

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 102**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2021** **PCT/ES2021/070101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2021** **WO21160919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2021** **E 21716480 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 4105318**

54 Título: **Sistema de almacenamiento y transporte de líneas celulares**

30 Prioridad:

14.02.2020 WO PCT/ES2020/070100

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

02.12.2024

73 Titular/es:

READYCELL, S.L. (100.0%)
Calle Pallars nº 179-185
08005 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

SOTO FERNANDEZ, CRISTINA;
VAZQUEZ SÁNCHEZ, MARIA, ANGELES;
GOMBAU SUÁREZ, LOURDES;
PALAU LLUCH, GERARD;
CABRÉ ESTIVILL, ALEXANDRE y
AUBOUY, LAURENT

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 991 102 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

Sistema de almacenamiento y transporte de líneas celulares

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del almacenamiento y transporte de líneas celulares. Más particularmente la invención se refiere a un sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de líneas celulares basado en la combinación de un determinado medio de transporte celular y una matriz de gelatina. El sistema de la invención es especialmente adecuado para el transporte de líneas celulares HEK-293 y Caco-2 ya que la supervivencia y viabilidad de éstas se mantiene sustancialmente inalterada durante al menos 96 horas de almacenamiento y/o transporte. La invención también tiene por objeto un procedimiento para el transporte *in vitro* de líneas celulares, así como un kit para el transporte de dichas líneas celulares.

Antecedentes de la invención

Los cultivos celulares, homogéneos o no (cocultivos), pueden constituir modelos útiles de algunos procesos genéticos, bioquímicos, metabólicos o fisiológicos que tienen lugar en el organismo vivo. La facilidad de su manipulación permite el análisis de gran número de condiciones antes de realizar los experimentos definitivos en animales o los ensayos clínicos en seres humanos. Los modelos *in vitro* constituyen una herramienta para la validación de nuevas dianas terapéuticas, para la selección de cabezas de serie en sistemas de alto rendimiento, para la definición del mecanismo de acción de nuevas moléculas y, en general, para la investigación biomédica, biotecnológica o cosmética.

En general, todos los modelos basados en cultivos celulares tienen una vida útil limitada. Así, las células en cultivo pasan por diferentes fases de diferenciación, y requieren de manipulación continua para mantener las propiedades que las hacen un modelo adecuado. Estas limitaciones en la manipulación y generación de los diferentes modelos celulares *in vitro* los hacen de difícil implementación para los usuarios ocasionales, y en general limitan la comercialización de los modelos en su formato final.

A esto se añade que, durante el transporte de líneas celulares, la supervivencia celular disminuye con el paso de las horas, lo que hace que el transporte de determinadas líneas celulares sea inviable para su explotación comercial en un formato "ready-to-use" (listo para su uso). Es por ello necesario el desarrollo de sistemas y/o medios de transporte de líneas celulares que permitan mejorar los tiempos y tasas de supervivencia celulares para facilitar el almacenamiento y transporte y, por tanto, la comercialización de estos modelos celulares "ready-to-use".

Existen algunos antecedentes que describen soluciones para mejorar el transporte de líneas celulares como por ejemplo el documento EP1650292. Sin embargo, el sistema y procedimientos de transporte descritos en este antecedente no son óptimos para el transporte de todos los tipos de líneas celulares. Por ejemplo, la línea celular HEK-293 se muestra muy sensible y difícilmente tiene una viabilidad superior a las 24 horas lo cual hace imposible su explotación comercial en formato "ready-to-use".

Existe por tanto la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de transporte de líneas celulares que permitan alargar las tasas de supervivencia y viabilidad de las líneas celulares más sensibles como las HEK-293 más allá de las 48 horas y preferiblemente más allá de las 72 horas de modo que este tipo de células pueda ser comercializadas en un formato "ready-to-use".

Algunas otras soluciones requieren condiciones hipotérmicas especiales para el transporte de células, como las soluciones proporcionadas en Evans et al. Cell Biol. Int., 1994, Vol.18 (11): 999 y el documento US2009042289.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de transporte de líneas celulares que permitan alargar las tasas de supervivencia y viabilidad de las líneas celulares más sensibles, como la HEK-293, más allá de las 48 horas y preferiblemente más allá de las 72 horas para que este tipo de células puedan comercializarse en un formato "ready-to-use".

La presente invención proporciona un sistema para el almacenamiento y transporte *in vitro* que permite la supervivencia y viabilidad de diversas líneas celulares, y de manera particular de la línea celular HEK-293, por periodos superiores a las 72 horas e incluso de hasta 96 horas lo cual permite en principio el transporte de estos tipos celulares en formato "ready-to use" a cualquier continente. El sistema de la presente invención se ha mostrado especialmente adecuado y útil para el transporte células HEK-293 y también de líneas celulares Caco-2.

