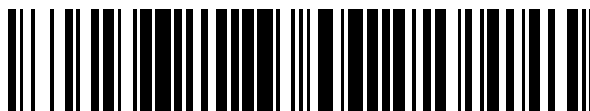


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 805**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09795717 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2369917**

54 Título: **Sistema de transporte celular**

30 Prioridad:

19.12.2008 ES 200803631

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**HISTOCELL, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia. Ed.800 - 2º planta
48160 Derio, ES**

72 Inventor/es:

**GARTZIA ARANAGA, MIREN ITXASO;
DEL OLMO BASTERRECHEA, MAITE;
CASTRO FEO, MARÍA BEGOÑA y
ACILU PÉREZ, MARTA**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 398 805 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de transporte celular .

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un sistema para el transporte celular. Dicho sistema permite el transporte de células, garantizando su integridad y viabilidad durante todo el proceso de transporte. Consiste en un sistema adecuado para una gran variedad de formatos que permite un amplio rango de aplicaciones técnicas del sistema. El sistema de la invención permite proporcionar células listas para su uso, sin tener que manipularse las células antes de usarse por expertos técnicos en biología celular. En particular, la invención hace referencia a una mezcla de agarosa más agarosa que cubre o envuelve, dependiendo del formato del sistema de transporte seleccionado, el cultivo celular, protegiéndolo durante el proceso de transporte, así como a la metodología de recuperación celular de las células transportadas en el sistema.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Existe un interés en el estado de la técnica en obtener sistemas de transporte que, manteniendo la integridad y viabilidad de las células, no requieran del manejo de metodologías complicadas, tanto durante su transporte como durante el proceso para la recuperación de las células, en su destino final.

Actualmente el transporte celular se lleva a cabo de dos formas diferentes, transportando las células en estado crioconservado o cultivado.

20 Las técnicas para el transporte de células en cultivo permiten que las células estén adheridas o en suspensión, en frascos con medio de cultivo líquido. En esta metodología, es necesario ser extremadamente cuidadoso con las condiciones de transporte, ya que pequeños movimientos sostenidos en el tiempo durante su transporte influyen de forma definitiva en la integridad y capacidad de adhesión celular y por lo tanto en la viabilidad de las células en su destino. Esto significa que la gran mayoría de los cultivos así transportados no lleguen al lugar de destino en condiciones de viabilidad aptas para utilizarse en los diversos proyectos de investigación, entendiéndose por viabilidad celular que no se produzcan alteraciones morfológicas y/o funcionales en las células.

25 Es por ello que un sistema de transporte de cultivos celulares efectivo debe asegurar que durante todo el proceso de transporte y el proceso para la recuperación de las células para su uso, la integridad de las mismas se mantenga de forma óptima (referencias 15-19), es decir, que la viabilidad de las mismas no se vea afectada durante todo el proceso.

30 El transporte en estado crioconservado implica el transporte de viales de células en estado de criocongelación, lo que significa que, para que las células se usen de nuevo, el lugar de destino debe contar con instalaciones y personal que están especializados en el cultivo celular, una laboriosa manipulación que incluye la amplificación y el mantenimiento celular, y la disposición de las células en los formatos requeridos para el desarrollo de las técnicas de testado.

Así, un aspecto a tener en cuenta en el transporte celular es la temperatura a la que se transportan las células, ya que esta temperatura afecta directamente al mantenimiento de la integridad celular, debido al hecho de que la mayoría de las líneas y tipos celulares son sensibles frente a los cambios de temperatura.

35 La crioconservación implica unas temperaturas de transporte muy bajas y constantes, difíciles de mantener durante todo el tiempo de transporte. Esto significa que el transporte debe tener lugar en unas condiciones muy específicas, es decir, los viales deben mantenerse a temperaturas inferiores a -80°C durante todo el proceso de transporte, ya que si no la viabilidad celular se vería gravemente afectada.

40 La temperatura de crecimiento óptima de los cultivos de células animales es de $36-38^{\circ}\text{C}$. Superado este intervalo de temperatura (condiciones de hipertermia) la viabilidad celular se ve afectada, dañando de manera irreversible la integridad de las células del cultivo, y provocando la muerte celular.

45 Las temperaturas por debajo del intervalo de temperatura óptima (condiciones de hipotermia) se toleran mejor por los cultivos celulares que las temperaturas altas. Así, en el caso de la aplicación de una temperatura inferior a la óptima recomendada, se produce una disminución en el metabolismo celular, es decir, las reacciones celulares (proliferación, metabolismos, crecimiento,...) se ralentizan pero la célula mantiene su integridad, y cuando se restablecen las condiciones térmicas óptimas para el crecimiento, las células recuperan su actividad celular.

50 En el estado de la técnica, la hipotermia es una metodología ampliamente usada para la ralentización del crecimiento de microorganismos y células tumorales. El sistema descrito en la presente invención se vale de dicha característica de manera que las células presentan su metabolismo ralentizado durante el transporte, ayudando al mantenimiento de su integridad.

El estado de la técnica comprende varios sistemas para el transporte de células en cultivo. En determinados documentos, los cultivos celulares se cubren con medios de cultivo al 1-20% de gelatina líquida que, tras su

solidificación, pueden transportarse sin que las células experimenten daños. Otros documentos, sin embargo, describen dispositivos específicos para el cultivo, almacenamiento y transporte de cultivos celulares.

- 5 La solicitud de patente P200301526 describe un método para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales en el que se inmovilizan las células sobre un soporte asimétrico, de tipo Transwell, que se cubre con una disolución de gelatina a una concentración del 1 al 5% que solidifica por enfriamiento, facilitando así que el sistema pueda transportarse manteniendo la integridad celular del cultivo. Ya en el laboratorio de destino se incuba la placa a 37°C durante 4 horas para que la gelatina se licue y poder retirarla del cultivo celular, estando listas las células para realizar los ensayos de migración oportunos. Este sistema, sin embargo, no permite el uso del cultivo celular para otras aplicaciones que no sean ensayos en los soportes asimétricos de tipo Transwell.
- 10 En cambio, la invención propuesta en el presente documento es adecuada para cualquier formato de cultivo celular requerido según su aplicación específica o bien en el propio sistema de transporte o bien una vez que se extrae del mismo y permite que la recuperación celular se produzca en un tiempo no superior a 3 horas, tiempo inferior al descrito por la solicitud de patente española P200301526 (4 horas).
- 15 La patente europea EP0702081 describe un método para el almacenamiento y transporte de tejidos tridimensionales. La invención descrita en este documento consiste en situar un cultivo tridimensional de piel fijado sobre dos tipos de esponja cubiertos por una disolución de gelatina del 1-20%, preferiblemente del 5-10%, de manera que cuando la disolución gelifica por enfriamiento se facilita su transporte y almacenamiento. Al igual que en la solicitud de patente española mencionada anteriormente, este documento describe el método usado para retirar la gelatina del cultivo tridimensional que consiste en aumentar la temperatura hasta un máximo de 37°C para licuarla, preservando la integridad celular del sistema. El documento, especifica que el uso de agarosa no sería adecuado para este sistema, ya que el punto de fusión de la agarosa se encuentra en torno a los 60°C, es decir, muy por encima de la temperatura que permite la viabilidad celular. El sistema descrito por este documento no permite la recuperación del cultivo celular para su empleo fuera del mismo.
- 20 La solicitud de patente internacional W02007/080600 describe un dispositivo desechable para el cultivo y/o almacenamiento y transporte de células adherentes viables. En dicho dispositivo las células se siembran sobre membranas, geles o sustratos microporosos sujetos al dispositivo sobre el que después se añadirá un medio que proveerá a las células con los nutrientes necesarios para mantener su crecimiento. El dispositivo se cierra de forma segura evitando pérdidas de líquido y la entrada de aire al compartimento en el que se cultivan las células. Una vez que el dispositivo llega a su destino, se extrae y se limpia la membrana, el gel o sustrato sobre el que las células están sembradas y puede procederse al trasplante del mismo. Sin embargo, el documento no indica en ningún caso que las células se separen de la membrana sobre las que se cultivan, de manera que tales células no pueden usarse de forma independiente. El dispositivo descrito por este documento además no permite el transporte de cultivos celulares que no sean adherentes.
- 25 Así, la presente invención presenta como medio de transporte una disolución de agarosa-agarasa que gelifica a temperatura ambiente y que puede retirarse una vez que la muestra alcanza su destino tras calentar el sistema a 37°C, como resultado de la activación a dicha temperatura de la agarasa que facilita la digestión de la agarosa. El sistema además es adecuado para cualquier formato de cultivo, incluyendo placas, cámaras de cultivo, botellas, tubos, soportes asimétricos de tipo Transwell, etc.
- 30 El sistema de transporte mencionado en la presente invención asegura que las células puedan transportarse en cultivo, tanto adheridas como en suspensión, evitando que los movimientos derivados del transporte dañen la integridad celular y por lo tanto manteniendo una viabilidad celular óptima que permita recuperar las células transportadas o llevar a cabo diferentes tipos de ensayos con las mismas.
- 35 La agarosa es un polisacárido térmicamente reversible, que consiste en copolímeros alternados de β -D-galactosa con unión (1-3) y (3-6)-anhidro- α -L-galactosa con unión (1-4), y que se usa comúnmente en la encapsulación celular. La agarosa puede fundirse o gelificarse a través de cambios en la temperatura a la que se somete.
- 40 En el estado de la técnica se conoce la encapsulación celular en agarosa para llevar a cabo una gran variedad de aplicaciones tales como por ejemplo el uso de células como biosensores, para usos terapéuticos (referencias 11, 12). Además, la biocompatibilidad de la agarosa ha quedado demostrada mediante la realización de estudios de implantación *in vivo* (referencias 1, 2, 13). Además, se ha observado que las células que se han encapsulado en hidrogeles de agarosa, presentan la capacidad de secretar su propia matriz extracelular (referencia 14) lo que refleja que las células no ven su comportamiento funcional alterado en este medio. Sin embargo, la agarosa no es un medio usado comúnmente en la formación de cultivos tridimensionales, puesto que no parece inducir la proliferación celular en este tipo de cultivo celular.
- 45 La agarasa es una enzima con un peso molecular de 32 kDA que hidroliza las uniones [1-3] entre los residuos D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa de la agarosa.
- 50
- 55

5 El estado de la técnica también describe cómo pueden recuperarse cultivos celulares encapsulados con agarosa por medio de tratamiento con una disolución de agarosa que se añade sobre el cultivo. En estos casos, el laboratorio receptor debe disponer de agarosa, preparar la mezcla a la concentración necesaria y añadirla al sistema. Además la digestión de agarosa siguiendo este método no resulta homogénea ya que la agarosa no está en contacto directo con todo el gel de agarosa, lo que aumenta el tiempo de recuperación, reduciendo finalmente la viabilidad celular.

10 Puede encontrarse un ejemplo en las referencias 1 y 2, que muestran la recuperación de cultivos celulares incluidos en una disolución de agarosa al 1,5%. Para llevar a cabo dicha recuperación, la estructura tridimensional se trata con una disolución de agarosa que se añade de forma independiente. El documento WO2001/40445 usa una disolución de agarosa al 2% para tratar una célula o poblaciones celulares y capturar las sustancias que secreten dichas células. La agarosa usada se trata previamente para incorporar en ella sitios de unión específicos para citocinas y hormonas. Para retirar la matriz de agarosa, se añade una disolución de agarosa que provoca la digestión enzimática de la agarosa.

15 En cambio, el sistema descrito en este documento implica una mezcla homogénea de agarosa-agarosa como medio de transporte, lo que evita que el laboratorio receptor tenga que disponer de agarosa, preparar la mezcla a la concentración necesaria y añadirla al sistema. Además, el sistema de la presente invención favorece una digestión homogénea en todo el cultivo celular consiguiendo una viabilidad óptima de los cultivos celulares recuperados.

Una ventaja adicional del sistema de la presente invención es el hecho de que usa porcentajes de agarosa menores, lo que significa que la cantidad de agarosa necesaria para la digestión completa de la agarosa sea menor y por lo tanto, las células no se verán afectadas por su acción enzimática, no presentando alteraciones en cuanto a la viabilidad y capacidad proliferativa.

20 A la vista del estado de la técnica es evidente la necesidad de proporcionar un sistema de transporte celular convencional para cultivos celulares, tanto adherentes como no adherentes, adecuado para cualquier formato de cultivo celular y aplicación del sistema, que garantice la integridad y viabilidad del cultivo celular durante el proceso de transporte, y es obvio que el proceso de recuperación celular no requiere de instalaciones ni de personal especializado en el área del cultivo celular. El sistema de transporte descrito en la presente invención propone un sistema de transporte celular sencillo que permite transportar células en cultivo, tanto adheridas como en suspensión, con unos criterios de calidad y viabilidad máximos, y además no requiere necesariamente una infraestructura específica para recuperar y usar el cultivo celular, si la aplicación final de las células transportadas no lo requiere.

