pulmón, páncreas, próstata y piel. La línea celular cancerosa se selecciona de en particular U-87 MG, MCF-7, HT-29, HT 1080, HepG2, A-549, Panc-1, LNCaP y A-431. De acuerdo con una realización preferente, la línea celular cancerosa es MCF-7.

La presente invención se define en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Materiales

Medio de células madre cancerosas

Solución salina tamponada con fosfato w/o $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (PBS, PromoCell #C-40232)
Detach-Kit (solución de neutralización de tripsina-EDTA y tripsina; PromoCell #C-41210)
Placas de cultivo en suspensión de 6 pocillos (por ejemplo, Greiner Bio One, #657 185)

Ejemplo 1 - Preparación de un medio CSC de acuerdo con la invención

Primero, el 90 % del volumen final de agua de grado de cultivo celular se coloca en un recipiente de mezcla. A excepción del bicarbonato de sodio, las cantidades pesadas o las cantidades apropiadas de soluciones madre de componentes se añaden posteriormente en el orden definido a continuación bajo agitación permanente. Cuando todo se disuelve, se añade el bicarbonato de sodio y finalmente se ajusta el volumen y se filtra el medio esterilizado. El medio final tuvo la siguiente composición: Nitrato de calcio tetrahidratado 6,18 10^1 mg/L, dicloruro de magnesio hexahidratado 4,18 10^1 mg/L, sulfato de magnesio anhidro 2,09 10^1 mg/L, cloruro de potasio 4,06 10^2 mg/L, cloruro de sodio 5,56 10^3 mg/L, fosfato de sodio dibásico anhidro 2,48 10^2 mg/L, fosfato de sodio monobásico anhidro 2,06 10^1 mg/L, Zn 4,13 10^2 nM, Cu 1,56 nM, Fe 7,31 10^2 nM, Se 1,95 10^2 nM, Mn 5,53 10^{-1} nM, Si 6,4 10^2 nM, Mo 3,48 nM, V 1,08 10^1 nM, Ni 9,64 10^{-1} nM, Sn 5,70 10^{-1} nM, Al 7,46 nM, Ag 1,40 nM, Ba 7,99 nM, Br 1,82 nM, Cd 2,11 10^1 nM, Co 5,50 nM, Cr 2,83 nM, F 6,00 10^1 nM, Ge 9,88 nM, I 1,33 nM, Rb 1,90 10^1 nM, Zr 1,80 10^1 nM, glicina 9,56 mg/L, L-alanina 2,54 mg/L, L-alanil-L-glutamina 1,14 10^3 mg/L, monoclorhidrato de L-arginina 6,31 10^1 mg/L, base libre de L-arginina 7,60 10^1 mg/L, L-asparagina monohidratado 6,06 mg/L, L-asparagina anhidra 2,85 10^1 mg/L, ácido L-aspártico 1,65 10^1 mg/L, monoclorhidrato de L-cisteína monohidratado 5,84 mg/L, diclorhidrato de L-cisteína 2,75 10^1 mg/L, ácido L-glutámico 1,04 10^1 mg/L, monoclorhidrato de L-histidina monohidratado 1,32 10^1 mg/L, L-hidroxil-L-prolina 1,85 10^1 mg/L, L-isoleucina 7,94 10^1 mg/L, L-leucina 3,36 10^1 mg/L, monoclorhidrato de L-lisina 5,61 10^1 mg/L, L-metionina 9,19 mg/L, L-fenilalanina 3,36 10^1 mg/L, L-prolina 3,01 10^1 mg/L, L-serina 2,14 10^1 mg/L, L-treonina 2,44 10^1 mg/L, L-triptófano 9,32 mg/L, Sal disódica de L-tirosina dihidrato 5,23 10^1 mg/L, L-valina 3,11 10^1 mg/L, D-biotina 1,88 10^{-1} mg/L, pantotenato D-Ca 1,42 mg/L, ácido fólico 1,56 mg/L, nicotinamida 1,58 mg/L, clorhidrato de piridoxal 5,70 10^{-1} mg/L, clorhidrato de piridoxina 4,41 10^{-1} mg/L, riboflavina 3,58 10^{-1} mg/L, clorhidrato de tiamina 2,86 mg/L, acetato de tocoferol 4,20 10^{-2} mg/L, vitamina B12 5,21 10^{-1} mg/L, ácido araquidónico 3,80 10^{-3} mg/L, ácido linoleico 1,62 10^{-2} mg/L, ácido linolénico 6,00 10^{-3} mg/L, ácido mirístico 1,30 10^{-2} mg/L, ácido oleico 1,60 10^{-2} mg/L, ácido palmítico 1,20 10^{-2} mg/L, ácido esteárico 1,90 10^{-2} mg/L, diclorhidrato de putrescina 7,50 10^{-2} mg/L, piruvato de sodio 1,57 10^1 mg/L, ácido tióctico 7,48 10^{-2} mg/L, timidina 1,21 10^{-1} mg/L, albúmina 6,00 10^3 mg/L, insulina 4,97 10^{-1} mg/L, transferrina 4,45 10^1 mg/L, hipoxantina 7,98 10^{-1} mg/L, ácido para-aminobenzoico 2,61 10^{-1} mg/L, mioinositol 3,84 10^1 mg/L, cloruro de colina 3,41 mg/L, factor de crecimiento epidérmico 1,10 10^{-2} mg/L, factor de crecimiento fibroblástico básico 3,60 10^{-2} mg/L, HEPES 4,56 10^3 mg/L, L-glutatión reducido 1,07 10^1 mg/L, D-glucosa anhidra 2,25 10^3 mg/L, colesterol 3,74 10^{-1} mg/L, polisorbato 80 3,96 mg/L, Poloxámero 188 1,90 10^2 mg/L, sal sódica de rojo fenol 5,93 mg/L, bicarbonato de sodio 2,39 10^3 mg/L.