Objeto de la invención

El objeto principal de la invención es un sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de líneas celulares que comprende:

- a) un medio de transporte celular que comprende:

- i. de 78 % a 88,5 % en volumen de Medio basal Leibovitz L-15
- ii. de 8 % a 12 % en volumen de FBS
- iii. de 2,5 % a 6 % en volumen de HEPES
- iv. de 0,5 % a 2 % en volumen de Glutamina
- v. de 0,5 % a 2 % en volumen de una mezcla de penicilina y estreptomicina

b) una matriz de gelatina solidificada de 10-50 mg de gelatina por ml de medio de transporte.

A partir de ahora, se hará referencia a este sistema de almacenamiento y/o transporte como el sistema de la invención.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para el almacenamiento y/o transporte *in vitro* de líneas celulares basado en el uso del sistema de la invención. Se hará referencia a este procedimiento como procedimiento de la invención.

Un objeto adicional se refiere a un kit que comprende el sistema de la invención y un soporte para la inmovilización de la línea celular a transportar. Este se denominará como kit de la invención.

Un último objeto de la invención viene representado por el uso del sistema de la invención para el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares y de manera preferente para el transporte de líneas HEK-293 y Caco-2.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Comparativa acerca de la viabilidad celular de HEK-293 mock tras su exposición al sistema de transporte de la invención frente al medio habitual (D6046) para el cultivo de estas células.

Figura 2: Comparativa acerca de la viabilidad celular de HEK-293 MATE1 tras su exposición al sistema de transporte de la invención frente al medio habitual (D6046) para el cultivo de estas células.

Figura 3: Comparativa sobre el mantenimiento de la integridad de la monocapa celular en células Caco-2 tras su exposición al sistema de transporte de la invención frente al sistema actual de transporte de células Caco-2 (CacoReady).

Descripción detallada de la invención

Sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de líneas celulares

El aspecto principal de la invención se refiere a un sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de líneas celulares que comprende:

a) un medio de transporte celular que comprende:

- i. de 78 % a 88,5 % en volumen de Medio basal Leibovitz L-15
- ii. de 8 % a 12 % en volumen de FBS
- iii. de 2,5 % a 6 % en volumen de HEPES
- iv. de 0,5 % a 2 % en volumen de Glutamina
- v. de 0,5 % a 2 % en volumen de una mezcla de penicilina y estreptomicina

b) una matriz de gelatina solidificada de 10-50 mg de gelatina por ml de medio de transporte.

De una manera más particular y preferente, el sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de la invención comprende:

El sistema de almacenamiento y transporte de la presente invención ha demostrado de manera sorprendente la capacidad de mantener la viabilidad celular más allá de las 72 horas. Para el caso de las células HEK-293 que, hasta la fecha no soportaban trayectos superiores a las 24 horas, se han observado tasas de supervivencia celular de como mínimo el 80% a las 96 horas. En el caso de células Caco-2 se ha observado que el sistema de almacenamiento y transporte de la presente invención permite el transporte a temperatura ambiente de las células, manteniendo la integridad de la monocapa inalterada hasta por lo menos 11 días.

El pH es uno de los parámetros principales que afecta a la viabilidad de las líneas celulares y, de manera particular, a las células HEK-293 y Caco-2. Los autores de la invención han observado, que la acción conjunta del HEPES, que es un agente tamponador, junto con la acción del medio basal Leibovitz L-15 proporcionan al sistema de la invención la capacidad de mantener un pH fisiológico estable de modo que la supervivencia y viabilidad celular se ven notablemente mejoradas.

Otro de los elementos esenciales del sistema de almacenamiento y transporte de la invención es la matriz de gelatina solidificada. Esta permite la protección de las células, así como la preservación de sus propiedades funcionales. La gelatina también garantiza un correcto intercambio gaseoso de las células.

Cualquier tipo de sustancia gelificante natural o comercial puede usarse en el contexto del sistema de la invención,

aunque de manera preferente la gelatina utilizada es gelatina de tipo A.

Como se ha comentado anteriormente, el sistema de la invención permite el transporte de cualquier tipo celular, pero es especialmente adecuado para el almacenamiento y transporte de líneas celulares particularmente sensibles a situaciones de estrés. En este sentido, el sistema está adaptado y es especialmente adecuado para el transporte de células HEK-293, así como de células Caco-2.

Para el uso del sistema de la invención, las células deben ser primero inmovilizadas en un soporte para su transporte. Cualquier tipo de soporte que permita el transporte de células puede ser usado. En una realización particular, el soporte se selecciona entre una placa de Petri, una placa de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular como, por ejemplo, un recubrimiento con colágeno, polilisina u otros elementos similares.

Cuando las células alcanzan su estado funcional apropiado y el estado de confluencia adecuado es cuando están listas para ser recubiertas con el sistema de la invención. En el contexto de la presente invención se entiende por estado funcional adecuado, el estado que presentan las células viables del cultivo cuando son capaces de realizar la función que tienen asignada para el ensayo para el cual están destinadas. En el momento en que alcanzan dicho estado funcional adecuado y la confluencia apropiada, es cuando se añade el sistema de la invención que garantiza que gracias a la gelatina, las células quedarán perfectamente inmovilizadas y mantendrán su estado funcional hasta que lleguen a su destino final. La gelatina limita y reduce el estrés mecánico al que se ven sometidas las células en el proceso de transporte.