25 Las condiciones de transporte que requiere el sistema descrito por la presente invención no son condiciones que requieran de una temperatura de transporte refrigerada, y el tiempo de transporte tampoco es un factor de riesgo ya que el sistema de transporte celular de la invención permite que las células se transporten a temperaturas no superiores a 25°C, durante un amplio intervalo de tiempo sin que la viabilidad del cultivo celular se vea afectada.

OBJETO DE LA INVENCION

35 La presente invención proporciona un sistema para el transporte celular, que permite el transporte de células garantizando su integridad y viabilidad durante el proceso y que es adaptable a una gran variedad de formatos, cubriendo un amplio rango de aplicaciones del sistema.

40 En dicho sistema, las células se cubren con o se incluyen en una mezcla homogénea de agarosa más agarosa, que una vez solidificada permite el transporte celular. El sistema se transporta en un intervalo de temperatura no superior a 25°C, preferiblemente de entre 18 y 23°C, más preferiblemente a 22°C, de manera que la agarosa permanece inactiva. La recuperación celular se lleva a cabo de manera sencilla mediante incubación del sistema a 37°C, lo que implica la activación de la agarosa, que digiere la agarosa facilitando su licuación, lo que permite la retirada de la misma del soporte de cultivo antes de su uso.

Los cultivos celulares recuperados mantienen su integridad y viabilidad, certificando la efectividad del sistema de transporte, es decir, el sistema de transporte descrito en la presente invención mejora sustancialmente la viabilidad del cultivo celular en las condiciones de transporte.

45 Así, este sistema permite proporcionar células listas para su uso, cuyo proceso de recuperación celular requiere manipulación y conocimientos mínimos en técnicas de biología celular.

En la presente invención,

Transporte celular se refiere al hecho de transportar cultivos celulares.

50 El criterio de calidad significa que al menos el 85%, preferiblemente el 100% de las células transportadas por el sistema de la invención no se hayan visto afectadas en cuanto a su viabilidad e integridad celular.

Viabilidad e integridad celular se refiere al mantenimiento de las propiedades celulares morfológicas y funcionales tales como la capacidad de adhesión celular, y de parámetros celulares básicos tales como la proliferación y la actividad metabólica.

Consistencia del medio de transporte se refiere a aquella consistencia semi-sólida, una vez que la mezcla agarosa-agarasa se ha gelificado, que evita que los movimientos sostenidos que se producen durante el transporte del mismo afecten finalmente en la viabilidad e integridad celular y se garanticen los criterios de calidad definidos para el sistema de la invención así como una fácil recuperación del cultivo celular.

- 5 Medio de transporte se refiere a la mezcla de agarosa-agarasa usada para transportar células en cultivo, en la que el porcentaje de agarosa usada es del 0,2-0,6%, preferiblemente del 0,5%, y la concentración de agarasa es de 60-90, preferiblemente 80 unidades por ml de agarosa al 1%.

- 10 Células en cultivo se refiere a la población de células en condiciones de cultivo celular, aplicable tanto a células en suspensión como a aquellas células que crecen adheridas, formando una monocapa sobre superficies que opcionalmente pueden haberse tratado de antemano con componentes de la matriz extracelular que aumentan la adhesión celular (laminina, colágeno, poli-L-lisina, etc.) de determinados tipos celulares semi-adherentes.

- 15 Cultivo celular se refiere a cualquier tipo de cultivo celular monocapa en sistemas tridimensionales (3D) o en suspensión, que incluye células modificadas o no modificadas genéticamente, de cualquier origen, preferiblemente células animales tales como: humanas, murinas (de ratones, ratas, hámsteres), caninas, bovinas, ovinas, etc. Dichos cultivos celulares incluyen células nerviosas, células del sistema nervioso central, células del sistema nervioso periférico, células del sistema dermo-epitelial, células del sistema osteoarticular, células progenitoras pluripotenciales embrionarias, células progenitoras pluripotenciales adultas, células progenitoras multipotenciales embrionarias, células progenitoras multipotenciales adultas, células del sistema hematopoyético, células del sistema inmunitario y/o células del sistema muscular. Preferiblemente, las células se seleccionan de:

- 20 - líneas celulares establecidas y cultivos primarios no patológicos de origen animal, incluido el ser humano, tales como por ejemplo: neuronas, células de la glía, células no gliales, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, células glandulares, células corneales, células retinianas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células epiteliales, plaquetas, timocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, miocitos, hepatocitos, células renales, células uretrales, cardiomiocitos, mioblastos y/o células germinales.

- 25 - líneas celulares establecidas y los cultivos primarios patológicos humanos tales como: leucemia mieloide aguda (THP-1), cáncer de mama (T47D, MCF-7, MDA-MB-438), cáncer de próstata (DUI45, Lncap, PC3), cáncer de colon (Hs 675.T), glioma (U87), cáncer óseo (Saos-2), melanoma de tumor primario (A375), melanoma metastásico (HS294), adenocarcinoma (HeLa, TAC-1), carcinoma de riñón (Hs I95.T), carcinoma (C-41), condrosarcoma (Hs 819.T), fibrosarcoma (HT-1080), glioblastoma (A172, U-138 MG, LN-18), leucemia (SUP-815), linfoma (1A2), neuroblastoma (CHP-212, IMR-32, SHSYSY, SK-N-MC), osteosarcoma (MG-63), rabiomiosarcoma (TE 441.T), etc.

- 30 - líneas celulares primarias/establecidas patológicas no humanas: melanoma metastásico (B16F10), melanoma de tumor primario (C32TG), mieloma, cáncer de tejido conjuntivo (MM37T), cáncer de mama (MM2MT), cáncer de próstata (R3327-G), carcinoma (CT26.WT), fibrosarcoma (MM47T), glioma (F98), leucemia (BB88), linfoma (WEHI-231), neuroblastoma (NB41A3), osteosarcoma (UMR-106), etc.

Restablecimiento celular se refiere a la recuperación de la actividad celular de aquellos cultivos celulares cuyo metabolismo se encontraba disminuido.

- 40 Un objeto de la presente invención se refiere a un sistema de transporte celular caracterizado porque comprende un soporte celular, células y una mezcla de agarosa y agarasa, que garantiza la integridad y viabilidad celular durante el proceso de transporte. En dicho sistema, las células transportadas pertenecen a cualquier tipo celular, seleccionándose del grupo de células adherentes, células semi-adherentes y células no adherentes.

- 45 Dichas células son preferiblemente células de origen animal seleccionadas del grupo de células humanas, murinas, caninas, bovinas y/u ovinas. En cuanto al tipo celular, las células del sistema de transporte de la presente invención se seleccionan del grupo de células del sistema nervioso central, células del sistema nervioso periférico, células del sistema dermo-epitelial, células del sistema osteoarticular, células progenitoras pluripotenciales embrionarias, células progenitoras pluripotenciales adultas, células progenitoras multipotenciales embrionarias, células progenitoras multipotenciales adultas, células del sistema hematopoyético, células del sistema inmunitario y/o células del sistema muscular. Preferiblemente las células se seleccionan del grupo de neuronas, células de la glía, células no gliales, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, células glandulares, células corneales, células retinianas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células epiteliales, plaquetas, timocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, miocitos, hepatocitos, células renales, células uretrales y/o células germinales. También están incluidas líneas celulares establecidas derivadas de tipos celulares primarios, líneas celulares de cáncer estables y líneas celulares convencionales del tipo Caco2, MDCK, Jurkats, etc.

- 55 En una realización particular, las células son neuronas.

En otra realización particular, las células que constituyen este primer objeto de la invención están genéticamente modificadas.

En otra realización particular, las células que constituyen este primer objeto de la invención son neuronas genéticamente modificadas.

- 5 En el sistema que constituye este primer objeto de la invención, las células pueden transportarse tanto cultivadas en forma de una monocapa sobre la que se añade la mezcla de agarosa y agarasa como en suspensión, incluidas en la mezcla de agarosa y agarasa.

10 El soporte celular puede presentar cualquier formato de cultivo celular, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende placas, frascos, cámaras de cultivo, tubos, botellas y/o soportes asimétricos de tipo Transwell. En una realización particular, la superficie del soporte incluye componentes de la matriz extracelular que aumentan la capacidad de adherencia de las células al soporte.

La concentración de agarasa es de entre 60 y 90 unidades por mililitro de agarosa al 1%, preferiblemente 80 unidades por mililitro de agarosa al 1%.

- 15 La agarosa usada es agarosa de bajo punto de fusión, siendo preferiblemente su punto de fusión próximo a 42°C. En dicho sistema de transporte, la concentración de agarosa final usada es del 0,2 al 0,6%, preferiblemente del 0,5%.

20 En una realización particular, el sistema de transporte que constituye este primer objeto de la invención comprende una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 0,2 al 0,6% y agarasa a una concentración de 80 unidades por mililitro de agarosa al 1%. En una realización preferida, esta mezcla de agarosa y agarasa permanece en estado semi-sólido a temperaturas no superiores a 25°C. En otra realización preferida, dicha mezcla permanece en estado líquido cuando se digiere la agarosa por la agarasa. La mezcla de agarosa y agarasa se retira del soporte celular dejando el cultivo celular listo para usarse en diferentes aplicaciones.

El sistema de transporte celular que constituye este primer objeto de la invención permite la extracción de las células del sistema de transporte por medio de técnicas de cultivo celular básicas.

- 25 Asimismo, el sistema de transporte de este primer objeto de la invención garantiza la viabilidad e integridad celular de al menos el 85% de las células cultivadas.

Un segundo objeto de la invención se refiere a un método para el transporte de células que implica el uso del sistema de transporte mencionado anteriormente, comprendiendo el método la preparación del sistema de transporte, que constituye el primer objeto de la invención, el transporte y la recuperación de las células.

En dicho método, la etapa de preparación del sistema de transporte celular comprende las etapas de:

- 30
- a. sembrar el cultivo celular,
 - b. preparar la mezcla de agarosa-agarasa,
 - c. añadir la mezcla de la etapa b al cultivo celular,
 - d. solidificar la mezcla de agarosa-agarasa,
 - e. sellar el sistema de transporte.

- 35 En este segundo objeto de la invención, la preparación de la mezcla de agarosa y agarasa usada en la etapa b anterior comprende a su vez, las etapas de:

- 40
- i. mezclar la disolución de agarosa en el medio de cultivo específico para el tipo del cultivo celular que va a transportarse a la concentración establecida, según se ha descrito en el primer objeto de la invención,
 - ii. añadir la agarasa a la concentración establecida en el primer objeto de la invención, a la disolución de agarosa de la etapa i,
 - iii. homogenizar la mezcla

45 En una realización, la etapa de adición de la mezcla de la etapa b al cultivo celular implica el recubrimiento de las células cultivadas en monocapa con la mezcla de agarosa-agarasa, y en otra realización implica la mezcla homogénea de las células en suspensión con la mezcla de agarosa-agarasa.

La etapa de solidificación de la mezcla de agarosa y agarasa se lleva a cabo, en una realización particular, a una temperatura inferior a 37°C en un periodo de 15-30 minutos.

En este método que constituye el segundo objeto de la invención, el transporte se lleva a cabo en una realización particular a temperaturas no superiores a 25°C, siendo el tiempo de transporte no superior a 60 horas preferiblemente en un intervalo de temperatura de entre 18 y 23°C, más preferiblemente a 22°C, durante un tiempo no superior a 72 horas. La viabilidad de las células es de al menos el 85%.

5 En este método que constituye el segundo objeto de la invención la recuperación de las células, comprende a su vez las etapas de:

- f. digerir la mezcla agarosa, agarasa,
- g. retirar el medio de transporte y sustituirlo por medio de cultivo,
- h. restablecer el cultivo celular.

10 Específicamente, la digestión de la mezcla de agarosa-agarasa comprende: incubar el sistema de transporte a 37°C durante un periodo de tiempo de entre 1,5-2 horas, añadir medio de cultivo atemperado e incubar el sistema durante una hora adicional a 37°C. En una realización particular cuando las células están en suspensión, la digestión de la mezcla de agarosa y agarasa comprende una etapa adicional que implica una centrifugación del sistema a 800-1000 g.

En una realización, la etapa h) implica la incubación de las células a 37°C y el 5% de CO₂.

15 En una realización particular de este segundo objeto de la invención, antes de su uso, las células se extraen del propio soporte que las transportaba, en otra realización particular, las células permanecen en el propio soporte que las transportaba.

Otro objeto de la invención se refiere al uso del sistema de transporte que constituye el primer objeto de la invención para el transporte de células.

20 Otro objeto de la invención se refiere al uso del sistema de transporte que constituye el primer objeto de la invención para llevar a cabo ensayos de biología celular y/o molecular. En una realización particular, dichos ensayos se seleccionan del grupo que comprende las pruebas de fármacos, biomateriales y nanopartículas, ensayos funcionales, estudios morfológicos, estudios para caracterizar la expresión génica, estudios para caracterizar la expresión de proteínas.

