



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 449**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G06F 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05760335 .9**

96 Fecha de presentación : **10.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1792177**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54

Título: **Métodos para identificar condiciones que afectan a un estado celular.**

30

Prioridad: **12.08.2004 US 600964 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.05.2011**

73

Titular/es: **CENTOCOR ORTHO BIOTECH Inc.**  
**800 Ridgeview Drive**  
**Horsham, Pennsylvania 19044, US**

72

Inventor/es: **Levinson, Douglas;**  
**Kitsos, Christine;**  
**Melnikova, Irena y**  
**McNulty, Christopher**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 359 449 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

Métodos para identificar condiciones que afectan a un estado celular

## CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere generalmente a métodos para identificar uno o más agentes. En particular, esta invención pertenece a métodos para identificar condiciones que promueven, permiten, inhiben o mantienen ciertos estados celulares.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las células diferenciadas comienzan su vida como células pluripotentes, típicamente denominadas células madre. Las células madre pluripotentes son células que todavía no se han asignado a un determinado fenotipo. El término "pluripotente" se refiere a esta capacidad, es decir, la capacidad de una célula madre de diferenciarse en cualquier número de células maduras. Por ejemplo, las células madre de la médula ósea pueden formar glóbulos rojos o glóbulos blancos dependiendo del ingrediente químico al que se expongan estas células. Los factores particulares o conjuntos de factores actúan sobre la célula madre dirigiéndolas hacia un determinado fenotipo. Dependiendo de qué factores o conjunto de factores actúan sobre una célula madre particular, la célula madre se diferenciará en una célula madura comprometida, tal como un linfocito T. A menudo no sólo es un factor el que determina el destino de una célula madre. Típicamente, es una combinación de factores que promueve una vía de diferenciación particular. La Figura 6 ilustra un proceso de diferenciación típico a partir de una célula madre. Por tanto, las células pueden tener múltiples vías diferentes. Las flechas indican sitios potenciales para que las células se diferencian, desdiferencian, transdiferencian o regeneran.

20 A menudo determinadas poblaciones de células desempeñan un papel crítico en, por ejemplo, en la lucha contra enfermedades. Por ejemplo, los glóbulos blancos como un total los emplea el cuerpo para luchar contra bacterias, virus e invasiones parasíticas. Dentro del agrupamiento de glóbulos blancos hay células específicas que tienen funciones particulares. Por ejemplo, el sistema de inmunidad específica está compuesto linfocitos. Los linfocitos pueden ser linfocitos T o linfocitos B. Los primeros se pueden subdividir en, por ejemplo, células T auxiliares y citotóxicas. Los últimos, los linfocitos B se pueden diferenciar adicionalmente en células de memoria o células plasmáticas (células que producen proteínas solubles denominadas anticuerpos). Todas estas células tienen fenotipos específicos asociados con las mismas; además también pueden compartir algunas características. Alguna de las características fenotípicas son antígenos particulares que se producen en la superficie de una célula diferenciada. Por ejemplo, las células T auxiliares producen un antígeno denominado CD4, mientras que las células T citotóxicas producen un antígeno CD8. Estos antígenos permiten un método para identificar ampliamente una población celular. Incluso algunos tipos celulares se pueden identificar por un marcador, puede que no todas las células de una población de células que expresan un marcador funcionen igual. Por tanto, no todas las células T citotóxicas CD8 responderán a los antígenos igual. Una población de células T citotóxicas CD8 consistirá en células en estados celulares variables incluso aunque todas las células puedan expresar CD8. Por tanto, todas las células de una población pueden ser positivas para CD8, pero pueden variar en la expresión de múltiples marcadores distintos o en la secreción de factores. Sería deseable identificar los estados celulares de diferentes de células que expresan CD8 para determinar qué factores producen ese estado celular y en que se diferencia este estado celular de otros estados celulares. De la misma manera, es deseable caracterizar el estado celular para muchos otros tipos celulares.

40 Las células del sistema inmune, específicas de antígeno o no, experimentan diferenciación celular. Los factores celulares influyen la vía específica de diferenciación. Algunos de los factores celulares asociados con diferenciación celular particular ya se han esclarecido. En un entorno terapéutico, es deseable tener la capacidad de aislar células madre y dirigir las hacia un cierto fin, por ejemplo, la producción de células T auxiliares. Aunque se han identificado los factores individuales que influyen en la diferenciación o pequeñas combinaciones de factores que influyen en la diferenciación, no se ha caracterizado la combinación compleja de factores o condiciones que afectan a la diferenciación celular y el estado celular. Por ejemplo, se puede conocer que la interleucina 6 provoca los efectos de diferenciación sobre las células T citotóxicas CD8, pero no se sabe que mezcla de factores generan las células T citotóxicas CD8 que tienen la respuesta más intensa frente a antígeno.

50 Para algunas condiciones clínicas, puede no ser deseable hacer que una célula no diferenciada se diferencie. También puede ser deseable desdiferenciar una célula, por ejemplo ir de una célula diferenciada a una célula desdiferenciada. Se conocen pocos factores celulares individuales implicados en este proceso. La desdiferenciación celular es probable que implique una mezcla compleja de factores celulares y no uno o dos factores individuales que se puedan identificar fácilmente. En otras condiciones clínicas, puede ser deseable provocar la transdiferenciación, por ejemplo, ir de un tipo de célula diferenciada a otro tipo de célula diferenciada. Este proceso puede convertir una célula madura en otras células maduras que tienen un fenotipo diferente. De manera similar, la transdiferenciación celular es probable que implique una mezcla compleja de factores celulares y no uno o dos factores individuales que se puedan identificar fácilmente.

60 La exploración tradicional para el esclarecimiento de diversos factores celulares responsables de la diferenciación celular a menudo es tediosa y requiere mucho trabajo. Además, la exploración de alto rendimiento tradicional respecto a la actividad de factores implica el ensayo de factores individuales. El ensayo de múltiples factores puede ser muy difícil para un sistema que no sólo ensaya la diferenciación celular, pero también ensaya respecto al

estado celular. Por ejemplo, si se ensayan 5 factores diferentes a tres concentraciones diferentes combinadas en tríos en dos dimensiones temporales diferentes, se tendrían 7.110 experimentos posibles si se comprobara un resultado. El número de experimentos aumentaría a 28.440 si se comprobaran cuatro resultados. El ensayo de una combinación compleja de factores y la búsqueda de múltiples estados celulares en tipos específicos de células no se pueden conseguir con sistemas farmacéuticos tradicionales de alto rendimiento. Los sistemas de alto rendimiento actuales están limitados típicamente en variedad de entradas o variedad de salidas. Por tanto, los sistemas actuales no dirigen de manera adecuada el gran espacio experimental en relación con el estado celular. Se necesita un nuevo tipo de sistema que pueda analizar los datos de entrada y la salida del complejo y agrupar los datos en un formato que se pueda leer.

Cada una de las técnicas mencionadas anteriormente debe estar acoplada con una forma de análisis de datos y técnicas de manipulación para permitir la recolección y procesamiento de datos de cientos o miles de muestras. Éstas y otras dificultades se superan por los métodos descritos en el presente documento.

El documento US 6.468.476 proporciona métodos para una detección potenciada de patrones de respuesta biológica (estados celulares). Dichas respuestas se agrupan de acuerdo con la similitud de su perfil biológico. Los métodos descritos son útiles en el descubrimiento de fármacos. Los métodos se pueden usar para comparar las respuestas biológicas con sensibilidad muy potenciada. El documento describe entre otros células de levadura en crecimiento en presencia de al menos 18 agentes diferentes (por ejemplo FK506, concentraciones diferentes del mismo); el análisis de la expresión de marcadores (expresión génica) después de un periodo predeterminado de tiempo (crecimiento de las células de levadura a una DO600 de 1) y el análisis de los datos de expresión por análisis de aglomerados (se seleccionan 48 de entre 6000 genes). El agrupamiento de los genes se representa en un gráfico. El agrupamiento de marcadores con expresión similar comprende el cálculo de las distancias Euclidianas entre genes y perfiles para identificar marcadores covariables. El patrón mostrado en la Figura 16 se interpreta como un "Gráfico de Tartán" puesto que muestra un patrón de tartán. El documento US 6.468.476 proporciona una guía detallada de las operaciones matemáticas a aplicar sobre los datos obtenidos.

Edward *et al.*, (2004) *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(4), pág. 392-398 revisa los métodos que usan el sistema citometría de flujo para las aplicaciones de exploraciones de alto rendimiento. Dichas técnicas permiten el análisis cuantitativo simultáneo de células con marcadores ópticos múltiples correlacionados con una respuesta biológica (reflejan un estado celular). Edwards *et al.*, (2004) describe adicionalmente experimentos que usan 4 marcadores diferentes analizados en la población celular después de la exploración respecto a ciertos ligandos. El documento, adicionalmente, hace observaciones sobre la adquisición de datos y el análisis de conglomerados generados por múltiples situaciones.

Edward *et al.*, (2001) *Journal of Biomolecular Screening*, Larchmont, NY, NS, 6(2), pág. 83-90 describe métodos y medios para ensayos exploración de fármacos. El ensayo comprende detección por citometría de flujo de estados celulares por citometría de flujo por lo que las células se toman de pocillos de placas de microtitulación después de la incubación con agente particular. Se analizaron Los datos fluorescentes obtenidos de muestreo multipocillo. Los algoritmos de software identificaron conglomerados de datos que representaban células de pocillos de muestras individuales.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para identificar agentes que afectan al estado celular. En particular, la presente invención proporciona métodos rápidos y eficaces para identificar agentes que afectan al estado celular.

En una realización, los métodos se dirigen hacia la exploración de combinaciones de complejos de agentes respecto a su capacidad de afectar al estado celular. Esta realización, las células se incuban en condiciones adecuadas y se someten a agentes diferentes. Después de una cantidad de tiempo apropiada, se ensayan las células para determinar qué características poseen, si es que poseen alguna. Las características celulares se organizan de un modo que se puedan identificar sus estados celulares diferentes y nuevos.

Los métodos para identificar un estado celular comprenden proporcionar una serie de receptáculos conteniendo cada uno células que se van a investigar, someter dichas células en diferentes receptáculos a diferentes agentes, esperar un período predeterminado de tiempo antes de analizar dichas células, analizar dichas células respecto a la expresión de al menos 5 marcadores, crear un espectro que representa la presión de marcadores de una población celular y adoptar dichas poblaciones celulares con espectros similares. El agrupamiento se representa en un diagrama o gráfico. En otro aspecto, el estado celular se produce en presencia de al menos tres condiciones de tratamientos diferentes, cinco condiciones de tratamiento diferentes, ocho condiciones de tratamiento diferentes o diez condiciones de tratamiento diferentes. En otro aspecto, las condiciones de tratamiento varían por el agente o agentes añadidos a los receptáculos. En un aspecto adicional, el estado celular se produce en presencia de al menos tres condiciones de tratamiento diferentes. El agrupamiento se produce calculando la distancia Euclidiana entre el espectro de diferentes condiciones de tratamiento y ordenando las medidas de distancia de todos los espectros en un gráfico Tartán basándose en la similitud. En una realización, dicho método comprende adicionalmente las etapas de representar gráficamente células con marcadores de expresión similares en perfiles que comprenden un primer eje que representa al menos dos marcadores y un segundo eje que representa el número de células positivas que expresan dichos marcadores.

En una realización, los agentes varían en una o más variables seleccionadas de las siguientes: una primera

5 variable de agente que se refiere al número de agentes añadidos a dicho receptáculo; una segunda variable de agente que se refiere a la temporización de la adición del agente en un receptáculo; una tercera variable de agente que se refiere a la cantidad o concentración del agente añadido a un receptáculo; una cuarta variable que se refiere a la identidad o tipo de agente añadido en un receptáculo y una quinta variable que se refiere al periodo de tiempo que un agente está presente en un receptáculo.

10 En otra realización, un método para identificar un estado celular comprende proporcionar una serie de receptáculos conteniendo cada uno células que se van a investigar, someter dichas células en diferentes receptáculos a diferentes agentes, esperar un periodo predeterminado de tiempo antes de analizar dichas células, analizar dichas células respecto a la expresión de marcadores, crear un espectro que representa la expresión de marcadores de una población celular y agrupar dichas poblaciones celulares con espectros similares, definiéndose dichos estados celulares por al menos 25 condiciones de tratamiento diferentes que tienen perfiles similares. En un aspecto, los estados celulares se identifican por al menos 50 o 100 condiciones de tratamiento diferentes que tienen perfiles similares. Los perfiles similares se determinan calculando la distancia Euclidiana entre el espectro de condiciones de tratamiento diferentes y ordenando las medidas de distancia de todos los espectros en un gráfico Tartán basándose en la similitud.

