



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 969**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03753734 .7**
96 Fecha de presentación : **03.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1551954**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

54 Título: **Cultivo celular.**

30 Prioridad: **03.10.2002 GB 0222846**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Plasticell Limited**
10 Sydney Street
London SW3 6PP, GB

72 Inventor/es: **Choo, Yen**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 307 969 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

Cultivo celular.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al cultivo celular, y en particular al cultivo de células primarias, líneas celulares, células pluripotentes, células totipotentes y células madre y a la regulación de los diversos procesos celulares de las mismas mediante la modulación de las condiciones del cultivo celular. La invención se refiere a la utilización de múltiples etapas de cultivo bajo una pluralidad de condiciones con el fin de modular las rutas celulares, y proporciona procedimientos para determinar el efecto de diversos múltiples regímenes de etapas de cultivo sobre los procesos celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación y la actividad metabólica.

Antecedentes de la invención

15 Durante los últimos años, el cultivo celular se ha convertido en una tecnología central en las ciencias de la vida. Se describe el cultivo celular en “Basic Cell Culture”, Oxford University Press, 2002, editor J.M. Davis, y “Animal Cell Culture”, Oxford University Press, 2000, editor John R.W. Masters. El cultivo celular proporciona la base para estudiar procesos celulares, tales como la viabilidad, fenotipo, genotipo, proliferación y diferenciación de las células, y la formación de moléculas biológicas, intermediarios y productos. También se ha proporcionado el medio para estudiar la regulación de dichos procesos, desde el nivel genético (aisladamente o en animales transgénicos completos) hasta el nivel de las moléculas individuales de proteína. Aunque ha contribuido enormemente al estado actual de la biología, en muchos aspectos el cultivo celular sigue siendo una disciplina en desarrollo, aunque es una ciencia inesperadamente excitante que en última instancia ofrece las posibilidades de la terapia genética y la ingeniería de tejidos.

25 Un objetivo importante del cultivo celular es ofrecer la posibilidad de cultivar una amplia diversidad de células *in vitro*. La lista de diferentes tipos celulares que pueden cultivarse es extensa (ver la American Type Culture collection, <http://www.atcc.org>; European Collection of Cell Cultures, <http://www.ecacc.org.uk>; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <http://www.dsmz.de>) incluye representantes de la mayoría de tipos celulares y continúa creciendo a medida que se descubren más condiciones de cultivo. A pesar del constante avance de la técnica, el procedimiento para determinar las condiciones de cultivo adecuadas para los nuevos tipos celulares sigue siendo totalmente empírico: las condiciones de crecimiento prácticamente siempre se descubren por ensayo y error. La elección del punto de partida con frecuencia se basa en lo utilizado anteriormente por otros para células similares, o incluso en lo que se utiliza actualmente en el laboratorio para células diferentes. En muchas ocasiones éstos simplemente resultarán totalmente inadecuados y debe iniciarse nuevamente un proceso de ensayo y error. Incluso cuando las nuevas condiciones de cultivo resultan exitosas, resulta conveniente recordar que las adaptaciones a protocolos anteriores habrán introducido un condicionamiento histórico en el experimento. Por ejemplo, muchos de los experimentos tempranos de cultivo de tejidos realizaron un uso extensivo de los fibroblastos, y hasta el momento la mayoría de condiciones estándares de cultivo celular favorecen el crecimiento de las células derivadas del mesodermo (fibroblastos, endotelio, mioblastos). El desarrollo de medios de crecimiento selectivos para las células epiteliales y para otros tipos celulares basado en dichas condiciones resultó un reto. Para algunos de dichos tipos celulares en la actualidad es conocido que el suero, un componente normal de muchos medios de cultivo para las células mesodérmicas, de hecho inhibe el crecimiento. Un aspecto de la invención descrito en la presente memoria es un procedimiento para desarrollar condiciones de cultivo adecuadas que proporcionen viabilidad, proliferación o crecimiento, y la retención del fenotipo de los tipos celulares particulares.

Además de las condiciones que favorecen la proliferación celular, una etapa particularmente importante en el cultivo moderno de tejidos consiste en poder controlar o dirigir la diferenciación de las células hacia un fenotipo particular. Debido a que la propagación de las líneas celulares quiere que se incremente el número de células, la amplia mayoría de condiciones de cultivo se han desarrollado para favorecer la máxima proliferación celular. No resulta inesperado que estas condiciones no resulten conducentes a la diferenciación celular, en la que el crecimiento celular con frecuencia se encuentra limitado o incluso impedido. Las condiciones que favorecen la proliferación celular son, de manera general, la densidad celular reducida, la concentración reducida de Ca^{2+} y la presencia de factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Por otra parte, la citostasis y la diferenciación resultan estimuladas en condiciones de elevada densidad celular, elevada concentración de Ca^{2+} y presencia de inductores de diferenciación, tales como hormonas (por ejemplo hidrocortisona), factores paracrinos (por ejemplo IL-6, KGF, NGF), retinoides e incluso compuestos polares planares, tales como dimetilsulfóxido (DMSO). Por lo tanto, pueden resultar necesarias diferentes condiciones para la propagación y para la diferenciación de una línea celular particular, y evidentemente estas condiciones respectivas pueden ser diferentes en células de diferentes linajes. Un segundo aspecto de la invención descrita en la presente memoria es un procedimiento para descubrir condiciones de cultivo adecuadas que permitan la diferenciación selectiva de las células.

Algunos problemas comunes que todavía se producen en el cultivo celular son la vida limitada de las líneas celulares primarias, la modificación de las características de las líneas celulares con los pasajes y la transformación de las mismas acompañada por la pérdida de características celulares interesantes. Estos efectos limitan severamente la utilidad de las células cultivadas para la utilización en experimentos o ensayos, por ejemplo los ensayos basados en células descritos a continuación. Las células primarias, es decir, las células recién aisladas de los tejidos, ofrecen claramente

los modelos de cultivo celular más exactos, debido a que se comportan de una manera que resulta aproximadamente similar al tejido de origen de las mismas. Resulta destacable que todavía no se haya desarrollado un procedimiento fiable de cultivo de células primarias y en consecuencia dichas células muestran una vida limitada *in vitro*. Lo anterior representa una limitación técnica grave, por ejemplo al intentar amplificar el cultivo primario, o al intentar llevar a cabo un experimento de más largo plazo. Otro problema asociado a la utilización de cultivos primarios es que, debido a que requieren un aislamiento reciente constante, puede resultar difícil determinar el origen del material primario, particularmente de seres humanos, y también resulta difícil obtener líneas que se comporten consistentemente. Por lo tanto, un tercer aspecto de la invención es un procedimiento para cultivar células primarias con el fin de obtener cultivos viables con una vida prolongada.

Si los cultivos primarios se mantienen *in vitro* durante un periodo prolongado, normalmente experimentan una crisis en la que la mayoría de las células muere. Sin embargo, las células supervivientes presentan una vida más larga y pueden cultivarse indefinidamente. La mayoría de dichas líneas celulares continuas prácticamente en todos los casos constituyen malas representaciones de la célula tal como se encuentra en los tejidos animales intactos. Un motivo para esto se basa en el hecho de que el procedimiento que permite que las células adquieran inmortalidad también afecta a las características de la célula. Por ejemplo, la mayoría de cultivos celulares establecidos han dejado de expresar genes específicos de tejido y por el contrario únicamente expresan genes de mantenimiento requeridos para el crecimiento continuo en cultivo celular. En consecuencia, la mayoría de dichas líneas celulares resultan más similares entre sí que al tejido del que se obtuvieron originalmente. Por ejemplo, la mayoría de líneas de células hepáticas han dejado de expresar enzimas metabolizadores de fármacos que normalmente las convertiría en herramientas interesantes para el ensayo de la toxicidad de fármacos. Otro aspecto de la invención descrito en la presente memoria es un procedimiento para cultivar células de manera que proporcionen modelos más exactos de los tejidos. Esto a su vez mejora la fiabilidad y poder predictivo de los experimentos y ensayos basados en células.

Existe una necesidad en la técnica de técnicas mejoradas para cultivar células y procedimientos para descubrir y poner en práctica dichas técnicas para la regulación de procesos celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación, la actividad metabólica y la expresión fenotípica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevas técnicas de cultivo de tejidos que se basan en la percepción de que el cultivo celular se entiende mejor como un proceso dinámico que implica etapas de cultivo en serie llevadas a cabo en una secuencia definida para alcanzar un efecto deseado. La invención reconoce que la exposición secuencial a agentes seleccionados puede explotarse para modular los procesos celulares y de esta manera conseguir un nivel de control sobre los mismos que anteriormente no podía conseguirse mediante técnicas convencionales.

La invención se refiere al problema de que las técnicas de cultivo celular que implican una pluralidad de etapas y agentes en la práctica resultan difíciles, si no imposibles, de determinar mediante experimentación convencional, que en la técnica anterior ha implicado el ensayo y error. Debido a la naturaleza incómoda del cultivo celular convencional, la determinación empírica de las condiciones de cultivo de tejidos en procedimientos multietapa complejos no resulta viable en la práctica debido a que implica cargas de trabajo masivas.

Se describe un procedimiento para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares, comprendiendo cada una, una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas,
- (b) subdividir uno o más de dichos grupos para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares,
- (c) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas adicionales,
- (d) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(c) iterativamente según resulte necesario, y
- (e) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a la que ha sido expuesta.

Ventajosamente, los grupos de células se encuentran agrupados y posteriormente se dividen. DE esta manera, también se describe un procedimiento para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula, comprendiendo las etapas siguientes:

- (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares, que comprende una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas,
- (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar por lo menos una agrupación,
- (c) subdividir la agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares,
- (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas,

ES 2 307 969 T3

(e) opcionalmente, repetir las etapas (b) a (d) iterativamente según resulte necesario, y

(f) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a la que ha sido expuesta.

5 La invención se refiere a la totalidad de los procesos celulares, incluyendo el fenotipo, el genotipo, la producción de moléculas, la viabilidad y la proliferación y diferenciación de células.

Preferentemente, la invención se utiliza para identificar condiciones que resultan en la diferenciación celular. Por ejemplo, pueden inducirse células para que se diferencien a lo largo de una ruta del desarrollo deseada, sometiendo
10 las células a condiciones de cultivo apropiadas. También se aprovecha la planificación temporal de las modificaciones de las condiciones de cultivo con el fin de definir mejor el programa de desarrollo de las células.

Entre las condiciones de cultivo se incluyen los medios de cultivo, los agentes químicos, moleculares y macro-
15 moleculares presentes en los medios de crecimiento, los regímenes de temperatura, los sustratos, las condiciones atmosféricas, la manipulación física de las células y similares.

El procedimiento mencionado anteriormente de la invención, conocido como cultivo celular combinatorial o cultivo
por división y mezcla, permite que las células se sometan a una serie de condiciones de cultivos y se expongan a una
serie de agentes en medios de cultivo de una manera sistemática y altamente productiva.

Aunque pueden utilizarse ciclos repetitivos de división y agrupación de manera altamente eficiente de manera similar
a los protocolos de química combinatorial, dado el necesario poder de procesamiento pueden utilizarse protocolos
que impliquen por lo menos dos etapas secuenciales de división (sin reagrupamiento). La desventaja de dichos
20 protocolos es que pueden generar rápidamente un número muy grande de muestras separadas, que han sido manipuladas
de manera diferente. Sin embargo, la ventaja es que cada muestra no requiere una laboriosa deconvolución, debido a
25 que las unidades celulares en las mismas únicamente han sido expuestas a un conjunto de condiciones. De acuerdo
con lo expuesto anteriormente, dado el equipo adecuado de manipulación de muestras, un enfoque de división puede
proporcionar resultados rápidos.

La invención utiliza unidades celulares, Estas unidades pueden ser células individuales, aunque resultan ventajosas
30 las colonias de dos o más células dispuestas de manera que resulten resistentes a la rotura incluso durante los procedimientos
de cultivo por división y mezcla. Por ejemplo, las células pueden cultivarse sobre un sustrato sólido, tal como
perlas, tal como se describe con mayor detalle a continuación.

Ventajosamente, las unidades celulares se marcan. El marcado permite el seguimiento de las condiciones de cultivo
al que han sido expuestas las células, o el seguimiento de las unidades celulares al exponerlas a diferentes condiciones
de cultivo; de esta manera, puede medirse el marcaje de cualquier unidad celular dada con el fin de determinar cómo se
35 ha derivado a partir del pool o cultivo celular inicial. Los marcajes pueden adoptar cualquiera de entre una diversidad
de formas moleculares o físicas, incluyendo marcajes de ácidos nucleicos, etiquetas codificadas de radiofrecuencia,
40 etiquetas fluorescentes u ópticos y codificación espacial de unidades celulares sobre una superficie o matriz.

El procedimiento de la invención permite someter a ensayo miles o millones de condiciones de cultivo celular en
un ensayo multiplexado de alto rendimiento, con el fin de determinar las condiciones necesarias para conseguir el
45 resultado deseado con respecto a cualquier proceso celular.

También se describe un procedimiento para exponer una célula a una diversidad de condiciones de cultivo celular,
que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares comprendiendo cada uno una o más
50 células, y exponer dichos grupos a más condiciones de cultivo deseadas;

(b) subdividir uno o más de dichos grupos para crear otro conjunto de grupos de unidades celulares;

(c) exponer dichos otros grupos a otras condiciones de cultivo deseadas, y

55 (d) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(c) de manera iterativa como resulte necesario.

En una forma de realización, se utiliza un procedimiento de agrupamiento como se hace referencia anteriormente.
Por lo tanto, en un aspecto la invención proporciona un procedimiento para determinar el efecto de una pluralidad de
60 condiciones sobre una célula, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares, comprendiendo cada uno una o más
células, y exponer dichos grupos a las condiciones de cultivo deseadas,

65 (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar por lo menos un segundo grupo,

(c) dividir el segundo grupo para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares,

ES 2 307 969 T3

(d) exponer dichos grupos adicionales a las condiciones de cultivo deseadas,

(e) repetir las etapas (b) a (d), y

5 (f) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a las que ha sido expuesta,

en el que las unidades celulares se marcan para realizar el seguimiento o para determinar las condiciones de cultivo a las que ha sido expuesta la unidad celular.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para exponer una célula a una diversidad de condiciones de cultivo celular, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares, comprendiendo cada uno una o más células, y exponer dichos grupos a las condiciones de cultivo deseadas,

15

(b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar por lo menos un segundo grupo,

(c) subdividir el segundo grupo para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares,

20

(d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas, y

(e) repetir las etapas (b) a (d),

25 en el que las unidades celulares se marcan para realizar el seguimiento o para determinar las condiciones de cultivo a las que ha sido expuesta la unidad celular.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar un gen que influye sobre un proceso celular, comprendiendo las etapas siguientes:

30 (a) determinar el efecto de una o más condiciones de cultivo sobre una unidad celular, de acuerdo con el aspecto mencionado anteriormente de la invención,

(b) analizar la expresión génica en dichas unidades celulares al exponerlas a dichas condiciones de cultivo, y

35

(c) identificar genes expresados diferencialmente bajo condiciones de cultivo deseadas.

Ventajosamente, las condiciones de cultivo utilizadas causan un cambio en el proceso celular; se seleccionan estas condiciones de cultivo para producir las células en las que se analizará la expresión génica. La expresión génica puede analizarse convenientemente utilizando cualquier tecnología de monitorización de expresión comparativa, incluyendo técnicas basadas en PCR, análisis en serie de la expresión génica (SAGE) o tecnología de series, tal como la disponible ampliamente de proveedores tales como Affymetrix.

40 También se describe un procedimiento para producir un ácido nucleico que codifica un producto génico que influye sobre un proceso celular, que comprende identificar un gen, tal como se ha indicado anteriormente, y producir por lo menos la región codificante de dicho gen mediante síntesis de ácidos nucleicos o replicación biológica.

También se describe un procedimiento para inducir un proceso celular en una célula, comprendiendo las etapas siguientes:

50 (a) identificar uno o más genes que se expresan diferencialmente en asociación con un proceso celular, tal como se describe en la presente memoria, y

(b) modular la expresión de dicho gen o genes en la célula.

55 La expresión de los genes en la célula puede modularse mediante, por ejemplo, la transfección o de otra manera la transferencia del gen hacia el interior de la célula de manera que se sobreexpresa de manera transitoria o permanente. Alternativamente, la expresión del gen endógeno puede alterarse, tal como mediante inserción dirigida de intensificador o la administración de agentes exógenos que causa un incremento (por ejemplo inductores gratuitos) o una reducción (por ejemplo cadenas antisentido, RNAI, factores de transcripción) en la expresión del gen. Además, el producto del gen puede administrarse por sí mismo o introducirse en la célula para conseguir un incremento de la actividad del mismo. Además, pueden administrarse en la célula agentes que incrementan o reducen la actividad del producto génico (por ejemplo inhibidores competitivos o no competitivos, fármacos, compuestos farmacéuticos).

60 También se describe un procedimiento para identificar el estado de un proceso celular en una célula, que comprende las etapas siguientes:

(a) identificar uno o más genes que se expresan diferencialmente en asociación con un proceso celular, tal como se ha indicado anteriormente, y

ES 2 307 969 T3

- (b) detectar la modulación de la expresión de uno o más de dichos genes en una célula, determinando de esta manera el estado del proceso celular en dicha célula.

5 Ventajosamente, los genes utilizados en dicho análisis codifican marcadores celulares, que pueden detectarse por ejemplo mediante inmunoensayo. Alternativamente, los productos génicos pueden ser enzimas que pueden someterse a ensayo para actividad mediante metodologías fluorométricas, colorimétricas, radiométricas u otras.

También se describe un procedimiento para regular un proceso celular, que comprende las etapas siguientes:

- 10 (a) determinar el efecto de una o más condiciones de cultivo sobre una unidad celular, de acuerdo con el aspecto anteriormente indicado de la invención,
- (b) exponer una célula a condiciones de cultivo que producen un cambio en el proceso celular, y
- 15 (c) aislar la célula deseada.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se describe un procedimiento para producir una célula diferenciada a partir de un progenitor bipotente, pluripotente o totipotente. Las células diferenciadas, particularmente las células pluripotentes parcialmente diferenciadas, o las células progenitoras de desarrollo determinado aunque no diferenciadas, resultan útiles para el descubrimiento de fármacos, para terapias celulares y para otros procedimientos en los que resulten necesarias células de un linaje deseado.

En otro aspecto de la invención también se proporciona un procedimiento para identificar un agente que puede inducir un proceso celular, que comprende las etapas siguientes:

- 25 (a) determinar el efecto de uno o más agentes sobre una unidad celular, de acuerdo con el aspecto anteriormente indicado de la invención, y
- (b) identificar aquel agente o agentes que inducen el proceso celular deseado en las unidades celulares.

30 Los agentes identificados de acuerdo con la invención pueden sintetizarse mediante técnicas convencionales químicas, bioquímicas y otras, y utilizarse en procedimientos para regular procesos celulares particulares en células, por ejemplo tal como se describe en la presente memoria.

35 También se describen procedimientos para cultivar células adherentes a portadores sólidos, tales como microportadores o perlas. Estos portadores pueden estar compuestos de macromoléculas, tales como celulosa, dextrano, agarosa o acrilamida, o materiales inorgánicos, tales como el vidrio. Las superficies de los portadores pueden modificarse adicionalmente mediante tratamientos físicos o químicos, tales como la adsorción o la reticulación covalente de entidades moleculares con un carga deseada u otra característica deseada. Alternativamente, el portador puede consistir de una célula o células encapsuladas dentro de una matriz que permita la perfusión de material de tamaño subcelular. El cultivo de microportador presenta ventajas significativas, incluyendo el escalado de cultivos, y también permite exponer convenientemente unidades celulares a condiciones de cultivo seleccionadas según resulte necesario para causar el proceso celular deseado. Por lo tanto, en la forma de realización más amplia, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células *in vitro*, que comprende cultivar dichas células adheridas a un microportador o a una

45 perla.

Ventajosamente las células se someten a por lo menos un cambio de condiciones de cultivo. Preferentemente, se someten a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más condiciones de cultivo diferentes. Preferentemente, dicho cambio de condiciones de cultivo comprende un cambio de medio.

50 También se describen procedimientos para cultivar células en las que se crean y se subdividen grupos de células. De esta manera, se describe un procedimiento para cultivar células *in vitro*, que comprende las etapas siguientes:

- (a) combinar uno o más cultivos de células cultivadas bajo condiciones diferentes, y
- 55 (b) cultivar las células bajo condiciones comunes.

También se describe un procedimiento para cultivar células *in vitro*, que comprende las etapas siguientes:

- 60 (a) incubar un cultivo celular, y
- (b) dividir dicho cultivo en dos o más grupos de células, y cultivar dicho grupo de células bajo dos o más conjuntos diferentes de condiciones de cultivo.

65 Preferentemente, las células se exponen a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más condiciones de cultivo diferentes. Las condiciones de cultivo utilizadas ventajosamente comprenden un cambio de medio. También se describen procedimientos para cultivar células madre, y células diferenciadas derivadas de células madre *in vitro*, adherentes a microportadores, tales como perlas. El cultivo de microportadores presenta ventajas significativas, incluyendo el escalado de cultivos,

ES 2 307 969 T3

y también permite exponer unidades de células madre a condiciones de cultivo seleccionadas según resulte necesario para obtener las condiciones de crecimiento y/o diferenciación. Por lo tanto, también se describe un procedimiento para cultivar células madre y células diferenciadas derivadas a partir de células madre *in vitro*, que comprende cultivar dichas células adheridas a un microportador o perla.

5

Ventajosamente, el cultivo se somete a por lo menos un cambio de condiciones de cultivo. Preferentemente, se someten a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más condiciones de cultivo diferentes. Preferentemente, dicho cambio de condiciones de cultivo comprende un cambio de medio.

10

También se describen procedimientos para cultivar células madre en los que se crean y subdividen grupos de células madre. De esta manera, también se describe un procedimiento para cultivar células madre y células diferenciadas derivadas de células madre *in vitro*, que comprende las etapas siguientes:

15

(a) combinar uno o más cultivos de células cultivadas bajo condiciones diferentes, y

(b) cultivar las células bajo condiciones comunes.

20

También se describe un procedimiento para cultivar células madre y células diferenciadas derivadas de células madre *in vitro*, que comprende las etapas siguientes:

(a) incubar un cultivo de células madre, y

(b) dividir dicho cultivo en dos o más grupos de células madre, y cultivar dicho grupo de células madre bajo dos o más conjuntos diferentes de condiciones de cultivo.

25

Preferentemente, las células se exponen a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más condiciones de cultivo diferentes. Las condiciones de cultivo utilizadas ventajosamente comprenden un cambio de medio.