25 Otro objeto de la invención en la presente solicitud es la incorporación del sistema de transporte en una caja de transporte y el conjunto sistema de transporte-caja de transporte derivado de dicha incorporación.

El soporte o la caja de transporte consistirá en cualquier estructura que pueda mantener durante al menos 75 horas el sistema celular transportado a una temperatura constante de 22°C, y que proporciona además al sistema la protección necesaria frente a movimientos mecánicos y oscilaciones que se producen durante el periodo de transporte.

30 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: concentración de agarosa en la mezcla de transporte final.

La figura 1 muestra el intervalo de concentración de agarosa determinado para el transporte basándose en la consistencia final de la mezcla y al grado de dificultad de recuperación celular a partir de la mezcla preparada. La línea continua representa la firmeza de la mezcla de transporte; cuanto mayor sea la concentración de agarosa de la mezcla de transporte, mayor será también la firmeza que la mezcla aporte al sistema y por lo tanto, el transporte se efectúa en condiciones más fiables. La línea discontinua representa el grado de dificultad para llevar a cabo la recuperación celular; cuanto mayor es el porcentaje/concentración de agarosa, más difícil resulta la recuperación celular debido a la elevada rigidez del sistema. Por lo tanto, es necesario establecer un intervalo de concentración final de agarosa que garantice el transporte de forma fiable y que al mismo tiempo facilite la recuperación del cultivo tras el transporte. Basándose en los ensayos realizados con las diferentes concentraciones (%) de agarosa se ha establecido que el intervalo de concentración óptima de agarosa para el transporte es del 0,2-0,6%, indicado en la figura con el recuadro sombreado.

Figura 2: determinación de la concentración final de agarosa en el sistema mediante análisis de la morfología celular del cultivo tras su exposición a la mezcla de agarosa y agarasa

Las imágenes de la figura 2 muestran la morfología celular del cultivo de las células SK-N-MC tras su exposición al medio de transporte (mezcla de agarosa-agarasa) empleando diferentes concentraciones de esta última, con el fin de determinar el efecto de cada una de las concentraciones sometidas a ensayo sobre la morfología celular. Las células que aparecen en las imágenes se han expuesto durante el tiempo de transporte estimado (24 horas) con la mezcla de agarosa al 0,3% y medio específico para este tipo celular, y con las concentraciones de agarosa indicadas en cada caso. Tras la incubación con el medio de transporte, la recuperación celular se ha llevado a cabo según el procedimiento descrito en el presente documento y tras 24 horas en cultivo (37°C, 5% de CO₂), se ha analizado la integridad y morfología del cultivo por medio de microscopía.

Las imágenes muestran de forma evidente que ninguna de las concentraciones de la mezcla de agarosa y agarasa usadas en el ensayo afecta a la integridad y morfología celular en comparación con el cultivo que no ha estado en contacto con la mezcla (control). La combinación de agarosa y agarasa en el medio de transporte asegura la recuperación óptima de las células.

5

Figura 3: determinación del tiempo de transporte

La figura 3 muestra la viabilidad celular del cultivo de las células SK-N-MC cuando se expone a la mezcla de agarosa y agarasa a lo largo del tiempo. Durante las primeras 48 horas en contacto con la mezcla y en las condiciones determinadas para el transporte, la viabilidad del cultivo no se ve afectada; sin embargo, a partir de las 48 horas la viabilidad celular comienza a decrecer y tras 72 horas en las condiciones descritas la viabilidad celular mostrada es del 60%. Tras 96 horas en cultivo, la viabilidad celular aparece se ve bastante afectada, con un porcentaje de supervivencia próximo al 30%.

10

Figura 4: determinación de la temperatura óptima de transporte.

La figura 4 muestra de forma gráfica la determinación de la temperatura de transporte óptima basándose en los criterios descritos: viabilidad celular, consistencia del medio de transporte y actividad de la enzima agarasa. La línea continua representa la viabilidad celular con respecto a la temperatura de cultivo; la temperatura óptima para el mantenimiento de células humanas en cultivo es de 36-38°C; sin embargo, la viabilidad celular no se ve afectada de forma drástica dentro del intervalo de 20-40°C. La línea discontinua representa la integridad o solidez de la mezcla de agarosa con agarasa y medio; a partir de 25°C el medio de transporte gelificado pierde consistencia y no garantiza un transporte celular fiable; por lo tanto basándose en la consistencia del medio de transporte, la temperatura no debe alcanzar los 25°C. La línea vertical representa la temperatura de acción óptima de la enzima agarasa, y la zona sombreada observada a ambos lados de esta línea corresponde al intervalo de temperatura en el que la enzima es aún activa. Por lo tanto, la temperatura de transporte óptima será la temperatura en la que la viabilidad celular sea lo más próxima posible al 100%, teniendo en cuenta que la mezcla de agarosa-agarasa mantiene una consistencia firme y además, la enzima agarasa no es activa. Esta temperatura es de 18-23°C, tal como muestra mediante la zona rallada definida en la figura.

15

20

25

Figura 5: representación gráfica del diseño del sistema de transporte celular.

La figura 5a se refiere al modelo de transporte en placa/frasco para células adherentes. En este caso, las células se cultivan en placa o frascos adecuados para la aplicación final del cultivo y una vez que las células se han adherido correctamente y muestran una morfología normal, se retira el medio de cultivo y se aplica sobre ellas la mezcla de agarosa más agarasa, que actuará como medio protector de las células durante el periodo de transporte.

30

En la figura 5b se muestra el esquema del modelo en placa/frasco para células en suspensión y células adherentes cuyo transporte se lleva a cabo con las incluidas en la mezcla de agarosa y agarasa.

Por último, la figura 5c muestra el modelo de transporte en tubo, en el que es posible transportar cualquier tipo celular, adherente o no, ya que las células, tal como se muestra en la figura 5b, se encuentran incluidas en la mezcla de agarosa más agarasa.

35

La elección de cada uno de los modelos dependerá de las características del tipo celular objeto de transporte y de la aplicación final del producto, es decir, del tipo de análisis que ha de realizarse con las células.

Figura 6: estudio de toxicidad de las células sometidas a la mezcla de agarosa y agarasa

Las gráficas muestran las curvas de citotoxicidad de las células AMSC (células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo), células CHO, células MDCK-II, células MDCK-II-MDR1, fibroblastos, queratinocitos y células de neuroblastoma SK-N-MC tras el contacto con la mezcla de agarosa más agarasa.

40

Los grupos incluidos en el ensayo son los siguientes: cultivo: células mantenidas en condiciones de cultivo convencionales; 37°C, 5% de CO₂ y medio de cultivo normal; control: células sometidas a las condiciones de transporte, es decir, 20-22°C, fuera del incubador pero con medio de cultivo normal; y mezcla de agarosa más agarasa: células sometidas a las condiciones de transporte, es decir, 20-22°C, fuera del incubador pero en el sistema de la invención.

45

Tal como se puede observar en las gráficas, las células sometidas al sistema de transporte no presentaron diferencias en cuanto a la capacidad proliferativa con respecto al control y al cultivo, lo que indica que las células no han experimentado efectos citotóxicos durante el tiempo que se han mantenido en el sistema de la invención.

Figura 7: estudio de la morfología celular tras la exposición a la cobertura o envoltura de agarosa más agarasa

Estas figuras muestran las fotografías de las células AMSC (células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo), células CHO, células MDCK-II, células MDCK-II-MDR1, fibroblastos, queratinocitos y células de neuroblastoma SK-N-MC tras la exposición a la mezcla de agarosa más agarosa.

La figura 7a muestra la morfología de las células antes de que se les aplicara la mezcla de agarosa más agarosa.

- 5 En la figura 7b se muestran imágenes de las células que tienen la cobertura de agarosa más agarosa sobre el cultivo en monocapa, y se comparan con las que sólo contienen el medio de cultivo.

- 10 Por último, en la figura 7c, es posible comparar la morfología de las células que están creciendo en condiciones de cultivo normal (cultivo), las células control (que se han sometido a las condiciones de transporte a 20-22°C, fuera del incubador pero cultivadas en medio de cultivo normal) y las células que se han tratado con la cobertura de agarosa más agarosa en las condiciones del transporte (20-22°C, fuera del incubador), 24 horas después.

Tal como se muestra en las figuras, la morfología celular de los diferentes tipos celulares no se ve afectada por la cobertura o envuelta de la mezcla de agarosa más agarosa. La morfología de las células expuestas a la mezcla del sistema de transporte no varía durante la exposición a la mezcla, ni siquiera tras la retirada de la misma.

Figura 8: aumento de la adhesión celular con laminina

- 15 La figura 8 muestra el efecto del empleo de soportes tratados con laminina sobre la proliferación y morfología de las células SK-N-MC. La figura 8a corresponde al análisis de la capacidad proliferativa de las células SK-N-MC cultivadas en placas de 24 pocillos convencionales (control) y placas de 24 pocillos tratadas con laminina (laminina). Tras 24 horas en cultivo, la tasa de proliferación de las células hechas crecer en las placas con laminina es superior a la mostrada por las células control. Tras 48 horas en cultivo, las tasas de proliferación se igualan, probablemente debido a la elevada confluencia del cultivo en el que la proliferación ha alcanzado su nivel máximo. Este aumento en la proliferación celular en el cultivo con laminina se debe a un mayor número de células adheridas al soporte, aumentando así el número de células que proliferan. En la figura 8b, se muestra claramente el efecto positivo de la laminina sobre la adherencia celular; en las placas tratadas con laminina se observa un número mayor de células a pesar de que el número de células sembradas inicialmente ha sido idéntico para las placas control y las placas tratadas con la laminina.

25 **Figura 9: Estudio de la capacidad proliferativa del sistema de transporte en el soporte con laminina**

La presente figura muestra la capacidad proliferativa de las células SK-N-MC tras el cultivo de éstas en placas de cultivo convencionales y placas tratadas con laminina. No se observan diferencias en la proliferación en ninguno de los tres grupos sometidos a ensayo, es decir, no se observan diferencias en las células cultivadas en el sistema de transporte con o sin laminina ni con respecto al control.

- 30 Los grupos sometidos a ensayo son los siguientes: grupo control: células cultivadas en condiciones de cultivo convencionales 37°C, 5% de CO₂ en medio normal; grupo de placa de A+A convencional: células sometidas a las condiciones de transporte (20-22°C, fuera del incubador) con la mezcla de agarosa más agarosa, pero sin laminina; grupo de placa de laminina A+A: células sometidas a las condiciones de transporte (20-22°C, fuera del incubador) con la mezcla de agarosa más agarosa con laminina.

35 **Figura 10: aumento de la adhesión celular con poli-L-lisina en el sistema de transporte**

Las gráficas de la figura 10 muestran las curvas de citotoxicidad de las células SK-N-MC tras el contacto con la superficie tratada con poli-L-lisina a diferentes concentraciones.

La figura 10a muestra el intervalo de concentración de poli-L-lisina superior (100-200 µg/ml) sometido a ensayo. En cambio, la figura 10b muestra las concentraciones de poli-L-lisina inferiores (10-75 µg/ml) sometidas a ensayo.

- 40 Tal como puede observarse en la gráfica en la figura 10A, las concentraciones crecientes de poli-L-lisina muestran una reducción en la capacidad proliferativa de las células SK-N-MC. La figura 10b muestra que los cultivos expuestos a las concentraciones de poli-L-lisina inferiores muestran una cinética de proliferación que permanece prácticamente inalterada con respecto a la observada en las células no expuestas a poli-L-lisina.

- 45 A partir de estos resultados, se concluye que a pesar de que ninguna de las concentraciones afecta drásticamente a la integridad o capacidad proliferativa del cultivo, a partir de la concentración de poli-L-lisina de 75 µg/ml, la proliferación celular parece reducirse a las 72 horas. Por lo tanto, el intervalo de concentración de poli-L-lisina en el sistema de transporte es de 10-75 µg/ml, preferiblemente de 50-70 µg/ml, considerando la concentración preferida final de 60 µg/ml.

Figura 11: verificación morfológica del cultivo celular tras el contacto de las superficies tratadas con diferentes concentraciones de poli-L-lisina

- 50 La figura 11 muestra la aparición de cada uno de los cultivos usados durante la exposición a poli-L-lisina. El control corresponde a las células que se han cultivado en placas que carecen de tratamiento, y se mantienen en las mismas

condiciones que las células en contacto con poli-L-lisina, pero que no habían tenido contacto con la molécula sometida a ensayo. El análisis se llevó a cabo durante 96 horas.

5 La figura 11a muestra las imágenes correspondientes a los cultivos de células SK-N-MC, la figura 11b muestra las células MDCK-II-MDCR₁, las células mostradas en la figura 11c son células mesenquimatosas humanas, y en último lugar, la morfología de los condrocitos articulares humanos se muestra en la figura 11d.

En las imágenes correspondientes a este ensayo, puede observarse que no hay ninguna diferencia en absoluto entre la morfología celular de los cultivos expuestos a poli-L-lisina y la morfología de las células no expuestas al contacto con dicha molécula.