15 Un método para identificar un estado celular comprende las etapas de proporcionar una población celular, introducir un conjunto de agentes a la población celular, detectar un conjunto de marcadores y crear un perfil. En un aspecto, la población celular puede ser una población celular heterogénea u homogénea. En otro aspecto, la población celular puede ser de células animales o células vegetales. En otro aspecto, la población celular procede de células seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, células endoteliales, células madre, células mesenquimales, fibroblastos, células neuronales, células hematopoyéticas y células progenitoras. En otro aspecto, las poblaciones celulares están esencialmente en el mismo ciclo celular.

20 En una realización, el conjunto de agentes comprende al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 15, entre 2 y 20, entre 4 y 10, entre 2 y 8 o entre 5 y 12 agentes. En un aspecto, los agentes se introducen a una o más concentraciones. Los agentes son proteínas o pequeñas moléculas.

25 En una realización, el marcador es la expresión de una molécula determinada; secreción de un determinado agente, un fenotipo específico; pérdida de una molécula específica; un cambio en la permeabilidad de membrana; un cambio en el potencial eléctrico; muerte celular; migración celular; diferenciación celular; cambio de la expresión génica; cambios en los niveles de proteínas; fosforilación; metilación o acetilación. El perfil comprende al menos cinco marcadores y puede comprender al menos 10 marcadores o al menos 15 marcadores. En otro aspecto, el marcador de detección es un anticuerpo, receptor; ligando, molécula antisentido, molécula pequeña y conclusión indicadora.

30 Un método para crear un perfil comprende las etapas de seleccionar un conjunto de marcadores, detectar dichos marcadores en una población de células y crear una representación gráfica del porcentaje de células que expresan un marcador particular. Un método para inducir un estado celular específico se describe, el cual comprende las etapas de identificar una población celular deseada, crear un perfil específico para dicha población celular deseada; crear una población celular inducida con un conjunto de agentes, identificar un perfil para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes y comparar dicho perfil específico para dicha población celular deseada con dicho perfil para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes. Se describe un método para identificar condiciones que inducen un estado celular específico que comprende las etapas de identificar una población celular deseada, crear un perfil específico con un conjunto de marcadores específicos para dicha población celular deseada, incubar una población celular con un conjunto de agentes, identificar un perfil con el mismo conjunto de marcadores para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes y comparar dicho perfil específico para dicha población celular deseada con dicho perfil para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes. Un perfil puede comprender un eje que representa al menos dos marcadores y un eje que representa el porcentaje de células positivas que responden a dichos marcadores. El porcentaje de células positivas puede calcularse haciendo la media del porcentaje de células que expresan un marcador particular a partir de al menos dos poblaciones de ensayo de células.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra (a) un histograma típico y (b) un perfil formado a partir de los histogramas;

La Figura 2 son tres ejemplos de perfiles (a, b y c);

50 La Figura 3 es una matriz generada a partir de perfiles múltiples;

La Figura 4 es una vista de los datos de matriz que muestran grupos de similitudes;

La Figura 5 es un gráfico de un proceso ejemplar de esta invención;

La Figura 6 es un gráfico de una vía de diferenciación de células madre típica;

La Figura 7 es una representación gráfica de expresión de marcador HL-60;

55 La Figura 8 es una representación gráfica de células HL-60 seleccionada respecto a la expresión de marcador mieloide;

La Figura 9 es un perfil que compara la dominancia de factores;

La Figura 10 es un gráfico que compara la velocidad de apoptosis de células HL-60 después del tratamiento con idarubicina y agentes adicionales y

La Figura 11 es una representación del tipo de datos usados en la generación de un perfil.

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se dirige a métodos para identificar agentes que afectan al estado celular. En particular, la presente invención proporciona métodos rápidos y eficaces para las condiciones del complejo de exploración que promueven, permiten, inhiben o mantienen un determinado estado celular. Adicionalmente, la invención proporciona métodos que se usan para explorar condiciones que modulan determinadas respuestas biológicas, tales como muerte celular, diferenciación celular proliferación celular, expresión de receptores, expresión génica, sensibilidad celular a estímulos y similares.

15 Para los fines de esta invención, "agente" incluye, pero sin limitación, factores solubles, factores insolubles, componentes de matriz celular, proteínas, péptidos, carbohidratos, pequeñas moléculas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, medio acondicionado, extractos celulares, extractos tisulares, modificadores de pH, gases modificables de presión osmótica, modificadores de fuerza iónica, virus, ADN, ARN, fragmentos génicos, moduladores de temperatura, moduladores de estrés mecánico y moduladores de presión.

Para los fines de esta invención, "condiciones complejas" se define como condiciones en las cuales al menos tipo celular está sometido al menos dos agentes diferentes.

20 Dados los fines de este invención, "marcador" se define como un tipo de identificación para un estado celular. Un marcador puede ser expresión de determinada molécula, secreción de un agente determinado, un fenotipo específico, pérdida de una molécula específica, un cambio en la permeabilidad de membrana, un cambio en el potencial eléctrico, muerte celular, migración celular, diferenciación celular, cambios de la expresión génica, cambios en los niveles proteicos, fosforilación, metilación, acetilación o cualquier otra característica que se pueda usar para diferenciar entre diferentes estados celulares.

25 Para los fines de este invención, "estado celular" significa una condición de una célula en la que la célula expresa factores específicos, responde de un modo particular a agentes, tiene un perfil metabólico específico, tiene un perfil de expresión proteico o génico específico o tiene una morfología específica.

Las realizaciones de este invención pueden: detectar estados celulares no esperados.

30 La presente invención emplea el uso de células. Estas células se pueden obtener a partir de un tejido fresco, pueden ser de una línea celular inmortalizada y similares. El sistema celular puede comprender una población celular homogénea. Como alternativa, el sistema celular puede comprender una población heterogénea de células. Las células pueden tener el mismo origen y estado de diferenciación. Como alternativa, la célula puede tener el mismo origen y aún diferir en su estado de diferenciación. En otro aspecto, las células pueden ser de diferente origen. Por ejemplo, las células madre pueden proceder de un embrión o de médula ósea. Las células pueden ser homogéneas respecto a su fenotipo o pueden ser heterogéneas respecto a su fenotipo, como se pone en evidencia, elaborando diferentes antígenos de superficie celular. Las células usadas pueden estar en diferentes fases mitóticas o pueden estar sincronizadas. En un aspecto, las células tienen un ciclo corto.

40 La muestra celular empleada puede ser de células animales o vegetales o una combinación de las mismas. En otro aspecto, una línea celular hospedadora comprende las siguientes características: tienen un ciclo corto (es decir, alrededor de 20-36 horas de tiempo de duplicación), sensible a procedimientos de alto rendimiento sin pérdida indebida de integridad membrana o viabilidad, susceptible a técnicas convencionales diseñadas para introducir varios agentes, incluyendo proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y una combinación de los mismos. Una elaboración de esa características se puede encontrar en el documento WO 03/008648. En un aspecto, las células usadas tienen una deficiencia, genética o de otro tipo, indicativa de una patología.

45 Las células típicas que se puede usar en este invención están disponibles a partir de la Compañía de Cultivo de Tejidos Americana. Cualquiera de las células disponibles a partir de la Compañía de Cultivo de Tejidos Americana se podría usar en este invención. Por ejemplo, una línea celular típica que se puede emplear es la célula de leucemia promielocítica HL60 (ATCC N° CCL-240). Otras células apropiadas para esta invención incluyen, pero sin limitación, Hs 855. T, HS-5, 2E8, HCN-2, FCH, J26, HF 345.We, 293, WI-38, CTLL y TM3. La amplitud de esta invención no está limitada por el tipo de células usadas. Por ejemplo, las células pueden proceder de células epiteliales, células endoteliales, células madre, células mesenquimales, fibroblastos, células neuronales, células hematopoyéticas, embriones y otros.

55 En un ejemplo, el ensayo es un ensayo no destructivo (por ejemplo, un ensayo basado en células en el que se puede obtener una medida del efecto de un agente sin dañar las células). Dicho ensayo permite múltiples combinaciones por pocillo. Por ejemplo, el agente A se añade a concentraciones en aumento a un pocillo y se toma una medida de marcador después de cada adición de agente. Cuando se consigue una concentración deseada de agente A (determinada basándose en una respuesta de ensayo a la deseada o en propiedades conocidas - tales como toxicidad,

solubilidad y similares, del factor), se añade el agente B en concentraciones en aumento con una medida de marcador tomada después de cada adición. Este proceso se puede repetir muchas veces en un pocillo individual (o usar múltiples pocillos), permitiendo que se realicen cientos, miles o incluso millones de ensayos en una única placa.

5 Los ensayos de comparación se pueden usar para identificar posibles efectos biológicos de condiciones complejas. Por ejemplo, las combinaciones de agentes que se exploran respecto a su capacidad de inducir una respuesta biológica particular, tal como expresión de un marcador particular, se pueden explorar simultáneamente. Obviamente, las combinaciones que producen el efecto deseado se prefieren, mientras que las combinaciones que no producen el efecto deseado se prefieren menos. Es importante notar, sin embargo, que las combinaciones menos preferidas pueden generar el efecto deseado a una concentración diferente. Las combinaciones de agentes pueden producir efectos sinérgicos o que son diferentes de los que podrían producir los agentes individualmente.

10 Las técnicas de cultivo celular para células transformadas y no transformadas se conocen bien en la técnica. Las células se pueden cultivar y almacenar hasta que se requieran para su uso. El medio usado para el cultivo se puede diseñar específicamente o como alternativa se pueden obtener fuentes comerciales de medio.

15 La plataforma usada en la presente invención comprende una serie de receptáculos que pueden recibir células y medio cultivo. Por ejemplo, una placa de 96 pocillos es una plataforma que se puede usar en la presente invención. Otras plataformas multipocillo se usan también dentro del alcance de esta invención. Las estructuras análogas también se pueden usar, por ejemplo, tubos de 1,5 ml. Cualquier receptáculo adecuado para sujetar y sostener células está dentro del alcance de esta invención. Una característica preferible del vehículo de contención es que permite que el análisis sea espectrofotométrico o cualquier otro método analítico bien conocido. Sin embargo, esto no es una limitación crítica ya que la solución contenida dentro de una plataforma dada se puede transferir a una plataforma adecuada susceptible a análisis adicionales. En otro aspecto, la plataforma es susceptible a la adición de una cubierta protectora, por tanto, protegiendo contra la entrada de contaminantes.

20 Las condiciones complejas se pueden examinar para determinar qué efecto tienen sobre una célula intacta, si tienen alguno. Las condiciones experimentales pueden variar basándose en sus agentes y/o la concentración de los agentes. Un aspecto de la invención se dirige a variaciones basándose en diferencias en la composición de agentes. Por ejemplo, la condición 1 puede comprender, ácido retinoico, interleucina 6 e interleucina 11, mientras que la condición 2 comprende dimetilsulfóxido, hormona de crecimiento y factor de crecimiento nervioso. Los agentes pueden incluir otras clases de moléculas también. Otro aspecto de esta invención incluye variar la concentración de uno o más agentes. Por ejemplo, tres concentraciones diferentes (alta, media y baja) se pueden usar para estudiar un intervalo de efectos de concentraciones de agentes. Por tanto, en una realización, la concentración de agente se ensaya en una concentración de agente alta, media y baja. Un experto en la materia podría identificar las concentraciones altas, medias y bajas específicas para cada agente específico.

25 Las diferencias entre diversas condiciones, también puede ser diferencias en dimensiones temporales y espaciales. Las diferencias en la administración temporal de agentes pueden afectar el estado celular. Por ejemplo, la administración de IL-12 a células T provoca la regulación positiva del receptor regulador inmune CD28. Por tanto, añadir B7.1 (el ligando para CD28) después de la regulación positiva de CD28 podría tener un efecto diferente que añadir B7.1 al mismo tiempo que la IL-2 o antes de la expresión de CD28. Por tanto, la variación en la administración temporal de agentes puede identificar distintos estados celulares e identificar los agentes que promueven, permiten, inhiben o mantienen esos estados celulares. En un aspecto de esta invención, el orden de administración de agentes varía. Los agentes se pueden añadir separados por minutos, separados por horas o separados por días.

30 Las variaciones en la administración espacial de los agentes también pueden afectar el estado celular. Por ejemplo, la activación de un anticuerpo unido a la superficie de una perla o una placa se sabe que activa las células de manera diferente que un anticuerpo libremente soluble. Por tanto, el modo espacial de presentación puede afectar al estado celular. Los ejemplos de diferencias especiales se dan cuando los agentes pueden estar libremente solubles, se pueden unir a una placa, se pueden unir a otra superficie rígida, se pueden aglomerar, se pueden poner en pequeños espacios, se pueden en poner en grandes espacios o pueden estar recubriendo.