Gracias a la acción conjunta del medio de transporte que reduce el estrés fisiológico, así como de la gelatina que reduce el estrés mecánico de las células, se produce un efecto sinérgico que proporciona las condiciones de transporte adecuadas para que las células lleguen a su destino en su estado funcional óptimo.

El sistema de la presente invención tiene la ventaja de que no requiere condiciones especiales de transporte y, de hecho, permite el transporte de las líneas celulares a temperatura ambiente. Esto representa una ventaja frente a otros sistemas que requieren refrigeración o condiciones especiales para su transporte.

Procedimiento para el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para el almacenamiento y/o transporte *in vitro* de líneas celulares que comprende:

A) cubrir una línea celular inmovilizada en un soporte con un sistema que comprende:

a) un medio de transporte celular que comprende:

- i. Medio basal Leibovitz L-15
- ii. FBS
- iii. HEPES
- iv. Glutamina
- v. mezcla de penicilina y estreptomina

b) una matriz de gelatina.

B) solidificar la matriz de gelatina a una temperatura de entre 15 y 25°C

C) almacenar y/o transportar la línea celular a una temperatura de entre 15 y 25°C por un periodo de hasta 96 horas.

En una realización particular, el procedimiento comprende usar:

a) un medio de transporte celular que comprende:

- i. 78% a 88,5% a en volumen de Medio basal Leibovitz L-15
- ii. 8% a 12% en volumen de FBS
- iii. 2,5% a 6% en volumen de HEPES
- iv. 0,5% a 2% en volumen de Glutamina
- v. 0,5% a 2% en volumen de una mezcla de penicilina y estreptomina

b) una matriz de 10 a 50 mg de gelatina por ml de medio de transporte.

La primera etapa del procedimiento (etapa A) está dirigida a preparar y acomodar el cultivo celular que va a ser objeto del traslado. Para ello antes de cubrir las células con el sistema de la invención, estas se siembran a la densidad determinada para cada tipo celular. En función del tipo de ensayo al que se destinen, las líneas celulares se siembran

en un tipo de soporte u otro. El cultivo debe mantenerse durante el tiempo necesario hasta que alcance del estado funcional y la confluencia adecuados, con cambios de medio preferiblemente cada 48-72 horas si fuera necesario.

5 Aunque se puede usar cualquier soporte adecuado para el transporte celular, de manera particular el soporte utilizado se selecciona entre una placa de Petri, una placa de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular como por ejemplo un recubrimiento con colágeno, polilisina u otros elementos similares.

10 Una vez alcanzado el estado funcional adecuado es cuando se procede a cubrir la línea celular con el sistema de la invención que comprende el medio de transporte y la solución de gelatina que debe estar en estado líquido de acuerdo con la etapa A del procedimiento. La solución de gelatina se prepara disolviendo gelatina en el propio medio de transporte que actúa como disolvente. Gracias al empleo del medio de transporte como disolvente se consigue que la línea celular almacenada y/o transportada de acuerdo con el procedimiento de la presente invención preserve las propiedades funcionales del cultivo de modo que pueda usarse de manera inmediata una vez alcanzado su destino final.

15 Cualquier tipo de sustancia gelificante natural o comercial puede usarse en el contexto del sistema de la invención, aunque de manera preferente la gelatina utilizada es gelatina de tipo A.

En la etapa B), la matriz de gelatina queda solidificada a una temperatura de entre 15 y 25°C y las células quedan así inmovilizadas y estabilizadas. La capa de gelatina representa una protección física para las células y les permite soportar mejor el estrés mecánico que puede producir el proceso de transporte.

20 El transporte (etapa C) se realiza a temperatura de entre 15 y 25°C y permite tránsitos superiores a 48 horas preferiblemente superiores a 72 horas y de manera preferente de hasta 96 horas o más dependiendo del tipo celular.

25 Una vez llegado a su destino y en el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células hasta la completa licuación de la misma, preferiblemente a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 1.5 a 4 horas. A continuación, se elimina mediante aspiración y se aplica el medio de cultivo específico para las células en cuestión y se incuban estas últimas a 37°C en 90% humedad/5% CO₂ hasta su uso.

Aunque el procedimiento de la presente invención es aplicable a cualquier tipo de línea celular, es especialmente adecuado para el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares seleccionadas entre HEK-293 y Caco-2.

Kit para el transporte de líneas celulares

30 En otro aspecto la presente invención se relaciona con un kit para el transporte y almacenamiento *in vitro* de líneas celulares que comprende:

- a. Un sistema de almacenamiento y/o transporte *in vitro* de líneas celulares de acuerdo con la invención,
- b. Un soporte para la inmovilización de la línea celular que se desee transportar.

35 El sistema de almacenamiento y transporte celular del kit de la invención comprende tanto el medio de transporte como la matriz de gelatina en los términos y parámetros anteriormente descritos.