30

Ventajosamente, las células o células madre se cultivan en unidades celulares, comprendiendo cada unidad celular una o más de dichas células. Por ejemplo, las unidades celulares pueden ser células individuales.

35

Sin embargo, cada unidad celular puede comprender una o más células o células madre adherentes o unidas por un sustrato sólido, tal como un microportador o una perla. Entre los sustratos sólidos adicionales se incluyen un pocillo o una barrera permeable al medio.

Los procedimientos para cultivar células o células madre pueden escalarse a biorreactores adecuados. Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede ponerse en práctica utilizando más de 50 g de peso seco de microportador.

Breve descripción de las figuras

40

La figura 1 representa un ejemplo de un cultivo celular por división y mezcla llevado a cabo en tres rondas. Se obtiene un grupo de unidades celulares mediante el cultivo bajo una condición dada. Las unidades celulares se ilustran en forma de esferas y los grupos de unidades celulares se representan en matraces. Las unidades celulares se dividen en tres alícuotas que se cultivan durante dos días bajo condiciones de cultivo diferentes denominadas A, B y C. Las unidades celulares posteriormente se agrupan y se dividen nuevamente en tres alícuotas que se cultivan bajo condiciones D, E o F. Tras dos rondas de este protocolo, puede observarse que los diversos grupos celulares han sido expuestos a todas las posibles combinaciones de condiciones de cultivo celular.

50

La figura 2 representa un ejemplo adicional de cultivo celular por división y mezcla. En este caso, el experimento se inicia con tres grupos, A, B y C. Las muestras se agrupan en la primera etapa, y posteriormente se dividen en los grupos D, E y F.

55

La figura 3 representa una variación del procedimiento de división y mezcla, en el que las muestras de los grupos A, B y C se dividen directamente en los grupos D, E y F sin agrupamiento previo. La división de grupos de células individuales puede ser aleatoria o puede ser predeterminada.

60

La figura 4 representa una variación adicional del procedimiento de división y mezcla en el que los grupos celulares A, B y C se dividen en los grupos celulares D, E y F sin agrupamiento previo, mientras que en una segunda etapa, los grupos celulares D, E y F se agrupan y posteriormente se dividen en los grupos celulares G, H e I.

65

La figura 5 representa un protocolo de subdivisión que comprende una primera etapa en la que el grupo celular A se divide para formar los grupos celulares B, C y D, y una segunda etapa en la que los grupos celulares B, C y D se dividen para formar los grupos celulares E a M.

La figura 6 representa un protocolo de división y mezcla que contiene una etapa de subdivisión. Tras dos rondas de división y mezcla, los grupos celulares A, B y C se dividen sin agrupamiento previo, resultando en tres linajes de grupo celular derivados variadamente de los grupos celulares A, B o C. Obsérvese que puede utilizarse la inclusión de una etapa de subdivisión para deducir el papel de las condiciones de cultivo celular en la producción de un efecto

ES 2 307 969 T3

celular. Por ejemplo, si se observa un efecto celular en unidades celulares derivadas del linaje A únicamente, y bajo la suposición de que las condiciones de cultivo celular sometidas a ensayo en los diversos agrupamientos de células posteriores a la divergencia de los linajes A, B y C son idénticas, las condiciones de cultivo del grupo celular A en el punto de división deben ser esenciales para el efecto celular. Obsérvese asimismo que los procedimientos ilustrados en las figuras 1 a 6 pueden utilizarse en varias combinaciones.

La figura 7 representa unidades celulares que comprenden células madre embrionarias pluripotentes, que expresan una proteína Tau quimérica-proteína fluorescente verde unida a microportadores porosos (Cytopore 2, Amersham Biosciences).

La figura 8, paneles A a H, representa unidades celulares que comprenden células ES que expresan una proteína de fusión de proteína fluorescente verde (GFP)-Tau y el microportador poroso Cultispher G que experimenta diferenciación según se determina mediante tinción de anticuerpos para la expresión del marcador glial GFAP. Los paneles A a D representan una unidad celular observada bajo un objetivo 40x de microscopía de fases (A) y con fluorescencia, en el que los núcleos celulares se tiñen de color azul utilizando DAPI (B) y resultan evidentes los marcadores (rojos) GFAP (C) y (verdes) GFP (D). Los paneles C y D representan aparentemente una serie lineal de células (flechas blancas) que recuerdan a neuroglía envolvente de un proceso neuronal. Los paneles E a H representan una unidad celular de control en la que se ha omitido el anticuerpo primario anti-GFAP.

El panel I representa una imagen compuesta obtenida mediante microscopía de fluorescencia que representan células madre embrionarias diferenciadas que crecen sobre un microportador no poroso (Cytodex 3, Amersham Biosciences). Las células expresan una Tau-GFP y se encuentran teñidas inmunquímicamente de color rojo con un anticuerpo fluorescente cultivado contra la proteína específica de neuronas beta-tubulina III. La coloración amarilla indica la coincidencia de tinciones roja y verde.

La figura 9 representa microfotografías de fases (paneles A, C y E) y de fluorescencia (paneles B, D y F) de unidades celulares que comprenden células HepG2 unidas a microportadores no porosos (Cytodex 3, Amersham Biosciences). Paneles A/B: unidad celular de control positivo que representa la conversión de etoxiresorufina a un producto fluorescente rojo; paneles C/D: unidad celular de control negativo cultivada de la misma manera pero a la que no se ha añadido etoxiresorufina; paneles E/F: unidades celulares tras un experimento de división y mezcla, que representa que algunas unidades celulares tratadas con el inductor de P450 beta-naftoflavona presentan niveles elevados de P450 y pueden convertir rápidamente la etoxiresorufina en producto fluorescente (panel F), mientras que otras unidades celulares sometidas a cultivo por división y mezcla se encuentran pobladas por un gran número de células que no expresan niveles elevados de P450 (por ejemplo la unidad celular evidente en la parte inferior derecha del panel E).

La figura 10 representa el marcaje de unidades celulares con RFID. Panel A: transpondedor de radiofrecuencia encapsulado en vidrio ID100-A (Trovan); panel B: células madre embrionarias de ratón que expresan una proteína de fusión Tau-GP que crece sobre el borde recto de un transpondedor de radiofrecuencia encapsulado en vidrio (microscopía óptica, parte superior; microscopía de fluorescencia, parte inferior; imagen fusionada, centro); (C) representa células madre embrionarias que expresan GFP que crecen sobre el borde redondeado de un transpondedor de radiofrecuencia encapsulado en vidrio (microscopía óptica, parte superior; microscopía de fluorescencia, parte inferior; imagen fusionada, centro).

La figura 11 ilustra la expresión génica diferencial tras el cultivo por división y mezcla de células ES de ratón. Las células ES se cultivaron sobre microportadores de Cytopore 2 en medio ES (A), CDM (B) o DMEM (C) sin adiciones (carriles 1, 4, 7, 10) o con adición de LiCl 1 μ M (2, 5, 8, 11) o de ácido retinoico 1 μ M (3, 6, 9, 12). Se preparó ADNc a partir de las células y se sometieron cantidades equivalentes a PCR con cebadores oligonucleótidos para el gen de control gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y marcadores de células ES no diferenciadas (Oct4), precursores neuronales (nestina) y células endodérmicas (HNF3 β). Las fotografías son de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR, que se indican mediante corchetes. "PD" indica productos de cebador-dímero.

La figura 12 representa el marcaje de microportadores. Paneles A a D: microportadores Cytodex 3 incubados sin (A, B) o con (C, D) un anticuerpo anti-colágeno biotinilado, teñidos con estreptavidina-FITC y visualizados bajo microscopía de fases (A, C) y de fluorescencia (B, D). Paneles E a H: microportadores Cultispher G sin (E, F) o con (G, H) grupos biotina entrecruzados, teñidos con perlas fluorescentes rojas de 1 μ m de diámetro recubiertas con estreptavidina y visualizados bajo microscopía de fases (E, G) y de fluorescencia (F, H).

La figura 13 representa el marcaje de unidades celulares. Se marcaron con perlas de látex fluorescentes rojas, perlas Cytodex 3 sembradas con células ES que expresaban una proteína de fusión tau-GFP, y se examinaron tras 30 minutos (A-C) o tras 24 horas (D-F). Los microportadores se visualizaron bajo microscopía de fases (A, D) y con filtros para detectar fluorescencia verde (B, E) o roja (C, F).

La figura 14 representa el marcaje de dos poblaciones de microportadores con dos marcajes fluorescentes diferentes. Se incubaron microportadores Cytodex 3 separadamente con perlas de látex estreptavidina rojas o verdes, y después se mezclaron en una proporción 1:1. Se visualizaron utilizando microscopía de fases (A) y con filtros para detectar fluorescencia verde (C) o roja (D). B es una fotografía de fusión de C+D. Ambos marcajes se detectaron con facilidad y no se detectaron ninguna transferencia significativa de marcajes.

ES 2 307 969 T3

La figura 15 ilustra el doble marcaje de microportadores con dos marcajes fluorescentes diferentes. Se incubaron microportadores Cytodex 3 con una mezcla 1:1 de perlas de látex estreptavidina rojas y verdes. Se visualizaron bajo microscopía de fases (A) y con filtros para detectar fluorescencia verde (C) o roja (D). B es una fotografía de fusión de C+D. Cada microportador se marcó doblemente.

La figura 16 representa la detección de una unidad celular que representa un proceso celular utilizando microscopía de fases (panel A) o de fluorescencia (panel B). Las unidades celulares que expresan una proteína de fusión Tau-GFP pueden discriminarse fácilmente respecto al fondo utilizando microscopía de fluorescencia (B) y pueden aislarse manualmente de la mezcla.

La figura 17 representa datos procedentes del análisis automatizado de microportadores y unidades celulares utilizando un instrumento COPAS Select (Union Biometrica Inc., Somerville, MA). Paneles A y B: se pasaron microportadores Cytodex 3 suspendidos en PBS a través del separador y se realizó un seguimiento del tamaño (tiempo de vuelo; TOF) frente a dispersión óptica (extinción; Ext) [A] y para fluorescencia verde (FLU1) frente a fluorescencia roja (FLU2) [B]. Paneles C y D: análisis de microportadores Cytodex 3 marcados con perlas de látex fluorescentes rojas que representan un gráfico de Ext. vs. TOF [C] y de fluorescencia [D]; comparación de los paneles B y D ilustran que el marcaje de los microportadores resulta en un incremento de la señal fluorescente roja de los mismos. Paneles E y F: análisis de un grupo de unidades celulares que comprende Cytodex 3 y células ES que expresan un transgén Tau-GFP. El incremento de dispersión en el gráfico que representa Ext. vs. TOF [E] y el amplio intervalo de fluorescencia verde (FLU1) [F] revelan unidades celulares que pueden separarse basándose en el número de células.

La figura 18 representa la identificación de una etiqueta utilizada para marcar una unidad celular. Paneles A a D: marcaje con estreptavidina-FITC de microportadores Cultispher modificados con biotina (A, B) o en el estado no tratado nativo (C, D) de los mismos. Paneles E a G: unidades celulares que comprenden células ES que expresan una proteína de fusión Tau-GFP y microportadores de Cultispher G biotinilados marcados con perlas de látex de 1 mm fluorescentes rojas recubiertas de estreptavidina (Sigma), observadas bajo microscopía de fases (E) y con óptica de epifluorescencia verde (F) y roja (G) para visualizar las células marcadas con GFP y las etiquetas fluorescentes rojas, respectivamente. Paneles H a K: calibración de FACS utilizando una muestra de control de perlas de látex fluorescentes rojas de 1 mm (Sigma) que representa los parámetros característicos de dispersión frontal y ortogonal (H; área en caja) y la intensidad de fluorescencia característica en el canal de fluorescencia FL3 (I). El análisis FACS de una unidad celular individual digerida proteolíticamente marcada con perlas de látex fluorescentes rojas de 1 mm (Sigma) puede llevarse a cabo mediante acotamiento utilizando los parámetros de tamaño determinados anteriormente para las etiquetas (J; área en caja), seguido de la detección de la intensidad característica del canal FL3 característica de las etiquetas (K).

La figura 19 representa la identificación de una multiplicidad de etiquetas utilizadas para marcar microportadores. Panel A: los parámetros de dispersión frontal/ortogonal fijados con etiquetas de control se utilizaron para definir los canales de tamaño para perlas de 4,4 mm (canal R1), 5,5 mm (canal R2) y 1 mm (canal R3). Paneles B a D: el análisis FACS de un digerido proteolítico de microportadores marcados revela la presencia de etiquetas correspondientes al conjunto nº 5 de perlas fluorescentes verdes de 4,4 mm de Bangs Labs (panel B), al conjunto nº 1 de perlas fluorescentes verdes de 5,5 mm de Bangs Labs (panel C) y a las perlas fluorescentes rojas de 1 mm de Sigma (panel D).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Condiciones de cultivo. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “condiciones de cultivo” se refiere al ambiente en el que se introducen las células o al que son expuestas con el fin de estimular el crecimiento o la diferenciación de dichas células. De esta manera, la expresión se refiere al medio, temperatura, condiciones atmosféricas, sustrato, condiciones de agitación y similares que pueden afectar al crecimiento y/o diferenciación de las células. Más particularmente, la expresión se refiere a agentes específicos que pueden incorporarse en el medio de cultivo y que pueden influir sobre el crecimiento y/o la diferenciación de las células.

Célula. Se define célula, tal como se hace referencia en la presente memoria, como la unidad estructural más pequeña de un organismo, que puede presentar un funcionamiento independiente, o a un organismo de una célula, constituida por uno o más núcleos, citoplasma y diversos orgánulos, completamente rodeado de una membrana celular semipermeable o de una pared celular. La célula puede ser procariótica, eucariótica o arqueobacteriana. Por ejemplo, la célula puede ser una célula eucariótica. Resultan preferidas las células de mamífero, especialmente las células humanas. Las células pueden ser naturales o modificadas, tal como mediante manipulación genética o pasaje de cultivo, con el fin de conseguir las propiedades deseadas. Se define una célula madre con mayor detalle a continuación, y es una célula totipotente, pluripotente o multipotente capaz de dar lugar a más de un tipo de célula diferenciada. Las células madre pueden diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células diferenciadas, que pueden ser multipotentes o pueden encontrarse terminalmente diferenciadas. Las células diferenciadas *in vitro* son células que se han creado artificialmente mediante la exposición de las células madre a uno o más agentes que estimulan la diferenciación celular.

Proceso celular. Un proceso celular es cualquier característica, función, proceso, suceso, causa o efecto, intracelular o extracelular, que se produce o que se observa o que puede atribuirse a una célula. Entre los ejemplos de

ES 2 307 969 T3

5 procesos celulares se incluyen, aunque sin limitación, viabilidad, senescencia, muerte, pluripotencia, morfología, señalización, unión, reconocimiento, producción o destrucción (degradación) de moléculas, mutación, plegamiento de proteínas, transcripción, traducción, catálisis, transmisión sináptica, transporte vesicular, función de orgánulos, ciclo celular, metabolismo, proliferación, división, diferenciación, fenotipo, genotipo, expresión génica o el control de estos procesos.

10 *Unidad celular.* Un grupo de células, que puede ser un grupo de uno. Los grupos de unidades celulares pueden separarse, subdividirse y manipularse sin disociar sustancialmente las unidades celulares mismas, de manera que la unidad celular se comporta como una colonia de células y cada célula en la unidad celular se encuentra expuesta a las mismas condiciones de cultivo. Por ejemplo, una unidad celular puede comprender una perla a la que se adhiere un grupo de células.

15 *Totipotente.* Una célula totipotente es una célula con el potencial de diferenciarse en cualquier tipo de célula somática o germinal presente en el organismo. De esta manera, puede derivarse cualquier célula deseada por algún medio a partir de una célula totipotente.

Pluripotente. Una célula pluripotente es una célula que puede diferenciarse en más de un tipo celular, aunque no en todos.

20 *Marcaje.* Un marcaje o etiqueta, tal como se utiliza en la presente memoria, son unos medios para identificar una unidad celular y/o para determinar una condición de cultivo, o una secuencia de condiciones de cultivo, a la que ha sido expuesto la unidad celular. De esta manera, un marcaje puede ser un grupo de marcajes, cada uno de los cuales se añade en una etapa de cultivo específica, o un marcaje añadido al inicio del experimento que se modifica o que se sigue según las etapas de cultivo a las que se expone la unidad celular, o simplemente una referencia posicional, que permite deducir las etapas de cultivo utilizadas. Un marcaje o etiqueta también puede ser un dispositivo que informa o registra la localización o la identidad de una unidad celular en cualquier tiempo dado, o asigna un identificador único a la unidad celular. Son ejemplos de marcajes o etiquetas, moléculas de secuencia, estructura o masa únicas; o moléculas u objetos fluorescentes, tales como perlas; o transpondedores de radiofrecuencia u otros transpondedores; u objetos con marcas o formas únicas.

30 *Exposición a condiciones de cultivo.* Una célula se expone a condiciones de cultivo cuando se pone en contacto con un medio, o se cultivo bajo condiciones que afectan a uno o más procesos celulares, tales como el crecimiento, diferenciación o estado metabólico de la célula. De esta manera, si las condiciones de cultivo comprenden cultivar la célula en un medio, la célula se introduce en el medio durante un periodo de tiempo suficiente para que el mismo presente un efecto. De manera similar, si las condiciones son de temperatura, las células se cultivan a la temperatura deseada.

40 *Agrupar.* Agrupar uno o más grupos de unidades celulares implica la mezcla de los grupos con el fin de crear un solo grupo o agrupamiento que comprende unidades celulares con más de un conjunto diferente de condiciones de cultivo. Un agrupamiento puede subdividirse adicionalmente en grupos, aleatoria o no aleatoriamente; estos grupos no son por sí mismos "agrupamientos" a los presentes fines, aunque pueden ellos mismos agruparse mediante combinación, por ejemplo tras la exposición a diferentes conjuntos de condiciones de cultivo.

45 *Proliferación.* El crecimiento celular y la proliferación celular se utilizan intercambiamente en la presente memoria para hacer referencia a la multiplicación del número de células sin diferenciación en diferentes tipos o linajes celulares. En otras palabras, el término se refiere al incremento del número de células viables. Preferentemente la proliferación no se ve acompañada por cambios apreciables de fenotipo ni de genotipo.

50 *Diferenciación.* La diferenciación celular es el desarrollo, a partir de un tipo celular, de un tipo celular diferente. Por ejemplo, una célula bipotente, pluripotente o totipotente puede diferenciarse en una célula neural. La diferenciación puede verse acompañada por la proliferación, o puede ser independiente de la misma. El término "diferenciación" se refiere de manera general a la adquisición de un fenotipo de tipo celular maduro a partir de un tipo celular menos definido en el desarrollo, por ejemplo una neurona, o un linfocito, pero no excluye la transdiferenciación, en la que un tipo de célula madura puede convertirse en otro tipo de célula madura, por ejemplo una neurona en un linfocito.

55 *Estado de diferenciación.* El estado de diferenciación de una célula es el nivel hasta el que se ha diferenciado una célula a lo largo de una ruta o linaje particular.

60 *Estado de un proceso celular.* El estado de un proceso celular se refiere a si se está produciendo un proceso celular o no y en procesos celulares complejos puede referirse a una etapa o estadio particular en ese proceso celular. Por ejemplo, una ruta de diferenciación celular en una célula puede encontrarse inactiva o haber sido inducida y puede comprender varias etapas o componentes discretos, tales como sucesos de señalización caracterizados por la presencia de un conjunto característico de enzimas o intermediarios.

65 *Gen.* Un gen es un ácido nucleico que codifica un producto génico: un polipéptido o un producto génico de ARN. Tal como se utiliza en la presente memoria, un gen incluye por lo menos la secuencia codificante que codifica el producto génico; opcionalmente puede incluir una o más regiones reguladoras necesarias para la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante.

ES 2 307 969 T3

Producto génico. Un producto génico típicamente es una proteína codificada por un gen de la manera convencional. Sin embargo, la expresión también incluye productos génicos no polipéptidos, tales como ácidos ribonucleicos, que se encuentran codificados por el gen.

5 *Síntesis de ácidos nucleicos.* Pueden sintetizarse ácidos nucleicos según cualquier técnica disponible. Preferentemente la síntesis de ácidos nucleicos se encuentra automatizada. Además, los ácidos nucleicos pueden producirse mediante replicación biológica, tal como clonación y replicación en células bacterianas o eucarióticas, según los procedimientos conocidos de la técnica.

10 *Expresión diferencial.* Pueden identificarse los genes que se expresan a niveles diferentes en respuesta a condiciones de cultivo celular mediante análisis de expresión génica, tal como en una serie génica, mediante procedimientos conocidos de la técnica. Los genes que se expresan diferencialmente representan una mayor o menor cantidad de ARNm o de producto génico en la célula bajo las condiciones de ensayo que bajo condiciones alternativas, respecto a los niveles globales de expresión génica.

15 *Transfección.* Pueden transfectarse genes en células mediante cualquier medio apropiado. El término se utiliza en la presente memoria para referirse a la transfección convencional, por ejemplo utilizando fosfato de calcio, pero también incluye otras técnicas para transferir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo la transformación, la transducción vírica, la electroporación y similares.

20 *Modulación.* El término modulación se utiliza para referirse a un incremento y/o reducción del parámetro que se modula. De esta manera, la modulación de la expresión génica incluye incrementar la expresión génica y reducir la expresión génica.

25 *Ensayos basados en células*

Los ensayos basados en células son un parte importante de las ciencias biomédicas modernas y comprenden cualquier ensayo que implica una etapa en la que se utilizan células. Pueden utilizarse ensayos basados en células en prácticamente todas las etapas del proceso de descubrimiento y desarrollo de compuestos farmacéuticos, y resultan valiosos para proporcionar información sobre cómo es probable que un compuesto interactúe en un sistema biológico, no únicamente sobre cómo interactúa con una potencial diana farmacológica de manera aislada.

30 Por ejemplo, pueden utilizarse los ensayos basados en células para identificar y validar potenciales dianas farmacológicas. Se han desarrollado ensayos basados en células que pueden utilizarse para identificar genes o rutas celulares implicadas en procesos de enfermedad, con el fin de determinar las funciones de los genes diana o para medir los cambios fenotípicos que pueden resultar inducidos al activarse determinados genes o los productos de los mismos.

40 También pueden utilizarse los ensayos basados en células en el descubrimiento de fármacos para el descubrimiento, selección y optimización de compuestos cabeza de serie. Al contrario que los ensayos bioquímicos que con frecuencia se utilizan en ensayos tradicionales de cribado de alto rendimiento, los ensayos basados en células pueden proporcionar información referente a propiedades farmacológicas, tales como absorción, permeabilidad, selectividad, especificidad y metabolismo. Como resultado, los compuestos cabeza de serie que se seleccionan tras el cribado basado en células se encuentran mejor caracterizados, resulta más probable que proporcionen cabezas de serie valiosos y resulta menos probable que sean eliminados en etapas posteriores del proceso de descubrimiento de fármacos.