Figura 12: protección del sistema de transporte frente a la agitación mecánica

10 La figura 12 muestra el número de células recogidas de los pocillos que contenían medio (control) y que contenían la mezcla de transporte (agarosa+agarasa) durante el periodo de agitación (horas). Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

15 La figura 12 muestra el número de células que permanecieron adheridas a la superficie de cultivo durante el tiempo en agitación. En esta figura, puede observarse cómo el número de células recuperadas de los pocillos en los que se aplicó la cobertura durante la agitación (agarosa+agarasa) era superior al recogido de los pocillos en los que se completó la agitación que contenían sólo medio de cultivo (sin la cobertura de agarosa más agarasa).

Figura 13: aplicación del sistema de transporte celular a sistemas de cultivo tridimensionales: análisis de la integridad de la monocapa celular tras retirar la cobertura.

20 La figura 13a muestra los valores de resistencia (TEER) obtenidos a partir de la medición de los pocillos control que se expusieron a la mezcla. Muestra tres mediciones diferentes que corresponden al momento antes de añadir la cobertura de agarosa más agarasa sobre el cultivo (antes), el momento inmediatamente después de retirarse la cobertura (0 h) y 24 horas tras retirarse la agarosa más agarasa (24 h). La lectura se realizó en 12 pocillos de cada una de las dos condiciones diferentes: pocillos control con medio y pocillos con cobertura de agarosa más agarasa.

25 La figura 13b muestra el porcentaje del dextrano detectado en los pocillos en la posición basal, es decir, el porcentaje de dextrano que atravesó la monocapa celular. Se realizaron dos lecturas, la primera correspondiente al momento inmediatamente después de retirarse la cobertura (0 h) y la segunda a 24 horas tras retirarse la mezcla de agarosa más agarasa (24 h). El análisis se llevó a cabo en 12 pocillos para cada una de las dos condiciones diferentes; pocillos de control con medio y pocillos con cobertura de agarosa más agarasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 El sistema de transporte descrito en la presente invención propone un sistema de transporte celular que permite transportar células en cultivo, adheridas o en suspensión, con unos criterios de calidad y viabilidad máximos y que no requiere necesariamente que el laboratorio receptor disponga de una infraestructura y personal cualificado para el cultivo celular, si la aplicación final de las células transportadas no lo requiere.

35 El medio de transporte de la invención consiste en una mezcla específica de agarosa y agarasa que puede aplicarse a cualquier tipo de cultivo celular, o bien cultivado en monocapa o bien en 3D o bien en suspensión. El sistema puede aplicarse por lo tanto a cualquier tipo celular de un origen diferente tal como: humano, murino (ratas, ratones, hámsteres), canino, bovino, ovino, etc. Las células transportadas por este sistema pueden ser células genéticamente modificadas.

40 El sistema de transporte de la presente invención puede incorporarse en cualquier dispositivo de acondicionamiento portátil que pueda mantener el intervalo de temperatura durante el tiempo de transporte independientemente de la temperatura ambiente.

45 Dichos dispositivos de acondicionamiento portátiles se conocen en el estado de la técnica como caja de transporte y consisten en cualquier estructura que pueda mantener durante al menos 75 horas el sistema celular transportado a una temperatura constante de 22°C, proporcionando adicionalmente al sistema la protección necesaria frente a movimientos mecánicos y oscilaciones que se producen durante el periodo de transporte. Los ejemplos de cajas de transporte existentes en el estado de la técnica para el fin de la presente invención incluyen: "Insulated box P650" y "KF TermoCell 22" comercializadas por Kern Frio S.A.

Ambas referencias consisten en sistemas de transporte aislados que permiten mantener de forma constante la temperatura deseada (20-22°C), con variaciones mínimas ($\pm 2^\circ\text{C}$).

50 Una vez que dichas células transportadas alcanzan su destino y se retira la mezcla de agarosa y agarasa en gel, pueden extraerse las células del soporte que las transportaba o usarse en el soporte que las transportaba. Asimismo, el sistema de transporte de la presente invención puede aplicarse a todo tipo de formato de cultivo celular, tal como por

ejemplo: placas de cultivo (con 6, 12, 24, 96, 384 pocillos, etc.), frascos de cultivo (de 25, 75, 175 cm², etc.), cámaras de cultivo o tubos (de 1,5, 15, 50 ml, etc.), botellas, etc. de modo que se contempla lo siguiente como posibles aplicaciones del sistema de transporte:

- 5 • ensayos funcionales: ensayos de citotoxicidad para el análisis de nuevas moléculas, fármacos, biomateriales y nanopartículas; ensayos de proliferación; ensayos de apoptosis; estudios de secreción de moléculas, proteínas, factores de crecimiento, proteoglicanos, mucopolisacáridos...; ensayos de respuesta y diferenciación celular, estudios de expresión de marcadores de membrana; etc.
- estudios morfológicos: ensayos histológicos, ensayos inmunohistoquímicos, análisis por SEM y TEM.
- 10 • estudios para caracterizar la expresión génica y de proteínas: extracción de ácidos nucleicos de forma directa sobre las células suministradas en el sistema, extracción de proteínas de forma directa sobre las células suministradas en el sistema, etc.

Es decir, basándose en el objetivo o el estudio que se pretenda llevar a cabo en el laboratorio receptor, el sistema de transporte es adaptable en cuanto al formato o soporte de transporte (placas, tubos, frascos, cámaras de cultivo, botellas, soportes asimétricos de tipo Transwell etc.) y la densidad celular del cultivo, ya que cada tipo celular requiere ser cultivado a densidades concretas dependiendo del formato del sistema de transporte y del tipo de ensayo a realizar posteriormente.

En una realización, el sistema de transporte comprende células del sistema nervioso. Dichas células pueden ser células genéticamente modificadas. Las modificaciones genéticas pueden estar relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, parkinson, Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, etc.), epilepsias, enfermedades del sistema nervioso periférico (síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, etc.), etc.

En una realización particular, el sistema de transporte comprende neuronas genéticamente modificadas. La mutación que presentan dichas neuronas está asociada con la enfermedad de Alzheimer.

Para que el sistema de transporte celular de la presente invención pueda aportar las ventajas mencionadas, el medio en el que se lleva a cabo este transporte debe de ser fácilmente manipulable en el momento de la siembra de las células. Asimismo, el medio de transporte debe aportar al sistema, durante el transporte, la firmeza suficiente para mantener la viabilidad celular en condiciones óptimas durante todo el tiempo que dure el transporte, es decir, evitando que se produzcan alteraciones de las propiedades morfológicas y funcionales en las células transportadas.

Por todo ello, lo ideal es que el sistema esté integrado por un medio de transporte cuyas características físicas puedan variar de manera simple y controlable, como por ejemplo en respuesta a cambios de temperatura. Es decir, que a temperaturas a las cuales se lleve a cabo el transporte, 18-23°C, el material se comporte como un sólido o semi-sólido para mantener la firmeza sistema, evitando que los movimientos sostenidos que se producen durante el transporte afecten finalmente a la integridad, y que dicho estado sólido o semi-sólido pueda revertirse mediante un cambio de la temperatura, a 37°C, facilitando el manejo y recuperación del cultivo celular en condiciones de viabilidad celular superiores al 85%.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la agarosa, que consiste en copolímeros alternados de β -D-galactosa con unión (1-3) y (3-6)-anhidro- α -L-galactosa con unión (1-4), es un polisacárido térmicamente reversible, es decir, puede fundirse o gelificarse basándose en la temperatura a la que se somete y comúnmente se emplea para la encapsulación celular.

El estado de la técnica describe cómo la agarosa se emplea habitualmente para el cultivo celular tridimensional (referencias 1 y 2) como soporte del cultivo. Para llevar a cabo la recuperación de las células incluidas en la agarosa empleada como soporte de cultivo, se trata la estructura tridimensional con una disolución de agarasa que, una vez añadida al soporte, digiere la agarosa en la que las células están creciendo, permitiendo así la recuperación celular.

En contraposición, el sistema de presente invención permite el transporte celular en un sistema que está listo para usarse y, cuando sea apropiado, la posible recuperación posterior de las células transportadas usando una metodología simple.

En el estado de la técnica, el uso de agarosas comúnmente aplicadas en el sistema de cultivo tridimensional implica que las células transportadas se sometan necesariamente a temperaturas de más de 65°C para facilitar la eliminación de la agarosa y por tanto para permitir la liberación de las células que forman el cultivo transportado

Sin embargo, la temperatura de 65°C a la que debe someterse el cultivo sería demasiado agresiva, resultando en la muerte del cultivo celular, ya que la temperatura de crecimiento óptima de las células animales es de 36-38°C. Por encima de esta temperatura óptima (condiciones de hipertermia) la viabilidad celular se ve afectada dañando la integridad de las células del cultivo de forma irreversible. Por el contrario, las temperaturas por debajo de la temperatura óptima, hipotermia, son toleradas por las células de mejor manera que las temperaturas altas. En el caso de la aplicación de una temperatura inferior a la óptima recomendada, se produce una disminución en el metabolismo celular,

las reacciones celulares (proliferación, metabolismos, crecimiento,...) se ralentizan pero la célula mantiene su integridad, y cuando se reestablecen las condiciones térmicas óptimas de crecimiento, las células recuperan su actividad celular normal. Así, la hipotermia es una metodología ampliamente empleada para la ralentización del crecimiento de microorganismos y células tumorales.

5 En el sistema descrito en la presente invención el medio de transporte comprende una mezcla de agarasa y agarosa que facilita la recuperación celular, lo que significa que este procedimiento se realice de manera más, incubando el sistema de transporte formado por el soporte que contiene las células que va a transportarse, a la temperatura a la que la enzima agarasa es activa. De esta manera se produce la digestión de la agarosa permitiendo la recuperación celular.

10 Una de las ventajas del sistema de la invención consiste en el hecho de que la digestión se lleva a cabo de forma homogénea, ya que la agarasa está también incorporada homogéneamente en la disolución de agarosa. De esta manera la digestión comienza homogéneamente en la disolución de agarosa cuando se incubaba a la temperatura adecuada para que la enzima agarasa actúe. Esto implica menor tiempo de recuperación y mayor viabilidad del cultivo celular recuperado.

15 Por otro lado, el hecho de que la agarasa se incorpore en el sistema de transporte facilita la estandarización de la preparación del sistema de transporte según el tipo celular y formato o soporte celular y de la recuperación celular.

Asimismo, la incorporación de la agarasa en el sistema de transporte evita la necesidad del uso de la enzima por parte del laboratorio receptor, simplificando el procedimiento de recuperación celular y posibilitando el uso del sistema en laboratorios muy diversos que no tienen conocimiento específico en las técnicas correspondientes.

20 La agarosa que se usa en la presente invención es una agarosa de bajo punto de fusión ("low melting point agarose") que presenta una ventaja significativa con respecto al uso de las agarosas habitualmente empleadas en cultivos celulares (con puntos de fusión de aproximadamente 65°C) ya que sitúa el punto de fusión de la agarosa en una temperatura próxima a la temperatura óptima de crecimiento del cultivo celular.

25 Están disponibles agarosas de bajo punto de fusión en el mercado, incluyendo agarosa de bajo punto de fusión Ultra Pure® comercializada por Invitrogen, agarosa NuSieve® GTC® comercializada por Lonza, agarosa LM y LM Sieve comercializadas por Pronadisa, agarosa SERVA Premium de bajo punto de fusión, agarosa SERVA para PCR de bajo punto de fusión y agarosa SERVA de bajo punto de fusión comercializadas por Serva.

30 Según el estado de la técnica mencionado anteriormente, la fusión de la agarosa de bajo punto de fusión a 42°C tal y como se describe en sus especificaciones, suscita el problema de que no se logra una fusión total sino parcial de la agarosa aplicada a las células, lo que dificulta la separación de la agarosa de dichas células, afectando negativamente a la recuperación celular correcta. En estos casos, la aplicación de una temperatura mayor para completar la fusión de la agarosa afectaría de forma significativa a la supervivencia celular, ya que la temperatura empleada (> 45°C) supera el rango en el cual las células mantienen aún su integridad.

35 Así, para facilitar la recuperación de las células transportadas y optimizar el sistema al máximo, es necesario promover la total separación de la agarosa de las células del cultivo. Esto se logra mediante el sistema propuesto por la presente invención.

40 La agarasa es un enzima con un peso molecular de 32 kDa que hidroliza las uniones [1-3] entre los residuos D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa de la agarosa. Para que la agarasa pueda llevar a cabo la hidrólisis descrita anteriormente, necesita estar activada. La temperatura a la cual la enzima agarasa muestra su máxima actividad es de 43°C, pero como ocurre para la mayoría de los enzimas, existe un margen por encima y por debajo de esta temperatura óptima en el cual la actividad mostrada por la enzima es también importante. En el caso de la enzima agarasa se observa que esta actividad es detectable a la temperatura de 37°C, pero no a 30°C. Finalmente, el intervalo de temperatura en el que la agarasa tiene actividad sustancial es de 37-42°C.