Ejemplo 2 - Transferencia de una línea celular de carcinoma mamario de un cultivo 2D adherente al cultivo de tumoresfera 3D

La transferencia de la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 de un cultivo 2D adherente en un medio de cultivo estándar no definido a un cultivo de tumoresfera 3D en el medio de cultivo CSC de acuerdo con el ejemplo 1 (medio PromoCell CSC) se probó mediante el uso del protocolo siguiente. Como referencia, un medio CSC comparativo para el cultivo tumoral de líneas celulares cancerosas se probó simultáneamente en el mismo experimento. El medio CSC comparativo es Cancer Stem Premium™ producido por Promab Biotechnologies Inc. No se divulga la composición exacta de este medio.

En el protocolo, ambos medios de cultivo, el medio CSC 1 y el medio CSC comparativo se denominan medio CSC.

2.1 Recolección de las células adherentes

Las células de una línea celular de cáncer de crecimiento adherente que contiene CSC humana, MCF-7, se separaron mediante el uso de procedimientos estándar, es decir, tripsinización con tripsina-EDTA mediante el uso

del kit Detach. Las células eran confluentes en un 80-90 % y estaban en buenas condiciones. Se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 300 x g y se aspiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 5 ml de medio CSC.

5 2.2. Recuento de células

Se contaron las células MCF-7 viables mediante el uso del reactivo ViaCount™ y el analizador de células Muse™ (Millipore) y se ajustó el volumen con el medio CSC para obtener una concentración de 1 millón de células/ml.

10 2.3 Establecimiento del cultivo de tumoresfera

Las células MCF-7 se sembraron en recipientes de cultivo en suspensión apropiados a 10,000 células/ml, es decir, 40,000 células en 4 ml del medio CSC en cada pocillo de una placa de cultivo en suspensión de 6 pocillos.

15 2.4. Permitir que crezcan las esferas tumorales

El cultivo se incubó durante 9 (8-10) días. Se añadió medio CSC fresco cada 3-4 días con un volumen del 50 % del volumen de cultivo. No se eliminó ningún medio.