50 Una aplicación importante de los ensayos basados en células es el cribado de toxicidad. Una parte crucial del descubrimiento y desarrollo de fármacos es el cribado de candidatos farmacológicos para eliminar compuestos que causarán efectos secundarios. Sin embargo, las metodologías actuales resultan en gran parte inadecuadas, y en particular la utilización de modelos animales para el cribado de toxicidad resulta caro y requiere mucho tiempo. Además, los modelos animales pueden ser poco fiables debido a que los resultados en estos modelos no siempre predicen con exactitud cómo se comportará un compuesto en el ser humano. De esta manera, resulta preferente el cribado basado en células humanas.

55

Células madre

60 Las células madre se describen en detalle en *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, Department of Health and Human Services, junio de 2001, <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.

Las células madre son células que pueden diferenciarse para formar por lo menos un tipo celular y en ocasiones muchos tipos celulares especializados. La gama de células diferentes que puede formarse a partir de las células madre se cree que es exhaustivo, es decir, incluye todos los diferentes tipos celulares que forman el organismo. Las células madre se encuentran presentes durante la totalidad del tiempo de vida de un organismo, desde el embrión temprano, cuando son relativamente abundantes, hasta el animal adulto, cuando son relativamente raras. Las células madre presentes en muchos tejidos de animales adultos resultan importantes en la reparación normal de tejidos y en la homeostasis.

65

La existencia de estas células ha posibilitado que puedan proporcionar un medio para generar células funcionales especializadas que puedan trasplantarse en el ser humano y sustituir células muertas o no funcionales en tejidos enfermos. La lista de enfermedades para las que lo anterior podría proporcionar terapias incluye la enfermedad de Parkinson, la diabetes, lesiones de la médula espinal, apoplejía, la enfermedad cardíaca crónica, la enfermedad renal de estadio terminal, la insuficiencia hepática y el cáncer. Con el fin de que la terapia de sustitución celular resulte viable, resultan necesarios por lo menos dos avances sustantivos en la investigación de células madre. En primer lugar, resulta necesario el desarrollo de condiciones para el cultivo de células madre en número suficiente, de manera que puedan prepararse dosis terapéuticamente relevantes de células. Idealmente, resultarían posibles cultivos a gran escala, proporcionando material para tratar múltiples pacientes. En segundo lugar, debido a que las células madre no diferenciadas trasplantadas en animales con frecuencia dan lugar a tumores, se contempla que la diferenciación de las células madre en células más especializadas será un prerrequisito para la terapia de sustitución celular, y de esta manera resultará necesario descubrir las condiciones para diferenciar células madre en los tipos celulares especializados particulares requeridos para las diferentes enfermedades.

Resulta evidente que la clave para superar dichos obstáculos radica en concebir procedimientos adecuados de cultivo celular para las células madre y derivados de las mismas. Sin embargo, por los motivos explicados anteriormente, es decir el laborioso proceso de ensayo y error que implica la evolución de las técnicas de cultivo celular, la tarea resulta particularmente difícil. Por lo tanto, una de las aplicaciones de la invención descrita en la presente memoria se encuentra en la elucidación de técnicas para el crecimiento y diferenciación de células madre.

Tipos de célula madre

Todavía existe un considerable debate sobre lo que constituye una célula madre, sin embargo para los fines del presente comentario, una característica clave es la capacidad de diferenciarse en un tipo celular diferente. Se proporcionan a continuación ejemplos de células madre.

Las diferentes células madre presentan diferente potencial para formar diversos tipos celulares: las células madre espermatogoniales son unipotentes, debido a que producen naturalmente únicamente espermatozoos, mientras que las células madre hematopoyéticas son multipotentes y las células madre embrionarias se cree que pueden dar lugar a todos los tipos celulares y se sostiene que son totipotentes o pluripotentes.

Hasta la fecha, se han aislado tres tipos de célula madre pluripotente de mamífero. Estas células pueden dar lugar a tipos celulares que normalmente se derivan a partir de las tres capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo). Los tres tipos de células madre son: células de carcinoma embrionario (EC), derivadas de tumores testiculares; células madre embrionarias (ES), derivadas del embrión preimplantación (normalmente el blastocito), y células germinales embrionarias (EG), derivadas del embrión posimplantación (normalmente células fetales destinadas a formar parte de las gónadas). Estas células están recibiendo atención particular en el esfuerzo por dirigir la diferenciación, precisamente debido a que son pluripotentes.

Las células madre también se encuentran presentes en el organismo adulto. Una célula madre de adulto es una célula no diferenciada que se encuentra en un tejido diferenciado (especializado), se renueva y puede diferenciarse, proporcionando células más especializadas. Recientemente se ha demostrado que las células madre de adulto son plásticas, es decir, pueden diferenciarse para proporcionar tipos celulares que no son característicos del tejido en el que residen, ni efectivamente de la capa germinal de la que se origina el tejido. Por ejemplo, se ha demostrado que las células madre sanguíneas (derivadas del mesodermo) pueden diferenciarse para formar neuronas (normalmente derivadas del ectodermo). Toma *et al.*, Nature Cell Biol. 3:778-784, 2001, recientemente han descrito la identificación y aislamiento de un nuevo tipo de célula madre que se ha derivado de la dermis de la piel. Estas células madre se han derivado células precursoras derivadas de la piel (SKP). Podrían inducirse las células SKP para que se diferencien en neuronas y células gliales, con la adición de 3% de suero se diferencian en células de músculo liso, e incrementar el suero a 10% causa que las células SKP se diferencien en adipocitos. Hasta el momento se ha informado de la presencia de células madre adultas en tejidos diversos, tales como el sistema nervioso, la médula ósea y la sangre, el hígado, el músculo esquelético, la piel y el sistema digestivo.

Además de las células madre adultas existen numerosos tipos de células progenitoras o precursoras. Éstas son células que se encuentran parcialmente restringidas en el potencial de diferenciación de las mismas y se encuentran presentes en probablemente la totalidad de los tejidos del cuerpo: pueden diferenciarse, aunque difieren de las células madre en que el repertorio de las mismas no es tan amplio, y por definición no pueden autorrenovarse.

La evidencia reciente incluso sugiere que algunos tipos celulares diferenciados son capaces de cambiar de fenotipo. Este fenómeno, denominado transdiferenciación, es la conversión de un tipo celular diferenciado en otro, con o sin división celular intermedia. Anteriormente se aceptaba generalmente que el estado diferenciado terminal era irreversible, pero en la actualidad resulta evidente que la diferenciación en ocasiones puede revertirse o alterarse. En la actualidad se encuentran disponibles protocolos *in vitro* en los que puede inducirse la transdiferenciación en líneas celulares (ver Shen, Slack y Tosh, Nature Cell Biol. vol. 2, p. 879-887, 2000; Horb *et al.*, Current Biol. vol. 13, p. 105-115, 2003). Finalmente, se ha informado de tipos celulares especializados que pueden desdiferenciarse para rendir células similares a células madre con potencial para diferenciarse en tipos celulares adicionales.

Crecimiento y diferenciación de células madre

Una propiedad importante de las células madre es su capacidad de dividirse simétricamente en cultivo, dando lugar a dos células hijas que son copias exactas de la célula madre a partir de la que se derivaron. Lo anterior permite expandir las células madre en cultivo en su estado no diferenciado, produciendo suficiente material para estudios biológicos o incluso para la terapia celular. Los medios por los que las células madre son capaces de llevar a cabo lo anterior son, comprensiblemente, materia de investigación intensa, aunque se conocen pocos de los factores que estimulan la renovación de las células madre. Típicamente, las líneas de células madre pluripotentes se mantienen en capas nodriza mitóticamente inactivas de fibroblastos, o en medio condicionado por estas células. Se supone que las células nodriza eliminan/neutralizan algún factor desconocido del medio de cultivo y/o proporcionan un factor que suprime la diferenciación y estimula la autorenovación de las células madre. Uno de estos factores es el factor inhibidor de la leucemia (LIF), un elemento de la familia de las citoquinas relacionado con IL-6, que es capaz de estimular la autorenovación de las células ES de ratón en ausencia de células nodriza. Las células madre cultivadas en ausencia de células nodriza (y/o LIF) con frecuencia se diferencian espontánea y aleatoriamente, produciendo una mezcla de tipos celulares diferenciados.

Los factores que pueden influir sobre la autorenovación de las células madre pueden ser estimuladores o inhibidores y pueden funcionar extracelular o intracelularmente. En el caso del factor secretado LIF, es conocido que el receptor extracelular del mismo es gp130, y que la activación de esta proteína resulta suficiente para inhibir la diferenciación de las células ES murinas. Dentro de la célula, un efector corriente abajo crucial de gp130 es el transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT-3). Otra molécula que resulta particularmente importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre es el factor de transcripción Oct-4, que, cuando se regula negativamente de manera artificial conduce a la pérdida del estado pluripotente de las células ES de ratón. Otras moléculas de señalización que inhiben naturalmente la autorenovación de las células ES, tales como las proteína quinasas activadas por mitógeno, también han sido identificadas. Un objetivo importante de la investigación de células madre será encontrar los factores naturales y sintéticos, fármacos, polipéptidos, genes, oligonucleótidos, medios y condiciones de cultivo de tejidos, medios condicionados específicos, células nodriza y otros estímulos que presenten el efecto de estimular la expansión y de retener el potencial de diferenciación de diversos tipos de células madre. Entre estos se incluyen las células madre adultas, que en la actualidad no han sido expandidas apreciablemente en cultivo celular.

El segundo reto importante de la investigación de células madre es dirigir la diferenciación de las células madre a tipos celulares particulares que resulten funcionales, que sustituyan células perdidas en diversos estados de enfermedad, y que den lugar a un resultado clínico positivo. La inducción de que las células madre inicien la diferenciación de hecho es un proceso bastante sencillo. Por ejemplo, las células ES extraídas de cultivos nodriza y cultivados hasta la confluencia en un sustrato adherente inician la diferenciación espontáneamente. De manera similar, las células ES extraídas de cultivos nodriza y cultivadas en un sustrato no adherente forman cuerpos embrioides: grupos de células no diferenciadas y parcialmente diferenciadas de las tres capas germinales. Estas células posteriormente pueden disociarse y sembrarse en placas en cultivo monocapa y exponerse a factores que estimulan la diferenciación dirigida. Los cultivos expuestos a estos factores resulta más probable que se poble de un menor número de tipos de célula diferenciada en comparación con los cuerpos embrioides o que los cultivos no tratados de células en diferenciación, que comprenden mezclas de muchos tipos celulares diferentes. Además, no resulta claro si cualquiera de los protocolos diseñados para la diferenciación de las células madre da lugar a células que resulten adecuadas para la terapia de sustitución celular; podría ser que las células no se hayan diferenciado terminalmente en el fenotipo preciso requerido, o que las células diferenciadas han perdido su viabilidad *in vivo*.

Entre los factores que se han utilizado para inducir la diferenciación dirigida de células madre se incluyen: ácido retinoico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), activina-A, factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF β -1), factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento nervioso, sonic hedgehog (SHH), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, vitamina D3, dexametasona, β -mercaptoetanol, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, DMSO, insulina, hormona tiroidea (T3), LIF, suero de feto bovino, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor acero, variaciones de la concentración de oxígeno, ácido ascórbico, β -glicerofosfato, nicotinamida, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), AMPc, diversas moléculas y sustratos de adhesión celular y otros. Además de estos factores definidos, resulta probable que puedan utilizarse factores no definidos, tales como medio condicionado, homogenados de tejido humano y animal, o extractos vegetales, para dirigir la diferenciación de las células madre. El fraccionamiento progresivo de estos extractos no definidos puede rendir fracciones activas o incluso componentes puros de elevada potencia. Estos factores pueden añadirse al medio de crecimiento utilizado en un experimento particular, solos o en combinación, o en un orden definido que resulte crucial para el resultado experimental.

Muchos sistemas que han sido concebidos para la diferenciación de las células madre *in vitro* son procedimientos multietapa complejos, en los que la naturaleza precisa de las diversas etapas, así como la cronología de las diversas etapas, resultan importantes. Por ejemplo, Lee *et al.*, (Nature Biotechnology vol. 18, p. 675-679, 2000), utilizaron un protocolo de cinco etapas para derivar las neuronas dopaminérgicas de células ES de ratón: 1) se expandieron células ES no diferenciadas en una superficie de cultivo de tejidos recubierta de gelatina en medio de células ES en presencia de LIF, 2) se generaron cuerpos embrioides en cultivos de suspensión durante 4 días en medio de células ES, 3) se seleccionaron células positivas para cuerpos embrioides en medio ITSFn durante 8 días tras sembrar en placa en superficie de cultivo de tejidos, 4) las células positivas para nestina se expandieron durante 6 días en un medio N2 que

contenía bFGF/laminina; 5) finalmente, se indujo la diferenciación de las células precursoras neuronales expandidas mediante la retirada de bFGF del medio N2 que contenía laminina.

En un segundo ejemplo de cultivo celular en serie, Bonner-Weir *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. 97:7999-8004, 2000] derivaron células productoras de insulina a partir de células ductales pancreáticas humanas mediante: 1) selección de células ductales respecto a las células de islotes mediante la adhesión selectiva sobre una superficie sólida en presencia de suero durante 2 a 4 días, 2) retirada posterior del suero y adición de factor de crecimiento de queratinocitos para seleccionar las células epiteliales ductales respecto a los fibroblastos durante 5 a 10 días, y 3) recubrir las células con la preparación de matriz extracelular "Matrigel" durante 3 a 6 semanas.

En otro ejemplo de cultivo celular en serie, Lumelsky *et al.* [Science 292:1389-1394, 2001] derivaron células secretoras de insulina mediante diferenciación dirigida de células madre (ES) embrionarias de ratón mediante: 1) expansión de células ES en presencia de LIF durante 2 a 3 días, 2) generación de cuerpos embrioides en ausencia de LIF durante 4 días, 3) selección de células positivas para nestina utilizando medio ITSFn durante 6 a 7 días, 4) expansión de precursores endocrinos pancreáticos en medio N2 que contenía suplemento de medio B27 y bFGF durante 6 días, y 5) inducción de diferenciación en células secretoras de insulina mediante la retirada del bFGF y la adición de nicotinamida.

Sin embargo, no son sólo la secuencia y la duración de las diversas etapas o las series de adición de los diferentes factores las que resultan importantes en la determinación de la diferenciación celular. Debido a que el desarrollo embrionario se encuentra regulado por la acción de gradientes de factores de señalización que proporcionan información posicional, puede esperarse que la concentración de un solo factor de señalización, y también la concentración relativa de dos o más factores, resultará importante para especificar el destino de una población celular *in vitro* e *in vivo*. Las concentraciones de factor varían durante el desarrollo y las células madre responden de manera diferente a diferentes concentraciones de la misma molécula. Por ejemplo, las células madre aisladas a partir del SNC de embriones de estadio tardío responden de manera diferente a diferentes concentraciones de EGF: las concentraciones bajas de EGF resultan en una señal para proliferar, mientras que las concentraciones más elevadas de EGF resultan en la proliferación y la diferenciación en astrocitos.

Muchos de los factores que se ha descubierto que influyen sobre la autorenovación y la diferenciación de células madre *in vitro* son moléculas naturales. Lo anterior resulta predecible, debido a que la diferenciación resulta inducida y controlada por moléculas señalizadoras y receptores que actúan a lo largo de rutas de transducción de señales. Sin embargo, de la misma manera, resulta probable que muchos compuestos sintéticos presenten un efecto sobre la diferenciación de células madre. Estos compuestos sintéticos que presentan una elevada probabilidad de interactuar con dianas celulares dentro de las rutas de señalización y transducción de señales (denominadas dianas relacionadas con la acción de los fármacos) se sintetizan rutinariamente, por ejemplo para el cribado de fármacos por parte de compañías farmacéuticas. Tras conocerse, estos compuestos pueden utilizarse para dirigir la diferenciación de células madre *ex vivo*, o pueden administrarse *in vivo*, en cuyo caso actuarían sobre células madre residentes en el órgano diana de un paciente.

Variables comunes en el cultivo de tejidos

Durante el desarrollo de condiciones para el cultivo con éxito de un tipo celular particular, o con el fin de conseguir o modular un proceso celular, con frecuencia resulta importante considerar una diversidad de factores.

Un factor importante es la decisión de si propagar las células en suspensión o en forma de una monocapa unida a un sustrato. La mayoría de células prefieren adherirse a un sustrato, aunque algunas, incluyendo las células transformadas, las células hematopoyéticas y las células procedentes de ascites, pueden propagarse en suspensión.

Bajo la premisa de que el cultivo es de células adherentes, un factor importante es la elección de sustrato de adhesión. La mayoría de laboratorios utiliza plásticos desechables como sustratos para el cultivo de tejidos. Entre los plásticos que han sido utilizados se incluyen poliestireno (el tipo más común), polietileno, policarbonato, Perspex, PVC, teflón, celofano y acetato de celulosa. Es probable que pueda utilizarse cualquier plástico, aunque muchos de ellos requerirán un tratamiento para que sean humectables y resulten adecuados para la unión de células. Además, resulta muy probable que pueda utilizarse cualquier sustrato sólido preparado convenientemente para proporcionar un soporte para las células, y entre los sustratos que se han utilizado hasta ahora se incluyen vidrio (por ejemplo vidrios aluminoborosilicato y sódico-cálcico), caucho, fibras sintéticas, dextranos polimerizados, metal (por ejemplo acero inoxidable y titanio) y otros.

Algunos tipos celulares, tales como epitelio bronquial, endotelio vascular, músculo esquelético y neuronas, requieren que el sustrato de crecimiento se encuentre recubierto con productos biológicos, habitualmente materiales de matriz extracelular, tales como fibronectina, colágeno, laminina, polilisina u otros. El sustrato de crecimiento y el procedimiento de aplicación (recubrimiento en húmedo o en seco, o la gelificación) pueden presentar un efecto sobre procesos celulares, tales como las características de crecimiento y de diferenciación de las células, y éstas deben determinarse empíricamente tal como se ha comentado anteriormente.

Probablemente la más evidentemente importante de las variables en el cultivo celular es la elección de medio cultivo y los suplementos, tales como el suero. Estos proporcionan un compartimiento acuoso para el crecimiento

celular, que se completa con nutrientes y diversos factores, algunos de los cuales han sido indicados anteriormente, y otros que se encuentran pobremente definidos. Algunos de estos factores resultan esenciales para la adhesión, otros para transportar información (por ejemplo hormonas, mitógenos, citoquinas) y otros como destoxificantes. Entre los medios utilizados comúnmente se incluyen RPMI 1640, sales MEM/Hank, sales MEM/Earle, F12, DMEM/F12, L15, MCDB 153 y otros. Los diversos medios pueden ser ampliamente diferentes en sus constituyentes, entre algunas de las diferencias comunes se incluyen la concentración de bicarbonato sódico, la concentración de iones divalentes, tales como Ca y Mg, la composición del tampón, antibióticos, elementos traza, nucleósidos, polipéptidos, compuestos sintéticos, fármacos, etc. Es bien conocido que diferentes medios son selectivos, es decir, estimulan el crecimiento de únicamente algunos tipos celulares. Los suplementos del medio, tales como suero, extractos de pituitaria cerebral y otros extractos, con frecuencia resultan esenciales para el crecimiento de las células en cultivo, y además con frecuencia son responsables de la determinación del fenotipo de las células en el cultivo, es decir, pueden determinar la supervivencia celular o de dirigir la diferenciación. El papel de los suplementos en procesos celulares, tales como la diferenciación, es complejo y depende de la concentración e los mismos, del punto temporal en el que se añaden al cultivo, del tipo celular y del medio utilizado. La naturaleza indefinida de estos suplementos, y su potencial de afectar el fenotipo celular, han motivado el desarrollo de medios libres de suero. Al igual que con todos los medios, el desarrollo de los mismos se ha producido en gran parte por ensayo y error, tal como se ha comentado anteriormente.

La fase gaseosa del cultivo de tejidos también resulta importante y la composición y volumen de la misma que debería utilizarse puede depender del tipo de medio utilizado, de la cantidad de tamponamiento necesaria, de si el recipiente de cultivo se encuentra abierto o sellado y de resulta necesario modular un proceso celular particular. Entre las variables comunes se incluyen la concentración de dióxido de carbono y de oxígeno.

Entre otras condiciones importantes para el cultivo de tejidos se incluyen la elección de recipiente de cultivo, la cantidad de espacio de cabeza, la densidad de inoculación, la temperatura, la frecuencia de las sustituciones de medio, el tratamiento con enzimas, la tasa y modo de agitación o mezcla.

Por lo tanto, la variación de las condiciones de cultivo es un procedimiento para conseguir un proceso celular deseado. Un aspecto de la invención reconoce que la variación de las condiciones de cultivo celular de manera seriada puede ser un procedimiento altamente efectivo para conseguir un efecto celular. En diversas aplicaciones, por ejemplo en estudios de diferenciación celular, con frecuencia es el caso de que resulta necesaria una serie específica de diferentes condiciones de cultivo de tejido para llevar a cabo un proceso celular. Entre las diferentes condiciones pueden incluirse adiciones o retiradas del medio o el cambio de medio en puntos específicos del tiempo. Este conjunto de condiciones, del que se proporcionan ejemplos posteriormente, se desarrollan comúnmente mediante ensayo y error, tal como se ha comentado anteriormente.

Formación de unidades celulares

Un aspecto importante de la presente invención es que pueden cultivarse grupos de células (colonias celulares) en cultivo celular bajo diversas condiciones y que la colonia puede mantener en gran parte su integridad bajo diversas condiciones, cuando se la perturba y cuando se mezcla con otras colonias. Estos grupos o colonias se denominan en la presente memoria unidades celulares. La formación de unidades celulares puede conseguirse, a título de ilustración, cultivando células como cultivos adherentes sobre sustratos sólidos, tales como portadores. Si se produce la proliferación celular tras la siembra sobre los portadores, las células hija se unirán sobre el mismo portador y formarán parte de la misma colonia. En general, las células adherentes vivas no se disocian con facilidad del sustrato de crecimiento de las mismas, y de esta manera persiste la integridad de la colonia celular a pesar de cualquier manipulación mecánica del portador, la agitación del medio de cultivo o la transferencia a otro sistema de cultivo de tejidos. De manera similar, si en cualquier momento se introducen múltiples portadores en el mismo recipiente (por ejemplo se agrupan las perlas), no se producirá transferencia sustancial de células de una perla a otra.