45 El medio de transporte de la presente invención comprende una concentración de agarosa en la mezcla final del 0,2-0,6%, preferiblemente del 0,5% y una concentración de agarosa no superior a 90 unidades por mililitro de agarosa al 1%, preferiblemente 80 unidades por ml de agarosa al 1%.

50 Así, en el desarrollo del sistema de transporte, propuesto por la presente invención se contemplan los siguientes aspectos: (i) cultivo de las células seleccionadas para su acondicionamiento y adhesión en el formato seleccionado, (ii) aplicación de la mezcla de agarosa-agarasa para la creación del sistema de transporte, (iii) condiciones de transporte, (iv) recuperación celular tras el proceso de transporte, (v) verificación del mantenimiento de la integridad celular tras el transporte en el sistema descrito en la invención por medio de la medida de la citotoxicidad y morfología celular.

i. cultivo de las células seleccionadas para su acondicionamiento y adhesión

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el sistema permite el transporte de cualquier tipo celular, incluyendo células modificadas genéticamente o no modificadas genéticamente. Dichas células pueden transportarse cultivadas en

monocapa, 3D, adheridas o incluidas en el interior de la mezcla de agarosa y agarasa (Figura 5). Las células se prepararán de forma específica para cada una de estas opciones.

1. Células en monocapa:

5 Las células del tipo celular seleccionado se siembran en la placa o frasco del formato adecuado para llevar a cabo la aplicación final. Se cultivan en las condiciones de temperatura, condiciones de humedad, condiciones atmosféricas y medio de cultivo específicos para su crecimiento óptimo y se mantienen en cultivo el tiempo suficiente para que las células se adhieran al plástico y adquieran una morfología celular óptima, habitualmente una incubación durante la noche debería de ser suficiente.

10 Existen tipos celulares, semiadherentes, que tienen como característica su poca capacidad de adherencia a los soportes habituales de cultivo celular, como por ejemplo las células SK-N-MC, etc. Para evitar que este tipo de células se pierdan en el proceso de recuperación celular tras el transporte, debido a una baja adherencia de éstas células al soporte, también se contempla la adaptación del sistema a tipos celulares con baja adherencia. Para ello, se considera la posibilidad de emplear placas o frascos tratados con diferentes moléculas o componentes de la matriz extracelular que aumentan la capacidad de adherencia de las células al soporte tales como: laminina, poli-L-lisina, colágeno, etc.,
15 componentes de la matriz extracelular ampliamente empleados para aumentar la adhesión celular al soporte del cultivo. Se ha observado que el uso de poli-L-lisina para el fin de aumentar la adherencia celular al soporte del cultivo en el presente sistema de transporte es particularmente ventajoso ya que induce mayor fijación a la superficie de cultivo sin alterar las características morfológicas y fisiológicas de las células expuestas a la misma.

20 Para establecer la concentración de poli-L-lisina adecuada en el sistema de transporte de la presente invención, se analizó la integridad celular tras la exposición del sistema a concentraciones crecientes de poli-L-lisina, tal como se describe en el ensayo 2.4.1.

25 Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 10 y permiten definir como concentración de poli-L-lisina adecuada en el sistema de transporte entre 10-75 µg/ml, preferiblemente, 50-70 µg/ml, más preferiblemente 60 µg/ml. La siguiente etapa del procedimiento no se realiza hasta el siguiente día, cuando las células ya están adheridas a la superficie de la placa o el frasco.

2. Células incluidas en el material de agarosa más agarasa

Las células se mantienen en condiciones de cultivo estándar hasta alcanzar la etapa ii.

ii. aplicación de la mezcla de agarosa más agarasa para la creación del sistema de transporte

30 Dependiendo del formato empleado para el transporte celular, la cantidad de mezcla que ha de añadirse es diferente. Por ejemplo, en el caso de los pocillos de una placa de 24 pocillos, la cantidad de mezcla empleada en cada uno de los pocillos es de 1 ml, mientras que para las placas de 96 pocillos es de 150 µl por pocillo, para las células en suspensión el volumen del mezcla a añadir será proporcional al frasco y proporcional al número de células dispuestas en el soporte porque se mantiene una proporción de $1-2 \times 10^6$ células por ml de mezcla. Así en tubos de 50 ml la cantidad de mezcla a emplear será de 20 ml, y en tubos de 15 ml, 6 ml.

35 1. Células en monocapa:

Al día siguiente de la siembra celular y una vez creada la monocapa deseada, se retira el medio del cultivo y se aplica sobre las células la cubierta de la mezcla de agarosa-agarasa, tal como se describe en el ejemplo 2.

40 El medio de transporte atemperado a 37°C se añade cubriendo la monocapa del cultivo celular en las placas/frascos de células dispuestas en hielo para evitar que la enzima agarasa actúe sobre la agarosa antes de tiempo, ya que la temperatura óptima de acción de la enzima agarasa es de 37-42°C. El tiempo estimado para que la mezcla adquiera la consistencia deseada es de 15-30 minutos, tras lo cual el soporte se sellará con Parafilm por todos sus extremos para evitar la apertura del sistema durante el transporte y el contacto del cultivo con el medio externo, eliminado el riesgo de contaminación durante el transporte.

2. Células incluidas en el material de agarosa más agarasa

45 En este segundo caso no es necesario sembrar las células el día previo al transporte ya que estas células se disponen directamente en la mezcla de agarosa y agarasa, mezclándose completamente con el sistema de transporte.

50 La mezcla de agarosa se prepara exactamente igual que para el caso de células en monocapa, tal y como se describe en el ejemplo 2. Se añaden la agarosa fundida y a continuación la agarasa a un volumen de medio, que variará dependiendo del formato seleccionado. Una vez mezclados los componentes de forma homogénea en el mismo tubo donde se encuentra el medio de transporte a 37°C, se añade la cantidad de células seleccionada para el transporte y se sitúa el tubo en hielo para evitar que la enzima agarasa actúe sobre la agarosa antes de tiempo. En 15-30 minutos la

mezcla de agarosa-agarasa habrá adquirido la consistencia adecuada tras lo cual el sistema empleado (tubo, frasco, cámaras de cultivo, etc.) se sellará tal y como se ha especificado en el punto anterior.

El caso 1 de la presente invención, será exclusivo para el transporte de cultivos celulares en monocapa mientras que el caso 2 será aplicable tanto a los tipos celulares adherentes que se transporten en suspensión como no-adherentes (figura 5).

iii. Condiciones de transporte:

1. *Temperatura de transporte*

Otro aspecto importante de la presente invención es el de determinar el rango de temperatura a la que se puede realizar el transporte del sistema, ya que una temperatura demasiado baja podría comprometer la viabilidad celular, mientras que una temperatura demasiado alta pondría en peligro la integridad del sistema para el transporte, y como consecuencia la viabilidad celular.

El rango de temperatura óptimo para el transporte celular empleando el sistema de transporte celular de la invención (figura 4) se ha determinado basándose en el análisis de tres parámetros limitantes como son la integridad celular, la integridad de la mezcla de agarosa-agarasa y medio y la temperatura a la cual la enzima agarasa permanece inactiva.

a. La integridad celular: Tal y como se ha descrito anteriormente, la temperatura óptima de crecimiento de los cultivos celulares es de 36-38°C, aunque el rango de temperatura en el que las células mantienen su viabilidad e integridad es de 20-42°C.

b. La integridad de la mezcla de agarosa-agarasa y medio: para que el transporte celular empleado en el sistema de la invención sea óptimo, es necesario que la mezcla de agarosa-agarasa proporcione una consistencia sólida o semisólida que garantice la protección de las células frente a los continuos movimientos que se dan durante el transporte. Por ello, es importante que el transporte se lleve a cabo dentro de un rango de temperatura que permita el mantenimiento del estado sólido de la mezcla. La consistencia de la mezcla es inversamente proporcional a la temperatura a la que está expuesta, cuanto mayor es la temperatura de exposición de la mezcla, menor es la integridad o solidez de la misma. Al analizar la integridad de la mezcla en un amplio rango de temperatura, se ha determinado que el punto de inflexión a partir del cual la mezcla pierde la consistencia deseada se sitúa en torno a los 25 °C.

c. La temperatura a la cual la enzima agarasa permanece inactiva: la ventaja de incluir la enzima agarasa en la mezcla del soporte de transporte de la presente invención consiste en facilitar la recuperación celular una vez las células transportadas han llegado al destino deseado, pero no conviene que la enzima actúe durante el transporte. La temperatura a la cual la enzima agarasa muestra su máxima actividad es de 43°C, pero como ocurre para la mayoría de los enzimas, existe un margen por encima y por debajo de esta temperatura óptima en el cual la actividad mostrada por la enzima es también importante. En el caso de la enzima agarasa, se ha observado que esta actividad es detectable a la temperatura de 37°C, pero no a los 30°C. Por tanto, es conveniente que el soporte de transporte no llegue a superar la temperatura de 30°C a partir de la cual se activa su acción, y evitar así que la enzima actúe antes de lo previsto.

Por lo tanto, tras testar el comportamiento del sistema frente a diferentes temperaturas en un rango de 18 a 28°C y teniendo en cuenta la integridad celular, la consistencia de la mezcla del soporte y la actividad de la enzima agarasa, la temperatura óptima del transporte, tal y como muestra la figura 4, no es superior a 25°C, siendo preferiblemente entre 18 y 23°C, más preferiblemente a 22°C.

2. *Tiempo de transporte*

El tiempo máximo de transporte se determina mediante la exposición de las células cubiertas o incluidas con el medio de transporte durante el tiempo que el transporte puede durar. Tal y como muestra la figura 3, las células transportadas durante 48 horas en el sistema de transporte de la invención presentan una viabilidad del 100% una vez que se han recuperado tras el proceso de transporte. Tras 60 horas, la viabilidad celular sigue siendo superior al 85%, es decir, dentro del rango de viabilidad óptimo requerido. Al cabo de 72 horas de aplicación del sistema, la viabilidad celular disminuye hasta el 60%. Dicho valor es aceptable en casos concretos, debido a que un 60% de viabilidad celular permite la recuperación del cultivo de forma eficaz.

Así, una realización preferida de la presente invención, en la que dicho sistema mantiene el estándar de calidad deseado, consiste en que la temperatura de transporte se encuentre por debajo de los 25°C, preferiblemente de 18 a 23°C, más preferiblemente a 22°C y que el tiempo máximo de transporte no supere las 60 h, más preferiblemente las 48 h.

iv. Recuperación celular tras el proceso de transporte

Una de las características del sistema de transporte de la invención es que permite la recuperación celular de las células transportadas. El método empleado para llevar a cabo la recuperación del cultivo celular varía dependiendo del formato utilizado para el transporte celular:

- 5 Cuando las células se han sembrado en monocapa sobre una superficie, y después recubierto con la mezcla de agarosa-agarosa (según la figura 5a), el proceso de recuperación celular deberá seguir las siguientes indicaciones:
- En el momento en que las células se reciben en el laboratorio de destino, se introducen en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante un periodo de 1,5 a 2 horas.
 - 10 - Tras la incubación a 37°C, se recupera la placa del interior del incubador y se añade medio de cultivo atemperado a 37°C sobre la cubierta de agarosa-agarosa para facilitar la digestión de la agarosa.
 - Se procede a una nueva incubación a 37°C durante una hora.
 - Tras esta última incubación, se mezcla con suavidad el contenido de los pocillos/frascos para que los restos de agarosa que puedan quedar sin digerir se mezclen con el medio, y se elimina este medio del pocillo/frasco.
 - A continuación se añade medio de cultivo fresco sobre las células.
 - 15 - Se introducen las células en la estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente para permitir una mejor recuperación del periodo de transporte. Tras este momento, las células estarán preparadas para llevar a cabo el procedimiento deseado.

Opcionalmente mediante técnicas de cultivo celular básicas, las células pueden extraerse del soporte celular en el que se han cultivadas y transportarse para llevar a cabo el procedimiento deseado.

- 20 Si las células se dispusieron en la mezcla de agarosa y agarosa (según las figuras 5b y 5c), las instrucciones a seguir para la recuperación celular serán las siguientes:

Tras los pasos 1 a 3 descritos anteriormente se procede de la siguiente manera:

- 25 - Tras la incubación, se homogeniza bien el contenido del tubo y se lleva a cabo una centrifugación suave (800-1000 g) con el fin de separar las células de la mezcla de agarosa digerida, medio y restos de agarosa y poderlas recuperar en el fondo del tubo.
- Después de la centrifugación, se resuspenden las células en medio de cultivo fresco, se realiza un recuento de células viables y se procede a la siembra en condiciones de cultivo estándar.
- 30 - Se introducen las células en la estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente para permitir una mejor recuperación del periodo de transporte. A partir de este momento, las células estarán preparadas para llevar a cabo el procedimiento deseado.

v. verificación de la integridad celular tras el periodo de transporte con el sistema de la invención, por medio del estudio de la citotoxicidad y de la morfología celular

- 35 Tras el transporte y recuperación celular, una vez transcurrido el periodo que permite a las células recuperarse de todo el proceso descrito, se procede a caracterizar la integridad celular mediante la realización de ensayos de citotoxicidad y el estudio de la morfología celular.