40 En cuanto al soporte, el kit puede incluir cualquier soporte adecuado para el transporte celular, aunque en una realización preferente el soporte utilizado se selecciona entre una placa de Petri, una placa de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular como, por ejemplo, un recubrimiento con colágeno, polilisina u otros elementos similares.

El kit de la presente invención es en principio útil para el transporte de cualquier tipo de línea celular, aunque es especialmente adecuado para el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares seleccionadas entre HEK-293 y Caco-2.

Uso

Un último aspecto de la invención viene representado por el uso del sistema de la invención.

Aunque el sistema de la invención permite en principio el almacenamiento y/o transporte de cualquier línea celular ha sido especialmente diseñado y desarrollado para el transporte de las líneas celulares más sensibles a situaciones de estrés.

50 De manera preferente el sistema de la presente invención es de utilidad en el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares HEK-293 y Caco-2.

Se ha observado que el sistema de la invención permite mantener la viabilidad celular del 100% de las células durante 72 horas y de al menos 80% de las células a las 96 horas o más dependiendo del tipo celular. Por ello el sistema de la invención permite el envío y transporte de células y particularmente de células sensibles como HEK- 293 y Caco-2 a prácticamente cualquier lugar de cualquier continente.

- 5 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención, pero en ningún caso pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: viabilidad celular de células HEK-293 mock y HEK-293 MATE1

- 10 Se llevaron a cabo una serie de ensayos en células HEK-293 mock y HEK-293 MATE1 para testar la viabilidad celular a las 72 horas (3 días) y 96 horas (4 días) utilizando diferentes medios de transporte. Como se observará, en este estudio comparativo se demostró el efecto de supervivencia mejorada de la composición de transporte de la invención frente al medio de mantenimiento utilizado habitualmente para este tipo de células (medio de transporte inicial).

Se ensayaron las siguientes formulaciones:

Medio de transporte inicial sin Hepes (D6046 + 0%H):

- 15 DMEM D6046 Bajo en glucosa 85,5% (Sigma);
FBS 10% (Biowest);
L-Glutamina 1% (Lonza);
Pen/Strep 1% (Lonza); y
Gelatina Tipo A 25mg/ml (Sigma).

Medio de transporte inicial + Hepes 5% (D6046 + 5%H):

- 20 DMEM D6046 Bajo en glucosa 80,5% (Sigma);
FBS 10% (Biowest);
Hepes 5% (Gibco);
L-Glutamina 1%(Lonza);
25 Pen/Strep 1%(Lonza); y
Gelatina Tipo A 25mg/ml (Sigma).

Nuevo medio de transporte sin Hepes (L15 + 0%H):

- 30 Medio Leibovitz L-15 85,5% (Sigma);
FBS 10% (Biowest);
Glutamina 1% (Lonza);
Penicilina-Estreptomicina 1% (Lonza); y
Gelatina Tipo A 25mg/ml (Sigma).

Nuevo medio de transporte + Hepes 5% (L15 + 5%H):

- 35 Medio Leibovitz L-15 80,5% (Sigma);
FBS 10% (Biowest);
Hepes 5% (Gibco);
Glutamina 1% (Lonza);
Penicilina-Estreptomicina 1% (Lonza); y
Gelatina Tipo A 25 mg/ml (Sigma).

NOTA: % volumen/volumen

- 40 El estudio comparativo se ha realizado sobre las células. La siembra tanto de las células HEK-293 mock y HEK-293 MATE1 se realizó a una densidad de 50.000 células/pocillos en placa de 96 pocillos con recubrimiento de Poli-D-Lisina. A las 24 horas de la siembra, habiendo llegado a total confluencia, se les retiró el medio y se les añadió 200 µl/pocillo de medio de transporte. La placa se dejó atemperar dentro de la cabina de flujo, se precintó con parafilm y posteriormente se introdujo en la cámara climática a 23°C. Se licuaron las placas tras tiempos de exposición al medio de transporte de 72 y 96 horas. El medio de transporte es licuado introduciendo las placas a 37°C en el incubador de CO2 durante 90 minutos. Una vez licuada la gelatina, el medio de transporte se retiró y se aplicó medio de mantenimiento HEK-293 (100 µl/pocillo).

Transcurridas 24 horas, se ensayó la viabilidad celular mediante Alamar Blue (110 µl/pocillo Alamar Blue 10% en medio de mantenimiento HEK-293, 2h incubación en incubador CO₂).

- 50 El porcentaje de viabilidad celular se calculó respecto a los valores netos de RFU (Relative Fluorescence Units) de células control a tiempo cero previo a la aplicación del medio de transporte (MT):

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 * (\text{RFU neto post-MT}) / (\text{RFU neto pre-MT})$$

Las diferencias significativas entre grupos fueron comprobadas mediante la prueba t de Student (*unpaired*). Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En las siguientes tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los ensayos comparativos tanto para células HEK-293 mock y HEK-293 MATE1. Los resultados también pueden visualizarse en la figura 1 (HEK-293 mock) y la figura 2 (HEK-293 MATE1).