20 Ejemplo 3 - Paso en serie de cultivos de tumores de esferas 3D

Las tumoresferas se sometieron a pases seriados en cultivo de tumoresfera 3D en el medio CSC cada 9 (8-10) días de acuerdo con el protocolo siguiente. Se llevó a cabo el paso mediante disociación de las tumoresferas a células individuales y el recubrimiento.

25 3.1. Colección de las tumoresferas

El medio que contenía las tumoresferas se transfirió a tubos cónicos de 15 ml mediante el uso de una pipeta serológica.

30 3.2. Sedimentación por gravedad de las esferas tumorales

Las esferas sedimentaron mediante sedimentación por gravedad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante, pero quedaron aproximadamente 200 µl en el tubo cónico.

35 3.3. Lavado de las esferas tumorales

Se repitió la sedimentación (etapa 3.2) con un volumen igual de PBS. Aspire suavemente el PBS dejando aproximadamente 200 µl en el tubo cónico.

40 3.4. Digestión enzimática de las esferas tumorales

Se añadió 1 ml de tripsina-EDTA a las esferas tumorales y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente.

45 3.5. Desglose de los agregados celulares restantes

Las esferas se pipetearon hacia arriba y hacia abajo 10-15 veces mediante el uso de una punta de pipeta de 1000 µl para generar una suspensión de células individuales. La suspensión de células se aspiró normalmente, pero la punta de la pipeta se inclinó ligeramente en el fondo del tubo al expulsar las células. Las fuerzas de cizallamiento generadas facilitaron la ruptura de cualquier agregado celular residual. Se realizó una verificación visual para confirmar que no quedaban agregados de células grandes. Inmediatamente después de la trituración, se añadió el doble del volumen de solución de neutralización de tripsina(TNS).

50 3.6. Determinación del número de células y viabilidad

El volumen se llevó a 5 ml con medio CSC reciente y se determinó el número de células y la viabilidad. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en medio fresco a 1 millón células/ml.

60 3.7. Revestimiento de las células

Las células se sembraron de nuevo a 10,000 células/ml en nuevos recipientes de cultivo en suspensión. Para ello se usaron placas de 6 pocillos con 40,000 células en 4 ml de medio por pocillo. Para continuar el paso en serie, se repitió el procedimiento completo a partir del paso 2.4.

65 3.8. Resultados

La Figura 1 resume de forma representativa los resultados de las pruebas realizadas. Las células MCF-7 transferidas de cultivo estándar 2D al medio CSC competidor disponible comercialmente generaron tumoresferas de crecimiento lento. Sin embargo, estas esferas tumorales dejaron de proliferar y comenzaron a descomponerse incluso antes del pase 1.

5 En contraste, las tumoresferas cultivadas en el medio presentado aquí proliferaron de manera constante y experimentaron 10 pases en serie como cultivo tumoral. La prueba se detuvo mientras el cultivo no mostraba signos de agotamiento.

10 Se obtuvieron resultados comparables con la línea celular de fibrosarcoma HT1080 cuando se cultivó en el medio descrito aquí y el medio CSC competidor. Mientras que el cultivo de la tumoresfera en el medio competidor cesó después de cuatro pases en serie, el cultivo en el medio presentado aquí podría pasarse 10 veces sin ningún signo de agotamiento(no mostrado).

15 Ejemplo 4 - Determinación de la eficiencia de formación de la tumoresfera (TFE) de células MCF-7 en medio PromoCell CSC

Para las células MCF-7 cultivadas de acuerdo con los ejemplos 1 y 2, se realizó la determinación repetida de la eficiencia de formación de la tumoresfera(TFE) a diferentes números de pases durante el pasaje en serie del cultivo de tumoresfera. El TFE se determinó en los pases en serie 1, 4 y 9(P1, P4 y P9) del cultivo de tumores de MCF-7 mediante el uso del medio químicamente definido.