Se considera un estándar de calidad óptimo que al menos un 85% de las células transportadas deben mantener su viabilidad e integridad celular intacta.

- 40 Para realizar esta verificación se consideran equivalentes los ensayos de proliferación y citotoxicidad, sometiendo a ensayo la capacidad proliferativa de las células por medio de la incorporación del MTT, que es una medida directa de la capacidad metabólica de las células expuestas al sistema de transporte, de manera que si la exposición a la mezcla resulta ser tóxica para las células su metabolismo se verá afectado, y se reflejará de forma directa en una disminución de su capacidad proliferativa.

- 45 Tal y como se conoce del estado de la técnica, el test MTT se basa en la capacidad que tienen las enzimas mitocondriales de las células vivas para transformar determinados sustratos en otros metabolitos secundarios. La cantidad de compuesto formado depende de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, lo cual es un claro indicador del número de células viables que existen en el cultivo.

Tal y como se observa en la figura 6, puede concluirse que el medio de transporte no afecta de forma significativa a la viabilidad celular, ya que no se producen modificaciones de la tasa proliferativa de las células con respecto al control (23°C) y el cultivo (37°C, 5% de CO₂) lo que indica que las células no han experimentado efectos citotóxicos durante el tiempo en el que se mantienen en el sistema de la invención.

- 5 A su vez, la figura 7 muestra cómo no se observan diferencias en la morfología celular de los cultivos sometidos a ensayo en las mismas condiciones que las descritas en el párrafo anterior.

A la vista de lo anteriormente expuesto, puede concluirse que el empleo del sistema de transporte descrito por la presente invención, para el transporte de cultivos celulares, no modifica ni altera la viabilidad ni la morfología celular de los cultivos celulares que transporta.

- 10 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de interpretarse como limitaciones a la invención que se reivindica en el presente documento.

- 15 Para llevar a cabo los ejemplos descritos en la presente invención, se han empleado los siguientes tipos celulares: células SK-N-MC, células MDCK-II y MDCK-II-MDR1, células CHO de origen murino, células mesenquimatosas, queratinocitos y fibroblastos, cuyas características y condiciones de cultivo las conoce un experto en la técnica.

- 20 La elección de estos tipos celulares se ha realizado en función de las características propias de cada tipo celular, debido a la importancia de someter a ensayo el sistema de transporte empleando tipos celulares de características variadas que demuestren la validez del sistema con un amplio rango de cultivos. Un segundo criterio de elección se ha basado en la aplicación final de las células transportadas, valorando la selección de tipos celulares comúnmente empleados para la identificación de fármacos, dianas génicas,...

Por lo tanto, en vista de los siguientes ejemplos puede concluirse que la mezcla de agarosa-agarasa no afecta a la viabilidad de los distintos tipos celulares por lo que podemos determinar que el medio de transporte es aplicable a cualquier tipo celular, ya crezcan éstos últimos adheridos a la superficie de un soporte o, por el contrario, crezcan en suspensión en el medio de cultivo específico.

25 Ejemplos

Ejemplo 1.- Determinación de los intervalos de agarosa y agarasa en el sistema de transporte.

1.1 Determinación de la concentración final de agarosa en el sistema

- 30 Teniendo en cuenta que cada uno de los tipos o líneas celulares requiere el uso de un medio de cultivo diferente y específico, y que las propiedades de los diferentes medios de cultivo difieren entre sí, y en muchas ocasiones los medios de cultivo comercialmente preparados no proporcionan la información necesaria para identificar las características específicas del medio, es necesario verificar de forma empírica, en cada uno de los medios de cultivo que van a transportarse, la concentración final de agarosa necesaria para aplicar el sistema de transporte de la presente invención.

- 35 Para determinar el intervalo de concentración final de agarosa que se usará en el sistema, se prepara una disolución madre de agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen) con una concentración final de agarosa al 2% en solución salina (PBS 1X). A partir de esta disolución se preparan diferentes diluciones, con un porcentaje final de agarosa de desde el 0,1% hasta el 1% en los diferentes medios de cultivo que muestran características diferentes.

- 40 Los medios de cultivo usados para estos estudios son el medio DMEM con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%, medio F12 de Han complementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%, medio MEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50 mg/ml de gentamicina y antibiótico al 1%, medio EpiLife (Cascade Biologics) complementado con el complemento para el crecimiento de queratinocitos humanos V2 (Cascade Biologics), y medio 106 (Cascade Biologics) complementado con el complemento de crecimiento LSGS (Cascade Biologics).

- 45 Tal como se observa en la figura 1, en las mezclas que contienen una concentración final de agarosa inferior al 0,2%, el sistema no tiene la firmeza y consistencia deseadas que garanticen el transporte seguro de las células sembradas en el soporte seleccionado.

- 50 Tal como se describe en la presente invención, el objetivo del sistema es generar una mezcla que sea lo suficientemente consistente como para transportar el cultivo en condiciones seguras y que las células no sufran debido a los movimientos y las fluctuaciones en el transcurso del transporte; y por otro lado, es necesario que una vez que el cultivo llegue a su destino, puedan recuperarse las células para su uso (ya sea por un usuario experimentado o por usuarios no familiarizados con las técnicas y metodología de cultivo celular) de manera simple y sencilla con un porcentaje de recuperación óptimo. Para ello, el porcentaje de agarosa en la mezcla establecido como óptimo fue el porcentaje en el que la mezcla fue lo suficientemente firme como para transportar las células sin que el soporte

experimente ningún tipo de deslizamiento, pero que al mismo tiempo permite separarla del cultivo de forma sencilla y eficaz.

Por lo tanto, el porcentaje final de agarosa en la mezcla debe ser superior al 0,2% independientemente del medio de cultivo usado para preparar la mezcla.

5 Tabla 1: intervalos óptimos para el % final de agarosa en la mezcla dependiendo del medio de cultivo usado en la invención.

| Medio de cultivo | % final de agarosa en la mezcla |
|--|---------------------------------|
| MEM complementado + suero bovino fetal al 10% + antibiótico al 19% | 0,3-0,4 |
| F12 de Ham + suero bovino fetal al 10% + antibiótico al 1% | 0,5 |
| DMEM + suero bovino fetal al 10% + antibiótico al 1% | 0,3-0,4 |
| MesenPro + antibiótico al 1% | 0,6 |
| Medio 106 + antibiótico al 1% | 0,5-0,6 |
| Medio EpiLife + antibiótico al 1% | 0,5-0,6 |

10 Tras la concentración del 0,2%, y en todas las concentraciones superiores al 0,3%, la mezcla tiene una consistencia ideal para el transporte. La concentración máxima de agarosa al 1% muestra una consistencia completamente sólida que garantiza de forma segura el transporte celular.

15 Sin embargo, a pesar del hecho de que cuanto mayor sea la concentración de agarosa usada en la mezcla final para el transporte más seguro es dicho transporte, también es necesario tener en cuenta las características del sistema de la invención, que se refiere a la recuperación simple y sencilla del cultivo celular tras su transporte. Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de agarosa en la mezcla final, más difícil es también en el momento de recuperar el cultivo debido a su elevada rigidez.

En este sentido, se han sometido a ensayo los diferentes porcentajes de agarosa en la mezcla con los diferentes medios de cultivo desde el 0,3% hasta el 1% (figura 1) para determinar la mayor concentración óptima para el sistema. Tras verificar el grado de solidificación de la mezcla para cada uno de los medios, se ha establecido que el límite superior de concentración de agarosa que debe usarse en el sistema es del 0,6%.

20 Si la concentración final de agarosa en la mezcla es mayor que la concentración óptima recomendada, la recuperación de las células que forman el cultivo transportado será difícil, disminuyendo el rendimiento de la recuperación celular y evitando la retirada completa de la mezcla del cultivo.

25 Por lo tanto, el intervalo de concentración de agarosa en la mezcla de transporte final es del 0,2-0,6%, preferiblemente del 0,5%, en el medio de cultivo basándose en una disolución de agarosa más concentrada preparada al 2% en solución salina (PBS 1X) y posteriormente esterilizada.

1.2 Concentración final de agarosa en el sistema

30 Para determinar el porcentaje de agarosa usado en la mezcla de agarosa, se ha mezclado la cantidad de agarosa necesaria para obtener el porcentaje final establecido con cantidades diferentes de agarosa para conseguir un intervalo de concentración final de agarosa de 80 unidades por 1 ml de agarosa al 1%. La determinación de la concentración final de agarosa en la mezcla se basó en la observación visual de la firmeza de la mezcla y en la observación microscópica de la integridad y morfología celular (figuras 2 y 7).

Una de las consideraciones cuando se determina el porcentaje de agarosa con el que preparar el medio de transporte es la consistencia de la mezcla de agarosa con agarosa y su correspondiente volumen de medio de cultivo específico.

35 Con el fin de transportar las células con seguridad mediante el sistema de la presente invención, es necesario que la mezcla de agarosa-agarosa sea lo suficientemente firme como para proteger a las células durante el proceso. Por ello, es necesario que la mezcla de agarosa-agarosa muestre una consistencia que garantice las condiciones deseadas y al mismo tiempo, es necesario verificar que se mantienen la integridad y morfología celular tras el contacto con la mezcla de agarosa y agarosa.

A partir de la concentración de 90 unidades de agarasa por mililitro de agarosa al 1%, la mezcla de agarosa-agarasa no muestra la consistencia necesaria para garantizar el transporte celular óptimo porque la mezcla de transporte muestra una consistencia que es demasiado licuada como para llevar a cabo un transporte seguro.

5 Por lo tanto, la concentración de agarasa de la mezcla final de agarosa y agarasa en el sistema será preferiblemente de 80 unidades de agarasa por mililitro de agarosa al 1%.

Tal como se muestra en la figura 2 la integridad y morfología celular de los cultivos expuestos a la mezcla de agarosa con las diferentes concentraciones finales de agarasa no muestran ninguna diferencia con respecto a los cultivos que se han expuesto a dicha mezcla. Ni siquiera las células en contacto con la mayor concentración de agarasa (85 unidades de agarasa por mililitro de agarosa al 1%) muestran diferencia en la viabilidad o morfología celular.

10 Ejemplo 2.- Ensayos llevados a cabo para validar el sistema descrito en la invención

2.1 Caracterización de la integridad celular tras exposición a la mezcla de agarosa con agarasa y medio mediante ensayos de citotoxicidad

Dependiendo del tipo celular seleccionado, las células se siembran en la densidad y medios apropiados y la(s) placa(s) se cultivan a 37°C y el 5% de CO₂.

15 Las superficies de cultivo pueden tratarse opcionalmente con poli-L-lisina, tal como se describe a continuación, antes de sembrar las células:

20 La disolución madre de poli-L-lisina está a una concentración de 500 µg/ml y es estéril mediante filtración. La concentración final de poli-L-lisina seleccionada es de 60 µg/ml. Para preparar la disolución que va a añadirse a los pocillos, se prepara el volumen adecuado de disolución madre de poli-L-lisina en H₂O para obtener la concentración deseada en el tratamiento de la superficie de cultivo.

Se añaden 80 µl de la disolución adecuada en los pocillos de la placa de 96 pocillos y se incuban las placas a temperatura ambiente, descubiertas sin la tapa dentro de la cámara de flujo laminar que funciona durante 1 hora.

25 Tras la incubación, se lava cada uno de los pocillos 3 veces con una solución salina atemperada (PBS 1X). Se cubren las placas con sus correspondientes tapas y se exponen a radiación ultravioleta (UV) durante un periodo de tiempo de al menos 1 hora para permitir que se esterilicen las superficies de cultivo.

Se usan estas placas en el plazo de la primera semana tras prepararse.

Siembra de las células

30 Las células SK-N-MC se siembran a una densidad de 40.000 células por pocillo en 200 µl de medio en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Estas células se cultivan en medio MEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50 mg/ml de gentamicina y antibiótico al 1%.

Las células CHO por su parte, se siembran a una densidad de 20.000 células por pocillo en 200 µl de medio en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. El medio de cultivo de las células CHO consiste en medio F12 de Han complementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%.

35 La densidad de siembra que se usa para las líneas celulares MDCK-II y MDCK-II-MDR1 es de 15.000 células y 200 µl de medio por pocillo de la placa de 96 pocillos. El medio específico para el cultivo de estas células es medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%.

40 Las células mesenquimatosas humanas se siembran a una densidad de 5.000 células por pocillo de la placa de 96 pocillos, en 200 µl. El medio de cultivo específico en el que se cultivan estas células es el medio Mesenpro (Gibco). El medio MesenPro es un medio con un contenido de suero reducido (2%) y está especialmente formulado para el crecimiento de células mesenquimatosas.