35 Un cóctel es una composición que comprende una o más moléculas de detección que son específicas para un marcador o conjunto de marcadores predeterminado particular. Los cócteles pueden contener 1, más de 1, más de 2, más de 3, más de 5, más de 10, más de 15 o más de 20, marcadores de detección diferentes. Los cócteles pueden diferir en sus constituyentes. Por ejemplo, el cóctel 1 contiene anticuerpos A, B y C, mientras que el cóctel 2 contiene anticuerpos D, E y F. Cada uno de estos anticuerpos es específico y está dirigido a un marcador particular. Los cócteles que detectan receptores pueden estar compuestos por anticuerpos, ligandos u otras moléculas que pueden unirse al receptor deseado. En otras realizaciones, un cóctel puede comprender un gen marcador tal como una proteína verde fluorescente. Los cócteles que detectan ADN o ARN podrían consistir en moléculas de unión a ácidos nucleicos. Por tanto, los componentes de un cóctel pueden variar dependiendo del marcador específico que se está explorando.

40 Las matrices múltiples de condiciones experimentales se pueden realizar exponiendo las células a múltiples agentes o múltiples combinaciones de agentes (incluyendo cambios ambientales, tales como pH, fuerza iónica, etc.). Cada uno de los cócteles y condiciones individuales se pueden añadir a unidades individuales (por ejemplo, pocillos) dentro de la plataforma. Por ejemplo, asumiendo que una placa de 96 pocillos es la plataforma que se utiliza. También asumiendo que hay tres agentes diferentes (A, B y C) a examinar. Adicionalmente, asumiendo que un cóctel comprende

- 5 anticuerpos X, Y y Z y que se usará para detectar la presencia (o ausencia) de determinados marcadores que acompañan a la población celular examinada. Asumiendo que el experimento se realiza por triplicado, la placa 1 comprenderá, por ejemplo, células en tres pocillos diferentes, lo mismo es válido para la placa 2 y la placa 3. A la placa 1 se añade la condición A, a la placa 2 se añade B y a la placa 3 se añade C. Se añade el cóctel que comprende los anticuerpos X, Y y Z a las placas 1, 2 y 3. Las células se incuban durante un periodo suficiente en condiciones adecuadas y después se someten a análisis. Los histogramas se pueden producir después partir de la realización del análisis de los marcadores de definición. Una vez que los histogramas se producen, la información contenida en los mismos se puede transformar en diversas otras formas de representación de datos, tales como un gráfico. Los agentes A, B y C también se pueden ensayar en diversas combinaciones.
- 10 Los agentes usados en un experimento puede que tengan o no actividad/función biológica. Algunos agentes funcionarán de manera similar de modo que se puedan encontrar relaciones sinérgicas. Otros agentes tendrán diferentes funciones. En un aspecto, el mismo agente se puede ensayar con relaciones o concentraciones diferentes múltiples de agente.
- 15 Adicionalmente, otros factores no químicos se pueden explorar en combinación con un conjunto específico de agente. Los factores no químicos pueden incluir, pero sin limitación, luz (visible y fuera del intervalo visible, por ejemplo, luz infrarroja y luz ultravioleta), radiación ionizante tal como rayos X y rayos gamma, presión hiperbárica, un aumento o disminución de temperatura o pH, sustancias gaseosas tales como oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y similares y vibraciones acústicas y de cualquier frecuencia.
- 20 El ensayo por sí mismo puede basarse en un componente celular individual, tal como la presencia o ausencia de un antígeno, como alternativa se puede basar en una respuesta biológica, tal como un cambio en el segundo mensajero o actividad eléctrica. Cualquier ensayo biológico que sea útil para ensayar agentes individuales o combinatorios se adapta fácilmente a la presente invención. Las medidas de ensayo también pueden incluir, por ejemplo, el transporte de un compuesto a través de la membrana celular, potencial eléctrico, generación del potencial de acción, proliferación celular, muerte celular, especificación celular, diferenciación celular, migración celular, expresión génica o niveles proteicos (medidos, por ejemplo, detectando ARNm, proteínas o un gen indicador), actividad enzimática, fosforilación, metilación, acetilación, translocación de una proteína al núcleo celular (u otros cambios en el locus proteico, tal como translocación de una proteína desde el citosol a la superficie celular), capacidad de resistir una exposición patogénica, capacidad para responder a un agente y la capacidad para producir una respuesta inmune.
- 25 El método de detección puede variar. Se puede usar cualquier sistema de detección que pueda detectar los marcadores aplicables. Los marcadores de detección funcionan para detectar un marcador específico. Los marcadores de detección incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, receptores, ligandos, moléculas antisentido, moléculas pequeñas y construcciones indicadoras (tal como proteína verde fluorescente). El marcador de detección usado variará dependiendo del ensayo biológico que se realice y el marcador que se desea.
- 30 Por ejemplo, si el ensayo se dirige hacia la diferenciación de una célula a partir de una célula madre a una célula T auxiliar, entonces un método de detección viable es emplear una mezcla de anticuerpos, como los marcadores de detección específicos hacia aquellos antígenos específicos para células T auxiliares, tales como el antígeno CD4 (el "marcador"). El anticuerpo primario específico para, en este ejemplo, el antígeno CD4, se puede marcar usando un tinte fluorescente o un compuesto radiactivo. Como alternativa, se puede marcar un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario y usarse en la técnica de sándwich bien conocida que amplifica la señal, en comparación con el uso solo del anticuerpo primario marcado. Ambos de estos marcadores se pueden detectar utilizando instrumentos analíticos bien conocidos.
- 35 Los dispositivos de lectura de placas se conocen bien en la técnica. Estos lectores de placa comerciales pueden analizar una placa convencional, tal como una placa de 96 pocillos. Estos lectores de placa analizarán pocillos predeterminados y generarán datos sin procesar. Estos datos se pueden transformar después y presentar en una diversidad de formas.
- 40 Los datos se pueden obtener para una o más muestras eliminando manualmente las plataformas que los contienen del bloque que las sujeta y presentando las plataformas al dispositivo analítico particular que se está usando (por ejemplo, espectrómetro de fluorescencia). Una realización usa un sistema mecánico (tal como un brazo robótico automático) para seleccionar o "seleccionar minuciosamente", plataformas particulares (por ejemplo, las identificadas como que cumplen determinados criterios por la estación de visualización (*vision station*)) del bloque o los bloques que las contienen.
- 45 Los marcadores celulares se usan para detectar y/o caracterizar condiciones que se han usado para determinar diferentes estados celulares. En esta realización, se presenta una plataforma (tal como una placa de 96 pocillos) que comprende células y varios cócteles a un espectrómetro de fluorescencia después de un tiempo de incubación suficiente y se forman imágenes de estas. Después de cada captura de imágenes, se realiza un análisis para determinar dónde están las "áreas de interés" en una plataforma, donde pueden incluir "áreas de interés" poblaciones celulares y en algunos casos cualquier gota de solución o disolvente restante.
- 50 Un tipo de herramienta de análisis de marcador es un análisis espectroscópico. El análisis espectroscópico de la plataforma generará histogramas. Véase Figura 1. Estos histogramas (Figura 1a) reflejan la intensidad de señal para cada marcador por pocillo de muestra, por ejemplo, se pueden usar cuatro marcadores de detección marcados por
- 55
- 60

pocillo. Los histogramas se transforman después en un perfil (Figura 1b). Un perfil representa datos obtenidos de un conjunto de agentes y un conjunto de marcadores de detección en los que se tratan las células. El perfil muestra los resultados de múltiples pocillos de muestras para una condición experimental dada. Los resultados están en términos de una respuesta de marcador, es decir, si, y en qué grado, una población de células dada respondió a un conjunto de agentes particular reflejado en términos de intensidad de marcador. Los perfiles tienen un eje "x" e "y", representando el eje "x" los marcadores que se examinan y representando el eje "y" el porcentaje positivo de células que responden a un marcador de detección dado. Los perfiles se agrupan después para formar una matriz (Figura 3). Cada caja en miniatura en la matriz representa una condición experimental diferente (por ejemplo, un conjunto diferente de agentes). Una matriz representa un agrupamiento de condiciones que favorece un resultado determinado reflejado por la respuesta a los marcadores de detección usados. Las matrices se analizan después adicionalmente y se transforman en aglomerados jerárquicos (Figura 4). Los aglomerados jerárquicos se agrupan basándose en la similitud a un perfil específico. Por tanto, las cajas a lo largo de la diagonal representan diferentes estados celulares. En la Figura 4, hay 5 estados celulares diferentes. Por tanto, en la caja 1, hay múltiples combinaciones de agentes diferentes que indujeron un estado celular con un perfil similar. Los análisis se pueden realizar después sobre los datos para determinar qué agentes, combinación de agentes o ausencia de agentes contribuyó a un estado celular específico. Sólo creando un perfil puede producirse un análisis complejo de diferentes estados celulares.

Un perfil comprende más de 4 marcadores y puede comprender más de 5 marcadores, más de 8 marcadores, más de 10 marcadores, más de 15 marcadores, más de 20 marcadores, más de 25 marcadores, más de 30 marcadores o entre 5 y 50 marcadores. El número de marcadores que se necesita depende del estado celular deseado. Por ejemplo, para caracterizar de manera precisa una célula madre hematopoyética específica que se está dividiendo activamente, un investigador puede querer caracterizar este estado celular con 8 marcadores diferentes. La caracterización de poblaciones celulares con marcadores adicionales permite la caracterización de estados celulares específicos y no sólo diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la caracterización típica de células madre hematopoyéticas puede marcar células como que tienen el marcador C34, pero que no tienen el marcador CD33. La caracterización de células hematopoyéticas con 5, 10 ó 15 marcadores diferentes podría permitir un mejor entendimiento de los distintos estados celulares dentro de la población CD34+ y CD33-. Los métodos de esta invención permiten esta caracterización.

En realizaciones particulares de la invención que usan análisis de espectros, los datos espectroscópicos se procesan usando lo que se denomina en el presente documento "sistema de agrupamiento espectral", que permite la identificación y análisis rápido de muestras en un conjunto, creando, por ejemplo, una familia o mapa de similitud (o matriz) basándose en un perfil particular. Algunas realizaciones del sistema de agrupamiento espectral comprenden una plataforma de instrumentación basada en hardware y un conjunto de algoritmos basado en software. El software del ordenador se usa para analizar, identificar y categorizar grupos de muestras que tienen perfiles similares, por tanto, identificando un grupo a partir del cual un operador o científico puede seleccionar después unas pocas muestras para un análisis adicional. Esta selección se puede realizar independientemente por el científico o usando un medio automatizado, tal como un software diseñado para seleccionar muestras de interés automáticamente. Los métodos analíticos y de agrupamiento particulares útiles en la invención se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003-0059837 presentada el 10 de mayo, 2002.

El sistema de agrupamiento espectral se usa generalmente en esta invención para detectar similitudes en los perfiles de muestras observando su comportamiento de agrupación. Por tanto, el número de poblaciones celulares que demuestran resultados positivos frente a cualquier marcador o combinaciones de marcadores dados se puede estimar por el agrupamiento espectral. La pluralidad de muestras se examina con un dispositivo para generar un espectro correspondiente de calidad aceptable, es decir, relación S/N suficiente. Ventajosamente, los perfiles se comparan por pares de acuerdo con una métrica para generar una puntuación similar. Otras comparaciones que usan más de dos espectros concurrentemente también son aceptables, sin embargo posiblemente complejas.

Una o más técnicas de aglomeración se pueden usar para generar agrupaciones que preferiblemente están bien definidas, sin embargo esto no es un requisito absoluto puesto que es aceptable generar una lista reducida de poblaciones candidatas para un conjunto de condiciones dado como una estimación de la heterogeneidad de las condiciones. Ventajosamente, la generación de grupos facilita la fácil evaluación de poblaciones celulares entre condiciones de muestras.

La invención usa una aglomeración jerárquica para representar los datos en forma de una matriz de similitud que tiene perfiles similares clasificados muy juntos. Dicha matriz de similitud se organizó para generar regiones de similitud a lo largo de una diagonal. El algoritmo de aglomeración jerárquica usa la distancia Euclidiana entre el espectro para obtener una medida de similitud (no similitud). La organización de las medidas entre todos los espectros del experimento proporciona un gráfico Tartán, en el que cada aglomerado es indicativo de un posible estado celular.

Ventajosamente, aunque los aglomerados están realmente en un espacio dimensional mayor, pueden proyectarse en un espacio bidimensional o tridimensional y visualizarse. Preferiblemente, el tiempo de respuesta para generar un perfil y asignar el perfil a una agrupación es menor de aproximadamente dos minutos, un minuto, diez segundos o un segundo. Además, el procesamiento del tiempo real limitado a menudo es posible si un perfil adquirido se va a asignar a agrupaciones existentes, o, en una realización de la invención, se actualiza una biblioteca de perfiles agrupados con perfiles recientemente adquiridos. En una realización, los perfiles recientemente adquiridos de una muestra individual pueden agruparse todos en una sola agrupación basándose en que una mayoría de ellos están más relacionados con la agrupación individual de acuerdo con una métrica, tal como los analizados a continuación y en otras



partes del presente documento.