Una ventaja de cultivar células en unidades o colonias es que si se introduce una unidad en serie en un conjunto de diferentes medios de cultivo de tejido, todas las células que comprende la colonia habrán sido expuestas a la misma serie de condiciones de cultivo, en el mismo orden y durante el mismo periodo de tiempo. El cultivo de células en unidades que no son necesariamente adherentes al recipiente de cultivo de tejidos presenta la ventaja de que pueden extraerse colonias individuales y transferirse a un recipiente de cultivo diferente. Una de las ventajas de este procedimiento es que puede miniaturizarse el cultivo de tejidos: sólo resultan necesarias relativamente pocas células para colonizar una perla microportadora (ver posteriormente) en comparación con hasta el matraz de cultivo de tejidos más pequeño. Una ventaja adicional de cultivar unidades celulares formadas sobre portadores es que resulta posible escalar el cultivo celular. El crecimiento de células madre sobre portadores ofrece una manera de escalar la producción para proporcionar material suficiente para la terapia con células madre. Igualmente, la diferenciación de las células madre sobre portadores ofrece una manera de escalar la producción a medida que transcurre la diferenciación, proporcionando finalmente suficiente material para las terapias de sustitución de células. El escalado de dichos cultivos celulares requiere por lo menos 50 g (peso seco) de microportador, preferentemente 100 g, 500 g, 1 kg, 10 kg o más.

Otra ventaja importante de formar unidades celulares sobre sustratos sólidos es que el sustrato, y por lo tanto las células unidas por medio de asociación, pueden etiquetarse mediante diversos medios.

Las esferas de vidrio de 3 mm y de 5 mm han sido ampliamente utilizadas como sustratos de adhesión celular, particularmente en biorreactores de perla de vidrio (por ejemplo las fabricadas por Meredos GmbH) utilizados para el escalado de los cultivos celulares. Estas perlas se utilizan típicamente en lechos empaquetados y no en cultivo por lotes, con el fin de evitar daños mecánicos a las células adherentes.

Por el contrario, cuando las células se cultivan sobre portadores más pequeños, pueden tratarse como un cultivo en suspensión. Un procedimiento común de cultivar células sobre portadores pequeños se denomina cultivo celular en microportadores (ver "Microcarrier cell culture, Principles and Methods", edición AA, disponible de Amersham Biosciences 18:1140-62. Los cultivos de microportador se utilizan comercialmente para la producción de anticuerpos y de interferón en fermentadores de hasta 4.000 litros. Se encuentra disponible una diversidad de microportadores, de una diversidad de formas y tamaños y de diferentes materiales. Las perlas microportadoras hechas de poliestireno (Biosilon, Nunc.), vidrio (Bioglass, Solohill Eng.), colágeno (Biospheres, Solohill Eng), DEAE sephadex (Cytodex-1, Pharmacia), dextrano (Dormacell, Pfeifer & Langen), celulosa (DE-53, Whatman), gelatina (Gelibead, Hazelton Lab.) y DEAE-dextrano (Microdex, Dextran Prod.) entre otros, se encuentran disponibles comercialmente. Estos portadores se encuentran bien caracterizados en términos de la gravedad específica de las perlas, el diámetro y el área superficial disponible para el crecimiento celular. Además, se encuentran disponibles varios (micro)portadores porosos con un área superficial muy incrementada para el crecimiento. Una característica adicional de estos portadores porosos es que resultan adecuados para el crecimiento de células tanto dependientes de anclaje, como de células en suspensión, que resultan transportadas mediante atrapado en la red de poros abiertos interconectados. Se encuentran disponibles portadores porosos en materiales tales como gelatina (Cultispher G, HyClone), celulosa (Cytocell, Pharmacia), polietileno (Cytoline 1 y 2, Pharmacia), caucho silicona (Immobilisil, Ashby Scientific), colágeno (Microsphere, Cellex Biosciences) y vidrio (Siran, Schott Glassware). Estos portadores resultan adecuados para sistemas de cultivo en lecho agitado, fluidizado o fijo.

Debido a que las propiedades físicas de portadores son bien conocidas, resulta fácil calcular el número de portadores utilizado en un experimento. Algunos de los portadores indicados y muchos otros se encuentran disponibles en forma de productos secos que pueden pesarse con exactitud y posteriormente prepararse mediante hinchado en medio líquido. Además puede calcularse y variarse el número de células utilizado para inocular un cultivo de microportador. Por ejemplo, un cultivo de Cytodex 3 (2 g/litro) inoculado a una densidad de 6 células por perla proporcionará un cultivo que contiene 8 millones de microportadores, sobre el que se cultivan 48 millones de células/litro a una densidad de 5×10^4 células/cm².

La recolección de células cultivadas sobre microportadores o la liberación de los marcajes de los microportadores (ver posteriormente) puede conseguirse mediante separación enzimática de las células y/o mediante digestión del portador según el caso: los portadores de gelatina pueden solubilizarse con tripsina y/o EDTA, los portadores de colágeno utilizando colagenasa y los portadores de dextrano utilizando dextranasa.

Además de los microportadores sólidos o porosos, las células pueden agruparse mediante amurallado, es decir, confinarse dentro de una barrera permeable al medio. Se han desarrollado sistemas de cultivo de membrana en los que una membrana de diálisis permeable retiene un grupo de células pero permite que el medio de cultivo y los constituyentes del mismo se intercambien libremente con los compartimientos internos y externos. También se ha desarrollado el cultivo celular en cartuchos de fibra hueca y se encuentran disponibles comercialmente una multitud de fibras e incluso sistemas listos para utilizar (por ejemplo de Amicon, Cellex Biosciences). También se ha desarrollado el encapsulado de células en matrices semisólidas, en el que las células se inmovilizan mediante adsorción, enlace covalente, entrecruzamiento o atrapado en una matriz polimérica. Entre los materiales que se han utilizado se incluyen gelatina, polilisina, alginato y agarosa. Un protocolo típico es mezclar agarosa al 5% a 40°C con una suspensión de células en el medio de crecimiento normal de las mismas, emulsionar la mezcla utilizando un volumen igual de aceite de parafina y enfriar en un baño de hielo, produciendo esferas de 80 a 200 μm de diámetro. Estas esferas pueden separarse del aceite y transferirse a un medio en un recipiente de cultivo de tejidos.

El atrapado de las células es un procedimiento simple para inmovilizar grupos de células, similar a la utilización de microportadores o de sustratos porosos. Una técnica simple es atrapar las células en fibras de celulosa, tales como DEAE, TLC, QAE, TEAE (todos disponibles de Sigma). Otros dispositivos más sofisticados son los cartuchos cerámicos que resultan adecuados para las células en suspensión, tal como en el sistema de cultivo Opticel (Cellex Biosciences).

Un experto en la materia contemplará, además de los procedimientos anteriores de creación de unidades celulares, otros procedimientos para crear agrupamientos de células, incluyendo formar cultivos 3D de células, tales como esferas neurales o cuerpos embrioides, o utilizar tejidos y efectivamente organismos completos, tales como *Drosophila* o *C. elegans*.

Las unidades celulares, o los sustratos que comprenden, pueden asociarse con un factor particular, incluyendo, aunque sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos químicos, tales como fármacos. El preacondicionamiento de sustratos puede conseguirse de muchas maneras, por ejemplo simplemente mediante la incubación del sustrato con el factor de interés, o mediante unión del factor covalentemente o no covalentemente al sustrato. Pueden incorporarse factores solubles en materiales secos mediante impregnación. Esta técnica se basa en la rápida entrada de líquido, que transporta factores solubles, en material poroso seco, que concomitantemente se hincha y queda listo para utilizar. Pueden incorporarse factores sólidos, por ejemplo mediante mezcla del factor en solución de fibrinógeno con

trombina, punto en el que se forma un coágulo de fibrina que contiene el factor. Resulta posible concebir múltiples otras maneras de asociar uno o más factores con un grupo celular, además de impregnar, atrapar o encapsular el factor conjuntamente con células.

5 Un procedimiento para asociar un grupo celular a varios factores diferentes es preformar cócteles de factores que posteriormente se asocian a un grupo celular particular. Un segundo procedimiento sería condicionar grupos celulares en varios factores. Utilizando las formulaciones secas de sustratos de crecimiento de grupo celular a título de ejemplo, el presente procedimiento implicaría en primer lugar hinchar parcialmente el sustrato en una solución que contiene un primer factor y posteriormente hinchar adicionalmente el mismo en una solución que contiene un segundo factor, resultando en un sustrato al que se han asociado ambos factores. Mediante el diseño de un protocolo sistemático de asociación de grupos celulares con diferentes combinaciones de diferentes factores, resultará posible muestrear el efecto sobre el grupo celular de cualquier combinación de un conjunto de factores.

15 Con independencia del procedimiento utilizado para condicionar las unidades celulares con factores, los factores resultan asimilados por las células que comprende la unidad celular. Los factores que se fugan hacia el medio de crecimiento se diluyen hasta el nivel en que la concentración de los mismos cae por debajo de los límites fisiológicamente relevantes y no presentan ningún efecto sobre cualquier grupo celular adicional al que se expongan. La difusión del factor hacia el exterior de, por ejemplo, la parte formadora de sustrato de la unidad celular se encuentra gobernada por parámetros tales como la naturaleza y las dimensiones del material, el diámetro medio de poro y el peso molecular y concentración del factor. Con el fin de calibrar el procedimiento en caso necesario, puede medirse la liberación del factor mediante ensayos físicos, tales como el análisis de HPLC o la liberación de factor marcado hacia el medio, o mediante ensayos biológicos, tales como el bioensayo de crecimiento del ganglio de la raíz dorsal para factores neurotróficos.

25 *Cultivo en serie combinatorial de células*

Cultivo celular por división y mezcla

30 La formación de unidades celulares (particularmente las unidades celulares microscópicas) además resulta útil para muestrear múltiples condiciones de cultivo de tejidos debido a que cada unidad celular constituye una unidad de fácil manipulación que puede exponerse a una diversidad de condiciones de cultivo celular. Por simplicidad, en el presente comentario se supone que los agrupamientos celulares son producidos por células en crecimiento en cultivo con microportadores, y los términos unidad celular, grupo celular, colonia y perla se utilizan intercambiamente. Sin embargo, los procedimientos descritos resultan igualmente aplicables a cualquier unidad celular, por ejemplo los indicados anteriormente. Un procedimiento particularmente eficiente para muestrear un número elevado de condiciones de cultivo celular se denomina cultivo celular combinatorial o cultivo celular por división y mezcla (figs. 1 y 2) y en una forma de realización implica la subdivisión en serie y la combinación de grupos de unidades celulares con el fin de muestrear múltiples combinaciones de condiciones de cultivo celular. En un aspecto de la invención, el procedimiento se inicia con un cultivo de partida inicial (o de diferentes cultivos de partida) de unidades celulares divididas en un número X_1 de alícuotas, conteniendo cada una múltiples perlas (grupos/colonias/portadores) que se cultivan separadamente bajo diferentes condiciones de cultivo. Tras el cultivo celular durante un tiempo dado, las unidades celulares pueden agruparse mediante combinación y mezcla de las perlas procedentes de las diferentes alícuotas. Este grupo puede dividirse nuevamente en un número X_2 de alícuotas, cada una de las cuales se cultiva bajo condiciones diferentes durante un periodo de tiempo, agrupando también posteriormente. Este procedimiento iterativo de división, cultivo y agrupamiento (o agrupamiento, división y cultivo, dependiendo de en qué punto se entre en el ciclo) de unidades celulares permite el muestreo sistemático de muchas combinaciones diferentes de condiciones de cultivo celular. La complejidad del experimento, o en otras palabras, el número de diferentes combinaciones de condiciones de cultivo celular sometidas a ensayo, es igual al producto del número de condiciones diferentes ($X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n$) muestreadas en cada ronda. Obsérvese que la etapa de agrupamiento de todas las unidades celulares previa a una división posterior puede ser opcional: una etapa en la que se agrupa un número limitado de unidades celulares, puede presentar el mismo efecto, tal como se ilustra en las figuras 3 y 4. Por lo tanto, la invención incorpora formas de realización de varios procedimientos relacionados de muestreo sistemático de múltiples combinaciones de condiciones de cultivo celular en las que se manipulan en masa grupos de unidades celulares.

55 Con independencia de la manera precisa con la que se muestree una diversidad de condiciones de cultivo celular por este medio, el procedimiento resulta eficiente debido a que múltiples unidades celulares pueden compartir un solo recipiente, dentro del cual se cultivan bajo condiciones idénticas, y puede llevarse a cabo utilizando únicamente unos pocos recipientes de cultivo en cualquier tiempo dado (el número de recipientes de cultivo durante la utilización resulta igual al número de muestras divididas). En muchos aspectos, el principio de este procedimiento resulta similar a la síntesis por división de bibliotecas químicas grandes (conocida como química combinatorial), que muestrea todas las posibles combinaciones de enlace entre los grupos de bloques de construcción químicos (ver, por ejemplo, *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press, 2000, Hicham Fenniri (editor)). Puede repetirse el cultivo por división y mezcla en cualquier número de rondas y puede muestrearse cualquier número de condiciones en cada ronda. Con la condición de que el número de unidades celulares (o perlas colonizadas en el presente ejemplo) sea superior o igual al número de condiciones diferentes muestreadas en todas las rondas, y bajo la suposición de que la división de las unidades celulares se produce de manera totalmente aleatoria, se espera que por lo menos una unidad celular que ha sido cultivada según cada una de las diversas combinaciones de condiciones de cultivo muestreadas en el experimento. Este procedimiento puede utilizarse para muestrear las condiciones de crecimiento o de diferenciación de cualquier

tipo celular, o la eficiencia de la producción de biomoléculas (por ejemplo la producción de eritropoyetina o interferón) por parte de cualquier tipo celular. Debido a que el procedimiento es iterativo, resulta óptimo para someter a ensayo los protocolos de cultivo de tejido multietapa, por ejemplo los indicados anteriormente en relación a la diferenciación de las células madre. Entre las variables que pueden muestrearse utilizando esta técnica se incluyen: tipo celular, agrupamiento celular (por ejemplo cultivo en microportador, encapsulado celular, organismo completo), sustrato de crecimiento (por ejemplo fibronectina sobre microportador), duración de la ronda de cultivo celular, temperatura, diferentes medios de cultivo (incluyendo diferentes concentraciones de constituyentes), factores de crecimiento, medios condicionados, cocultivo con diversos tipos celulares (por ejemplo células nodriza), extractos animales o vegetales, fármacos, otros compuestos químicos sintéticos, infección por virus (incluyendo virus transgénicos), adición de transgenes, adición de moléculas antisentido o antígeno (por ejemplo ARNi, triple hélice), entradas sensoriales (en el caso de organismos), estímulos eléctricos, lumínicos o redox y otros.

Cultivo celular por subdivisión

El propósito de llevar a cabo procedimientos de división y mezcla sobre unidades celulares es exponerlas sistemáticamente a una combinación predefinida de condiciones. El experto en la materia concebirá muchos medios diferentes de conseguir este resultado. Además de los procedimientos de división y mezcla y las variaciones de los mismos, resulta conveniente comentar brevemente los procedimientos de subdivisión. Un procedimiento de subdivisión implica subdividir un grupo de unidades celulares por lo menos dos veces, sin agrupamiento intermedio de las unidades celulares (fig. 5). Si se utilizan procedimientos de subdivisión durante un número elevado de rondas, se incrementa exponencialmente el número de muestras individuales generadas. En este caso resulta importante utilizar algún nivel de automatización, por ejemplo una plataforma robótica y sofisticados sistemas de rastreo de muestras. La ventaja de las etapas de subdivisión es que (debido que las unidades celulares no se han combinado) resulta posible segregar linajes de las diversas unidades celulares basándose en la historia de cultivo celular de las mismas. En consecuencia, pueden utilizarse las etapas de subdivisión para deducir si una condición de cultivo celular particular es responsable de algún proceso celular dado y por lo tanto pueden utilizarse para deducir la historia de cultivo de las unidades celulares (ilustrada en la fig. 6 y explicada en detalle en la sección titulada “Determinación de la historia de cultivo de una unidad celular”).

Protocolos predeterminados

La división y/o agrupamiento de las unidades celulares puede conseguirse de manera totalmente aleatoria o puede seguir un protocolo predeterminado. En el caso de que las unidades celulares se dividan y/o agrupen aleatoriamente, la segregación de una unidad celular dada hacia cualquier grupo no se encuentra predeterminada o prejuiciada en modo alguno. Con el fin de que resulte una elevada probabilidad de que por lo menos una unidad celular se haya expuesto a cada una de las posibles combinaciones de condiciones de cultivo celular, resulta ventajoso utilizar un número de unidades celulares mayor que el número total de combinaciones de condiciones de cultivo celular sometidas a ensayo. Por lo tanto, bajo determinadas circunstancias resulta ventajoso dividir y/o agrupar unidades celulares de acuerdo con un protocolo predeterminado, siendo el efecto global el bloqueo de las duplicaciones accidentales o de las omisiones de combinaciones. Puede planificarse opcionalmente por adelantado la manipulación predeterminada de unidades celulares y registrarse en una hoja de cálculo o programa informático, y ejecutarse operaciones de división y/o agrupamiento utilizando protocolos automáticos, por ejemplo robóticos. El marcaje de unidades celulares (ver a continuación) puede llevarse a cabo mediante cualquiera de entre varios medios, por ejemplo marcando con RFID, etiquetado óptico o codificación espacial. Se han descrito dispositivos robóticos capaces de determinar la identidad de una muestra y por lo tanto de dividir las muestras de acuerdo con un protocolo predeterminado (ver “Combinatorial Chemistry, A practical Approach”, Oxford University Press, 2000, editor H. Fenniri). Alternativamente, la robótica estándar de laboratorio de manipulación de líquidos y/o de cultivo de tejidos (por ejemplo tales como los fabricados por Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA; The Automation Partnership, Royston, Reino Unido) es capaz de codificar espacialmente la identidad de múltiples muestras y de añadir, extraer o trasladar las mismas de acuerdo con protocolos preprogramados.

Análisis y/o separación de unidades celulares

Tras cada ronda de cultivo celular, o tras un número definido de rondas, las unidades celulares pueden estudiarse con el fin de observar cualquier proceso celular dado que puede haber resultado afectado por las condiciones de cultivo de tejidos. Los ejemplos posteriormente son ilustrativos y pretenden limitar el alcance de la invención.

Tras cada ronda de cultivo celular, o tras un número definido de rondas, las unidades celulares pueden someterse a ensayo con el fin de determinar si existen elementos que muestren un nivel incrementado de proliferación celular. Lo anterior puede conseguirse mediante una diversidad de técnicas, por ejemplo mediante inspección visual de las unidades celulares bajo un microscopio, o mediante cuantificación de un producto marcador característico de la célula. Éste puede ser un marcador endógeno, tal como una secuencia particular de ADN o una proteína celular que pueda detectarse con un ligando o anticuerpo. Alternativamente, puede introducirse un marcador exógeno, tal como proteína fluorescente verde (GFP), en las unidades celulares sometidas a ensayo para proporcionar una lectura específica de las células (vivas). Las células vivas pueden visualizarse utilizando una diversidad de tinciones vitales, o a la inversa, pueden marcarse células muertas utilizando una diversidad de procedimientos, por ejemplo utilizando yoduro de propidio. Además, las unidades celulares marcadas pueden separarse de las no marcadas mediante una diversidad de técnicas, tanto manuales como automatizadas, incluyendo la purificación por afinidad (“panning”) o mediante separación celu-

lar activada por fluorescencia (FACS) o técnicas ampliamente similares (fig. 17). Dependiendo de la aplicación, puede resultar posible la utilización de equipos estándar de laboratorio, o puede resultar ventajosa la utilización de instrumentación especializada. Por ejemplo, determinados instrumentos de análisis y de separación (por ejemplo ver Union Biometrica Inc., Somerville MA, USA) presentan diámetros de celda de flujo de hasta un milímetro, que permite la separación en flujo de perlas con diámetros de hasta 500 micrómetros. Estos instrumentos proporcionan una lectura del tamaño de perla y la densidad óptica, así como dos longitud de onda de emisión fluorescente procedentes de etiquetas, tales como GFP, YFP o DS-rojo. Resultan posibles velocidades de separación de 180.000 perlas por hora y la dispensación en placas multipocillo o en un receptor en masa.

Tras cada ronda de cultivo celular, o tras un número definido de rondas, pueden someterse a ensayo las unidades celulares con el fin de determinar si existen elementos que muestran un genotipo o fenotipo particular. La determinación de genotipo puede llevarse a cabo utilizando técnicas bien conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la secuenciación de ADN y otros. Puede llevarse a cabo la determinación del fenotipo mediante una diversidad de técnicas, por ejemplo mediante inspección visual de las unidades celulares bajo un microscopio o mediante detección de un producto marcador característico de la célula. Éste puede ser un marcador endógeno, tal como una secuencia particular de ADN o ARN, o una proteína celular que pueda detectarse mediante un ligando, la conversión de un sustrato de enzima o un anticuerpo que reconozca un marcador fenotípico particular (por ejemplo ver el apéndice E de “Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions”. Department of Health and Human Services, junio de 2001). El marcador genético también puede ser exógeno, es decir, uno que ha sido introducido en la población celular, por ejemplo mediante transfección o transducción vírica. Son ejemplos de marcadores exógenos las proteínas fluorescentes (por ejemplo GFP) o los antígenos de superficie celular que no se expresan normalmente en un linaje celular particular o modificados con un epítipo o procedentes de una especie diferente. Puede expresarse un transgén o un gen marcador exógeno con elementos de control transcripcional asociados de una manera que refleje un patrón representativo de uno o más genes endógenos. Lo anterior puede conseguirse mediante asociación del gen con un promotor mínimo específico de un tipo celular o mediante integración del transgén en un locus particular (por ejemplo ver la patente europea EP 0695351). Las unidades celulares marcadas pueden separarse de las no marcadas mediante una diversidad de técnicas, tanto manuales como automatizadas, incluyendo la purificación por afinidad (“panning”) o mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS). Nishikawa *et al.* (Development vol. 125, p. 1747-1757, 1998) utilizaron marcadores de superficie celular reconocidos por anticuerpos para realizar el seguimiento de la diferenciación de células ES murinas totipotentes. Mediante la utilización de FACS pudieron identificar y purificar células del linaje hematopoyético en diversas etapas de diferenciación de las mismas.