25 Durante el proceso de pasaje del cultivo tumoral, se obtienen células individuales por disociación enzimática(ver Ejemplo 3, etapa 3.4). En P1, P4 y P9 se colocaron en placas células individuales de la disociación tumoresfera en dos placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos: una célula individual por pocillo con 100 µl del medio químicamente definido. Después de 5-6 días, se añadió 100 µl de medio fresco. Después de 10 días, se comprobó la presencia de tumoresferas en los 192 pocillos y se calculó el porcentaje de todas las células sembradas en placa, que formaron una tumoresfera. El porcentaje de células capaces de formar tumoresfera es el TFE de las células.

30 El TFE para las células MCF-7 cultivadas como tumoresferas en el medio químicamente definido fue del 2 % en P1, pero aumentó al 14 % en P4 y al 28 % en P9(ver Figura 2). Dado que se considera que solo las células madre cancerosas tienen la capacidad de formar una esfera tumoral a partir de una sola célula, estos resultados sugieren que el paso en serie de células MCF-7 como cultivo de esferas tumorales en el medio químicamente definido aumentó significativamente el número y el porcentaje de células madre cancerosas dentro del cultivo en una forma dependiente del tiempo/número de pasaje.

35 Ejemplo 5 - Cultivo de tumoresfera 3D de líneas celulares cancerosas en el medio PromoCell CSC

40 Con el fin de verificar la amplia aplicabilidad del medio presentado para el mantenimiento de líneas de células cancerosas de diferente origen como cultivo de tumoresfera 3D, las líneas celulares enumeradas en la tabla 1 que representan los tipos más frecuentes de neoplasias malignas humanas se probaron en cuanto a la proliferación de forma continua y su capacidad de pasarse en serie. Todas las líneas celulares probadas pudieron expandirse como cultivos tumorales y exhibieron una proliferación continua durante 10 pases en serie. Todos los cultivos se terminaron en el pase 10 sin ningún signo de inhibición de la velocidad de crecimiento.

Tabla 1: Lista de tipos de célula probados para pases en serie con el medio PromoCell CSC

Tejido	Línea celular probada	Origen de la línea celular
50 Cerebro	U-87 MG	Glioblastoma/astrocitoma de grado IV del cerebro humano
Mama	MCF-7	derrame pleural de adenocarcinoma de mama humano metastásico
Colon	HT-29	adenocarcinoma de colon humano
55 Tejido conectivo	HT 1080	fibrosarcoma humano
Hígado	HepG2	hepatocelular del hígado humano
Pulmón	A-549	carcinoma de pulmón humano
60 Páncreas	Panc-1	carcinoma epitelioide del conducto pancreático humano
Próstata	LNCaP	metástasis en los nódulos linfáticos del adenocarcinoma de próstata humano
Piel	A-431	carcinoma epidermoide de piel humana

65 Ejemplo 6 - Cultivo de tumoresfera 3D de líneas de células cancerosas en el medio PromoCell CSC 2

El siguiente ejemplo muestra que el medio químicamente definido de acuerdo con la invención soporta el crecimiento tumoral 3D de líneas celulares incluso en ausencia de factores de crecimiento.

Se produjo un segundo medio de cultivo celular, a saber, medio PromoCell CSC 2 que tiene los mismos componentes que el medio PromoCell CSC de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto que no se incluyen el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos básico. El medio PromoCell CSC 2 se produjo como se describe para el medio PromoCell CSC en el Ejemplo 1 se omiten los dos factores de crecimiento mencionados.

Se probó el medio 2 de PromoCell the CSC en cuanto a su capacidad para soportar el crecimiento tumoral de dos líneas celulares cancerosas diferentes. MCF-7 es una línea celular derivada de cáncer de mama humano y la línea celular HT-29 es una línea celular derivada de cáncer de colon.

Las dos líneas celulares MCF-7 y HT-29 se cultivaron de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 3 mediante el uso del medio 2 PromoCell CSC sin factor de crecimiento en lugar del medio PromoCell CSC que contenía factor de crecimiento.

Por consiguiente, las líneas celulares se sometieron a tres pases consecutivos (en serie) con intervalos de pases constantes de 14-16 días para MCF-7 y de 10-12 días para HT-29. Ambas líneas celulares exhibieron una fuerte proliferación con aproximadamente tres duplicaciones de población por pase.