Una vez se han recogido los perfiles de todas las muestras a analizar, se procesan por una serie de algoritmos. Estos algoritmos facilitan la agrupación de perfiles de muestra de acuerdo con una o más características espectrales. Los ejemplos de dichas características incluyen, pero sin limitación, porcentaje positivo de marcadores específicos, la localización de picos, inicio de picos, altura de picos y áreas de pico. En una realización, el proceso de agrupamiento espectral agrupa perfiles basándose en el porcentaje de células positivas en un pocillo por condición examinada, expresada como porcentaje positivo.

El proceso de encontrar picos en un perfil es un aspecto esencial de muchas técnicas de procesamiento espectral, de modo que hay muchos programas disponibles en el mercado para realizar esta tarea. Las muchas variaciones de algoritmos de localización de picos se pueden encontrar en la bibliografía. Un ejemplo de algoritmo simple es encontrar los cruces cero del primer derivado de un espectro suavizado o no suavizado y después seleccionar los cruces ceros cóncavos hacia abajo que cumplen determinados criterios de altura y separación.

Para generar estos espectros binarios, se aglomeran los perfiles respecto al porcentaje positivo por marcador. El proceso usado para realizar esta aglomeración de perfiles puede ser una forma modificada de un algoritmo de aglomeración de k-medias iterativo unidimensional. El proceso comienza con la selección del espectro de un espectro compuesto. Una agrupación espectral cubre un intervalo de células caracterizadas por un perfil particular que se puede especificar por el operador.

Usando la matriz de similitud o la matriz de perfiles binaria, se emplea la aglomeración jerárquica para asignar perfiles en agrupaciones.

Usando la información de la ejecución de la aglomeración jerárquica, la aglomeración de k-medias se puede realizar con posiciones centroides iniciales y números de aglomerado definidos por el usuario. En otra realización, el número de aglomerados se puede seleccionar automáticamente para minimizar algo de métrica, tal como la suma de cuadrados de error o el rastreo o determinante dentro de la matriz de dispersión de aglomerados. Véase, Dud, R., Hart, P., y Stork, D., "Pattern Classification", John Wiley y Sons, 2ª Edición (noviembre 2000).

La aglomeración jerárquica produce una lista de perfiles organizada por dendrograma, de modo que perfiles similares están muy próximos entre ellos. Esta lista organizada por dendrograma se puede usar para presentar la matriz de similitud de un modo codificado, usándose los indicios de similitud para cada región de similitud, incluyendo sin limitación, diferentes símbolos (tales como entramado), sombras de color o diferentes colores. En una realización específica, la matriz de similitud codificada se presenta de un modo codificado por colores, con regiones de alta similitud en colores cálidos y regiones de baja similitud en colores fríos. Usando dicha visualización, muchos aglomerados se vuelven evidentes como regiones cuadradas de similitud en colores cálidos a lo largo de la diagonal de la matriz. Estas regiones cuadradas representan el alto grado de similitud entre todos los perfiles en esas regiones. Sin embargo, debe notarse que la imposibilidad de la matriz de similitud codificada para presentar una forma diagonal se espera con algunos tipos de muestras, no obstante, la matriz todavía es útil en la representación de relaciones de similitud más complejas. Adicionalmente, en algunos casos puede haber regiones de similitud a lo largo de más de una diagonal posible que corresponde a diferentes redistribuciones. Dichas redistribuciones dan como resultado unas regiones cuadradas de similitud fuera de la diagonal que se vuelven parte de las regiones cuadradas de similitud diagonal.

Junto de la representación de la matriz de los datos de aglomerado, también es útil mostrar cuando todos los perfiles y límites de aglomerado permanecen en un espacio dimensionalmente reducido (normalmente 2 dimensiones). Hay varias formas de realizar esta reducción de dimensionalidad. En una realización, se hace una proyección lineal de una matriz de perfiles binarios sobre sus dos primeros componentes principales. Como alternativa, la matriz de similitud elegida seleccionada se puede usar para generar un mapa de los datos usando un escalado multidimensional.

En una realización, los métodos se dirigen hacia la exploración de múltiples condiciones respecto a su capacidad de inducir cambios en el estado celular. En esta realización, las células se incuban en condiciones adecuadas y se someten a diferentes cócteles experimentales. Después de una cantidad de tiempo apropiada, las células se ensayan para determinar qué características de marcador poseen, si es que poseen alguna. En un aspecto, las células en estado de desarrollo temprano, por ejemplo, células madre, se someten a múltiples condiciones para determinar qué condiciones facilitan la diferenciación de estas células en células más maduras. En un aspecto particular, las células diferenciadas generarán antígenos específicos (o marcadores) en su superficie celular que se pueden detectar por un marcador de detección, tal como un anticuerpo específico para ese antígeno. En otro aspecto, las células se diseñan con o se les introduce por transfección un gen indicador. Este gen indicador funciona como el marcador. Por tanto, se pueden caracterizar los agentes que promueven, inhiben, permiten o mantienen el gen específico unido al gen indicador.

En otro aspecto, las células diferenciadas se someten a diversos agentes para determinar qué conjunto de condiciones da como resultado la desdiferenciación de una célula madura. De nuevo, la detección se puede conseguir detectando marcadores específicos generados en una célula en fase temprana, como alternativa, la detección puede estar basada en la pérdida de un marcador o marcadores particulares que acompañan sólo a las células maduras.

Un ejemplo de un método de la presente invención implica la exploración de alto rendimiento usando múltiples agentes, múltiples marcadores de detección, creación de perfiles y análisis de los datos. En una realización, el método

implica los siguientes componentes informáticos: una herramienta DOE, un controlador de estación Tecan, un citómetro de flujo y un visualizador de resultados. En un aspecto de la presente realización, se emplean los siguientes componentes de hardware: (1) un Tecan estéril (w/PC) y (2) un Citómetro de Flujo FACSCalibur.

5 Los agentes a usar en la formación de las condiciones experimentales se pueden disolver en disolventes apropiados, tales como DMSO (dimetil sulfóxido) o etanol. Las concentraciones apropiadas se determinan para factores de diferenciación y los factores se diluyen por consiguiente en medio de crecimiento celular a una concentración de  $N_x$  (donde N es el orden del experimento – para un experimento binario  $N = 2$ , para uno ternario  $N = 3$ , etc.).

10 Una vez que los agentes y concentraciones de agentes se han determinado, un profesional habilitado puede diseñar un experimento usando una herramienta DOE basada en un sitio web. Esta herramienta actualmente permite a un profesional habilitado diseñar un experimento combinatorio factorial completo. El profesional habilitado especifica el tipo celular que se está ensayando, el número de concentración por agente, el número de agentes en la mezcla y el número de controles. Después el profesional habilitado selecciona agentes apropiados e introduce las concentraciones que se van a ensayar. Finalmente, el profesional habilitado envía el diseño y se introduce en la base de datos.

15 Los agentes se pueden cargar en, por ejemplo, una plataforma Tecan en tubos Falcon de 50 ml. El controlador de estación Tecan especifica el modo en que los tubos Falcon se van a cargar en la plataforma. Las placas de cultivo de 96 pocillos con códigos de barras cubiertas también se pueden cargar en la plataforma Tecan. El controlador de estación Tecan genera una lista de trabajo de pipeteo que se puede cargar en Gemini y ejecutarse como parte de una secuencia de comandos Tecan más grande. Esta secuencia de comandos Tecan debe quitar las tapas de las placas de cultivo, realizar la distribución y después poner de nuevo las tapas sobre las placas.

20 En un ejemplo específico, el volumen diana para un pocillo completo es 200  $\mu\text{l}$ . Este proceso se repite tantas veces como sea necesario para producir el número apropiado de placas para todos los marcadores que se usan en experimento. Una vez que la distribución combinatoria se ha completado, se añaden 5-10  $\mu\text{l}$  de células en medio de cultivo celular a todos los pocillos. Se puede usar un Multidrop estéril para la distribución. Después, se incuban las placas de cultivo durante 2 días. Un poco antes del final de segundo día de incubación, la etapa de distribución inicial se repite exactamente como se describe anteriormente. Después de 2 días de incubación, las placas de cultivo madre originales se centrifugan. El medio se elimina con cuidado y se sustituye con el medio fresco de la segunda distribución. Después de 2 días adicionales de incubación, las placas de cultivo madre originales se marcan con marcadores de detección. Los agentes se pueden añadir a los pocillos a diversos tiempos. Por ejemplo, el agente se puede añadir con la siembra en placas original de las células o el agente se puede añadir justo una hora antes de la adición de los marcadores de detección.

30 En la fluorescencia para detectar se usa un marcador de detección, los pocillos de células marcadas se pueden transferir a tubos de citometría de flujo y leer en el citómetro de flujo. Los pocillos se leen de un modo por primera columna (A1, B1, etc.). Los archivos de datos para una placa se almacenan en un directorio con el ID de la placa como un nombre. El pocillo A1 se almacena en un archivo denominado Barcode.001. El pocillo A2 se almacena en un archivo denominado Barcode.002 y sucesivamente. Una vez que se ha leído una placa entera en el citómetro de flujo, el controlador de estación del citómetro de flujo se puede usar para cargar toda la información del citómetro de flujo en una base de datos. Se puede usar un lector SpectraMax para acumular más información sobre los cultivos celulares. Se pueden realizar unos ELISA y el SpectraMax puede recoger datos de criterios de valoración colorimétricos o fluorométricos. Un controlador de estación SpectraMax permitirá que los datos de SpectraMax se almacenen de manera apropiada en la base de datos.

35 La aplicación de análisis incorporará toda la información para un pocillo dado o para un agente dado en una única fila. Por tanto, la aplicación de análisis presentará vistas de datos que se centran en la mezcla y que se centran en los pocillos. Los datos de la citometría de flujo para una fila serán visibles a través de un gráfico de puntos 4D. Los datos de la citometría de flujo para 2 filas diferentes se podrán abrir a la vez para comparación.

45 La Figura 1(a) es un ejemplo del tipo de datos que se obtiene. Los gráficos de histogramas individuales se combinan para generar un perfil (Figura 1(b)). Este perfil individual representa una condición experimental (por ejemplo, conjunto de agentes) y 12 marcadores diferentes. La Figura 2 (a-c) es ilustrativa de los datos obtenidos en un experimento bajo múltiples condiciones. Los perfiles (a) – (c) representan datos transformados a partir de histogramas que se recogen de experimentos realizados usando diferentes condiciones sobre células y detectando el mismo conjunto de cinco marcadores en la superficie de la célula. Cada línea en las tres figuras representa una condición experimental diferente. Las Figuras 2(b) y 2(c) ilustran que incluso en condiciones experimentales diferentes, las células pueden mostrar perfiles similares. El ejemplo de la Figura 2(a) ilustra que en otros casos, las células tendrán diferentes perfiles que no se pueden corresponder fácilmente con otros perfiles. Los tres espectros representan los tres aglomerados diferentes (o condiciones). Este tipo de análisis puede identificar determinadas condiciones experimentales que favorecen la elaboración de determinados marcadores, conjuntos de marcadores o perfiles. Determinados perfiles indican un estado celular específico. Por tanto, este análisis puede indicar un estado celular particular o encontrar condiciones que promueven, mantienen, permiten o prohíben un determinado estado celular.

60 Una realización comprende un método para identificar un estado celular que comprende las etapas de: a) proporcionar una población celular; b) introducir un conjunto de agentes a la población celular; c) detectar un conjunto de al menos 5 marcadores y d) crear un perfil. Las células pueden ser heterogéneas u homogéneas. Las células pueden

ser de cualquier tipo suficiente para completar un ensayo. El número de agentes puede variar de dos a 20 o más. En algunos aspectos, los agentes se ensayan en múltiples concentraciones diferentes.

En otra realización, se genera un perfil que comprende las etapas de seleccionar un conjunto de marcadores, detectar los marcadores en una población de células y crear una representación gráfica del porcentaje de células que expresan un marcador particular. Como alternativa, la representación gráfica puede mostrar el número total de células que expresan dichos marcadores.

Otra realización comprende un método de inducir un estado celular específico que comprende las etapas de: a) identificar una población celular deseada; b) crear un perfil para dicha población celular deseada, c) crear una población celular inducida con un conjunto de agentes; d) identificar un perfil para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes y e) comparar dicho perfil específico para dicha población celular deseada frente a dicho perfil para dicha población inducida con dicho conjunto de agentes.