Una técnica alternativa o complementaria para enriquecer unidades celulares de un genotipo o fenotipo particular es la selección genética de los grupos deseados. Lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, mediante la introducción de un marcador seleccionable en las unidades celulares, y someter a ensayo la viabilidad bajo condiciones selectivas, por ejemplo ver Soria *et al.* (Diabetes vol. 49, p. 1-6, 2000), quien utilizó dicho sistema para seleccionar las células secretoras de insulina a partir de células ES diferenciadas. Li *et al.*, (Curr. Biol. vol. 8, p. 971-974, 1998), identificaron progenitores neurales mediante la integración de β geo bifuncional marcador de selección/informador (que proporciona actividad β -galactosidasa y resistencia a G418) en el locus Sox2 mediante recombinación homóloga en células ES murinas. Debido a que una de las características de los progenitores neurales es la expresión de Sox2, y por lo tanto los genes marcadores integrados, estas células pudieron seleccionarse de entre linajes no neuronales mediante la adición de G418 tras inducir la diferenciación utilizando ácido retinoico. Pudo determinarse la viabilidad mediante inspección bajo un microscopio, o mediante seguimiento de la actividad β -gal. Al contrario que los enfoques de selección basados en el fenotipo, que pueden verse limitados por la disponibilidad de un ligando o anticuerpo apropiado, la selección genética puede aplicarse a cualquier gen expresado diferencialmente.

Determinación de la identidad o historia de cultivo celular de una unidad celular

Durante la manipulación de un número elevado de unidades celulares, puede confundirse la identidad y/o historia de cultivo celular de las mismas (por ejemplo la cronología y la naturaleza exacta de una serie de condiciones de cultivo a las pueden haber sido expuestas cualquier grupo o unidad. Por ejemplo, el protocolo de división y mezcla de cultivo celular incluye necesariamente mezclar unidades celulares en cada ronda, dificultando el seguimiento de las unidades individuales. La determinación de la historia de cultivo celular de una unidad celular en una mezcla de unidades celulares que han sido sometidas a múltiples condiciones de cultivo en ocasiones se denomina “deconvolución” de la historia de cultivo celular. Un procedimiento para llevar a cabo lo anterior es marcar unidades celulares y por lo tanto resulta ventajoso marcar las unidades celulares. El marcaje puede llevarse a cabo al inicio de un experimento o durante cada ronda de un experimento, y puede implicar un único marcaje (que puede modificarse o no durante el curso de un experimento) o una serie de marcajes que comprende un único agregado. De manera similar, la lectura del marcaje o marcajes puede tener lugar durante cada ronda o simplemente al final del experimento. Preferentemente, se leen marcajes únicos, tales como marcajes RFID, durante cada ronda, mientras que los marcajes añadidos en serie en cada ronda se leen al final de un experimento.

El marcaje de las unidades celulares puede conseguirse mediante una diversidad de medios, por ejemplo marcando las células mismas o cualquier material al que las células se encuentran unidas o asociadas de otra manera. Cualquiera de los procedimientos químicos y no químicos utilizados para codificar bibliotecas combinatoriales sintéticas puede adaptarse para este fin y algunos de ellos se describen en Methods in Enzymology vol. 267, (1996), “Combinatorial Chemistry”, John N. Abelson (editor); Combinatorial Chemistry, Oxford University Press, (2000), Hicham Fenniri

(editor); K. Braeckmans *et al.*, “Scanning the code”, *Modern Drug Discovery* (febrero de 2003); K. Braeckmans *et al.*, “Encoding microcarriers: Present and Future Technologies”, *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 1, p. 447-456, (2002). A continuación se proporcionan algunos ejemplos de procedimientos de marcaje.

5 Un procedimiento de marcaje de unidades celulares implica asociar las unidades celulares a una etiqueta que resulta modificada secuencialmente al someterla a diferentes condiciones de cultivo. Lo anterior puede implicar la adición o extracción de unidades adicionales a la etiqueta, de manera que la estereoquímica, secuencia o masa de las mismas resulta alterada, o la alteración de memoria electrónica, tal como en transpondedores RF de lectura-escritura (ver posteriormente).

10 Otro procedimiento de marcaje de unidades celulares implica asociar secuencialmente etiquetas únicas a las unidades celulares cada vez que se cultivan bajo condiciones diferentes, de manera que la detección e identificación posteriores de las etiquetas permite un registro inequívoco de la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celular a las que ha sido expuesta la unidad celular. Las etiquetas pueden resultar asimiladas por células o unirse a la superficie celular mediante adsorción, o mediante un ligando o anticuerpo adecuado, o conjugarse a una matriz asociada a la célula, tal como un portador mediante adsorción, fuerzas coloidales o una diversidad de enlaces, tales como el enlace covalente o el enlace no covalente, por ejemplo el enlace biotina-estreptavidina. Por ejemplo, una etiqueta simple que puede introducirse en las células o unirse a una matriz asociada a las células es un oligonucleótido de longitud y/o secuencia definida. Los oligonucleótidos pueden comprender cualquier clase de ácido nucleico (por ejemplo ARN, ADN, APN, lineal, circular o vírico) y puede contener secuencias específicas para la amplificación (por ejemplo secuencias de cebador para PCR) o etiquetas para la detección (por ejemplo fluoróforos o inhibidores, o etiquetas isotópicas). La detección de estos puede ser directa, por ejemplo mediante secuenciación de los oligos o mediante hibridación de los mismos con secuencias complementarias (por ejemplo en una serie o chip) o indirecta, tal como mediante seguimiento de un producto génico codificado por un oligonucleótido, o la interferencia del nucleótido con una actividad celular (por ejemplo la inhibición por antisentido de un gen particular). Un procedimiento ventajoso para amplificar los ácidos nucleicos es mediante la amplificación por círculo rodante (RCA; V. Demidov, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2(6):89-95, 2002), en la que las etiquetas de ácido nucleico pueden comprender moldes del RCA, cebadores de alargamiento o travesaños que ayudan a la circularización de moldes minicírculos).

30 Puede utilizarse cualquier etiqueta molecular o macromolecular con la condición de que sea detectable, incluyendo etiquetas péptidos, compuestos pigmentados o fluorescentes, aminor secundarias, halocarburos, mezclas de isótopos estables, etc. Las etiquetas pueden unirse a unidades celulares directamente o mediante un intermediario, por ejemplo un anticuerpo cultivado contra un componente de la unidad celular, o mediante un par interaccionante, tal como biotina-estreptavidina. Además, las etiquetas pueden protegerse frente a la degradación con los componentes del cultivo celular, por ejemplo mediante modificación química o de otro tipo o mediante encapsulado. El encapsulado de etiquetas puede tener lugar en muchos medios diferentes, por ejemplo en perlas, muchos tipos de las cuales se encuentran disponibles de suministradores tales como Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA) y el encapsulado puede utilizarse para estandarizar la dosis de etiqueta, además de proporcionar componentes para la amplificación y/o detección de la etiqueta (por ejemplo proporcionando cebadores de PCR para la utilización con una etiqueta de ADN). Un procedimiento preferente de marcaje de las unidades celulares hace uso de perlas fluorescentes, tales como aquéllas fabricadas por Luminex Corporation (Austin, TX, USA). El sistema Luminex comprende perlas de poliestireno que puede derivatizarse externamente o no (por ejemplo con avidina o anticuerpo) y se encuentra pigmentados internamente con diferentes proporciones de dos fluoróforos espectralmente separados y un lector que es capaz de caracterizar la firma espectral de cada perla. Un procedimiento preferente adicional hace uso de perlas tales como aquéllas fabricadas por Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA). El sistema de Bangs comprende conjuntos de perlas que pueden distinguirse basándose en los diferentes tamaños (por ejemplo conjuntos de perlas de 4,4 μm y de 5,5 μm de diámetro). Las perlas dentro de cada conjunto además pueden distinguirse entre sí basándose en la diferente intensidad de fluorescencia, debido a la diferente carga con un solo pigmento fluorescente. Resulta posible utilizar muchos pigmentos diferentes con diferentes características de absorción o de emisión, que pueden cargarse internamente o unirse externamente a portadores mediante una multiplicidad de medios. Además, resulta posible utilizar “puntos cuánticos” para obtener un número muy elevado de diferentes marcajes fluorescentes que pueden leerse convenientemente.

55 Los sustratos de crecimiento celular, tales como los indicados en relación a la formación de las unidades celulares, pueden derivatizarse o recubrirse con sustancias que faciliten el etiquetado y que no interfieran con el crecimiento celular. Un procedimiento preferente de derivatización de portadores es la modificación de los mismos covalentemente o no covalentemente con biotina, a la que puede unirse una etiqueta mediante estreptavidina o avidina. En general, resulta importante utilizar una etiqueta que no induzca por sí misma un efecto celular (es decir, una etiqueta inerte) y que pueda distinguirse de moleculares presentes en unidades celulares o en el medio de cultivo, y que pueda unirse a su diana y posteriormente detectarse sobre el fondo de dichas moléculas. Para facilitar la detección, puede resultar ventajoso eluir selectivamente las etiquetas de las unidades celulares o desprender las células de las unidades celulares utilizando condiciones selectivas. También pueden contemplarse estrategias de etiquetado molecular más complicadas, incluyendo la estrategia de “codificación binaria”, en la que la información se registra con un conjunto de códigos binarios asignados a un conjunto de etiquetas moleculares y las mezclas de las mismas.

65 La detección de etiquetas puede conseguirse mediante una diversidad de procedimientos que resultan familiares para los expertos en la materia. Entre los procedimientos se incluyen la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear, la secuenciación, la hibridación, la detección de antígenos, la electroforesis, la espectroscopía, la microscopía, el análisis de imágenes, la detección de fluorescencia, etc.

Resultan de particular interés las estrategias de marcaje o de codificación en las que el marcaje se lleva a cabo únicamente una vez o en las que el marcaje y/o detección no son físicos y por lo tanto, no invasivos. La identificación de radiofrecuencias (RFID) es un ejemplo de un sistema que muestra estas propiedades. La RFID hace uso de transpondedores (etiquetas RF), antenas y lectores. Una etiqueta RF es un circuito electrónico pequeño, habitualmente incluido en vidrio o plástico, que en su forma más simple proporciona acceso a un código de identificación único que puede “leerse”, sin contacto ni línea de visión, mediante un dispositivo electrónico adecuado. Las etiquetas también pueden almacenar información generado por el usuario, nuevamente sin contacto ni línea de visión. Un “lector” es una unidad electrónica que transfiere información hacia y desde una o más etiquetas (debe indicarse que el término lector se utiliza intercambiamente refiriéndose tanto a una unidad de sólo lectura como de lectura/escritura). El tamaño y características de un lector pueden variar considerablemente, y puede funcionar aisladamente o conectarse a un sistema informático remoto. Se utiliza una antena para transmitir información de un lector a una etiqueta y para recibir información enviada por una etiqueta RF. El tamaño y formato de una antena reflejarán la aplicación específica y pueden abarcar desde una hélice circular pequeña hasta estructuras planares grandes. Un sistema RFID puede funcionar aisladamente o encontrarse conectado a un ordenador remoto para una interpretación y manipulación más integradoras de los datos de identificación y datos asociados derivados de una etiqueta. Se describe una estrategia RFID utilizada en química combinatorial en Nicolaou *et al.* (Angew Chem. Intl. Ed. Engl., vol. 34, página 2289, 1995) y comprende: (i) una envoltura porosa que contiene un sustrato de síntesis y la etiqueta semiconductor, (ii) la resina de síntesis de fase sólida, (iii) una unidad semiconductor etiqueta de radiofrecuencia direccionable única o múltiple incluida en vidrio capaz de recibir, almacenar y emitir señales de radiofrecuencia. Podría adaptarse un dispositivo similar para cultivar y realizar el seguimiento de unidades celulares simplemente sustitución de la resina de síntesis de fase sólida con microportadores de cultivo de tejidos o unidades celulares adecuadas. Resulta posible concebir más variaciones de lo anterior, incluyendo, aunque sin limitación, etiquetas RF (recubiertas o no recubiertas) sobre las que pueden cultivarse las células directamente o etiquetas RF implantadas en unidades celulares u organismos.

De esta manera, las etiquetas no deben necesariamente distinguirse por su estructura química o molecular en primera instancia. Pueden diseñarse múltiples variaciones de la estrategia de etiquetado no químico con el fin de determinar la identidad de una unidad celular dada en una mezcla o de deducir la identidad de las diferentes unidades celulares que comprende una mezcla. Por ejemplo, se han descrito procedimientos ópticos o visuales de etiquetado en los que objetos de diferente forma, objetos codificados gráficamente o diferentes colores indican la identidad de una muestra (por ejemplo ver Guiles *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. vol. 37, p. 926, 1998; Luminex Corp., Austin TX, USA; BD Biosciences; Memobead Technologies, Ghent, Bélgica) o en los que un patrón o un código de barras se encuentra grabado sobre un sustrato, tal como una barra de cerámica y es reconocido utilizando tecnología de reconocimiento de patrones (por ejemplo ver Xiao *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. vol. 36, p. 780, 1997; SmartBead Technologies, Babraham, Reino Unido).

Un procedimiento adicional de seguimiento o de marcaje de unidades celulares es codificar la identidad de las mismas espacialmente, es decir por su posición en el espacio. En el presente procedimiento, se segregan diferentes unidades celulares en posiciones relativas definidas y estas posiciones indican o codifican la identidad de las unidades. Por ejemplo, las unidades celulares pueden cultivarse en una serie, en la que la identidad y/o historia de cultivo de cada unidad son conocidos y se asocian a una posición particular en el ensayo. En las formas más simples, dichas series pueden comprender colecciones de matraces de cultivo de tejidos, pocillos de una placa multipocillo o localizaciones sobre un portaobjetos de vidrio u otra superficie. Pueden encontrarse ejemplos de estrategias de codificación posicional en Geysen *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 81, p. 3998-4002, 1984); Fodor *et al.*, (Science vol. 251, p. 767-773, 1991), Ziauddin y Sabatini, (Nature vol. 411, p. 107-110, 2001) y Wu *et al.*, (Trends Cell Biol. vol. 12(10), p. 485-8, 2002).

Las unidades celulares se encuentran marcadas. El marcaje de una unidad celular permite derivar información útil del experimento respecto al resultado de las condiciones particulares muestreadas por la unidad celular marcada, es decir, no por la totalidad de las unidades celulares. Alternativamente, en ocasiones resulta ventajoso marcar uno o unos cuantos grupos de unidades celulares, la totalidad de los cuales ha sido expuesto a un protocolo de cultivo determinado, por ejemplo un grupo de unidades celulares que han sido segregadas en el mismo medio durante una etapa particular de división o de agrupamiento. También resultará evidente que el marcaje de determinadas unidades celulares permite inferir la identidad de otras unidades celulares (posiblemente no marcadas).

De manera similar, resultará evidente que llevar a cabo experimentos de cultivo celular en los que se omiten diversas condiciones puede proporcionar información respecto a la utilidad de aquellas condiciones con respecto a un resultado experimental particular. Por lo tanto, resulta posible evaluar cada una de las condiciones muestreadas de una manera según la invención mediante la repetición del experimento varias veces, omitiendo cada vez un conjunto diferente de condiciones.

También pueden utilizarse etapas de cultivo de subdivisión para determinar el efecto de un conjunto particular de condiciones sobre el resultado experimental. En efecto las etapas de subdivisión resultan en la formación de linajes particulares de unidades celulares, cada una de las cuales han sido expuestas a condiciones únicas de cultivo celular en el momento de la ramificación. Mediante el estudio de los diferentes linajes, resulta posible determinar la utilidad de las condiciones de cultivo de tejido estudiado en el punto de ramificación (fig. 6) con respecto a un resultado experimental particular.

La invención se describe adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Diferenciación de unidades celulares ES mediante la utilización del cultivo celular por subdivisión*

Se llevó a cabo un experimento de cultivo de división y mezcla con el fin de someter a ensayo las condiciones de cultivo de tejidos que podrían dar lugar a neuronas de un fenotipo dopaminérgico utilizando un cultivo de partida de células ES de ratón no diferenciadas.

10

Se cultivaron las células ES no diferenciadas sobre placas de cultivo de tejido recubiertas con gelatina en presencia de 1.400 U ml^{-1} de factor inhibidor de la leucemia (LIF; Chemicon) en medio de células ES constituido por un medio esencial mínimo de Dulbecco knockout (DMEM; GIBCO/BRL) suplementado con FCS al 15%, aminoácidos no esenciales MEM 100 mM, 2-mercaptoetanol 0,55 mM, L-glutamina y antibióticos (todos de GIBCO/BRL). Con el fin de inducir la formación de cuerpos embrioides (EB), se disociaron las células para formar una suspensión de células individuales utilizando tripsina al 0,05% y EDTA al 0,04% en PBS y se sembraron en placa sobre placas de cultivo bacteriano no adherente a una densidad de 2 a $2,5 \times 10^4$ células cm^{-2} en el medio indicado anteriormente. Las EB se formaron durante cuatro días y después se sembraron en placa sobre una superficie adhesiva de cultivo de tejidos en el medio de células ES. Tras 24 horas de cultivo, se consiguió la selección de células positivas para nestina mediante la sustitución del medio de células ES por insulina/transferrina/selenio/fibronectina libre de suero (ITSFn) y la incubación durante 10 días.

15

20

Dichas células positivas para nestina se utilizaron como el material de partida para un experimento de cultivo de división y mezcla. Específicamente, las células se disociaron con tripsina al 0,05%/EDTA al 0,04% y se sembraron sobre >10.000 bioesferas de vidrio (Whatman, Reino Unido) a una densidad de aproximadamente $1,5$ a 2×10^5 células cm^{-2} . Las placas de cultivo de tejidos en lo sucesivo se prepararon a partir de material no adherente.

25

Se precubrieron perlas de vidrio estériles con poliornitina (15 mg ml^{-1}) y laminina ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$, ambos de Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Las perlas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, cada uno de los cuales se incubó en uno de cuatro medios de cultivo de tejidos (denominados A1, A2, A3 o A4), la composición de los cuales se proporciona en la Tabla 1, posteriormente. Dichos medios se basan en medio N2 modificado según Johe *et al.* (Genes Dev. vol. 10, p. 3129-3140, 1996) y que en lo sucesivo se denominan simplemente medio N2.

30

TABLA 1

35

A1	medio N2 suplementado con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de laminina
A2	medio N2 suplementado con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de laminina, 10 ng ml^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN)
A3	medio N2 suplementado con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de laminina, 10 ng ml^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal murino de SHH (500 ng ml^{-1} , de R&D Systems)
A4	medio N2 suplementado con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de laminina, 10 ng ml^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal murino de SHH (500 ng ml^{-1} , R&D Systems) y FGF8 murino isoforma b (100 ng ml^{-1} , R&D Systems)

40

45

50

Se expusieron cuatro conjuntos de perlas a los medios respectivos de cultivo de tejidos durante dos días y después las perlas de los cuatro cultivos se agruparon, se lavaron brevemente en medio N2 y nuevamente se dividieron en cuatro conjuntos, cada uno de los cuales se incubó en uno de los medios A1 a A4. Tras dos días, se repitió nuevamente este procedimiento con el fin de muestrear el cultivo celular en diversas combinaciones de los medios A1 a A4 durante un periodo de seis días. Tras este periodo, se agruparon las perlas de los cuatro cultivos, se lavaron brevemente en medio N2 y se dividieron aleatoriamente en cuatro nuevos conjuntos, cada uno de los cuales se incubó en uno de entre cuatro nuevos medios (denominados B1, B2, B3 o B4), la composición de los cuales se proporciona en la Tabla 2 a continuación.

55

60

65

ES 2 307 969 T3

TABLA 2

5	B1	medio N2 suplementado con 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de laminina, 10 ng ml^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal murino de SHH (500 ng ml^{-1} , R&D Systems) y FGF8 murino isoforma b (100 ng ml^{-1} , R&D Systems)
10	B2	medio N3FL: medio DMEM/F12 (1:1) que contiene insulina (25 $\mu\text{g/ml}$), transferrina (50 $\mu\text{g/ml}$), progesterona (20 nM), putrescina (100 μM), cloruro de selenio (30 nM), bFGF (5 ng/ml) y laminina (1 $\mu\text{g/ml}$)
15	B3	medio N2 suplementado con HEPES 25 mM (pH 7,4), laminina (1 mg ml^{-1}), AMPc (1 μM , Sigma, St. Louis, MO) y ácido ascórbico (200 μM , Sigma, St. Louis, MO)
20	B4	medio N2 suplementado con laminina (1 mg ml^{-1}), AMPc (1 μM , Sigma, St. Louis, MO) y ácido ascórbico (200 μM , Sigma, St. Louis, MO)

Cada ronda de cultivo duró cinco días, después se agruparon las perlas de los cuatro cultivos, se lavaron brevemente en medio N2 y se dividieron en cuatro conjuntos, cada uno de los cuales se incubó nuevamente en uno de los medios B1 a B4. Este procedimiento se llevó a cabo un total de tres veces, de manera que las perlas se encontraron presentes en el medio B un total de 15 días.

Incluido en la composición de los diferentes medios de cultivo se encontraba un marcaje oligonucleótido único que se adhería a los microportadores de vidrio (o células) en pequeñas cantidades y posteriormente se amplificó y se analizó con el fin de deducir la localización de una perla microportador en cualquier punto del tiempo en el régimen de cultivo de división y mezcla. La secuencia de ADN de cada marcaje era diferente, de manera que pudiesen distinguirse los diferentes medios (por ejemplo, medio A1 vs. medio A2) y también la exposición al mismo medio en dos rondas diferentes de cultivo de división y mezcla (por ejemplo, medio A1 utilizado el día 0 vs. utilizado el día 4). En la Tabla 3 posteriormente se proporciona un resumen del régimen de cultivo de división y mezcla en los diversos medios durante un total de 21 días. Cada entrada en la tabla también muestra (entre paréntesis) la identidad del marcaje incluido en el matraz de cultivo de tejidos. Se muestra en la Tabla 4 la secuencia completa de ADN del marcaje.

TABLA 3

Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 11	Día 16
A1 (L1)	A1 (L5)	A1 (L9)	B1 (L13)	B1 (L17)	B1 (L21)
A2 (L2)	A2 (L6)	A2 (L10)	B2 (L14)	B2 (L18)	B2 (L22)
A3 (L3)	A3 (L7)	A3 (L11)	B3 (L15)	B3 (L19)	B3 (L23)
A4 (L4)	A4 (L8)	A4 (L12)	B4 (L16)	B4 (L20)	B4 (L24)

ES 2 307 969 T3

Mediante el cultivo de división y mezcla de las células madre tres veces en los diferentes medios A seguido de tres veces en los diferentes medios B, resultó posible muestrear 4.096 protocolos de cultivo de tejidos diferentes, siendo éste el número total de diferentes combinaciones de los tampones anteriormente indicados a las que se expusieron las diferentes perlas.