45 Los queratinocitos humanos adultos se cultivan a una densidad celular de 10.000 células en 200 µl de medio por pocillo de la placa de 96 pocillos. En este caso el medio usado para el crecimiento celular consiste en medio EpiLife (Cascade Biologics) complementado con complemento para el crecimiento de queratinocitos humanos V2 (Cascade Biologics) que contiene factor de crecimiento de tipo insulina humano recombinante (ILGF), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, prostaglandina E-2 e hidrocortisona.

El número de células sembradas en el caso de los fibroblastos es de 5.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos en 200 µl de medio. El medio usado para el cultivo de fibroblastos consiste en el medio 106 (Cascade Biologics) complementado con el complemento de crecimiento LSGS (Cascade Biologics) que contiene suero bovino fetal, hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano, factor de crecimiento básico para fibroblastos y heparina.

Al día siguiente se retira la placa del incubador y se sitúa sobre una superficie refrigerada, por ejemplo una caja con hielo, y en condiciones estériles se cubren los diferentes cultivos con el medio de transporte de la invención, que se prepara tal como se describe a continuación:

Preparación del medio de transporte

- 5 Se funde la disolución de agarosa al 2% preparada en PBS 1X en un microondas, se toma el volumen adecuado para preparar una disolución con una concentración final de agarosa del 0,3% en el medio de cultivo específico para cada cultivo celular. A la disolución de agarosa se le añade la agarasa, que se prepara a una concentración de 0,2-2 mg/ml (255,6-2.556 U/ml) en tampón de fosfato de potasio pH 6,0 o PBS 1X, y cuya concentración final en la mezcla será de 60-80 unidades de agarasa por mililitro de agarosa al 1%, es decir, 78 U/ml para la concentración del 0,3% usada. Por
- 10 cada ml de medio de transporte se añaden 150 μ l de agarosa al 2% y 7-95 μ l de agarasa a 0,2-2 mg/ml (255,6-2.556 U/ml).

Adición del medio de transporte sobre el cultivo celular

Una vez bien mezclado y atemperado a 37°C el medio de transporte, se retira el volumen de medio de los pocillos de la placa de 96 pocillos en los que está añadiéndose la mezcla, cubriendo el cultivo celular.

- 15 Por tanto, se añaden 150 μ l de la mezcla sobre las células sembradas en cada uno de los pocillos y se mantiene la placa sobre hielo hasta que la mezcla adquiere la consistencia deseada, aproximadamente 15-30 minutos tras añadirse a la placa.

Preparación de la placa para su transporte y condiciones de transporte

- 20 Después se sella la placa completamente con Parafilm y se mantiene a la temperatura del transporte, 18-23°C, preferiblemente a 22°C.

Recepción de la placa, retirada del medio de transporte

- 25 Tras el periodo de transporte necesario para alcanzar su destino, en este caso se han sometido a ensayo 24 horas de transporte, la placa debe desenvolverse con cuidado y desinfectarse su superficie con EtOH antes de introducirse en el incubador de cultivo celular a 37°C para iniciar la digestión de la cobertura de agarosa-agarasa, y la posterior recuperación celular.

Por tanto, la placa se introduce en un incubador de 37°C y el 5% de CO₂. La incubación en estas condiciones debe ser durante aproximadamente 2 horas. Una vez transcurridas las dos horas de la primera incubación, se saca la placa del incubador y se añaden a cada uno de los pocillos 100 μ l de medio de cultivo celular atemperado a 37°C, y la placa se devuelve al incubador durante otra hora.

- 30 La cobertura de agarosa más agarasa se retira tras la última hora de incubación. Se mezcla el contenido de pocillo con mucha suavidad y cuidado con ayuda de una pipeta P100 o P200, y se retira el medio de cultivo mezclado con medio de cultivo con cuidado para no arrastrar y levantar las células que se encuentran adheridas al fondo del pocillo. Entonces se añade medio nuevo atemperado. En este punto, es necesario intentar eliminar la máxima cantidad del medio con agarosa, pero sin poner el cultivo en riesgo.
- 35 Una vez completados todos los pocillos de la placa, cuando todos contienen medio nuevo, la placa se devuelve al incubador hasta el día siguiente para permitir que las células se recuperen tras los procesos de transporte y recuperación celular.

Ensayo de proliferación

- 40 Una vez transcurrido el periodo de recuperación, las células ya están listas para llevar a cabo los ensayos relevantes, en este caso concreto un ensayo de proliferación. De forma paralela a la determinación de la capacidad proliferativa de las células mantenidas con la mezcla de agarosa y agarasa en las condiciones anteriormente descritas, también se somete a ensayo a modo de control la capacidad proliferativa de todas las líneas celulares y cultivos primarios que se han mantenido en las siguientes condiciones:

- 45 - Cultivo: las mismas líneas celulares y cultivos primarios que se expusieron a la mezcla de agarosa y agarasa pero incubadas en condiciones de cultivo normales (37°C, el 5% de CO₂), y para las cuales la tasa de proliferación será la considerada como control de referencia.

- 50 - Control: las mismas líneas celulares y cultivos primarios que se expusieron a la mezcla de agarosa y agarasa y que se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, condiciones de embalaje,... que las expuestas a la mezcla pero que únicamente han estado en contacto con su medio de cultivo específico. Estas células se denominan Control en las gráficas de la figura 6 que muestran la proliferación celular de estos ensayos. El objetivo de incluir este control en el ensayo consiste en determinar el efecto de las condiciones de transporte (temperatura, embalaje, tiempo,...) sobre la

viabilidad y proliferación celular; determinar si los efectos del transporte se deben al contacto con la mezcla, o por el contrario a las condiciones en las que se transportan.

La integridad celular se determinó midiendo la proliferación celular por medio de la prueba MTT.

5 La prueba MTT se basa en la capacidad que tienen las enzimas mitocondriales de las células vivas para transformar algunos sustratos en otros metabolitos secundarios. La cantidad de compuesto formado depende de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, que es un claro indicador del número de células viables existentes en el cultivo.

10 Específicamente, en esta prueba mitocondrial, Cell Proliferation kit I (MTT) n.º de cat. 1 465 007 Roche, se determina la transformación que llevan a cabo las succinato deshidrogenasas mitocondriales celulares de la sal de tetrazolio (amarilla) para dar cristales insolubles de formazán (azul). Posteriormente las células se permeabilizan y los cristales formados se solubilizan, dando lugar a una disolución coloreada que puede cuantificarse midiendo su absorbancia en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 550 nm.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

15 En el momento en el que tiene que someterse a ensayo la capacidad proliferativa o integridad celular, se añaden 10 µl de la disolución de MTT (0,5 mg/ml) al cultivo a cada pocillo, por 100 µl de medio, y se incuba durante 4 horas a 37°C en el incubador.

Cuando finaliza la incubación pueden observarse los cristales de formazán en el interior de las células. Se añaden 100 µl de la disolución de solubilización a cada cultivo o pocillo y se incuba a 37°C en el incubador durante la noche. De esta manera, se permeabilizan las células y se solubilizan los cristales, dando lugar a una disolución coloreada fácilmente cuantificable.

20 Una vez solubilizados los cristales, se lee la placa de cultivo directamente con un lector de multiplacas ELISA a 550 nm. Antes de la lectura es aconsejable limpiar la superficie inferior de la placa con etanol.

Se leyó la actividad mitocondrial tras el periodo de recuperación de las células al tiempo de 0, 24 y 72 horas. La figura 6 muestra la representación de los valores de absorbancia con respecto al tiempo obtenidos midiendo la proliferación por el método de MTT en todos los tipos celulares y cultivos primarios sometidos a ensayo.

25 El análisis de la tasa de proliferación de las líneas celulares SK-N-MC, CHO, MDCK-II y MDCK-II-MDR1 representadas en la figura 6 no muestra ningún efecto negativo sobre el crecimiento celular de estos tipos celulares sometidos a ensayo con el medio y condiciones definidas para el transporte celular, mostrando incluso un aumento en la tasa de proliferación de estas células tras la exposición a la mezcla y condiciones determinadas para el transporte celular.

30 Tras analizar el crecimiento de los cultivos primarios de las células mesenquimatosas (AMSC), queratinocitos y fibroblastos, que también muestra la figura 6, se observa que la exposición de estas células a la mezcla de agarosa-agarasa y su mantenimiento en las condiciones de transporte seleccionadas, no afecta de forma significativa a su tasa de proliferación. En estos casos también se observa un ligero aumento de la capacidad proliferativa de los cultivos expuestos a la mezcla.

35 A partir de estos resultados se concluye que el medio de transporte (agarosa-agarasa) no afecta de forma significativa a la integridad celular, ya que la tasa de proliferación de las células expuestas a la mezcla y condiciones de transporte es similar a la de las células no expuestas a ella y a las cultivadas en las mismas condiciones de temperatura (23°C). Por tanto puede concluirse que los cultivos celulares expuestos al medio y condiciones de transporte proliferan además de forma similar a las células mantenidas en condiciones de cultivo convencionales (37°C, el 5% CO₂).

40 Por tanto, una realización particular de la invención corresponde a un porcentaje final del 0,3% de agarosa, 80 unidades de agarasa por mililitro de agarosa al 1% de la mezcla del sistema y las condiciones de temperatura específicas (22°C) para el transporte no afectan a la integridad de las células sometidas a ensayo en las condiciones descritas.

2.2 Caracterización de la integridad celular tras la exposición a la mezcla de agarosa con agarasa y medio mediante comprobación morfológica del cultivo celular

Siembra de las células

45 Las células se siembran en placa de 24 pocillos a una densidad celular diferente dependiendo del tipo celular implicado, y estas células se cultivarán en el medio de cultivo específico para cada tipo celular tal como se ha descrito en el ensayo anterior.

50 Para la realización específica de este ensayo particular las células se sembraron con su medio de cultivo específico a 37°C y el 5% de CO₂ en las siguientes densidades: SK-N-MC, 300.000 células por pocillo en 1 ml; CHO, 100.000 células por pocillo en 1 ml de medio; MDCK-II y MDCK-II-MDR1, 65.000 células por pocillo en 1 ml de medio; células

mesenquimatosas humanas, 50.000 células por pocillo en 1 ml de medio; queratinocitos humanos adultos a 110.000 células por pocillo en 1 ml de medio; fibroblastos, 90.000 células por pocillo en 1 ml de medio.

Los cultivos celulares se tratan con en medio de transporte tal como se ha descrito en el ejemplo anterior.

5 Una vez retirado el medio de transporte de las células y se han recuperado tal como se ha descrito en el ejemplo anterior, se analiza la morfología celular del cultivo de cada una de las líneas celulares y cultivos primarios incluidos en el ensayo. De forma paralela al análisis de la morfología celular mediante microscopía de las células mantenidas con la mezcla de transporte, también se analiza, a modo de control, la morfología celular de todas las líneas celulares y cultivos primarios en las mismas condiciones (cultivo y control) que se usaron en el ejemplo anterior.

10 La morfología celular se analizada mediante observación microscópica de los cultivos celulares de las células de neuroblastoma SK-N-MC, células CHO, células MDCK-II y MDCK-II-MDR1, y también los cultivos primarios de células mesenquimatosas, fibroblastos y queratinocitos, todos de origen humano.

15 El análisis se realizó durante todo el proceso de manipulación celular. La figura 7 muestra las imágenes obtenidas a partir de este análisis morfológico. La figura 7a muestra el aspecto del cultivo de todas las células sometidas a ensayo antes de la incorporación de la mezcla de agarosa con agarasa y medio. En ella puede observarse el aspecto normal de cada uno de los tipos celulares.

20 La figura 7b muestra el aspecto de cada uno de los cultivos en el momento previo a la retirada de la mezcla de agarosa con agarasa y medio. En otras palabras, las células que aparecen en estas imágenes están recubiertas de la mezcla de agarosa y agarasa en el momento de la captura de la imagen. El control corresponde a las células que permanecieron en la misma placa que las células expuestas a la mezcla de agarosa con agarasa y medio, mantenidas en las mismas condiciones que las células con la mezcla, pero que, sin embargo, no han tenido ningún contacto con la mezcla sometida a ensayo. En las imágenes correspondientes a este punto, puede observarse que no hay ninguna diferencia en la morfología celular de los cultivos mantenidos a 23°C, sin aporte externo de CO₂ y en las condiciones de embalaje, si estuvieron en contacto con el medio de transporte y si sólo se mantuvieron con su medio de cultivo específico, cuando se compara con la morfología de las células mantenidas en condiciones de cultivo convencionales (37°C, el 5% CO₂).