En otra realización, un método para identificar condiciones que inducen un estado celular específico comprende las etapas de a) identificar una población celular deseada; b) crear un perfil específico con un conjunto específico de marcadores para dicha población deseada; c) incubar una población celular con un conjunto de agentes; d) identificar un perfil con el mismo conjunto de marcadores para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes y e) comparar dicho perfil específico para dicha población celular deseada frente a dicho perfil para dicha población celular inducida con dicho conjunto de agentes.

En una realización adicional, un perfil comprende un eje x que representa al menos 5 marcadores y un eje y que representa el porcentaje de células positivas que responden a o expresan dichos marcadores. Como alternativa, el eje x del perfil podría representar al menos 8 marcadores, al menos 10 marcadores o al menos 15 marcadores. La representación de los ejes x e y también pueden invertirse. En otra realización, el porcentaje de células positivas se calcula haciendo la media del porcentaje de células que expresan un marcador particular a partir de al menos dos poblaciones de células de ensayo. En otra realización, dichos marcadores se identifican por una o más moléculas de detección. Las moléculas de detección pueden responder a análisis espectroscópico. Como alternativa, el eje y podría representar el número de células positivas que responden a los marcadores.

En otra realización, un método para identificar estados celulares similares comprende las etapas de crear un perfil y agrupar perfiles similares. En algunas realizaciones, la agrupación se produce por aglomeración jerárquica.

Otra realización implica la sinergia no esperada de dos agentes. Se mostró que forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y dimetilsulfóxido (DMSO) hacen a una línea celular de leucemia más susceptible a la apoptosis después del tratamiento con un agente promotor de apoptosis. En una realización, una composición contiene PMA, DMSO y un agente promotor de apoptosis. Los ejemplos específicos de agentes promotores de apoptosis incluyen derivados de antraciclina, idarubicina y daunorubicina. Otras realizaciones suponen un método para tratar a un paciente con PMA, DMSO y un agente promotor de apoptosis. Los pacientes típicos pueden incluir pacientes de cánceres, pacientes que necesitan apoptosis de células leucémicas, pacientes con cáncer de mama, pacientes con leucemia o pacientes que se tratan típicamente con fármacos derivados de antraciclina. En otra realización, un paciente primero se expone a PMA y DMSO y de manera secundaria se expone a un agente promotor de apoptosis. En otra realización, una composición comprende una forma de dosificación que primero libera PMA y DMSO y de manera secundaria libera un agente promotor de apoptosis.

#### EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Experimentos binarios y ternarios para examinar la diferenciación de una célula

Se usaron células HL-60 para estudiar qué factores están implicados en la diferenciación celular. El día 0, las células se sembraron en placas en pocillos usando una placa de 96 pocillos a una densidad de siembra de aproximadamente 60.000 células, se añadió medio celular adecuado. (Véase, Tablas 1 y 2 a continuación). El día 2, el medio se aspiró de los pocillos y se distribuyó medio fresco en los pocillos. Las células se indujeron con los factores en la Tabla 1 y Tabla 2. El día 4, las células se recogieron y se marcaron con anticuerpo (véase Tabla 3) para la citometría. El marcaje se consiguió lavando las células con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Después se usó gamma globulina para bloquear sitios de unión no específicos. El tratamiento con gamma globulina duró aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador de balanceo.

La concentración de cóctel de anticuerpos para cada anticuerpo usada se basó en las instrucciones del fabricante ajustadas para el número de células final. El cóctel de anticuerpos se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador con balanceo. Después de la incubación, las células se lavaron usando PBS. Las células se resuspendieron en formaldehído ultrapuro sin metanol al 1% y se refrigeraron hasta el análisis. Se analizaron las células utilizando un BD FACSCalibur equipado con un muestreador de alto rendimiento (HTS) que tiene una línea de excitación de láser dual: argón (488 nm) y diodo rojo (635 nm).

Los controles positivos para estos experimentos fueron 100 nm de vitamina D3 más anticuerpo CD 14. Los controles negativos fueron (1) células no tratadas más cócteles de anticuerpos localizados en las placas y (2) células no tratadas frescas más cócteles de anticuerpo localizados en placas separadas. La Figura 5 explica el proceso de análisis.

TABLA 1: experimento binario

Factor	Conc. final 1	Conc. final 2	Conc. final 3
Vitamina D <sub>3</sub>	100 nM	1 nM	10 pM
Dimetilsulfóxido	0,26 nM	0,18 M	0,13 M
Ácido trans retinoico	10 µM	10 nM	10 pM
Medio con pH 7,8 + butirato sódico	600 µM	300 µM	100 µM
12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato	81 nM	16 nM	0,81 nM

TABLA 2: experimento ternario

Factor	Conc. final 1	Conc. final 2
Vitamina D <sub>3</sub>	100 nM	1 nM
Dimetilsulfóxido	0,19 nM	0,15 M
Ácido trans retinoico	50 µM	500 nM
Medio con pH 7,8 + butirato sódico	500 µM	200 µM
12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato	100 nM	1 nM

5

TABLA 3: Anticuerpos y tintes

CD 3	CD 14	CD 42 b	CD 66 a	CD 235 a
B220	CD 33	CD 56	CD 72	Anexina 5
CD 11 b	CD 34	CD 57	CD 83	7-AAD
CD 11 c	CD 38	CD 62 p	CD 86	
CD 13	CD 42 a	CD 66	CD 125 w	

## Ejemplo 2

10 Se expusieron células HL-60 a cinco factores de diferenciación química bien estudiados (dimetilsulfóxido (DMSO), Vitamina D<sub>3</sub>, Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), butirato sódico + pH 7,8 y Ácido Trans Retinoico (ATRA)) que se sabe que promueven la diferenciación a lo largo de tres vías distintas (neutrófilos, monocitos, eosinófilos/basófilos) dentro del linaje mielóide. La diferenciación se indujo creando combinaciones de cinco factores binarios y ternarios usando los cinco factores a tres concentraciones para el experimento binario y dos concentraciones para el experimento ternario.

15 Después de la diferenciación, se podían observar cambios morfológicos en pocillos que contenían combinaciones de factores de diferenciación en comparación con pocillos de control. Por ejemplo, las combinaciones que contenían PMA (16 nM) + butirato sódico (600 µM), pH 7,8, produjeron agregados de células mientras que PMA (81 nM) + butirato sódico (600 µM), pH 7,8 no lo hicieron.

20 Para observar los amplios perfiles de los experimentos de expresión de marcadores, se usó el porcentaje de células positivas para todos los marcadores y se construyó un perfil para cada tratamiento combinatorio. El aglomerado jerárquico ordena los datos de modo que los perfiles más similares están cerca entre ellos en el gráfico. Esto da como resultado varias separaciones diferentes a lo largo de la diagonal de la matriz de similitud y se muestra en el gráfico Tartán en la Figura 7a. Los espectros que corresponden a los tratamientos ordenados se muestran en la Figura 7b.

25 Para refinar el análisis de aglomerados con información relevante, se pueden seleccionar marcadores de superficie celular específicos. Para ensayar la validez del experimento, se aglomeró basándose en los marcadores de superficie celular que se sabe que se expresan en el linaje mielóide: CD66b, CD11b/Mac-1, CD13 + CD14 (Figura 8 a, b). Las células que se habían diferenciado hacia el linaje monocítico tienen un perfil de expresión CD14<sup>hi</sup>, CD11b/Mac-1<sup>hi</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD66b. El gráfico espectral para estos marcadores de superficie muestra que de hecho hay una región que

muestra este patrón de expresión (Figura 4b, flecha, formulaciones).

Dibujando una caja alrededor de las formulaciones correspondientes del gráfico Tartán, se puede clicar y ver el visualizador de formulación para determinar qué factores contribuyeron al perfil de caracterización de monocitos (Figura 8c). Se determinó que cada paradigma de tratamiento que contribuyó al perfil de caracterización de monocitos contiene Vitamina D<sub>3</sub> o PMA, dos factores, coherentes con hallazgos bibliográficos, que se sabe que inducen la diferenciación de células HL-60 en monocitos. Además, la figura 8d muestra el espectro para el perfil de caracterización fenotípica. De manera no esperada, se descubrió que se pueden inducir los mismos o similares estados celulares en una diversidad de condiciones diferentes lo que indica que las células están entrando en un estado celular preferido.

Ejemplo 3

Consultando la base de datos, fue posible encontrar evidencia de dominancia de evidencia de factores. Se observó que cuando se combinaban PMA + butirato sódico (pH 7,8), se produjo un perfil fenotípico que es más similar al de PMA (Figura 9a). Sin embargo, la presencia de PMA como un factor dominante en una combinación, no siempre predice cómo se comportará ese factor en otros paradigmas de tratamiento. Por ejemplo, cuando DMSO se combina con PMA, las características del fenotipo son más similares a las de DMSO, lo que indica que para este paradigma de tratamiento, DMSO actúa como el factor dominante (Figura 9b).

Se descubrieron pruebas de interacciones no obvias en las cuales un perfil para un tratamiento de combinación dio como resultado un único perfil en comparación con sus componentes individuales. La combinación binaria de DMSO<sup>med</sup> + butirato sódico<sup>med</sup>, pH 7,8 produjo células que expresaban altos niveles del marcador de superficie celular CD 125w, mientras que ni DMSO<sup>med</sup> ni butirato sódico<sup>med</sup>, pH 7,8 solos produjeron células positivas para CD 125w. (Las anotaciones en superíndice "lo", "med" y "hi" se usan para indicar concentraciones relativas de componentes respectivos). La combinación ternaria que consistía en DMSO<sup>lo</sup>, butirato sódico<sup>hi</sup>, pH 7,8 y ácido retinoico<sup>hi</sup> produce unas características que tienen una expresión diferencial de CD 83 y CD 235 cuando se comparan tanto con los componentes individuales como los que están en las combinaciones binarias. Además, cuando DMSO, butirato sódico, pH 7,8 y ácido retinoico se combinaron en un esquema de concentración diferente, se produjo un perfil de caracterización diferente.

Ejemplo 4:

En algunos casos, la combinación de dos factores de diferenciación produjo una expresión de marcadores de superficie no esperada. Por ejemplo, algunos paradigmas de tratamiento produjeron células que mostraron alta expresión de marcadores de linfocitos (CD3, B220), marcadores HSC (CD34) y marcadores eritrocíticos (CD 235a). Para la mayoría de casos en los que se observó una expresión de marcadores de superficie alta en linajes celulares no esperados, también hubo expresión de marcadores de superficie alta de marcadores de linaje mieloides. Los tratamientos que producen este perfil de caracterización anormal contenían concentraciones diferentes de PMA y DMSO.

Las células HL-60 se indujeron para que experimentaban diferenciación durante 5 días con PMA, DMSO o PMA + DMSO. Las células diferenciadas se trataron después con Idarubicina, un antibiótico derivado de antraciclina, normalmente usado para inducir la apoptosis en células leucémicas. Los tratamientos que contenían PMA+DMSO provocaron que más células experimentaran apoptosis que PMA o DMSO solos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un estado celular que comprende:
- 5 proporcionar una serie de receptáculos conteniendo cada uno células a investigar;
- someter dichas células en receptáculos diferentes a diferentes condiciones de tratamiento generándose dichas condiciones de tratamiento diferentes con diferentes agentes y seleccionándose dichos agentes a partir de pequeñas moléculas y proteínas;
- esperar un periodo predeterminado de tiempo antes de analizar dichas células;
- 10 detectar la expresión de al menos 5 marcadores en dichas células siendo dichos marcadores receptores o ligandos y haciéndose dicha detección con la ayuda de un anticuerpo y un marcador fluorescente;
- crear un espectro que represente la expresión de marcadores de una población celular y
- 15 usar aglomeración jerárquica para representar los datos en forma de una matriz de similitud organizada para generar regiones de similitud a lo largo de una diagonal, donde el algoritmo de aglomeración jerárquica usa la distancia Euclidiana entre los espectros para obtener una medida de similitud y ordenar las medidas entre todos los espectros del experimento proporciona un gráfico Tartán y donde cada aglomerado es indicativo de un estado celular posible.