Tras la ronda final de cultivo de división y mezcla, las perlas se agruparon, se lavaron brevemente en medio N2 y se analizaron mediante FACS utilizando protocolos estándar. Brevemente, las células se fijaron en paraformaldehído al 4%/ácido pícrico al 0,15% en PBS. Con el fin de detectar las neuronas dopaminérgicas, las células se tiñeron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (Sigma), seguido de un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), ambos según las instrucciones del fabricante.

Las cinco perlas con la intensidad de fluorescencia más elevada se separaron en pocillos separados de una placa de PCR y los marcajes oligonucleótidos se amplificaron con treinta ciclos de PCR utilizando polimerasa Taq (Stratagene, La Jolla, CA) y los cebadores mostrados en la Tabla 5 a continuación.

TABLA 5

PRF1	TGCAGGAATTCGCGCTATGC
PRR2	CAGGAATTCGGCCGGGTCGG

Se purificaron los productos de PCR mediante extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación con etanol, se digirieron utilizando el enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs, Beverley, MA) y se clonaron en vector pBluescript II KS+ preparado de manera similar (Stratagene, La Jolla, CA). El vector recombinante se electroporó en células *E. coli* DH5 α competentes y se sembró en medio que contenía antibiótico ampicilina. Se recolectaron doscientas colonias para cada perla analizada y se preparó plásmido de ADN y se secuenciaron en la región del polilinker.

El análisis de secuenciación reveló que la mayoría de perlas que portaban células con un fenotipo dopaminérgico se marcaron con oligos (L4, L8, L12, L16, L20 y L24). La correlación de estos marcajes con las condiciones de cultivo celular respectivas de los mismos sugirió que estas perlas habían sido divididas en medio A1 durante un total de seis días (los días 0, 2 y 4) seguido de medio B4 durante quince días adicionales (los días 6, 11 y 16). Se dedujo que este protocolo de cultivo resultaba apropiado para la producción de neuronas dopaminérgicas mediante el procesamiento de células ES de ratón tal como se ha indicado anteriormente.

Tras establecer dichas condiciones, se cultivaron nuevamente células ES no diferenciadas según el protocolo anterior (es decir, expansión, formación de EB, selección por nestina, etc.) sin pasar por el procedimiento de cultivo de división y mezcla. Las células se cultivaron sobre placas de cultivo de tejido adhesivas en lugar de perlas, no se añadieron marcajes oligonucleótidos a los diferentes medios de cultivo, y se sometieron a ensayo únicamente las condiciones de cultivo exitosas. Se extrajo el ARN total de las células obtenidas de las cuatro etapas del protocolo de cultivo: (1) población de células ES pluripotentes, (2) cuerpos embrioides, (3) células disociadas y sembradas en placa sometidas a selección para nestina, y (4) células positivas para nestina cultivadas en tampón A4. Se preparó ADNc utilizando transcriptasa inversas y cebado con hexámeros aleatorios y se normalizó la cantidad de transcrito de actina entre las diversas muestras. Se prepararon ADNc neurales utilizando los cebadores representados en la Tabla 6:

TABLA 6

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO	ETAPA POSITIVA
Otx2	CCATGACCTATCTCAGGCTTCAGG	GAAGCTCCATATCC-CTGGGTGGAAAG	1,(2,3),4
Pax2	CCAAAGTGGTGGACAAGATTGCC	GGGATAGGAAGGACGCTCAAAGAC	3,4
Pax5	CAGATGTAGTCCGC-CAAAGGATAG	ATGCCACTGATGGAGTATGAGGAGCC	3,4
En1	TCAAGACTGACTCACAGCAACCCC	CTTTGTCCTGAACCGTGGTGGTAG	4
Wnt1	ACCTGTTGACGGATTCCAAG	TCATGAGGAAGCGTAGGTCC	3,4
Nurr1	TGAAGAGAGCGGAGAAGGAGATC	TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG	3,4
nestina	GGAGTGTGCTTAGAGGTGC	TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC	(1),3,4

La Tabla 6 también muestra las etapas en las que se detectaron transcritos de los diversos genes mediante PCR-RT (los paréntesis indican que se detectaron cantidades traza). A partir de estos resultados se dedujo que la expresión de En1, Pax2, Pax5, Wnt1 y Nurr1 resultaría un marcaje adecuado para células determinadas a un destino dopaminérgico. A la inversa, la transfección de células madre pluripotentes con dichos genes, por ejemplo Nurr1, podría resultar en la determinación de un fenotipo dopaminérgico *in vitro* (Wagner *et al.*, Nature Biotechnology vol. 17, p. 653-659, 1999).

ES 2 307 969 T3

Ejemplo 2

Cultivo celular de división y mezcla de unidades celulares HepG2

5 Se llevó a cabo un experimento de cultivo por división y mezcla con el fin de someter a ensayo las condiciones de cultivo de tejidos que podrían afectar a un proceso celular particular, es decir la expresión y/o la actividad de enzimas metabólicas del citocromo P450 (CyP450). Los miembros de esta clase de enzimas, tales como 1A1 y 1A2, pueden someterse a ensayo utilizando un sustrato, la etoxiresorufina, que se hidroliza enzimáticamente para producir un producto, la resorufina, que presenta características de fluorescencia diferenciadas que pueden utilizarse para medir la actividad enzimática CyP450. Puede regularse la expresión de enzimas CyP450 mediante moléculas inductoras, tales como β -nafto flavona, e inhibidores, tales como α -nafto flavona, quinidina o aminotriazol. También resulta posible que algunas moléculas induzcan la expresión de uno o más genes CyP450, aunque inhiban la actividad del producto enzimático de ese gen. Por lo tanto, pueden surgir patrones complicados de expresión y actividad según el patrón de exposición en serie de las células a compuestos reguladores.

15 Se cultivó la línea celular de hepatoma humano HepG2 en Cytodex 3 (Amersham Biosciences) en medio DME suplementado con L-glutamina, penicilina+estreptomina y suero de feto bovino inactivado por calor al 10%. Un día después de la siembra, las unidades celulares se dividieron en 5 grupos y se cultivaron en pocillos separados de una placa de cultivo multipocillo en medio de cultivo que contenía 5 μ M de uno de entre α -nafto flavona, β -nafto flavona, quinidina, aminotriazol o dimetilsulfóxido (DMSO; el portador solvente para los compuestos de ensayo). Tras cultivar durante 24 horas (37°C, 5% de CO₂), las unidades celulares en los pocillos individuales se lavaron dos veces con PBS, se agruparon en medio de crecimiento y se dividieron en cinco grupos que se cultivaron en los cinco medios diferentes utilizados en la primera ronda. Tras 24 horas adicionales de cultivo, las unidades celulares se trataron con una tercera ronda de cultivo de división y mezcla, tal como anteriormente. Tras 24 horas adicionales de cultivo, se recogieron muestras de perlas de los cinco grupos celulares finales y de un grupo de control que había sido cultivado en medio estándar con DMSO durante el periodo total del experimento de división y mezcla.

25 Para el ensayo de CyP450, se extrajeron alícuotas de perlas en medio de crecimiento y se añadió el sustrato enzimático etoxiresorufina hasta una concentración final de 10 μ M. Las muestras de perlas se situaron sobre un portaobjetos de microscopía con un cubre y se observaron inmediatamente con un microscopio de epifluorescencia utilizando un conjunto estándar de filtros para fluorescencia de rojo Texas/rodamina (ver la figura 9). Las células de control mostraron fluorescencia de resorufina aproximadamente 15 a 20 minutos tras la adición del sustrato, y no se observó fluorescencia en ausencia de etoxiresorufina. Al tratar las unidades celulares con β -nafto flavona en un experimento de control, resultó evidente la actividad enzimática dentro de los 5 a 10 minutos (datos no mostrados). Las unidades celulares extraídas del grupo sometido al procedimiento de cultivo de división y mezcla mostraron diversos grados de actividad enzimática (dentro de los 10 minutos), indicando que habían experimentado una diversidad de condiciones que indujeron o inhibieron la actividad de los enzimas de CyP450 que pueden metabolizar la etoxiresorufina.

40 Ejemplo 3

Crecimiento de unidades celulares que comprenden células madre pluripotentes

45 Se mantuvieron células ES de ratón pluripotentes que expresaban una proteína de fusión Tau-GFP sobre una capa nodriza de células SNL (derivadas de las células STO) tratadas con mitomicina C en medio de células ES constituido por medio de Iscove suplementado con FCS al 15%, 2-mercaptoetanol 0,55 mM, L-glutamina, antibióticos (todos de GIBCO/BRL) y 1.400 U ml⁻¹ de factor inhibidor de la leucemia (Chemicon) y se dividieron 1:5 cada dos días. Las células ES y las células nodriza utilizadas para la formación de las unidades celulares se transfirieron a un matraz recubierto de gelatina y se cultivaron durante un día en medio ES con el fin de reducir el número de células nodriza en el cultivo. Las células ES se tripsinizaron de las placas de gelatina y se lavaron con medio que contenía FCS, después se incubaron con microportadores Cytopore 2 o Cytodex 3 (Amersham Biosciences) que habían sido hidratados en PBS, se esterilizaron mediante autoclavado o tratamiento con etanol al 70%, lavando después con medio ES. Las células ES se sembraron a una densidad de aproximadamente 10 células/microportador en una placa de plástico no adherente. El cultivo de células ES se mantuvo bajo condiciones estándar (5% de CO₂, 37°C) con sustitución de la mitad del medio cada día con medio ES fresco (ver la figura 7). Se observó un crecimiento de las células pluripotentes durante cinco días bajo estas condiciones, transfiriendo después las células de medio de células ES para iniciar la diferenciación.

60 Ejemplo 4

Diferenciación de unidades de células madre mediante cultivo por subdivisión

65 Se cultivaron células ES de ratón pluripotentes durante cinco días en medio de células ES (ver el Ejemplo 3), se decantó el medio ES y las unidades celulares se lavaron dos veces con PBS para eliminar las trazas de medio ES. Se dividió la población de perlas en tres grupos, y se decantó el PBS y se sustituyó por uno de entre: (i) medio de células ES, (ii) medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de feto bovino al 10%, o (iii) medio definido químicamente (CDM; Wiles M.V., Johansson B.M., 1999, Exp. Cell Res. vol. 247, p. 241-8). Tras el cultivo durante una hora bajo condiciones estándar, se dividió cada uno de los tres grupos en tres grupos adicionales, cada uno de los

ES 2 307 969 T3

cuales se incubó en uno de entre: (i) el medio en el que se habían cultivado los grupos celulares, (ii) el medio en el que se habían cultivado los grupos celulares, incluyendo LiCl 1 μ M, o (iii) el medio en el que se habían cultivado los grupos celulares, incluyendo ácido retinoico (RA) 1 μ m. Cada dos días, se sustituyó la mitad del medio con el medio fresco respectivo.

5

Ejemplo 5

10 *Detección de procesos celulares, comprendiendo la diferenciación celular en unidades celulares utilizando un marcador fenotípico*

Se sembraron microportadores Cultispher G (PerCELL Biolytica) con células ES de ratón que expresan una proteína de fusión Tau-GFP y se cultivaron durante cuatro semanas en un medio libre de suero (sustituto de suero KO Gibco al 15%, DMEM de Iscove modificado con Glutamax (Gibco), suplementado con penicilina/estreptomicina y 1.400 U/ml de LIF). El medio se sustituyó al tornarse ácido, tal como mostraba el indicador de color presente en el medio. Se extrajo una alícuota de las perlas y se lavó con PBS antes de fijar con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 20 minutos. Las perlas se lavaron varias veces con PBS, se resuspendieron en PBS/FCS al 2,5%, Tritón X-100 al 0,1% y se dividieron en dos muestras. Una muestra se diluyó 1:200 con un anticuerpo monoclonal murino anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la otra se dejó como control. Tras una incubación durante la noche a 4°C, las muestras se lavaron 3 veces con PBS, después ambas se incubaron con un anticuerpo de burro antiratón marcado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, después se depositaron en puntos sobre portaobjetos de microscopía con medio de montaje que contenía DAPI (Vector). La mayoría de las células sobre los microportadores mostraba tinción específica para GFAP (ver la figura 8 A-H).

25

En un experimento separado, se transfirieron unidades celulares que comprendían células ES de ratón que expresaban una proteína de fusión Tau-GFP y microportadores Cytodex 3 (ver el Ejemplo 3) de medio ES a CDM y se cultivaron durante 4 días bajo condiciones estándar, y después se lavaron las unidades celulares una vez con PBS y se dejaron sedimentar por gravedad. Se extrajo el PBS y las unidades celulares se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a 4°C, y después se separó la solución y las unidades celulares se lavaron tres veces con PBS. Las unidades celulares se resuspendieron en PBS que contenía suero de feto bovino al 2,5% y Tritón X100 al 0,1% (Sigma) y se dividieron en tres tubos de microcentrifugación separados. Se añadió una inmunoglobulina de ratón específica para la tubulina beta III (Sigma) a una muestra a una dilución de 1:200 y se dejó que se produjese la tinción del anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente resuspendiendo ocasionalmente. A continuación, las tres muestras se lavaron tres veces con un amplio exceso de PBS. La muestra se incubó con los anticuerpos antitubulina y otra muestra se incubó a continuación durante 2 horas a temperatura ambiente con una dilución 1:200 de una inmunoglobulina de burro antiratón conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) en PBS/FCS/Triton X100. A continuación, las tres muestras se lavaron tres veces con un amplio exceso de PBS, después las unidades celulares se resuspendieron en medio de montaje que contenía DAPI (Sigma), se depositaron puntos sobre portaobjetos de microscopía con cubres y se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia o confocal (ver la figura 8, panel I).

40

Ejemplo 6

45

Detección de la expresión génica diferencia debida a un proceso celular

Se lavaron con PBS unidades celulares de células ES de ratón inducidas a diferenciarse mediante cultivo por subdivisión (ver el Ejemplo 4), y se preparó ARN a partir de las unidades celulares utilizando reactivos Rneasy siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). A continuación, las muestras de ARN se utilizaron para preparar ADNc de cadena primaria con cebadores oligo-dT utilizando transcriptasa inversa siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para normalizar las concentraciones de las muestras, se preparó una serie de dilución de 10 veces para cada muestra de ADNc y se sometió a 25, 30 y 35 rondas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleótidos para un gen "de mantenimiento", de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Se utilizó la tinción con bromuro de etidio de los productos resultantes separados en un gel de 1,5% de agarosa para estimar la cantidad relativa de ADNc en cada muestra. Seguidamente se utilizaron cantidades equivalentes de ADNc de cada muestra en una reacción de PCR con cebadores de ADN para Oct4 (que se predice se encuentra en células ES no diferenciadas), nestina (que se predice se encuentra en la progenie neuronal diferenciada) o HNF3 β (que se predice se encuentra en la progenie endodérmica diferenciada). Las secuencias de cebador eran las siguientes:

60

65

HNF3b	ggacaagggaaatgagagg; ataacacctcactccactacc
Nestina	agtcagagcaagtgaatgg; agaaacaagatctcagcagg
Oct4	cgcgttctctttggaagggtgctc; ctccaaccacatccttctct
G3PDH	accacagtccatgccatcac; tccaccaccctgttgctgta

ES 2 307 969 T3

Las cantidades relativas de estos marcadores distintivos diferían dependiendo de las condiciones de cultivo a las que las unidades celulares se habían expuesto. Por ejemplo, RA en el medio ES indujo la expresión del marcador endodérmico HNF3 β , mientras que DMEM con RA, y en menor grado LiCl, condujeron a la expresión de nestina, un marcador de precursores neuronales. La reducción de Oct4 fue particularmente marcada en DMEM, aunque LiCl inhibió la reducción (ver la figura 11).

Ejemplo 7

10 *Marcaje de unidades celulares utilizando RFID*

Se trataron transpondedores ID 100-A incluidos en vidrio (Trovan) durante 2 horas con ácido hidroclicórico 1 N, se lavaron extensivamente con agua desionizada, después se incubaron durante 2 horas con aminopropiltriétoxisilano (Sigma) en un recipiente de vidrio. Se decantó el reactivo silano y las etiquetas se lavaron en serie con agua, etanol al 70%, agua desionizada estéril y después solución salina tamponada con fosfato. Las etiquetas se introdujeron individualmente en pocillos de placas multipocillo de plástico bacterianas no adherentes (Sterilin). Se disoció una línea pluripotente de células ES que expresaban un transgén de fusión Tau-GFP mantenida en medio de células ES con LIF (Chemicon) sobre placas recubiertas con gelatina en una suspensión de células individuales mediante tratamiento con tripsina. Las células se lavaron una vez con medio de células ES, se resuspendieron en medio ES a una densidad de 10⁶ células/ml y se depositaron 250 μ l de suspensión sobre cada etiqueta. Tras la incubación de una hora bajo condiciones de cultivo estándar (37°C, 5% de CO₂), se añadieron 1,5 ml de medio ES más y se devolvieron las placas al incubador.

Los transpondedores también se sembraron con la línea celular de hepatoma humano HepG2 y el derivado de células STO de ratón, SNL. El pretratamiento y el proceso de siembra se llevaron a cabo tal como se ha descrito para las células ES, aunque las células se mantuvieron en DMEM con 10% de FCS.

Los cultivos adherentes se observaron con un microscopio de disección y las células etiquetas fluorescentemente se visualizaron utilizando epifluorescencia (ver la figura 10). Los diversos tipos celulares adheridos mostraron una morfología expansiva normal y proliferaron sobre los transpondedores. Las unidades celulares marcadas pudieron mantenerse durante semanas sin deterioro evidente de las unidades celulares ni de los marcajes. Pudo registrarse la identidad única de las unidades celulares con un lector de bolsillo Trovan sin perturbar las condiciones de cultivo celular o el mantenimiento de las unidades celulares.

35 Ejemplo 8

Marcaje de unidades celulares mediante etiquetas fluorescentes, moleculares u ópticas

Los microportadores Cytodex 3 (Amersham Biosciences) se encuentran compuestos de dextrano con una capa superficial de colágeno desnaturalizado (gelatina). Se incubaron perlas de Cytodex 3 (50 μ l de volumen sedimentado tras la hidratación en PBS) en 90 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anticolágeno conjugado con biotina (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución de 1:50 en PBS con suero de feto bovino al 2,5% en un volumen total de 200 μ l. A continuación, las perlas se lavaron tres veces en un amplio exceso de PBS mediante resuspensión y después sedimentando por gravedad. Se trató una muestra de control de la misma manera, aunque sin la adición del anticuerpo anticolágeno. Cada una de las muestras de control y de las muestras tratadas se dividieron en dos, y una muestra de cada se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con un conjugado estreptavidina-FITC a una concentración de 2,5 μ g/ml en un volumen de 250 μ l de PBS/FCS. Las dos muestras restantes se incubaron bajo las mismas condiciones aunque sin estreptavidina-FITC. Las perlas pretratadas con anticuerpo anticolágeno biotinilado y después con conjugado estreptavidina-FITC mostraron niveles más elevados de fluorescencia (ver la figura 12). El recubrimiento de las perlas microportadoras con un anticuerpo biotinilado es un medio para proporcionar grupos biotina que a su vez puedan unirse a conjugados de estreptavidina fácilmente detectables. Debido a que la estreptavidina puede conjugarse con un número muy grande de entidades moleculares y macromoleculares, resulta posible de esta manera derivatizar las perlas microportadoras de manera que pueden unirse con elevada afinidad a un amplio abanico de etiquetas.

En un experimento separado, se marcaron microportadores de Cultispher G (PerCell Biolytica) con perlas de látex que proporcionan etiquetas convenientes. Se hidrataron los microportadores en PBS, se esterilizaron con etanol al 70%, se lavaron con PBS y después se unieron covalentemente a grupos de biotina. La biotinilación se llevó a cabo utilizando 10 mg de éster N-hidroxisuccinimida de ácido biotinamidoheptanoil-6-aminoheptanoico (Sigma) disueltos en 400 μ l de dimetilformamida, que se añadieron a 1 ml de volumen sedimentado de microportadores en PBS. Se dejó transcurrir la reacción durante la noche a temperatura ambiente y los microportadores se lavaron 3 veces con un amplio exceso de PBS. Se incubó una alícuota de perlas tratadas y una muestra de control no modificada con 1x10⁵ perlas fluorescentes rojas recubiertas de estreptavidina de 1 μ M de diámetro (Sigma), o con 2,5 μ g/ml de estreptavidina-FITC (Sigma) en PBS con suero de feto bovino al 2,5%. Se comparó el nivel de marcaje con las etiquetas perla (fig. 12 E-H) o con FITC (fig. 18 A-D) se comparó utilizando microscopía de fluorescencia.

En un experimento adicional, se marcaron microportadores Cytodex 3 con perlas fluorescentes rojas o verdes de 1 μ M de diámetro recubiertas de estreptavidina (Sigma). Los microportadores Cytodex 3 (Amersham Biosciences) se

ES 2 307 969 T3

incubaron con suspensiones de perlas de látex rojas, verdes o con una mezcla 1:1 de rojas y verdes durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS con FCS al 2,5%. Las muestras se lavaron tres veces en un amplio exceso de PBS mediante resuspensión y posterior sedimentación por gravedad. A continuación, se mezcló una alícuota de las perlas marcadas por las etiquetas rojas con una alícuota del mismo volumen procedente de la muestra que contenía perlas marcadas por las etiquetas verdes con el fin de determinar si podía producirse el marcaje cruzado. A continuación, las muestras se visionaron con un microscopio de epifluorescencia utilizando conjuntos de filtros estándar para la detección de FITC y rojo de Texas/rodamina (ver las figuras 14 y 15). Los microportadores pudieron marcarse robustamente utilizando las etiquetas perlas de látex, resultando en poblaciones marcadas diferentemente. La mezcla de las dos poblaciones no resultó en una transferencia significativa de marcajes entre microportadores, implicando que las poblaciones seguían resultando distinguibles. Los microportadores incubados con una combinación de las dos etiquetas se encontraban establemente marcados por ambas, indicando que un microportador individual puede marcarse con una multiplicidad de etiquetas. Debido a que las etiquetas, tales como las utilizadas en el presente experimento, pueden conjugarse con un número muy grande de informadores (por ejemplo diferentes fluoróforos, pigmentos o enzimas), resulta posible utilizar dichos informadores para marcar microportadores con un abanico grande de etiquetas diferenciadoras. Además, resulta posible combinar los anticuerpos con las etiquetas perlas de látex con el fin de dirigirlos a microportadores o a unidades celulares.