Después del tercer pase, se analizaron las líneas celulares. Los cultivos no mostraron signos de inhibición del crecimiento. Las imágenes del cultivo de células MCF-7 se muestran en la Figura 3 (aumento de 100x). De la figura 3 se puede concluir que incluso en ausencia de factores de crecimiento añadidos, es decir, EGF y bFGF, el cultivo es capaz de una formación y un crecimiento robustos de tumores esféricos en cultivo de células MCF-7. Además, las células que forman las esferas muestran un patrón morfológico uniforme y saludable.

En combinación con la tasa de proliferación sostenida(aunque algo desacelerada) del cultivo, estos resultados indican que incluso la variante libre de factor de crecimiento del medio químicamente definido soporta el cultivo continuo en serie de tumores de esferas 3D de líneas celulares de cáncer humano.

Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención que se exponen en la presente memoria serán evidentes para un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención, que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que la invención no se limita a las realizaciones específicas divulgadas y que las modificaciones y otras realizaciones se incluyen dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Aunque términos específicos se emplean en la presente memoria, ellos se usan en un sentido genérico y descriptivo solamente y no para propósitos de limitación.

REFERENCIAS

1. Sanges, D. y M.P. Cosma, Reprogramming cell fate to pluripotency: the decision-making signalling pathways. *Int J Dev Biol*, 2010. 54(11-12): p. 1575-87.
2. Tu, S.M., Cancer: a "stem-cell" disease? *Cancer Cell Int*, 2013. 13(1): p. 40.
3. Bonnet, D. y J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 730-7.
4. Jordan, C.T., Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(6): p. 708-12.
5. Clarke, M.F., y otros, Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9339-44.
6. Lamb, R., y otros, Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*, 2015. 6(7): p. 4569-84.
7. Sheridan, S.D., V. Surampudi, y R.R. Rao, Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int*, 2012. 2012: p. 738910.
8. Zhao, W., y otros, Embryonic stem cell markers. *Molecules*, 2012. 17(6): p. 6196-236.
9. Adil, M., y otros, Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells. 2012.
10. Pearce, D.J., y otros, Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*, 2005. 23(6): p. 752-60.
11. Greve, B., y otros, Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A*, 2012. 81(4): p. 284-93.
12. Stuelten, C.H., y otros, Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells*, 2010. 28(4): p. 649-60.
13. Liu, Y., y otros, Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*, 2014. 110(8): p. 2063-71.
14. Kim, H.S., Y.J. Sung, y S. Paik, Cancer Cell Line Panels Empower Genomics-Based Discovery of Precision Cancer Medicine. *Yonsei Med J*, 2015. 56(5): p. 1186-98.
15. Kondo, T., Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Inflammation and Regeneration*, 2007. 27(5): p. 506-511.

16. Masters, J.R., Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(3): p. 233-6.
17. Fillmore, C.M. y C. Kuperwasser, Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(2): p. R25.
- 5 18. Min, S.O., y otros, Ideal sphere-forming culture conditions to maintain pluripotency in a hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int*, 2015. 15: p. 95.
19. Qiu, X., y otros, Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Letters*. 323(2): p. 161-170.
20. Grimshaw, M.J., y otros, Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(3): p. R52.
- 10 21. Hurt, E.M., y otros, Identification of vitronectin as an extrinsic inducer of cancer stem cell differentiation and tumor formation. *Stem Cells*, 2010. 28(3): p. 390-8.
22. Martin, M.J., y otros, Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 2005. 11(2): p. 228-32.
- 15 23. Guerrero-Cazares, H., K.L. Chaichana, y A. Quinones-Hinojosa, Neurosphere culture and human organotypic model to evaluate brain tumor stem cells. *Methods Mol Biol*, 2009. 568: p. 73-83.
24. Calvet, C.Y., F.M. Andre, y L.M. Mir, The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e89644.
25. Moore, N. y S. Lyle, Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol*, 2011. 2011.
- 20 26. Pecqueur, C., y otros, Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cell Biol*, 2013. 2013: p. 805975.
27. Akrap, N., y otros. Identification of Distinct Breast Cancer Stem Cell Populations Based on Single-Cell Analyses of Functionally Enriched Stem and Progenitor Pools. *Stem Cell Reports*, 2016. 6(1): p. 121-36.
- 25 28. Kim, S. y C.M. Alexander. Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics. *Biotechnol Lett*, 2014. 36(3): p. 481-8.