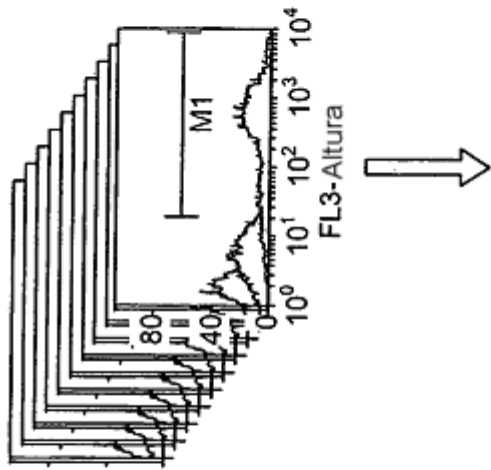


FIG. 1A

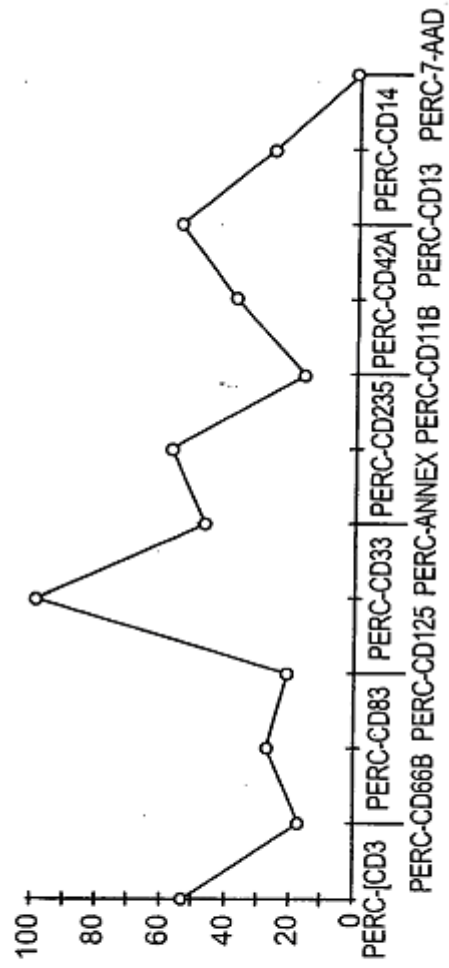
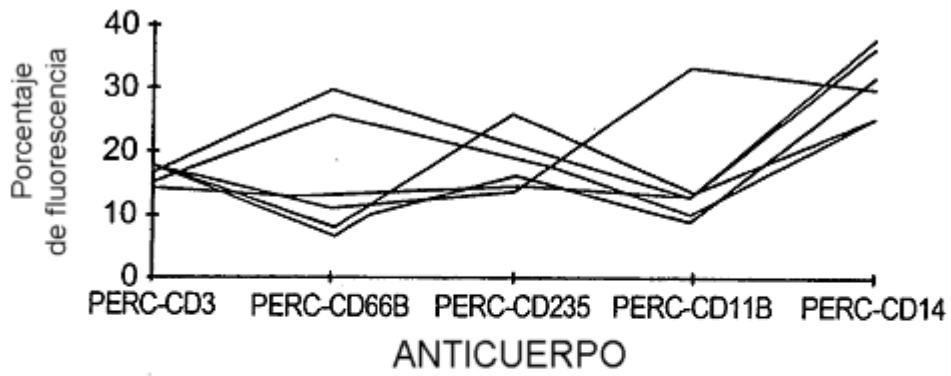
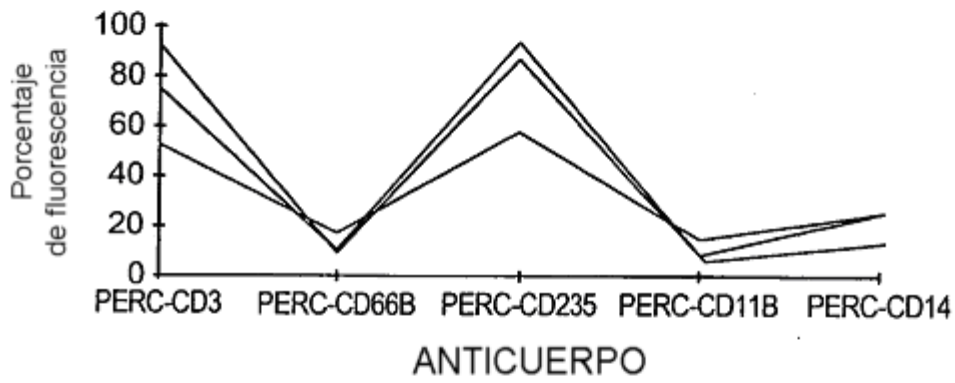