Ejemplo 9

Marcaje de unidades celulares con etiquetas fluorescentes, moleculares u ópticas

Se sembraron microportadores Cytodex 3 (Amersham) con células ES que expresaban un transgén Tau-GFP. Un día después, los microportadores se lavaron con PBS, después se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una suspensión de perlas rojas de látex de 1 μ M de diámetro que se ligaron covalentemente a estreptavidina (Sigma) y se analizaron inmediatamente o transcurridas 24 horas del cultivo bajo condiciones estándar. El análisis incluyó lavar tres veces en un amplio exceso de PBS mediante resuspensión y posterior sedimentación por gravedad, y las muestras se visionaron con epifluorescencia utilizando conjuntos de filtros estándares para la detección de FITC y rojo de Texas/rodamina. Las unidades celulares que comprendían células ES (verdes) y que habían sido marcadas mediante interacción coloidal con etiquetas perlas de látex (rojas) resultaban evidentes en cada caso (ver la figura 13).

Debido a que las perlas compuestas de látex y de otros polímeros pueden conjugarse con un número muy elevado de informadores moleculares y supramoleculares, de esta manera resulta posible marcar unidades celulares con un amplio abanico de marcajes diferenciadores.

Ejemplo 10

Análisis y aislamiento manuales de unidades celulares basándose en un proceso celular

Se mezclaron unidades celulares que comprendían células ES de ratón que expresaban una proteína de fusión Tau-GFP y microportadores Cytodex 3 con microportadores Cytodex 3 desnudos en una proporción de 1:100. La mezcla se observó bajo un microscopio utilizando parámetros de fases y de fluorescencia. Las unidades celulares que expresaban GFP resultaban fácilmente visibles al utilizar microscopía de fluorescencia, incluso en un gran exceso de portadores no fluorescentes (ver la fig. 16). Las unidades celulares individuales pudieron separarse manualmente utilizando una pipeta montada posicionada para aspirar volúmenes reducidos del cultivo que contenía las unidades celulares.

Ejemplo 11

Análisis y separación automatizados de microportadores marcados y unidades celulares

Resulta deseable poder analizar y separar las unidades celulares que se encuentran marcadas con diversas etiquetas o visualizar procesos celulares particulares de manera automatizada o de alto rendimiento. Se utilizó un instrumento COPAS Select (Union Biométrica Inc., Somerville, MA) capaz de separar organismos multicelulares y perlas con un diámetro de hasta 0,5 mm para analizar unidades celulares, microportadores y microportadores marcados. Se analizaron las perlas Cytodex 3 (Amersham Biosciences) con el instrumento según el tamaño y características ópticas de las mismas (Tiempo de vuelo, TOF; Extinción, Ext) y mostraban una ligera variación de tamaño aunque ninguna autofluorescencia significativa con los parámetros utilizados (ver la fig. 17 A/B). El marcaje de microportadores Cytodex 3 con perlas de látex rojas conjugadas con estreptavidina (Sigma) (ver el Ejemplo 9) condujo a un desplazamiento detectable de fluorescencia roja (fig. 17 C/D).

Se utilizaron unidades celulares que comprendían microportadores Cytodex 3 sembradas con células ES que expresaban un transgén Tau-GFP, en un experimento para separar unidades celulares basándose en el número celular. Se pasaron grupos de unidades celulares que comprendían unidades celulares que soportaban diversas densidades celulares a través del instrumento sin fijación y demostrando un amplio abanico de intensidad de fluorescencia verde (fig. 17 E/F). El instrumento se utilizó para separar unidades celulares altamente fluorescentes de unidades celulares de baja fluorescencia. Las muestras analizadas posteriormente utilizando microscopía de epifluorescencia revelaron

ES 2 307 969 T3

que las unidades celulares separadas basándose en la fluorescencia elevada portaban un gran número de células vivas, mientras que las unidades celulares de baja fluorescencia se encontraban poco pobladas. De esta manera, el análisis, identificación y aislamiento automatizados de las unidades celulares puede llevarse a cabo según múltiples parámetros, incluyendo el número celular, el fenotipo y el marcaje con etiquetas de identificación.

5

Ejemplo 12

Identificación de etiquetas a partir de una sola unidad celular

10

Se entrecruzaron microportadores Cultispher G (Percell Biolytica) con grupos de biotina (ver el Ejemplo 8) y se confirmó la biotilación comparando el nivel de tinción con estreptavidina-FITC utilizando microscopía de fluorescencia (figura 18 A-D).

15

Las unidades celulares se formaron mediante incubación de una suspensión de células individuales de 10^6 células ES-TGFP con $250 \mu\text{l}$ de microportadores Cultispher G biotilados de volumen sedimentado en medio de crecimiento de células ES durante 24 horas. Se etiquetó una muestra de $50 \mu\text{l}$ de unidades celulares con perlas de látex fluorescentes rojas de $1 \mu\text{m}$ (Sigma) mediante incubación con aproximadamente 5×10^5 etiquetas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las unidades celulares se lavaron del exceso de perlas de látex mediante varias rondas de resuspensión y sedimentación en grandes volúmenes de PBS. Se utilizó la microscopía de epifluorescencia para confirmar que las unidades celulares se encontraban marcadas con las etiquetas perlas de látex (fig. 18 E-G).

20

25

Se situaron unidades celulares en una placa de Petri montada bajo un microscopio de disección y se aislaron unidades individuales utilizando una pipeta y se introdujeron en tubos FACS de 5 ml (Becton Dickinson Falcon). Se añadió una alícuota de $200 \mu\text{l}$ de una solución 1x de proteasa neutra de *Bacillus polymyxa* (dispasa II, Roche) a cada tubo, y se digirió la matriz de microportador durante la noche a temperatura ambiente. El digerido se pasó a través de un citofluorímetro (Becton Dickinson FACScalibur) que había sido calibrado para detectar sucesos en el intervalo de tamaño de $1 \mu\text{m}$ y en el espectro de emisión del rojo lejano (FL3) (fig. 18 H, I). Pudo confirmarse la identidad de las etiquetas aisladas a partir de una sola unidad celular mediante la detección de sucesos que conforman a los criterios de tamaño y fluorescencia apropiados (fig. 18 J, K).

30

Ejemplo 13

35

Identificación de una multiplicidad de etiquetas utilizadas para marcar unidades celulares

40

La disponibilidad de una amplia diversidad de perlas de látex de tamaños y características de fluorescencia precisas permite el marcaje multiplex de microportadores. Se marcaron microportadores Cultispher G biotilados (ver el Ejemplo 12) mediante incubación en serie en un medio que contenía tres tipos diferentes de etiquetas perlas recubiertas de estreptavidina de tamaño, espectro de emisión de fluorescencia e intensidad de fluorescencia diferentes. Los tipos de perla utilizados como etiquetas fueron: 1) perlas de látex fluorescentes verdes de $1 \mu\text{m}$ fabricados por Sigma, 2) conjunto de perlas n° 1 en la serie de perlas de látex fluorescentes rojas de $5,5 \mu\text{m}$ (QuantumPlex) fabricados por Bangs Laboratories, y 3) conjunto de perlas n° 5 en la serie de perlas de látex fluorescentes rojas de $4,4 \mu\text{m}$ fabricadas por Bangs Laboratories.

45

50

Los microportadores etiquetados se digirieron a continuación proteolíticamente y las etiquetas liberadas se sometieron a análisis FACS tal como anteriormente (ver el Ejemplo 12). El citofluorímetro (Becton Dickinson FACScalibur) se calibró con muestras de las etiquetas para fijar los canales de tamaño (fig. 19 A) y las firmas fluorescentes de las tres diferentes etiquetas se detectaron mediante análisis de los sucesos en los canales de fluorescencia (verde o roja) apropiados (fig. 19 B-D).

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares, comprendiendo cada uno, una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas;
- (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar por lo menos un segundo agrupamiento;
- (c) subdividir el segundo agrupamiento para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares;
- (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas;
- (e) repetir las etapas (b) a (d); y
- (f) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a las que ha sido expuesta,

en el que las unidades celulares son marcadas para realizar el seguimiento o determinar las condiciones de cultivo a las que la unidad celular ha sido expuesta, con la condición de que la célula no sea una célula madre embrionaria humana.

2. Procedimiento para exponer una célula a una diversidad de condiciones de cultivo celular, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar un primer conjunto de unidades celulares, comprendiendo cada uno, una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas;
- (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar por lo menos un segundo agrupamiento;
- (c) subdividir el segundo agrupamiento para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares;
- (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas; y
- (e) repetir las etapas (b) a (d),

en el que las unidades celulares son marcadas para realizar el seguimiento o determinar las condiciones de cultivo a las que ha sido expuesta la unidad celular.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el marcaje se encuentra espacialmente codificado.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el marcaje se selecciona de entre el grupo constituido por un oligonucleótido, un péptido, un compuesto fluorescente, una amina secundaria, un halocarburo, una mezcla de isótopos estables, un código de barras, una etiqueta óptica, una perla, una etiqueta codificante de radiofrecuencia y un punto cuántico.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se cultivan en unidades celulares, comprendiendo cada unidad celular una o más células.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que las unidades celulares son células individuales.

7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que cada unidad celular comprende una o más células adherentes a o unidas por un sustrato sólido.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el sustrato sólido es un microportador o perla.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el microportador está compuesto de celulosa, dextrano, agarosa, acrilamida, materiales inorgánicos, poliestireno, vidrio, colágeno, DEAE sephadex, gelatina o DEAE-dextrano.

10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el microportador es un microportador poroso o no poroso.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el microportador poroso es un microportador Cultispher G o un microportador Cytopore 2.

12. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el sustrato sólido es un pocillo o una barrera de permeabilidad al medio.

ES 2 307 969 T3

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de cultivo son medios a los que la célula se encuentra expuesta.
- 5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que los medios contienen uno o más agentes específicos que influyen sobre un proceso celular.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar a una o más temperaturas específicas.
- 10 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar sobre uno o más sustratos específicos.
17. Procedimiento para identificar un gen que influye sobre un proceso celular, que comprende las etapas siguientes:
- 15 (a) determinar el efecto de una o más condiciones de cultivo sobre una unidad celular, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- (b) analizar la expresión génica en dichas unidades celulares cuando se exponen a dichas condiciones de cultivo; y
- 20 (c) identificar los genes que se expresan diferencialmente bajo condiciones de cultivo deseadas.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que las condiciones de cultivo deseadas influyen sobre un proceso celular.
- 25 19. Procedimiento según la reivindicación 17 ó 18, que comprende la etapa adicional que consiste en producir por lo menos la región codificante de dicho gen mediante síntesis de ácidos nucleicos o replicación biológica.
- 30 20. Procedimiento para identificar un agente que puede inducir un proceso celular, que comprende las etapas siguientes:
- (a) determinar el efecto de uno o más agentes sobre una unidad celular, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; y
- 35 (b) identificar el (los) agente(s) que inducen el proceso celular en las unidades celulares.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, que comprende las etapas adicionales siguientes:
- 40 (c) sintetizar o aislar el (los) agente(s).
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que el proceso celular es la proliferación o diferenciación celular.
- 45 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que la célula es una célula madre o una célula que ha sido obtenida a partir de una célula madre *in vitro*.
24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que las células se cultivan en unidades celulares, comprendiendo cada unidad celular una o más células.
- 50 25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que las unidades celulares son células individuales.
26. Procedimiento según la reivindicación 24 ó 25, en el que cada unidad celular comprende una o más células adherentes a o unidas por un sustrato sólido.
- 55 27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el sustrato sólido es un microportador o perla.
28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que el sustrato sólido es un pocillo o una barrera de permeabilidad al medio.
- 60 29. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que las células diferenciadas se aíslan mediante desprendimiento enzimático del microportador.
30. Procedimiento según reivindicación 27, en el que las células diferenciadas se aíslan mediante digestión del microportador.
- 65

Figura 1

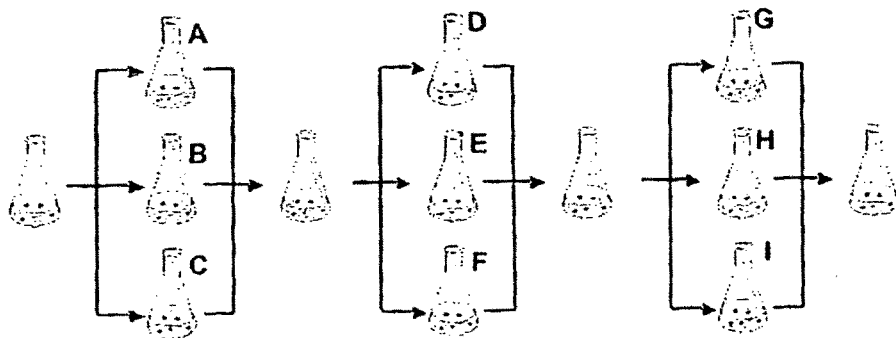


Figura 2

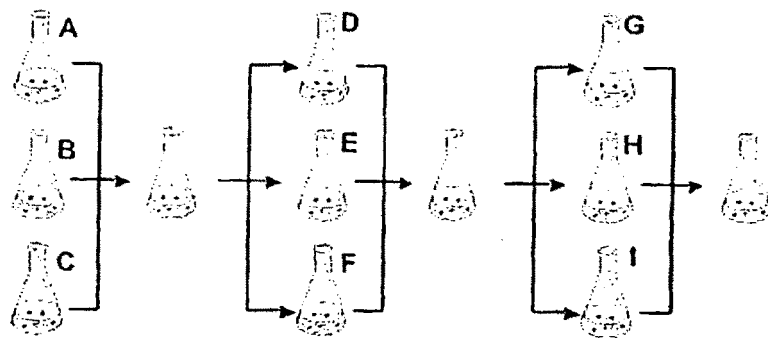


Figura 3

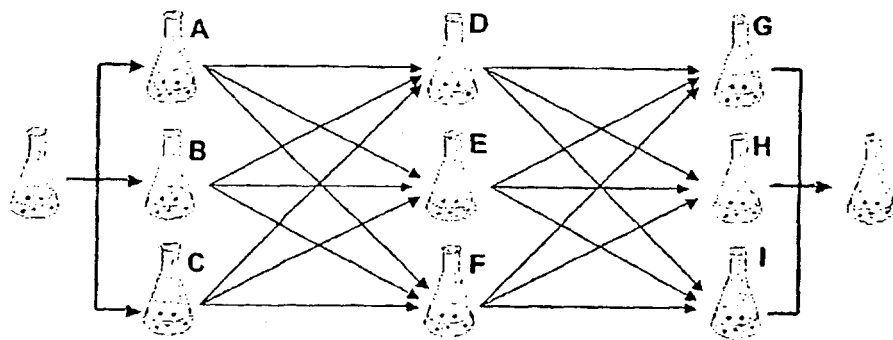


Figura 4

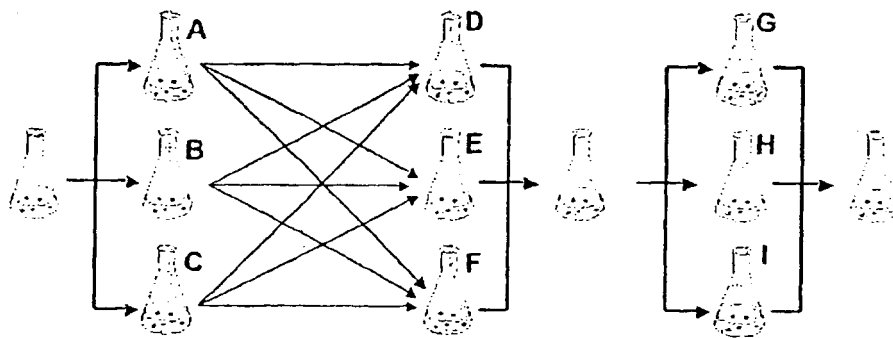


Figura 5

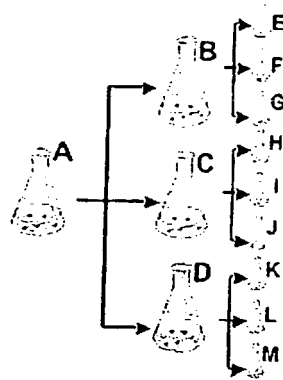


Figura 6

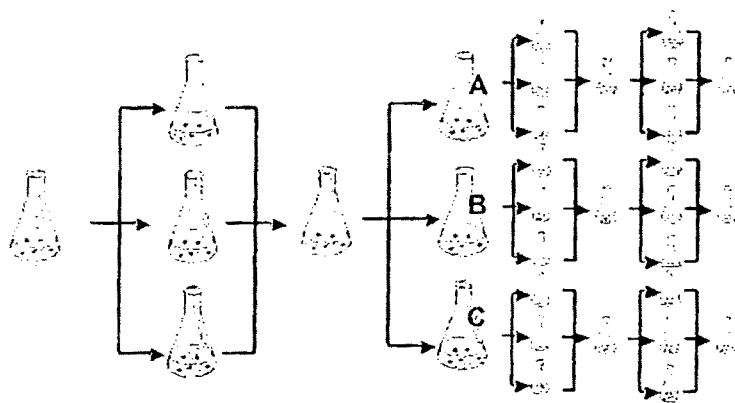


Figura 7

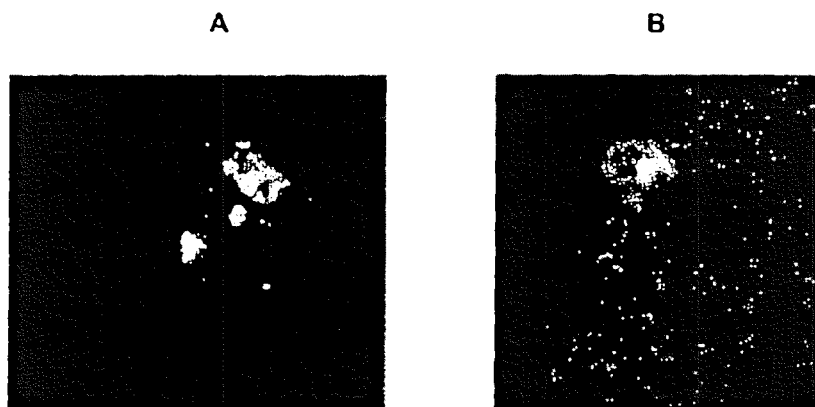


Figura 8

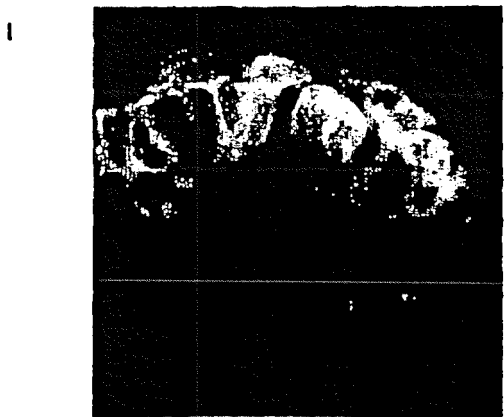
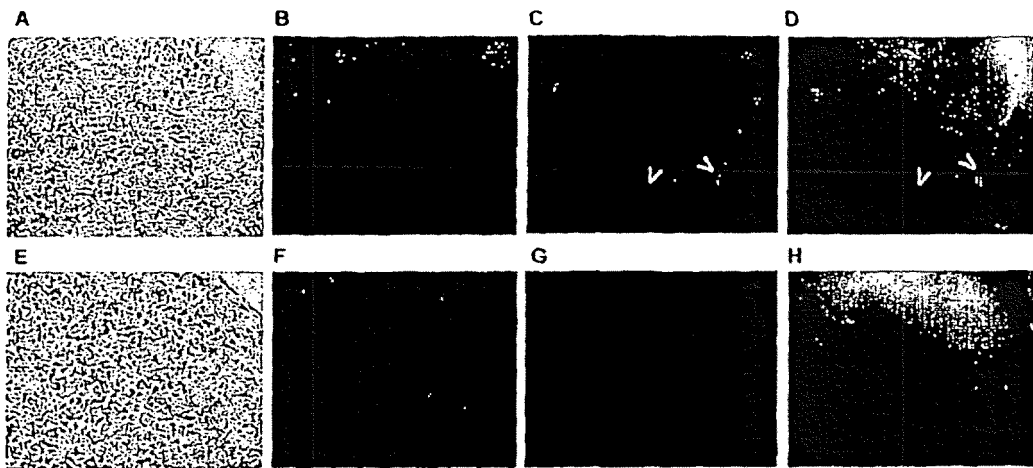