Tabla 1

Células HEK-293 mock			
72 horas de exposición			
Grupo 1	Grupo 2	Valor p	Estadísticamente Significativo
D60+0%H	L15+0%H	3,5471 E-11	Extremadamente
D60+5%H	L15+0%H	0,46483386	No
D60+0%H	L15+5%H	2.3528E-08	Extremadamente
D60+5%H	L15+5%H	0,00882694	muy
L15+0%H	L15+5%H	0,01120801	significativo

96 horas de exposición			
Grupo 1	Grupo 2	Valor p	Estadísticamente Significativo
D60+0%H	L15+0%H	2,2275E-08	Extremadamente
D60+5%H	L15+0%H	0,66333988	No
D60+0%H	L15+5%H	1.5208E-10	Extremadamente
D60+5%H	L15+5%H	1.6274E-06	Extremadamente
L15+0%H	L15+5%H	2.993E-05	Extremadamente

Los resultados con células HEK-293 mock demuestran ya a las 72 horas que las diferencias entre usar un medio basal Leibovitz L15 frente DMEM D6046 sin la presencia de tampón HEPES proporciona una clara mejora de la supervivencia. Esta diferencia se minimiza cuando se añade HEPES al medio DMEM D6046 pero no al medio basal Leibovitz L15. Sin embargo, una vez se añade HEPES al medio L15 se observa que las diferencias con el medio DMEM D6046 son muy significativas. También se observa una diferencia significativa en la comparativa entre el medio L15 con o sin HEPES. Lo que indica la importancia de este tampón en la supervivencia

celular. No obstante, lo que sugieren estos resultados leídos de manera conjunta es que en la supervivencia a las 72 horas de las células HEK-293 mock es de vital importancia la combinación de medio basal Leibovitz L15 y del tampón HEPES.

A las 96 horas los resultados son similares, aunque las diferencias se acentúan de modo que el uso de medio basal Leibovitz L15 con 5% HEPES aumenta la viabilidad celular de manera extremadamente significativa frente al resto de controles.

Tabla 2

Células HEK-293 MATE1			
72 horas exposición			
Grupo 1	Grupo 2	valor p	Estadísticamente Significativo
D60+0%H	L15+0%H	5,9771 E-05	Extremadamente
D60+5%H	L15+0%H	0,0913461	No
D60+0%H	L15+5%H	6,2158E-08	Extremadamente
D60+5%H	L15+5%H	5.1036E-05	Extremadamente
L15+0%H	L15+5%H	0,00603245	Muy
96 horas exposición			
Grupo 1	Grupo 2	valor p	Estadísticamente Significativo
D60+0%H	L15+0%H	4.3599E-08	Extremadamente
D60+5%H	L15+0%H	0,00270635	Muy
D60+0%H	L15+5%H	2.8354E-06	Extremadamente
D60+5%H	L15+5%H	2.8354E-06	Extremadamente
L15+0%H	L15+5%H	0,00062192	Muy

Los resultados en células HEK-293 MATE1 a las 72 horas son similares a los resultados células HEK-293 mock pero se observa que el impacto del HEPES en la supervivencia es más importante en todas las comparativas.

- 5 A las 96 horas se observa un patrón similar, aunque lo que se deduce es que la importancia relativa del medio basal L15 en la supervivencia de HEK-293 MATE1 es más importante dentro del sistema de la invención que para las células HEK-293 mock. Esto no implica que no tenga importancia el HEPES en la supervivencia a las 96 horas, pero de nuevo sugiere el efecto sinérgico entre el uso del medio basal Leibovitz L15 junto con el tampón HEPES en la mejora significativa de la viabilidad celular tanto a las 72 como a las 96 horas en células HEK-293 MATE1 y en células HEK-293 mock.

En conclusión, la composición L15+5% HEPES ensayada permite el transporte a temperatura ambiente de las células, manteniendo la viabilidad celular sustancialmente inalterada hasta 4 días.

Tras 4 días de exposición a temperatura ambiente, el medio de transporte basado en L15 + 5% HEPES mantiene una viabilidad celular del 100% y 80% de HEK-293 mock y MATE1 respectivamente.

Ejemplo 2: evaluación de la integridad celular en células Caco-2

Se llevaron a cabo una serie de ensayos para evaluar la integridad de la capa celular en células Caco2 a los 4 días (96 horas) y 11 días (264 horas) utilizando diferentes medios de transporte. El medio de transporte actualmente disponible permite trayectos por un periodo máximo de 4 días por eso se quería testar si el sistema de transporte de la presente invención podía superar esta barrera de tiempo. Como se observará en este estudio comparativo, se demostró el efecto de supervivencia mejorada de la composición de transporte de la invención frente al medio actual. Para ello se evaluó la integridad celular de la monocapa después del periodo de ensayo mediante la medida de la resistencia transepitelial de la monocapa celular (TEER).