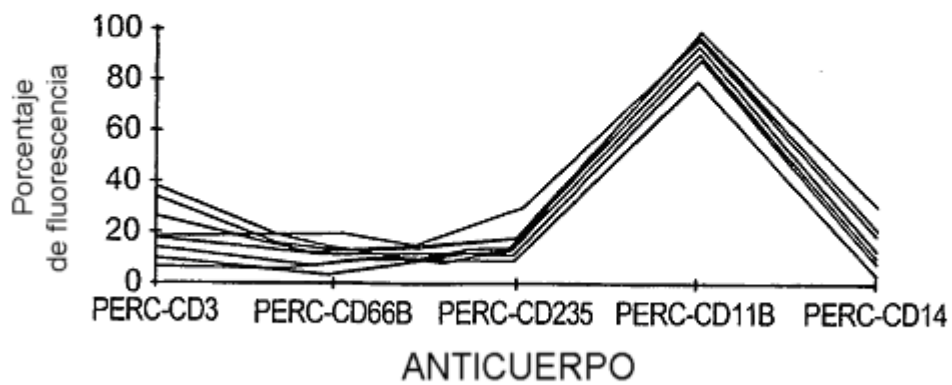
FIG. 1B



**FIG. 2A**

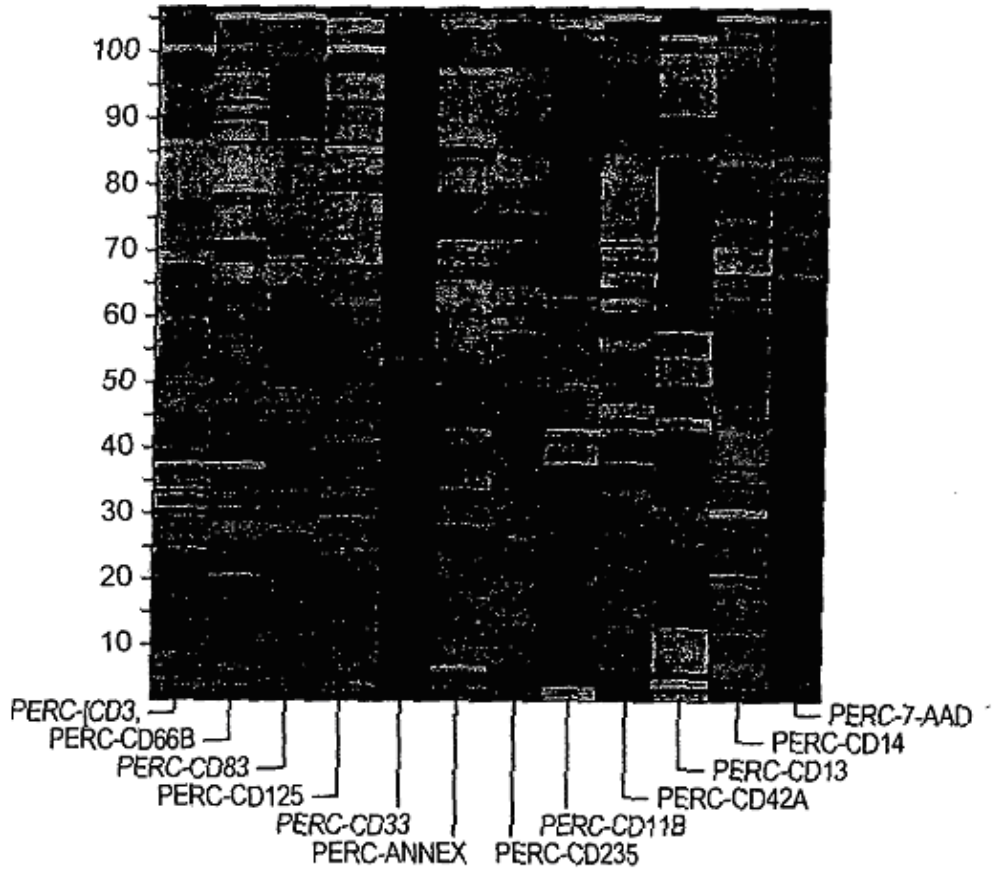


**FIG. 2B**

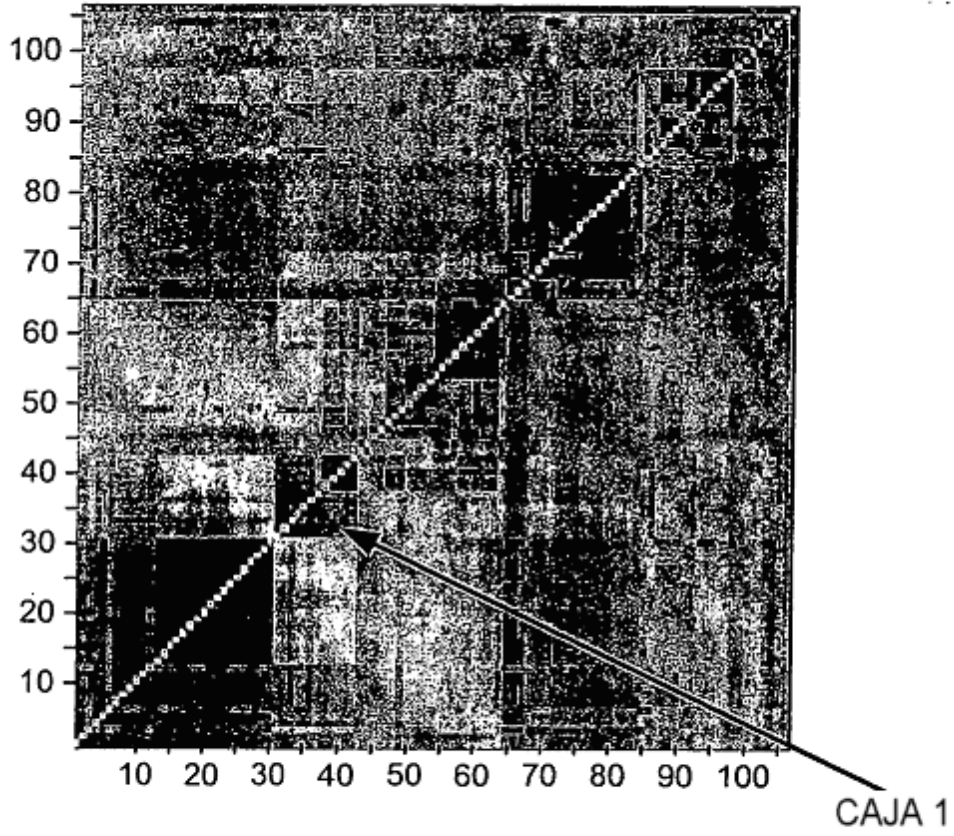


**FIG. 2C**

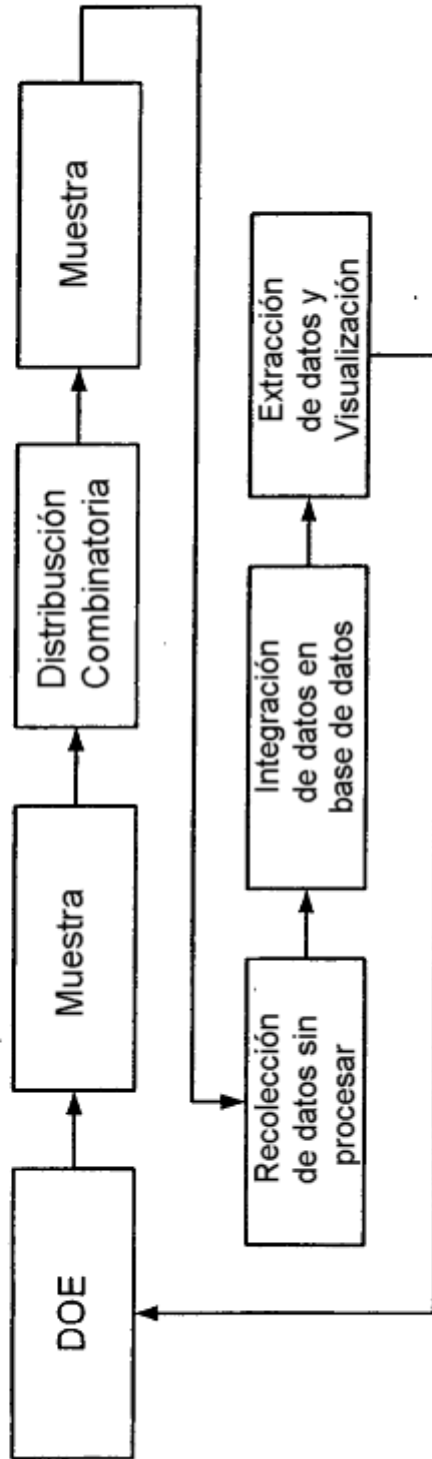




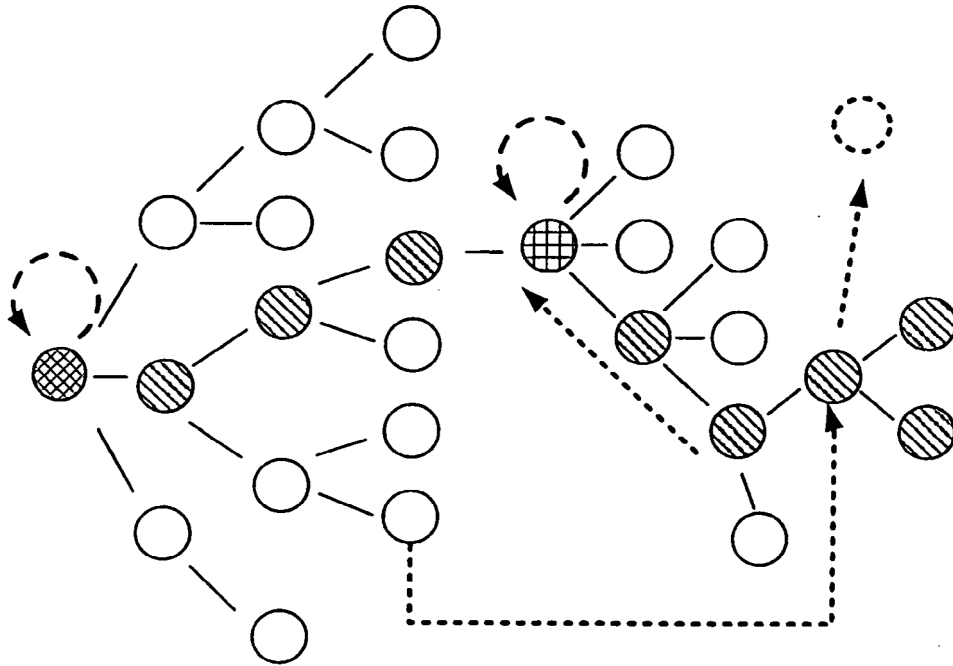
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**

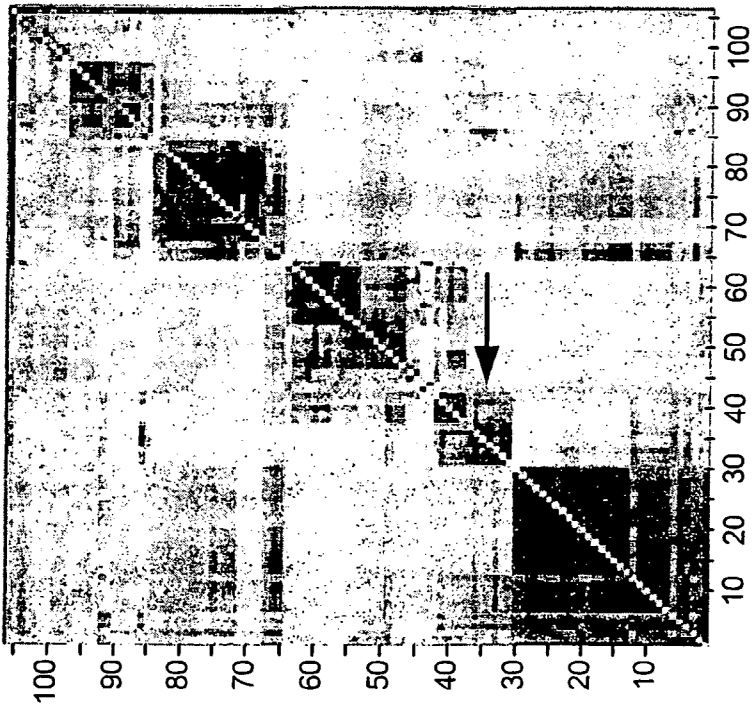


FIG. 7A

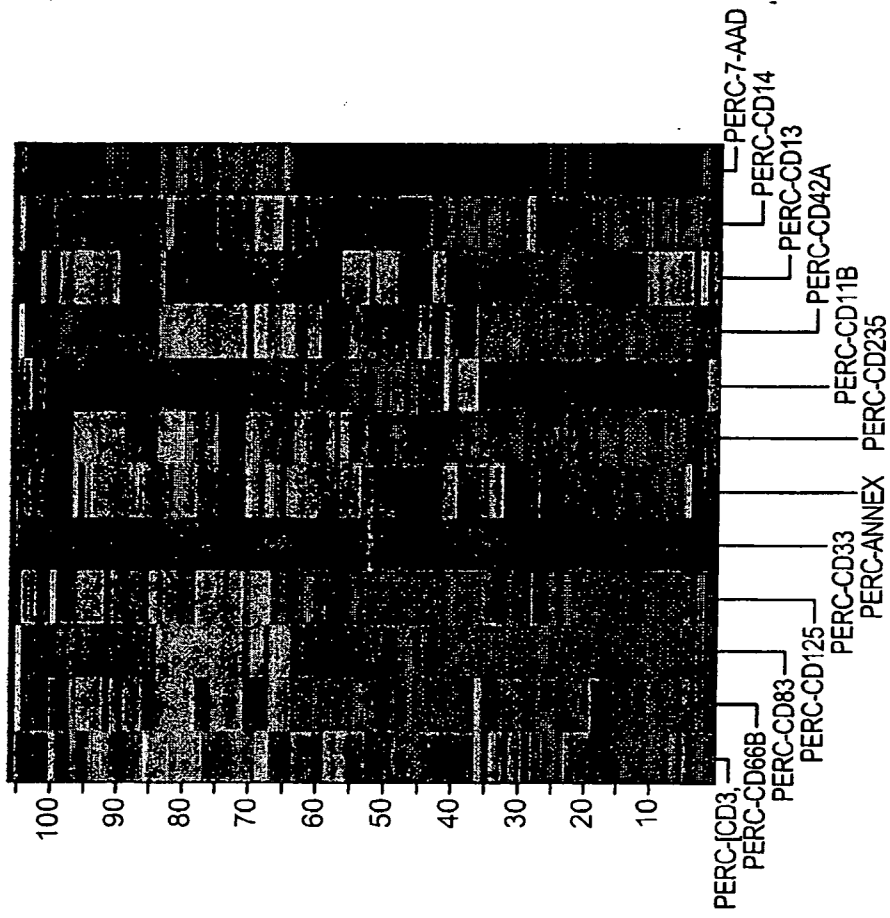
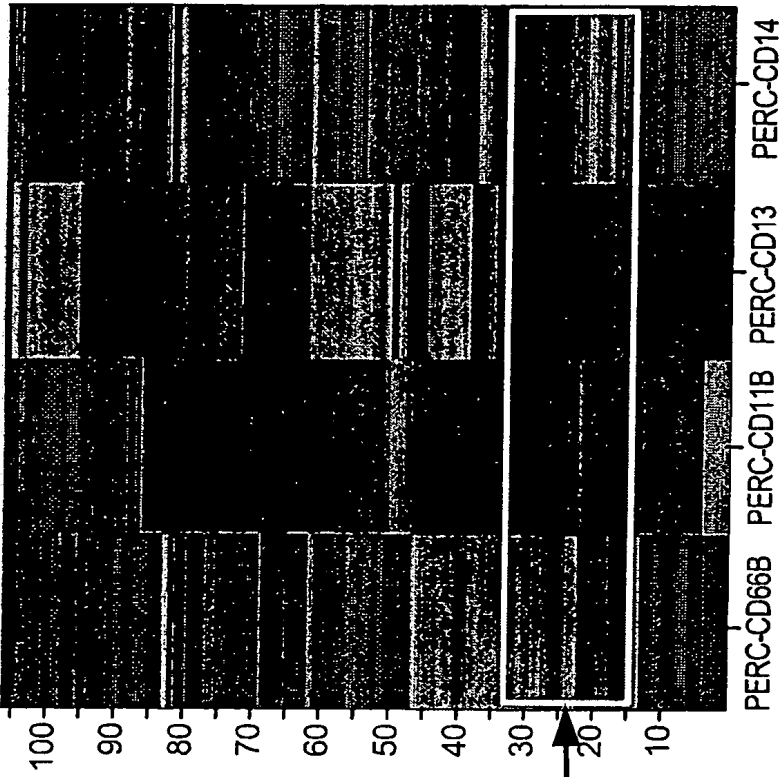
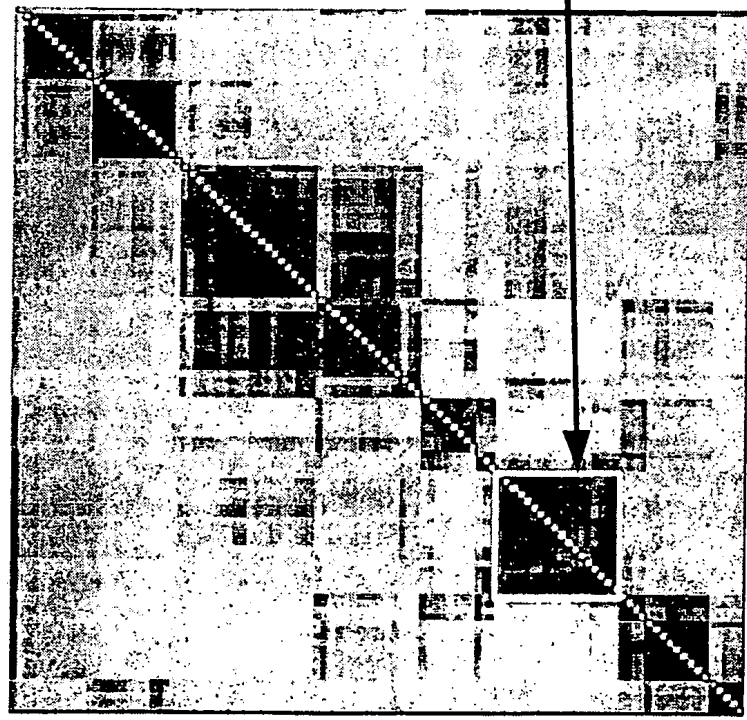


FIG. 7B



**FIG. 8B**



**FIG. 8A**

EXC_COM...	EXC_COM...	EXC_COM...	EXC_COM...
Vitamina D3	100	PMA	16
Vitamina D3	.01	PMA	16
PMA	81	Butir. sódico	100
Vitamina D3	100	PMA	81
Vitamina D3	1	PMA	16
PMA	16	Butir. sódico	100
PMA	81	Butir. sódico	300
PMA	16	Butir. sódico	300
PMA	16		
PMA	81		
DMSO	.26	Ácido retinoico	.01
Vitamina D3	1	DMSO	.13
DMSO	.26	Butir. sódico	300
DMSO	.26	Ácido retinoico	10
DMSO	.26	Ácido retinoico	10000
DMSO	.26	Butir. sódico	600
DMSO	.18	PMA	16
PMA	16	Ácido retinoico	.01
D3	.01		