Figura 9

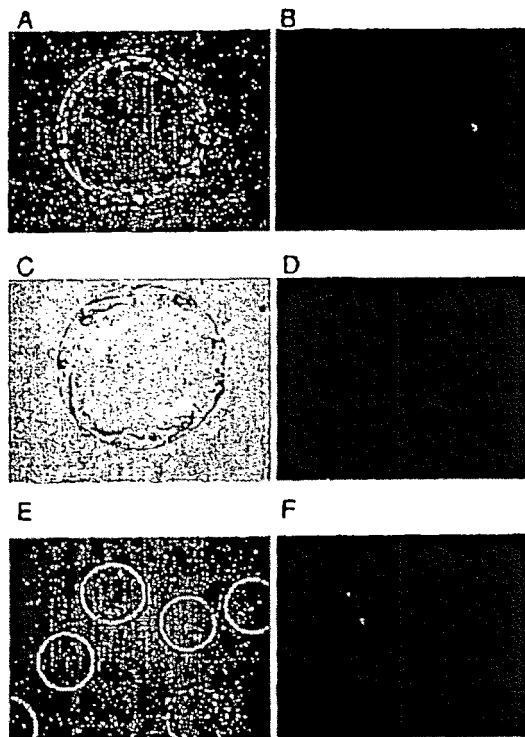


Figura 10

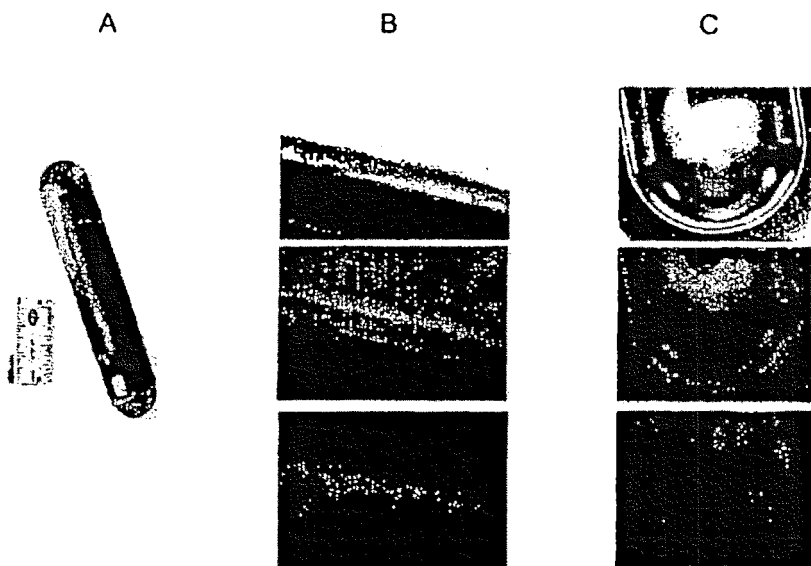


Figura 11

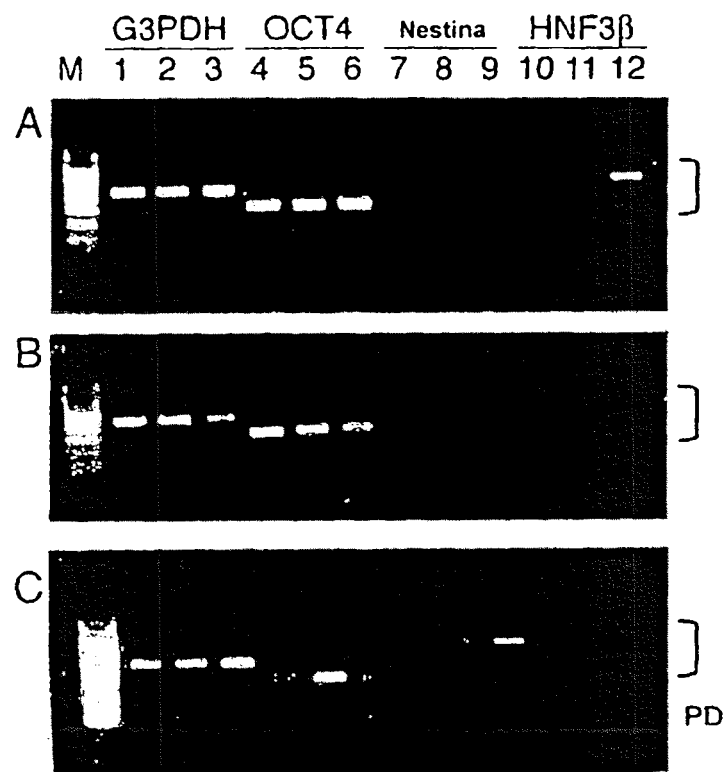
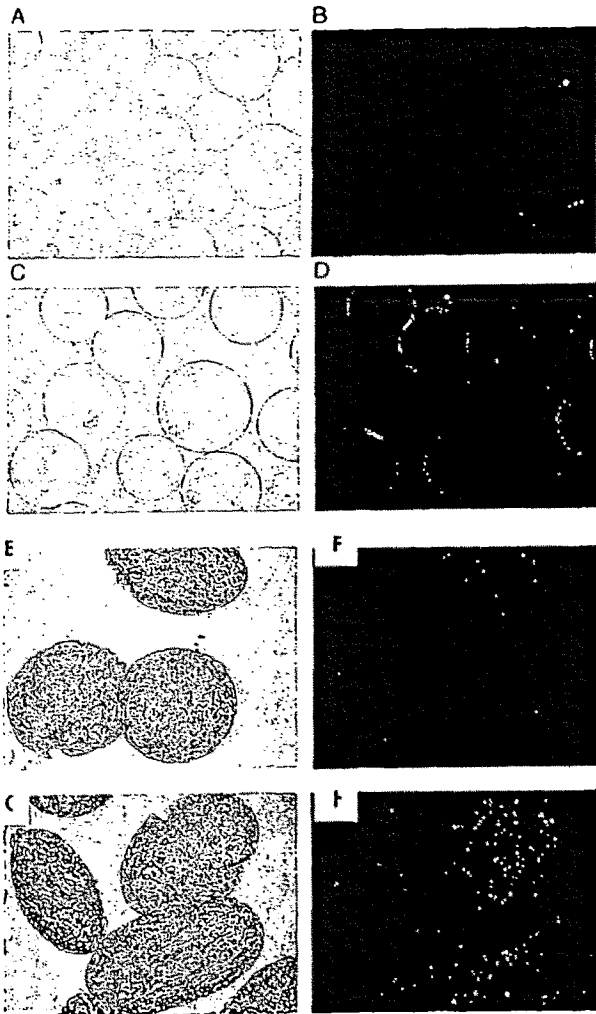
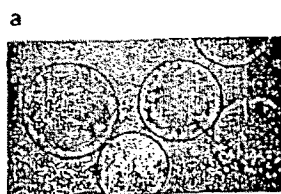


Figura 12



Figura



A

B

C

Figura 13

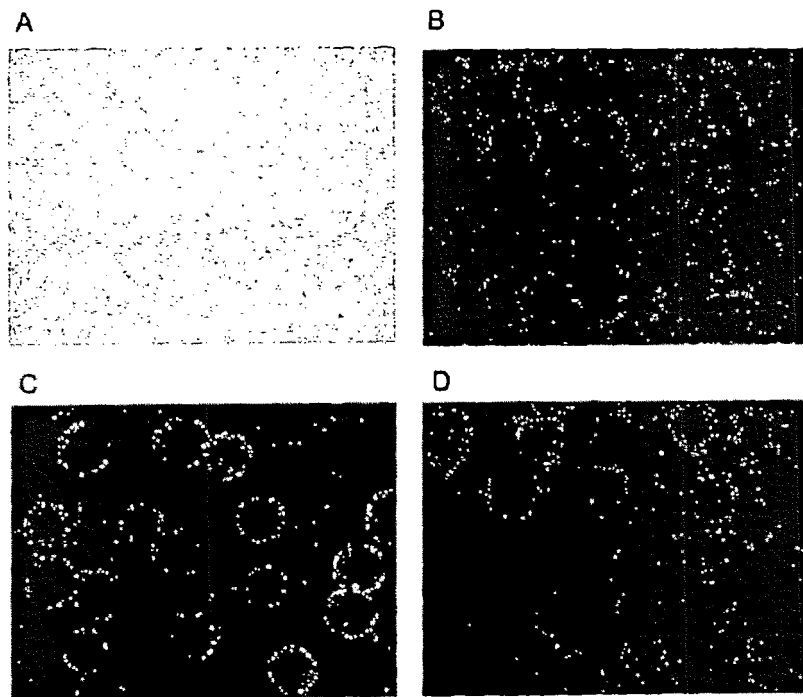


Figura 14

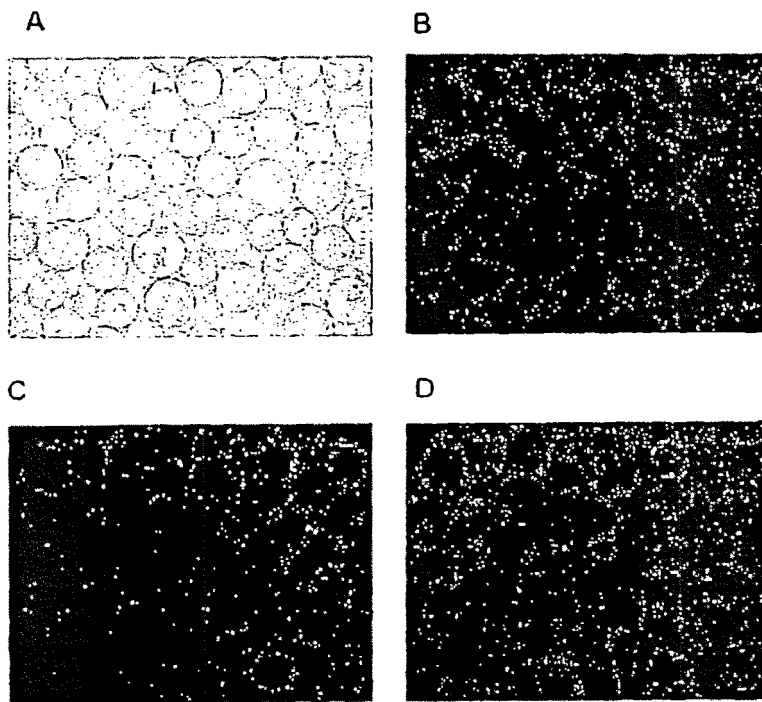
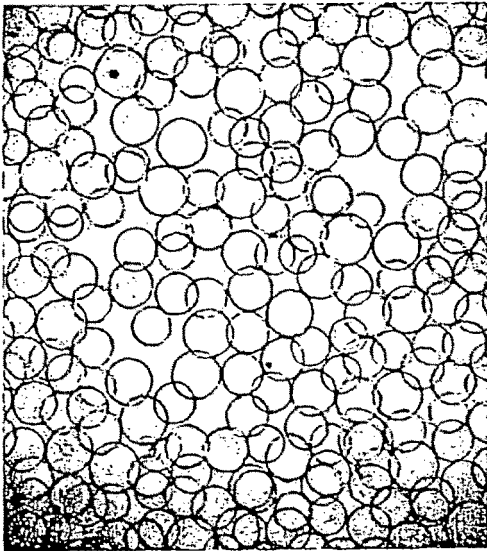


Figura 15

A



B

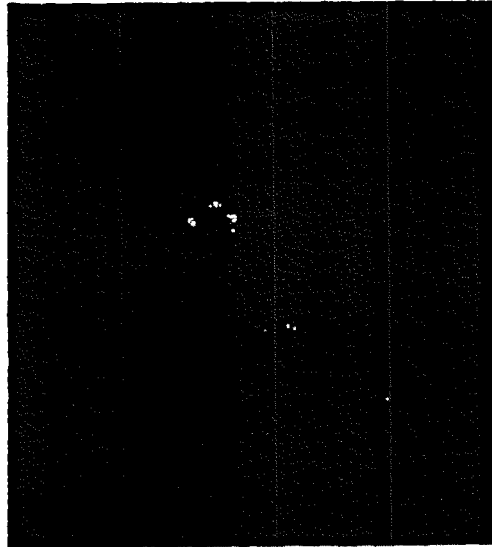


Figura 16

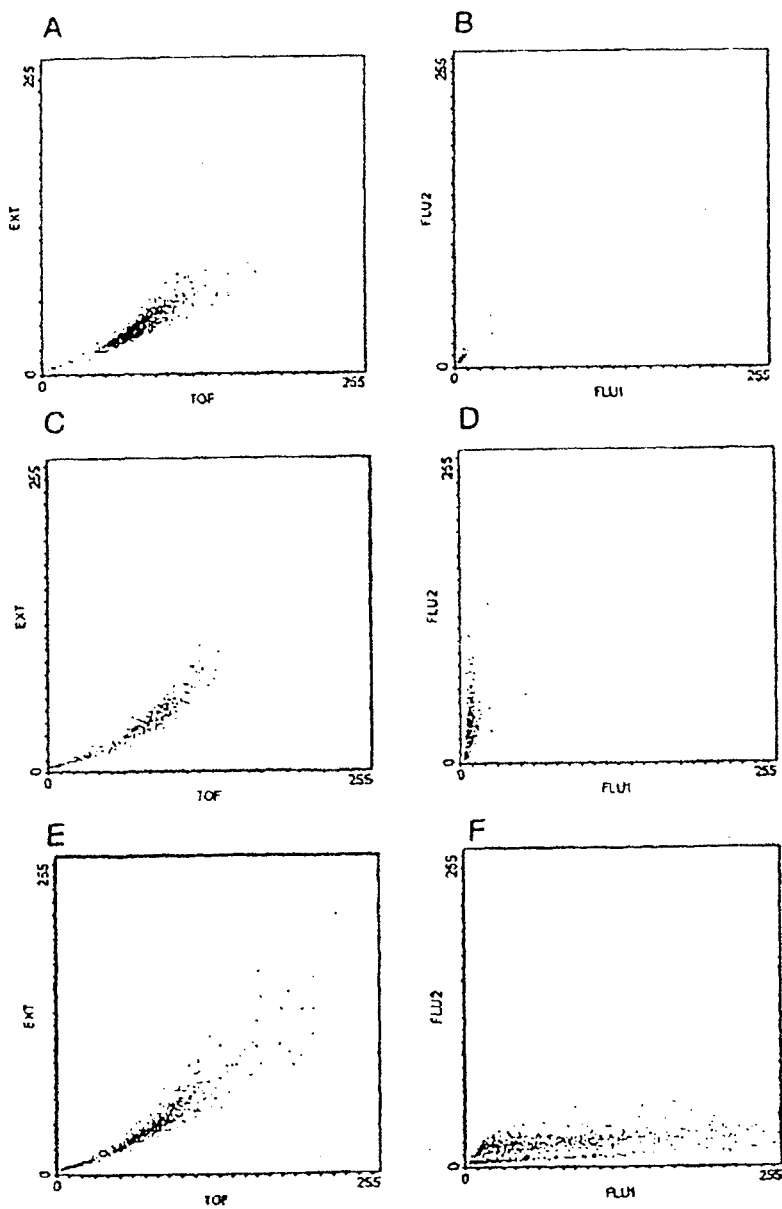


Figura 17

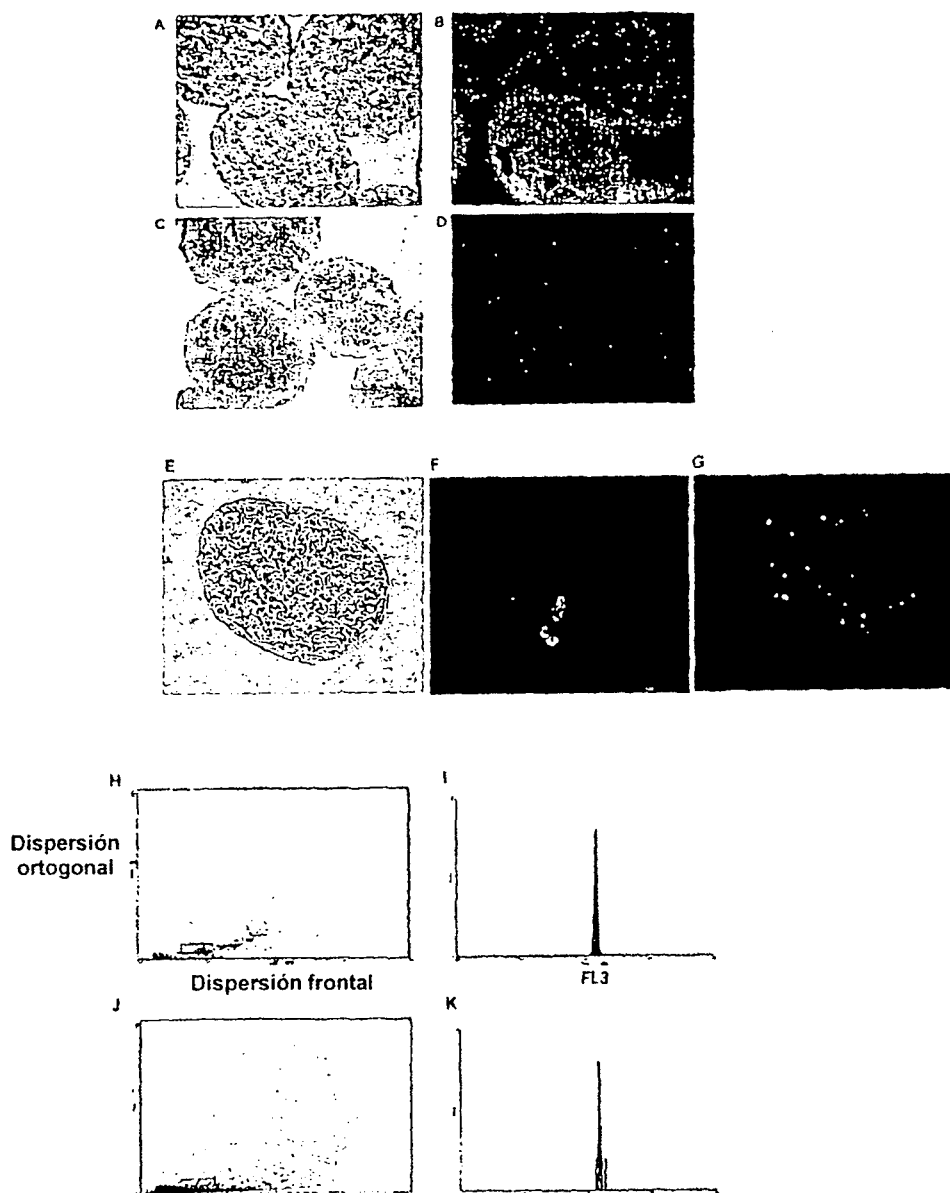
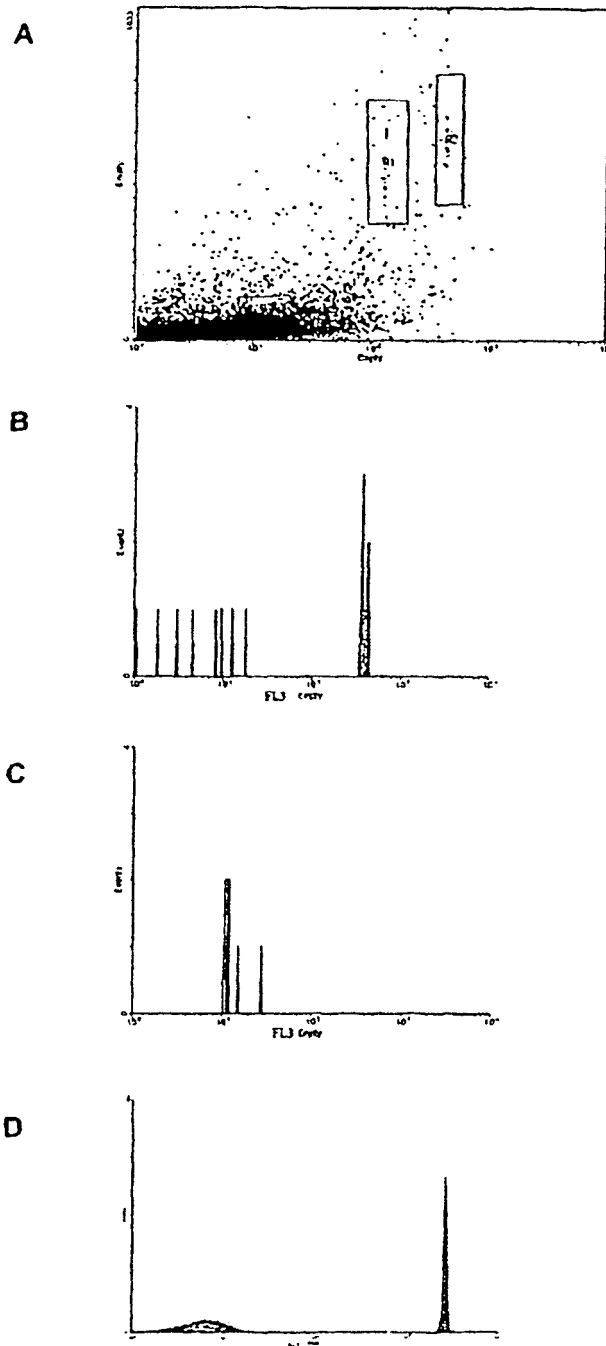


Figura 18



ES 2 307 969 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Choo, Yen
- 5 <120> Cultivo celular
- <130> P015366wo ATM
- 10 <140> PCT/GB2003/004287
<141> 2003-10-13
- <150> GB0222846.8
- 15 <151> 2002-10-03
- <160> 48
- 20 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 67
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Marcaje L1
- <400> 1
- 35 **tgagggaatt cgcgctatgc taacgtgaag ccacgtcgcc gccgccgccg acccgccga** 60
attcctg 67
- 40 <210> 2
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Marcaje L2
- 50 <400> 2
- tgagggaatt cgcgctatgc tgacgtgaag tcacgtcgcc accgccgccg acccgccga** 60
attcctg 67
- 55 <210> 3
<211> 67
- 60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 65 <223> Marcaje L3

ES 2 307 969 T3

<400> 19

5 tgcaggaatt cgcgctatgc taacgcgaag acacatcgcc accgctgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 20
<211> 67
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Marcaje L20

<400> 20

20 tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acacgtcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 21
<211> 67
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcaje 21

35 <400> 21

40 tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtaaag acacgccgcc accgagcccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 22
<211> 67
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Marcaje 22

<400> 22

55 tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acacgtcgcc accgagcccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 23
60 <211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Marcaje L23

ES 2 307 969 T3

	<400> 23		
5	tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtcaag acacgacgcc accgctgccg acccggccga		60
	attcctg		67
	<210> 24		
	<211> 67		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Marcaje L24		
	<400> 24		
20	tgcaggaatt cgcgctatgc taacgttaag acacggcgcc accgccgccg acccggccga		60
	attcctg		67
	<210> 25		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de PCR		
	<400> 25		
35	tgcaggaatt cgcgctatgc		20
	<210> 26		
40	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 26		
50	caggaattcg gccgggtcgg		20
	<210> 27		
55	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 27		
65	ccatgaccta tactcaggct tcagg		25

ES 2 307 969 T3

	<210> 28	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
10	<400> 28	
	gaagctccat atccctgggt ggaaag	26
15	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
25	<400> 29	
	ccaaagtggg ggacaagatt gcc	23
30	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
40	<400> 30	
	gggataggaa ggacgctcaa agac	24
45	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
55	<400> 31	
	cagatgtagt ccgccaagg atag	24
60	<210> 32	
	<211> 26	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 307 969 T3

	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
5	<400> 32		
	atgccactga tggagtatga ggagcc		26
10	<210> 33		
	<211> 24		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
20	<400> 33		
	tcaagactga ctcacagcaa cccc		24
25	<210> 34		
	<211> 24		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador de PCR		
	<400> 34		
40	ctttgtcctg aaccgtggtg gtag		24
	<210> 35		
45	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador de PCR		
	<400> 35		
55	acctgttgac,ggattccaag		20
	<210> 36		
60	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Cebador de PCR		

ES 2 307 969 T3

	<400> 36	
	tcatgaggaa gcgtaggtcc	20
5	<210> 37	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
15	<400> 37	
	tgaagagagc ggagaaggag atc	23
20	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
30	<400> 38	
	tctggagtta agaaatcgga gctg	24
35	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
45	<400> 39	
	ggagtgtcgc ttagagggtc	20
50	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
60	<400> 40	
	tccagaaagc caagagaagc	20
65	<210> 41	
	<211> 19	

ES 2 307 969 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 41	
10	ggacaaggga aatgagagg	19
	<210> 42	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 42	
25	ataacacctc actccactac c	21
	<210> 43	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 43	
40	agtcagagca agtgaatgg	19
	<210> 44	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 44	
55	agaaacaaga tctcagcagg	20
	<210> 45	
60	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de PCR	

ES 2 307 969 T3

	<400> 45	
5	cgcggtctct ttggaaaggt gttc	24
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
15	<400> 46	
20	ctcgaaccac atccttctct	20
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
30	<400> 47	
35	accacagtcc atgccatcac	20
	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
45	<400> 48	
50	tccaccaccc tgttgctgta	20
55		
60		
65		