Se ensayaron las siguientes formulaciones:

Composición de transporte actual (SM CR):

- DMEM Bajo en glucosa 85,5% (Sigma);
- FBS 10% (Biowest);
- 5 • L-Glutamina 1% (Lonza); y
- Penicilina-Estreptomicina 1%(Lonza);
- Gelatina Tipo A 25mg/ml (Sigma).

Composición de transporte de la invención (SM L15):

- 10 • Medio L-15 (Leibovitz) con L-glutamina 80,5% (Sigma);
- FBS 10% (Biowest);
- Hepes 5% (Gibco);
- L-Glutamina 1% (Lonza);
- Penicilina-Estreptomicina 1% (Lonza); y
- Gelatina Tipo A 25mg/ml (Sigma).

15 Medio de mantenimiento Caco (utilizado para la siembra y mantenimiento de las placas):

- DMEM Bajo en glucosa (D6046 Sigma)
- FBS 10% (Biowest)
- L-Glutamina 1% (Lonza)
- Penicilina-Estreptomicina 1% (Sigma)

20 NOTA: % volumen/volumen

Para llevar a cabo el ensayo se usaron los siguientes equipos:

- 25 Cabina biológica
- Incubador CO2
- Cámara climática
- Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter - EVOM2
- STX100C96 electrodo específico para medir la resistencia eléctrica transepitelial en placa de 96 pocillos transwells de la marca Corning

El estudio comparativo se realizó sobre las células Caco2, y siguiendo el procedimiento de fabricación estipulado internamente para el producto CacoReady 96-wells.

30 Se realizó siembra celular a densidad de 11.000 células/pocillo en 4 placas de 96 pocillos (#3392, Corning). Se mantuvieron los cultivos durante 13 días, procediendo con cambios de medio cada 48 horas aproximadamente.

35 A día 14 de la siembra, habiendo llegado a total confluencia, se les retiró el medio y se les añadió 75 µl en el compartimento apical y 235 µl en el compartimento basal de medio de transporte. Las placas se dejaron atemperar dentro de la cabina de flujo, se precintaron con parafilm y posteriormente se introdujeron en la cámara climática a 23°C.

Las placas fueron licuadas tras tiempos de exposición al medio de transporte de 4 días (día 18) y 11 días (Día 25). El medio de transporte se licuó introduciendo las placas a 37°C en el incubador de CO₂ durante 4 horas. Una vez el medio de transporte se licuó, éste se retiró y se aplicó medio de mantenimiento Caco2 (75 µl/apical + 235 µl/basal).

40 Transcurridas 48 horas desde la licuación, se realizan cambios de medio cada 2 días hasta el día 25 y 32 del proceso, en los cuales se procede a medir la resistencia transepitelial de la monocapa celular (TEER) de forma aleatoria para comprobar la integridad de la barrera.

En la tabla 3, se resume el calendario:

Tabla 3

CALENDARIO						
LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
DO SIEMBRA	D1	D2	D3	D4	D5	D6

ES 2 991 102 T3

D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
D14 APPL.SM	D15	D16	D17	D18 LICUE. SM-1	D19	D20
D21	D22	D23	D24	D25 TEER SM- 1 LICUE. SM-2	D26	D27
D28	D29	D30	D31	D32 TEER SM- 2		

■ SM-1: proceso actual - 4 días de exposición

■ SM-2: proceso testado - 11 días de exposición

La resistencia transepitelial se calcula respecto a los valores netos de TEER por el área de la membrana del pocillo de siembra.

$$TEER = \Omega \cdot cm^2$$

- El área de la membrana para la referencia #3392 de Corning 96-wells es igual a 0,143 cm²
- Las especificaciones del producto CacoReady establecen un estado correcto de la monocapa celular para una medida de TEER > 500 $\Omega \cdot cm^2$

Los resultados obtenidos sobre la resistencia transepitelial de las monocapas celulares para el medio de transporte actual (SM CR) así como para el sistema de transporte de la presente invención (SM L15) se detallan en la tabla 4 para los periodos de 4 días y 11 días respectivamente. Estos resultados se detallan asimismo de forma gráfica en la figura 3.

Tabla 4

		LECTURAS TEH [^] (Ω)						Promedio (Ω)	$\Omega \cdot cm^2$	DT
EXP 4D	SM CR	12762	10641	12240	10420	12071	11500	1160567	1624,79	129,88
	SM L15	10699	9710	11488	11520	11401	11308	1102100	1542,94	99,32
EXP 11D	SM CR	2250	1570	1740	1200	925	976	1443,50	202,09	71,42
	SM L15	12600	13200	13450	12550	12240	11350	12565,00	1759,10	104,20

Como se puede observar el medio actual de transporte (SM CR) no permite mantener la integridad de la monocapa por un periodo de 11 días ya que los resultados de TEER se encuentran fuera de la especificación límite establecida.