REIVINDICACIONES

1. Un medio químicamente definido para el cultivo de tumoresferas 3D, caracterizado porque comprende los elementos traza,
 - 5 - aluminio (Al), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - bario (Ba), en una concentración en el intervalo de 1,5 nM a 15 nM;
 - bromo (Br), en una concentración en el intervalo de 0,4 nM a 4 nM;
 - cadmio (Cd), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;
 - cobalto (Co), en una concentración en el intervalo de 1 nM a 10 nM;
 - 10 - cromo (Cr), en una concentración en el intervalo de 0,5 nM a 5 nM;
 - germanio (Ge), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 20 nM;
 - yodo (I), en una concentración en el intervalo de 0,25 nM a 2,5 nM;
 - flúor (F), en una concentración en el intervalo de 12 nM a 120 nM;
 - níquel (Ni), en una concentración en el intervalo de 0,2 nM a 2 nM;
 - 15 - manganeso (Mn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM;
 - molibdeno (Mo), en una concentración en el intervalo de 0,7 nM a 7 nM;
 - rubidio (Rb), en una concentración en el intervalo de 4 nM a 40 nM;
 - selenio (Se) en una concentración en el intervalo de 40 nM a 400 nM;
 - plata (Ag), en una concentración en el intervalo de 0,3 nM a 3 nM
 - 20 - silicio (Si), en una concentración en el intervalo de 130 nM a 1,3 µM
 - estaño (Sn), en una concentración en el intervalo de 0,1 nM a 1 nM
 - vanadio (V), en una concentración en el intervalo de 2 nM a 22 nM; y
 - circonio (Zr), en una concentración en el intervalo de 3,5 nM a 35 nM.
- 25 2. El medio químicamente definido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio químicamente definido no comprende ningún factor de crecimiento.
3. El medio químicamente definido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende uno o más factores de crecimiento.
- 30 4. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende uno o más ácidos grasos, en el que uno o más ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácido araquidónico, ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, cada uno en una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas.
- 35 5. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos un tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico, con mayor preferencia un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo de polisorbatos y Poloxámero 188.
- 40 6. El medio químicamente definido de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende los dos tensioactivos no iónicos polisorbato 80 y Poloxámero 188.
- 45 7. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que uno o más factores de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante (TGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor inhibidor de leucemia (LIF), preferentemente el medio de cultivo celular químicamente definido comprende EGF y bFGF.
- 50 8. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además insulina, transferrina y/o albúmina, preferentemente cada una con una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas.
- 55 9. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende al menos un elemento tampón, en el que el elemento tampón se selecciona de HEPES, bicarbonato inorgánico, fosfato inorgánico, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS).
- 60 10. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende al menos tres elementos tampón, en particular HEPES, bicarbonato inorgánico, fosfato inorgánico.
- 65 11. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además colesterol y/o acetato de tocoferol, preferentemente cada uno con una concentración suficiente para soportar la proliferación y/o el mantenimiento de células madre cancerosas.
12. El medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que comprende al menos dos de los ácidos grasos, preferentemente al menos tres, más con mayor preferencia al menos cuatro, en particular todos los ácidos grasos enumerados.

13. Uso del medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el cultivo de células madre cancerosas.

5 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el cultivo de células madre cancerosas se realiza como cultivo en suspensión 3D.