FIG. 8C

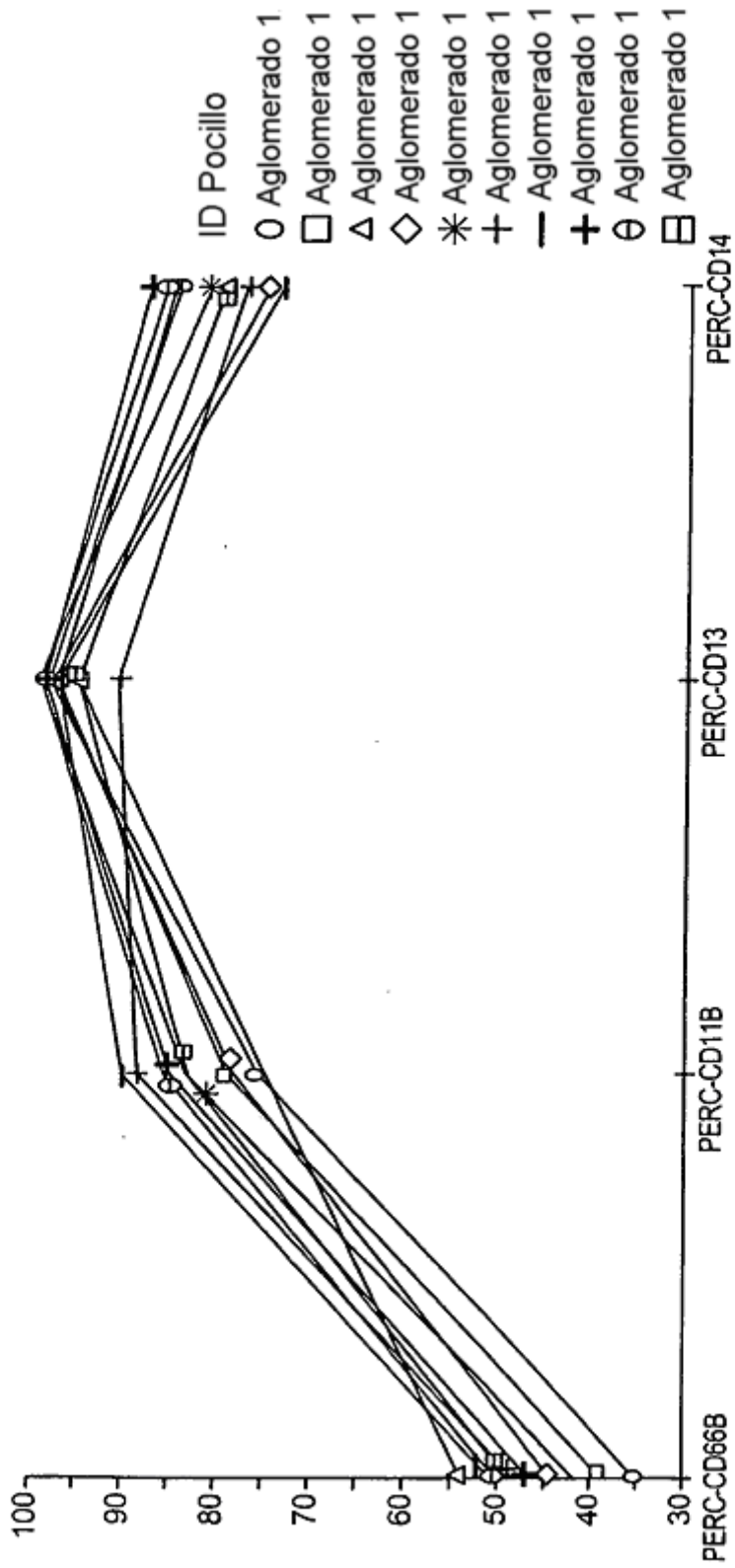
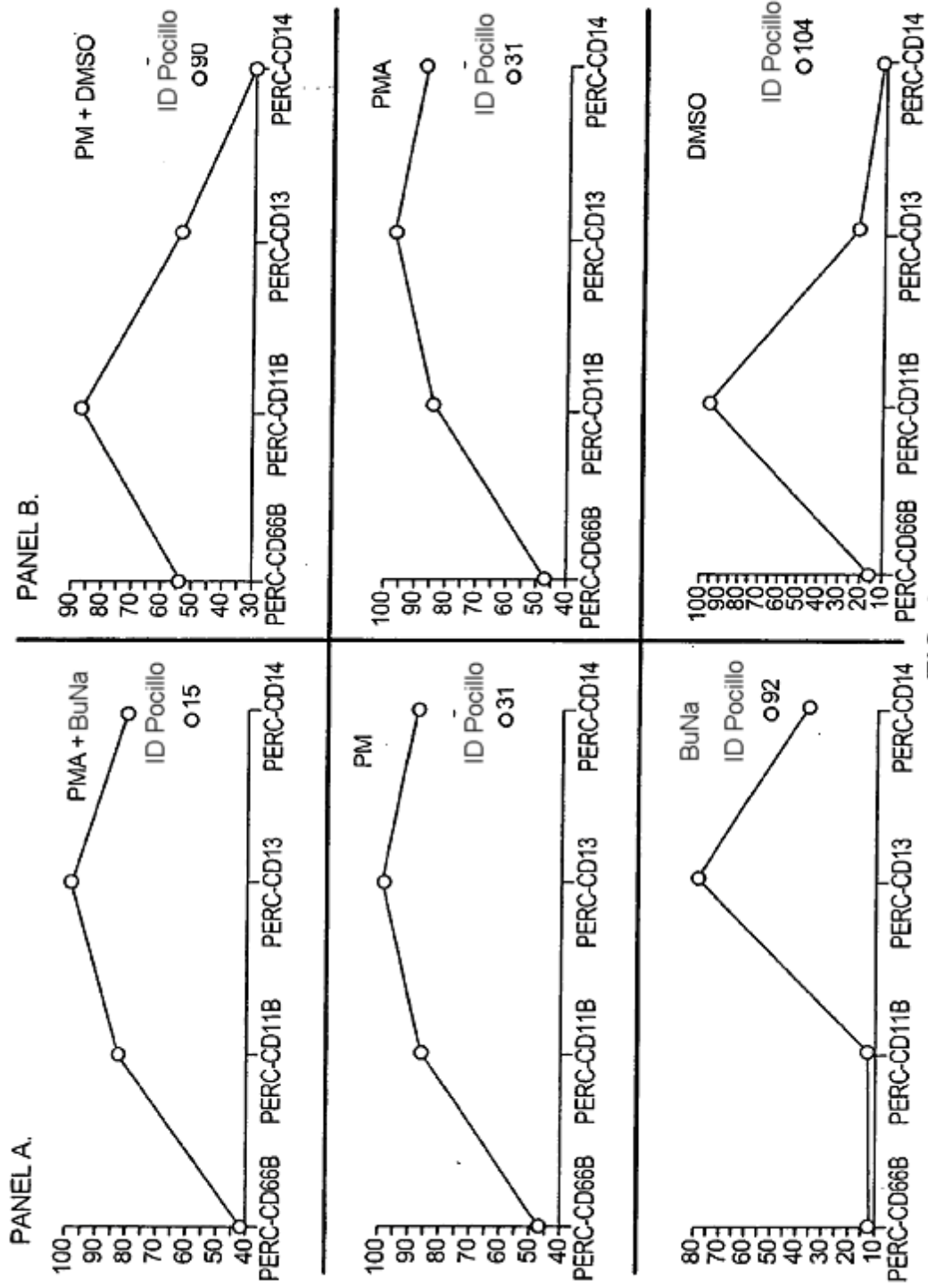


FIG. 8D





**FIG. 9**

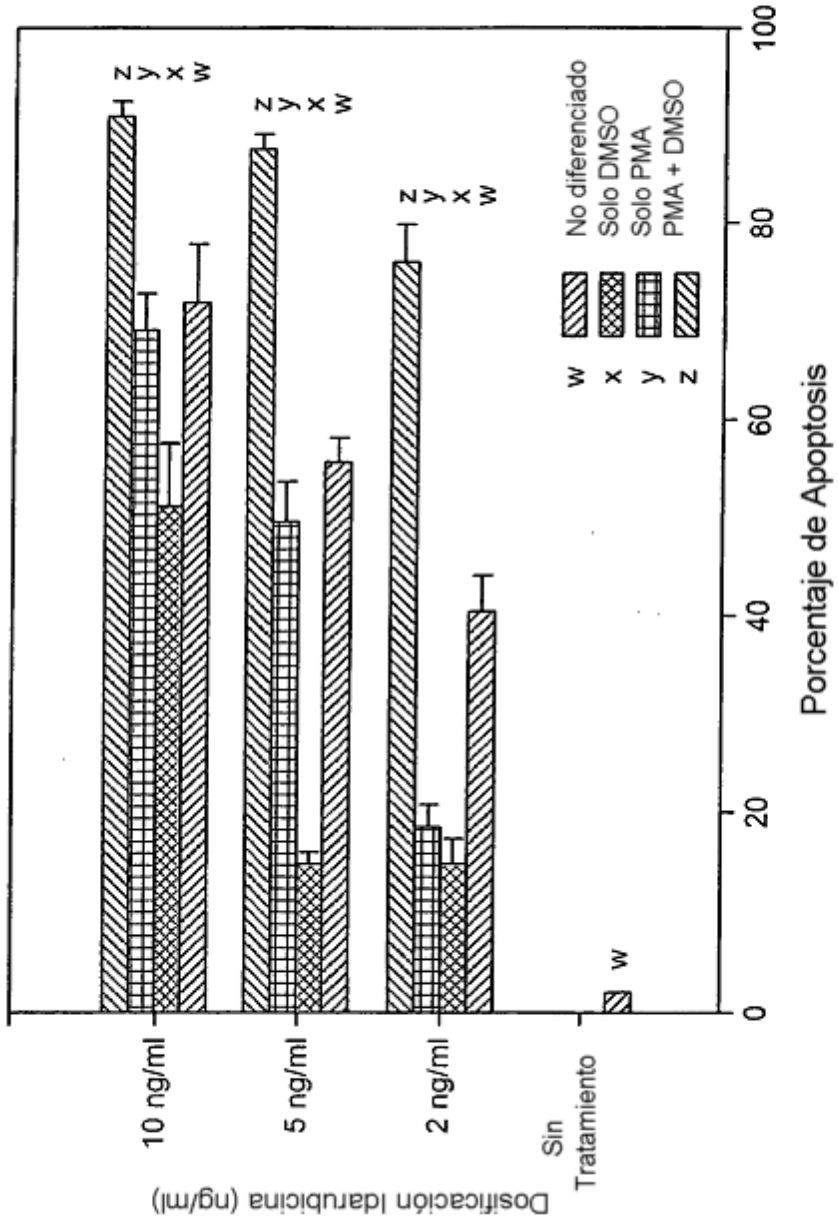


FIG. 10

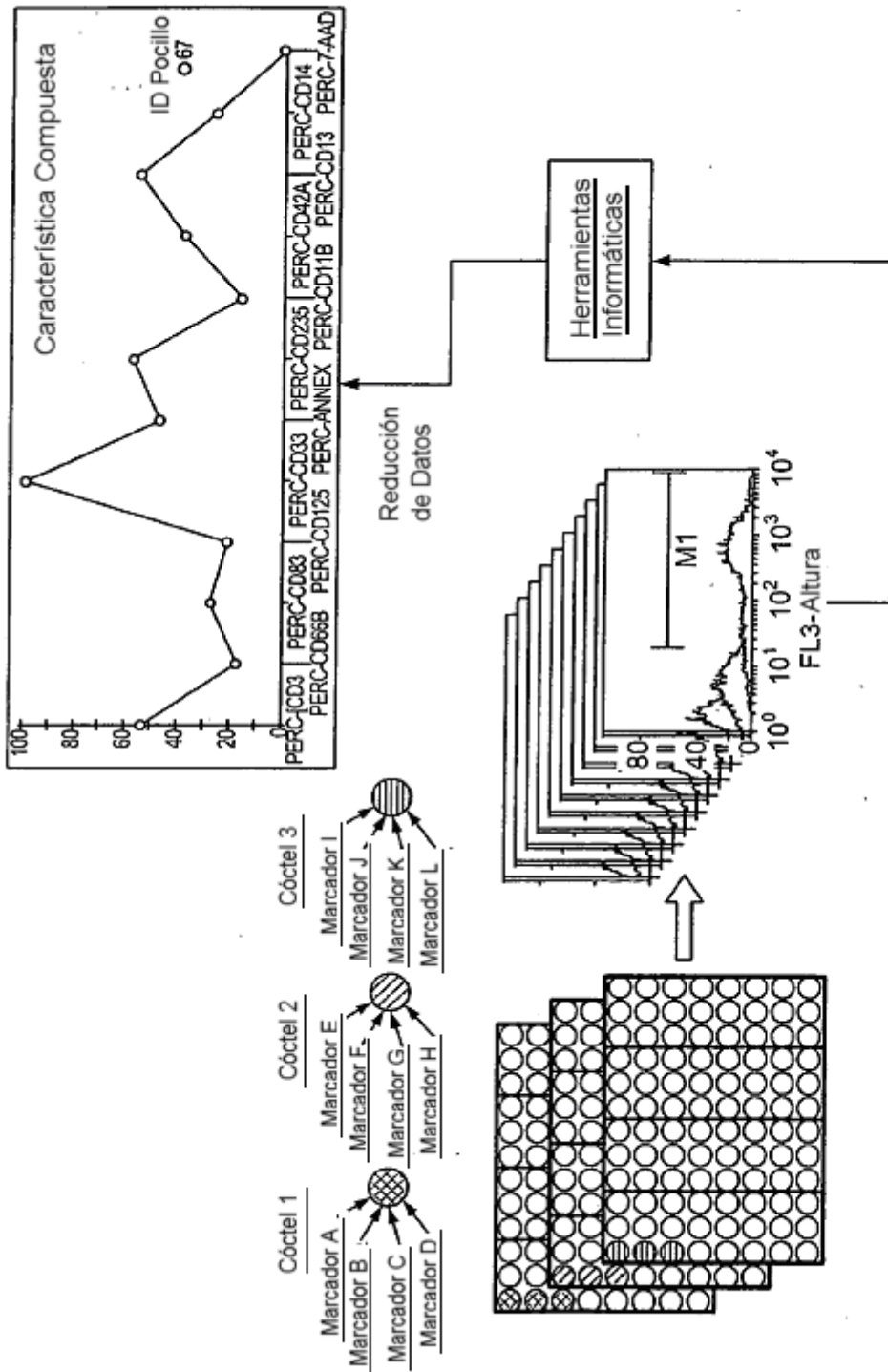


FIG. 11