Por el contrario, estos resultados demuestran que el sistema de la presente invención (SM L15) permite el transporte a temperatura ambiente de las células Caco2 manteniendo la integridad de la monocapa inalterada hasta por lo menos 11 días, lo cual representa una mejora significativa respecto a la composición actualmente existente.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de almacenamiento y transporte *in vitro* de líneas celulares que comprende:
 - a) un medio de transporte celular que comprende:
 - i. Medio basal Leibovitz L-15
 - ii. FBS
 - iii. HEPES
 - iv. Glutamina
 - v. mezcla de penicilina y estreptomicina
 - b) una matriz de gelatina solidificada.
2. Sistema de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
 - a) un medio de transporte celular que comprende:
 - i. 78% a 88,5% a en volumen de Medio basal Leibovitz L-15
 - ii. 8% a 12% en volumen de FBS
 - iii. 2,5% a 6% en volumen de HEPES
 - iv. 0,5% a 2% en volumen de Glutamina
 - v. 0,5% a 2% en volumen de una mezcla de penicilina y estreptomicina
 - b) una matriz de 10 a 50 mg de gelatina por ml de medio de transporte solidificada.
3. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las líneas celulares se seleccionan entre HEK-293 y Caco-2.
4. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la matriz solidificada es de gelatina de tipo A.
5. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la línea celular se inmoviliza en un soporte para su transporte.
6. Sistema de acuerdo con la reivindicación 5 donde el soporte se selecciona entre una placa de Petri, placas de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular.
7. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el transporte se realiza a temperatura ambiente.
8. Procedimiento para el almacenamiento y/o transporte *in vitro* de líneas celulares que comprende:
 - A) cubrir una línea celular inmovilizada en un soporte con un sistema que comprende:
 - a) un medio de transporte celular que comprende:
 - i. Medio basal Leibovitz L-15
 - ii. FBS
 - iii. HEPES
 - iv. Glutamina
 - v. mezcla de penicilina y estreptomicina
 - b) una matriz de gelatina;
 - B) solidificar la matriz de gelatina a una temperatura de entre 15 y 25°C;
 - C) almacenar y/o transportar la línea celular a una temperatura de entre 15 y 25°C por un periodo de hasta 96 horas.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 donde el sistema comprende:
 - a) un medio de transporte celular que comprende:
 - i. 78% a 88,5% a en volumen de Medio basal Leibovitz L-15

- ii. 8% a 12% en volumen de FBS
 - iii. 2,5% a 6% en volumen de HEPES
 - iv. 0,5% a 2% en volumen de Glutamina
 - v. 0,5% a 2% en volumen de una mezcla de penicilina y estreptomicina
- 5 b) una matriz de 10 a 50 mg de gelatina por ml de medio de transporte.
- 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 donde el soporte se selecciona entre una placa de Petri, placas de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular.
- 10 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la matriz solidificada es de gelatina de tipo A.
- 12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las líneas celulares almacenadas y/o transportadas se seleccionan entre HEK-293 y Caco-2.
- 13. Un kit para el transporte y almacenamiento *in vitro* de líneas celulares que comprende:
- 15 a. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6- 7.
- b. Un soporte para la inmovilización de la línea celular.
- 14. Un kit de acuerdo con la reivindicación 13 que donde el soporte se selecciona entre una placa de Petri, placas de múltiples pocillos, insertos de membrana para transwells, sistemas biomiméticos, soportes sintéticos para cultivos 3D, placas de vidrio, portaobjetos o cualquier tipo de soporte sometido a recubrimiento previo para facilitar la adhesión celular.
- 20 15. Uso de un sistema de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 para el almacenamiento y/o transporte de líneas celulares, preferentemente líneas celulares HEK-293 y Caco-2