15. Un sistema de cultivo celular, que comprende células cancerosas, en particular células madre cancerosas, y un medio químicamente definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

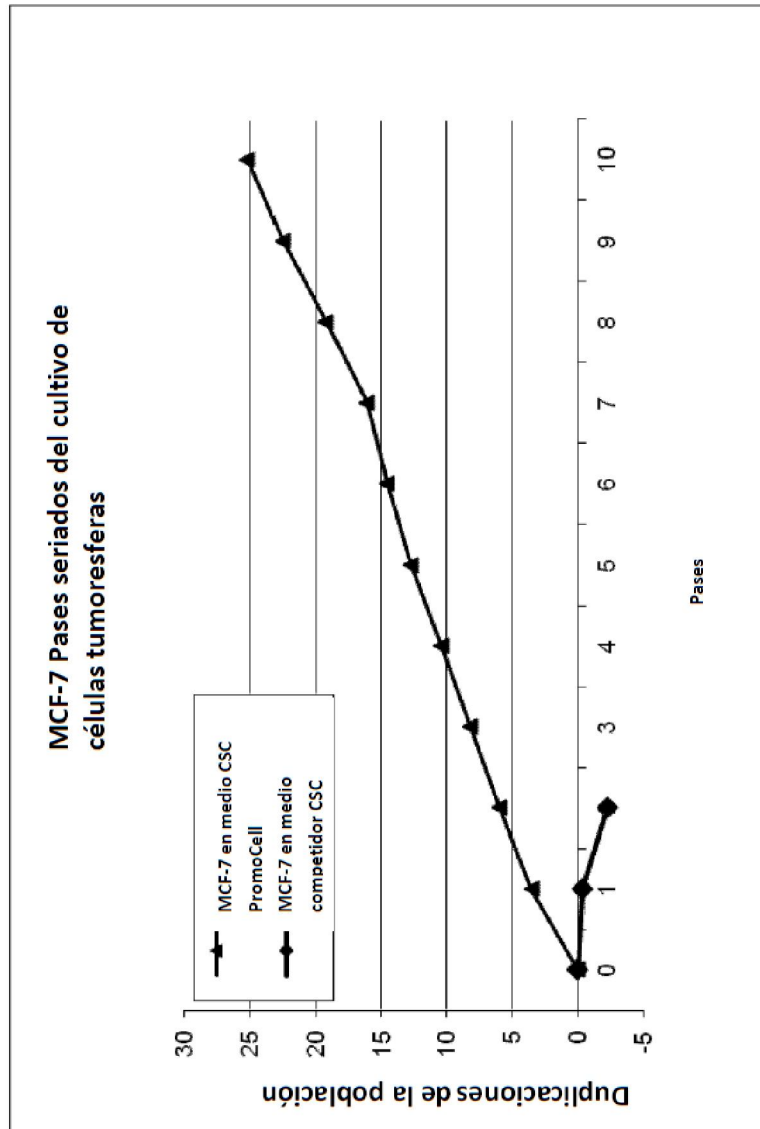


Figura 1

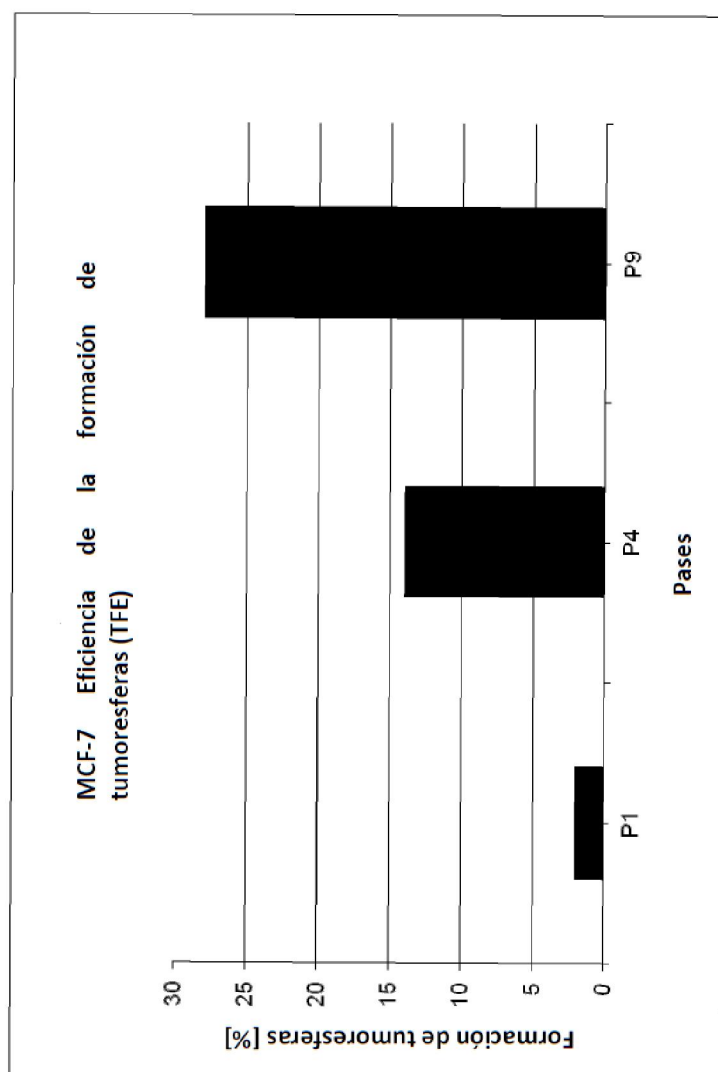


Figura 2

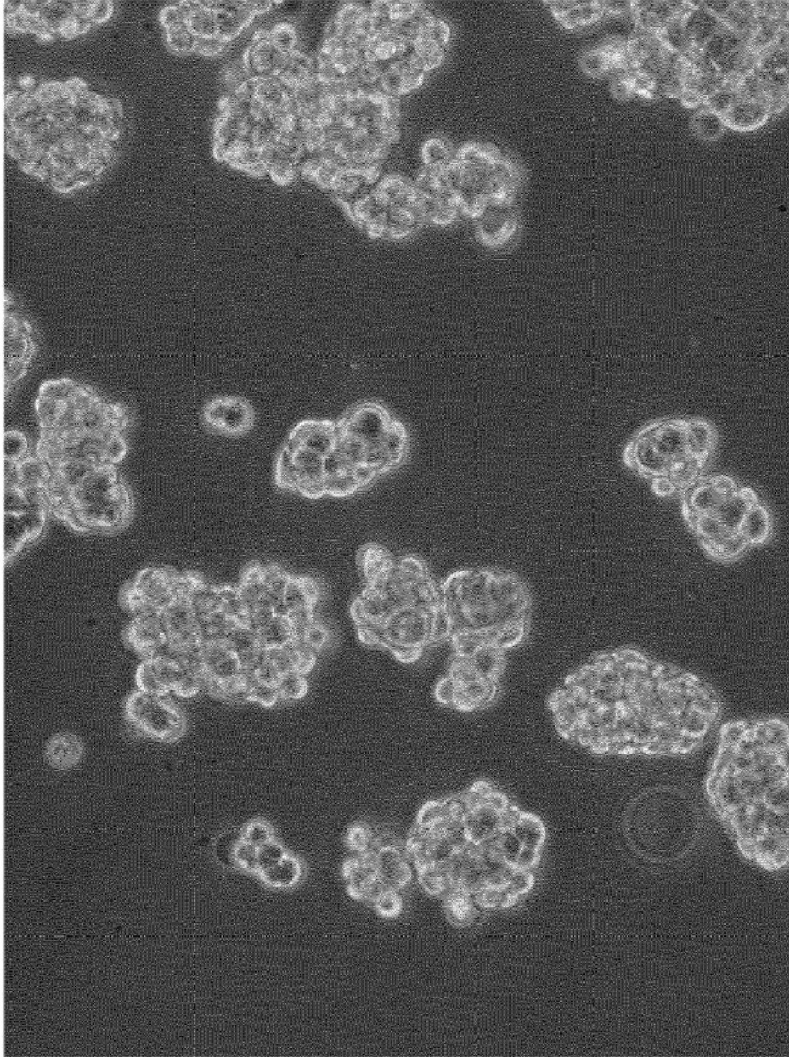


Figura 3