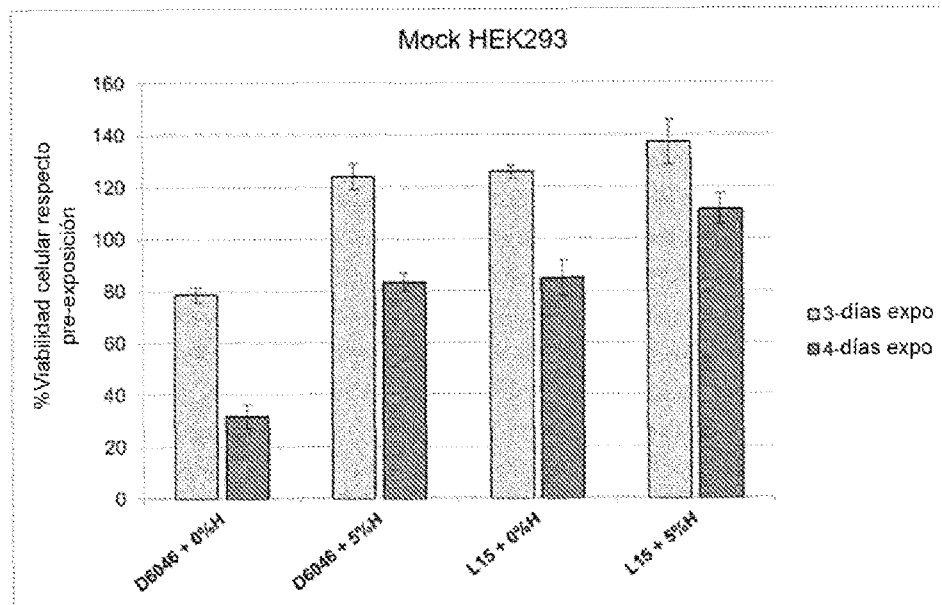


Fig. 1

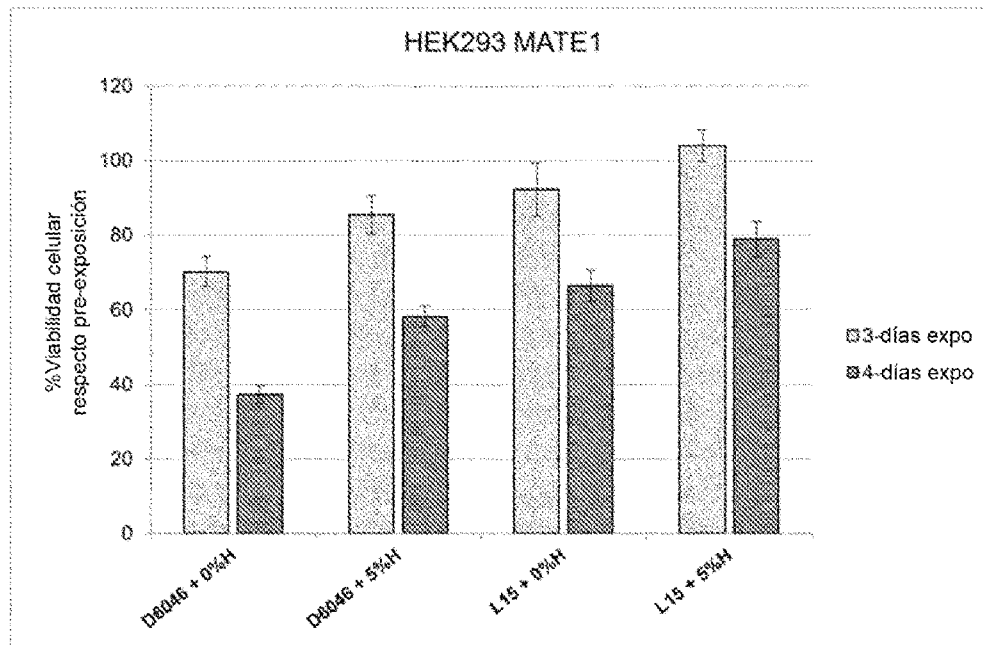


Fig. 2

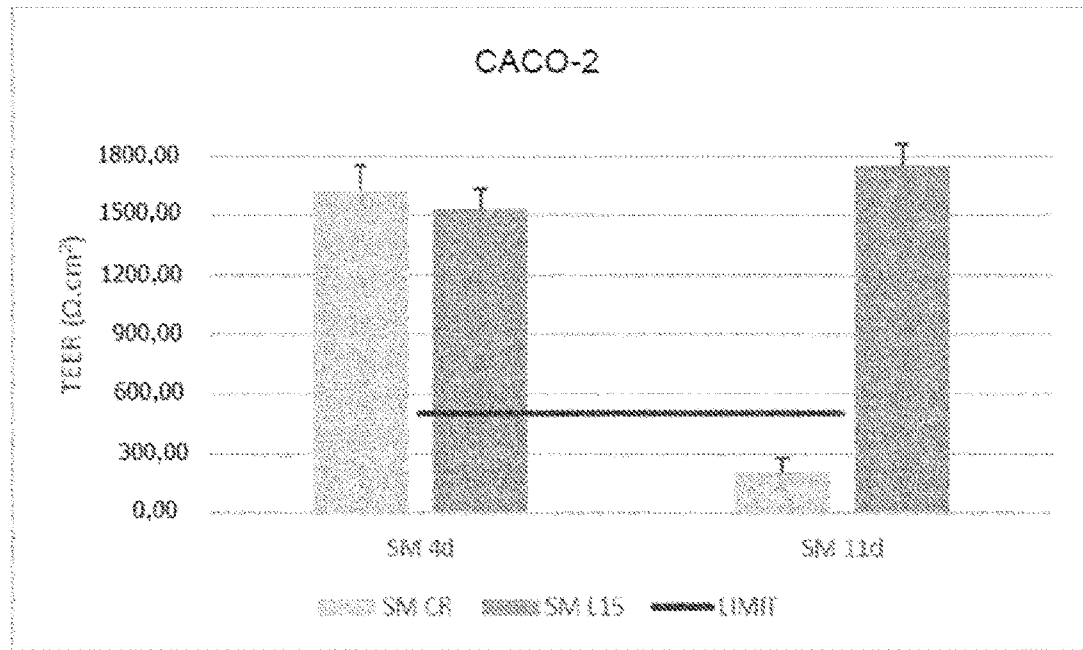


Fig. 3