25 La figura 7c muestra las imágenes correspondientes a los cultivos celulares el día posterior a la retirada de la mezcla de agarosa más agarasa y medio, tras el periodo de recuperación recomendado para las células. La figura 7c muestra las imágenes de la morfología normal de todas estas líneas celulares y cultivos primarios en condiciones de cultivo normales (células control que se mantuvieron en cultivo de forma habitual), y se representan en esta figura 7c como Cultivo. Además, la figura 7c muestra las imágenes del análisis morfológico de las células denominadas Control, mantenidas en las condiciones de transporte junto con las sometidas a ensayo con la mezcla de agarosa más agarasa y medio, pero sin contacto con la mezcla. Esta figura muestra en último lugar, la morfología correspondiente a los cultivos celulares de todas las células que se trataron y expusieron a la mezcla de agarosa más agarasa y medio en las condiciones descritas en la metodología, denominadas Agarosa+agarasa.

35 A partir de estas imágenes puede determinarse que no se observan diferencias en la morfología celular de los cultivos sometidos a ensayo en las condiciones de transporte denominadas cultivo, control y agarosa+agarasa. Por lo tanto, puede concluirse que la aplicación de la mezcla de agarosa más agarasa y medio en las condiciones determinadas no modifica ni altera la morfología celular normal de los cultivos de las células de neuroblastoma SK-N-MC, células CHO, células MDCK-II y MDCK-II-MDR1, y también los cultivos primarios de células mesenquimatosas, fibroblastos y queratinocitos, todos de origen humano.

40 2.3 Caracterización del aumento de la capacidad de adherencia celular de las células SK-N-MC sobre placas tratadas con laminina mediante ensayo de proliferación con MTT y comprobación de la morfología y densidad celular por microscopía

45 De entre todas las líneas celulares adherentes seleccionadas para el ensayo de transporte con el sistema de la presente invención, las células SK-N-MC neuronales epiteliales tuvieron la menor capacidad de adherencia. Por ello, se seleccionaron las células SK-N-MC para el ensayo del sistema en placas específicamente tratadas para aumentar la adherencia celular.

Varias referencias bibliográficas científicas describen la laminina como el componente de la matriz extracelular que se usa más comúnmente para aumentar la adherencia de células neuronales, como es el caso de las células SK-N-MC (10).

50 Como resultado, las células SK-N-MC se cultivaron en placas de 24 pocillos convencionales y en placas de 24 pocillos previamente tratadas con laminina (Laminin 24-well Multiwell plates, BD) a una densidad celular de 300.000 células por pocillo y 1 ml de medio específico que consistía en medio MEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50 mg/ml de gentamicina y antibiótico al 1% a 37°C y el 5% de CO₂.

Al día siguiente de la siembra de las células SK-N-MC en las placas de 24 pocillos convencionales y en placas de 24 pocillos tratadas con laminina, se simulan las condiciones de transporte según las especificaciones descritas en el ejemplo anterior.

- 5 Una vez transcurrido el tiempo necesario para que las células se recuperen del transporte, se determina la tasa de proliferación de ambos cultivos midiendo la proliferación celular, a los tiempos de 24 y 48 h, usando la prueba MTT descrita en el ejemplo anterior.

La figura 8a muestra la representación de los valores de absorbancia con respecto al tiempo obtenidos midiendo la proliferación mediante el método de MTT en las células cultivadas de manera habitual y las cultivadas sobre la superficie tratada con laminina.

- 10 El análisis de la tasa de proliferación de las células SK-N-MC representado en la figura 8a muestra un aumento en la proliferación de las células de la placa tratada con laminina tras 24 horas en cultivo, debido al hecho de que cubrir con laminina proporciona a las células SK-N-MC una mayor adhesión al sustrato del soporte, permitiendo el establecimiento de un mayor número de células y aumentando por lo tanto el número de células viables en el cultivo. Tras 48 horas en cultivo, la tasa de proliferación de ambos cultivos es igual; sin embargo, en las imágenes de los cultivos celulares (figura 8b) todavía se observa una densidad celular mayor en las placas de cultivo con laminina.

- 15 A su vez, el análisis de la morfología celular de los cultivos de SK-N-MC en placas de 24 pocillos normales y placas de 24 pocillos tratadas con laminina mostrado en la figura 8b, demuestra que el número de células en el cultivo en placas con laminina es mayor que el del cultivo en placa normal a pesar del hecho de que el número de células de partida para ambos es el mismo, lo que reafirma los resultados obtenidos midiendo la proliferación mediante MTT. La no detección de diferencia en la densidad celular mediante el ensayo de proliferación mediante MTT puede deberse a la elevada confluencia celular de ambos cultivos.

Por lo tanto, puede concluirse que las placas tratadas con laminina mantienen la morfología celular del cultivo de partida y favorecen la adhesión celular al sustrato, promovida por el tratamiento con laminina del soporte.

- 25 2.4. Caracterización del aumento de la capacidad de adherencia celular de las células SK-N-MC sobre placas tratadas con poli-L-lisina mediante un ensayo de proliferación con MTT y verificación de la morfología y densidad celular mediante microscopía

2.4.1 Ensayo de la integridad celular del sistema de transporte tras aumentar las exposiciones de poli-L-lisina y determinación de los intervalos de concentración de poli-L-lisina en el sistema de transporte.

Tratamiento de las superficies de cultivo con poli-L-lisina

- 30 La disolución madre de poli-L-lisina está a una concentración de 500 µg/ml, estéril mediante filtración. Las concentraciones finales de poli-L-lisina sometidas a ensayo con las células SK-N-MC fueron de entre 10-200 µg/ml.

Tras definir las concentraciones de poli-L-lisina que van a usarse en el ensayo, se determina la cantidad de poli-L-lisina que va a añadirse en cada caso de modo que la concentración final cumple con la concentración deseada.

- 35 Se añaden 80 µl de la disolución adecuada a los pocillos de la placa de 96 pocillos y las placas se incuban a temperatura ambiente, descubiertas sin la tapa dentro de la cámara de flujo laminar durante 1 hora.

Tras la incubación, se lava cada uno de los pocillos 3 veces con una solución salina atemperada (PBS 1X). Se cubren las placas con sus correspondientes tapas y se exponen a radiación ultravioleta (UV) durante un periodo de tiempo de al menos 1 hora para permitir que se esterilicen las superficies de cultivo.

Se usan estas placas en el plazo de la primera semana tras prepararse.

- 40 Siembra de las células SK-N-MC en las placas tratadas con poli-L-lisina

Las células SK-N-MC se siembran en las placas tratadas con poli-L-lisina a una densidad de 15.000 células por pocillo en 200 µl de medio en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Estas células se cultivan en medio MEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50 mg/ml de gentamicina y antibiótico al 1%.

- 45 Ensayo de la integridad celular tras exposición a concentraciones crecientes de poli-L-lisina

La integridad celular se determinó por medio de la medición de la proliferación celular mediante la prueba MTT.

Tras una breve exposición (4 horas aproximadamente) de las células a la superficie de la placa, se toma la primera medición de la integridad celular, con su correspondiente adición de MTT para determinar el valor inicial o tiempo a las 0 horas.

La prueba MTT se basa en la capacidad que tienen las enzimas mitocondriales de las células vivas para transformar algunos sustratos en otros metabolitos secundarios. La cantidad de compuesto formado depende de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, que es un claro indicador del número de células viables existentes en el cultivo.

5 Específicamente, en esta prueba mitocondrial, Cell Proliferation kit I (MTT) n.º de cat. 1 465 007 Roche, se determina la transformación que llevan a cabo las succinato deshidrogenasas mitocondriales celulares de la sal de tetrazolio para dar cristales insolubles de formazán. Posteriormente las células se permeabilizan y los cristales formados se solubilizan, dando lugar a una disolución coloreada que puede cuantificarse midiendo su absorbancia en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 550 nm.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 10 1. En el momento en el que tiene que someterse a ensayo la capacidad proliferativa o integridad celular, se añaden 10 µl de la disolución de MTT (0,5 mg/ml) al cultivo a cada pocillo, por 100 µl de medio, y se incuba durante 4 horas a 37°C en el incubador.
- 15 2. Cuando finaliza la incubación pueden observarse los cristales de formazán en el interior de las células. Se añaden 100 µl de la disolución de solubilización a cada cultivo o pocillo y se incuba a 37°C en el incubador durante la noche. De esta manera, se permeabilizan las células y se solubilizan los cristales, dando lugar a una disolución coloreada fácilmente cuantificable.
3. Una vez solubilizados los cristales, se lee la placa de cultivo directamente con un lector de multiplacas ELISA a 550 nm. Antes de la lectura es aconsejable limpiar la superficie inferior de la placa con etanol.

20 Concentración de poli-L-lisina en el sistema de transporte

Las gráficas de la figura 10 muestran las curvas de citotoxicidad de las células SK-N-MC tras el contacto con la superficie tratada con poli-L-lisina a diferentes concentraciones.

La figura 10a muestra el intervalo de concentración de poli-L-lisina superior (100-200 µg/ml) sometido a ensayo. En cambio, la figura 10b muestra las concentraciones de poli-L-lisina inferiores (10-75 µg/ml) sometidas a ensayo.

25 Tal como puede observarse en la gráfica 10a, las concentraciones crecientes de poli-L-lisina muestran una reducción en la capacidad proliferativa de las células SK-N-MC. En la figura 10b, se observa que los cultivos expuestos a las concentraciones de poli-L-lisina inferiores muestran una cinética de proliferación que permanece prácticamente inalterada con respecto a la observada en las células no expuestas a la poli-L-lisina.

30 A partir del ensayo anterior, puede deducirse que a pesar de que ninguna de las concentraciones afecta drásticamente a la integridad o capacidad proliferativa del cultivo, a partir de la concentración de poli-L-lisina de 75 µg/ml, la proliferación celular parece reducirse a las 72 horas. Por tanto, el intervalo de concentración de poli-L-lisina en el sistema de transporte es de 10-75 µg/ml, preferiblemente de 50-70 µg/ml, considerando la concentración final preferida de 60 µg/ml.

35 2.4.2 Caracterización de la integridad celular tras el contacto con las superficies tratadas con diferentes concentraciones de poli-L-lisina por medio de la verificación morfológica del cultivo celular

Tratamiento de las superficies de cultivo con poli-L-lisina

La disolución madre de poli-L-lisina está a una concentración de 500 µg/ml, estéril mediante filtración. Las concentraciones finales de poli-L-lisina sometidas a ensayo con las células SK-N-MC fueron de entre 10-50 µg/ml.

40 Tras definir las concentraciones de poli-L-lisina que van a usarse en el ensayo, se determina la cantidad de poli-L-lisina que va a añadirse en cada caso de modo que la concentración final cumpla con la concentración deseada.

Se añaden 300 µl de la disolución adecuada a los pocillos de la placa de 24 pocillos y las placas se incuban a temperatura ambiente, descubiertas sin la tapa dentro de la cámara de flujo laminar durante 1 hora.

45 Tras la incubación, cada uno de los pocillos se lava 3 veces con una solución salina atemperada (PBS 1X). Las placas se cubren con sus tapas correspondientes y se exponen a radiación ultravioleta (UV) durante un periodo de tiempo de al menos 1 hora para permitir esterilizar las superficies de cultivo.

Estas placas se usan en el plazo de la primera semana tras prepararse.

Siembra de las células

Las células se siembran en una placa de 24 pocillos a una densidad celular diferente dependiendo del tipo celular implicado, y estas células se cultivarán en el medio de cultivo específico para cada tipo celular tal como se ha descrito en ejemplos anteriores.

- 5 Para la realización específica de esta realización particular, las células se sembraron con su medio de cultivo específico a 37°C y el 5% de CO₂ en las siguientes densidades: SK-N-MC, 150.000 células por pocillo en 1 ml; MDCK-II-MDR1, 65.000 células por pocillo en 1 ml de medio; células mesenquimatosas humanas, 50.000 células por pocillo en 1 ml de medio; condrocitos articulares humanos, 65.000 células por pocillo en 1 ml de medio.

Análisis de la morfología celular de los cultivos expuestos a poli-L-lisina

- 10 Una vez sembradas las células en la superficie de cultivo tratada con poli-L-lisina, se analiza la morfología celular del cultivo de cada una de las líneas celulares y cultivos primarios incluidos en el ensayo. De forma paralela al análisis de la morfología celular por medio de microscopía de las células expuestas a poli-L-lisina, también se analiza a modo de control la morfología celular de todas las líneas celulares y cultivos primarios en la superficie de cultivo no tratada (control).

- 15 Se analiza la morfología celular mediante observación microscópica de los cultivos celulares de células de neuroblastoma SK-N-MC y MDCK-II-MDR1, y también los cultivos primarios de células mesenquimatosas y condrocitos articulares, todos de origen humano, durante las 24, 48 y 96 horas tras la exposición a la superficie de cultivo tratada con poli-L-lisina.

- 20 La figura 11 muestra el aspecto de cada uno de los cultivos usados durante la exposición a poli-L-lisina. El control corresponde a las células que se cultivaron en placas sin tratamiento y mantenidas en las mismas condiciones que las células en contacto con poli-L-lisina, pero que, sin embargo, no tuvieron ningún contacto con la molécula sometida a ensayo. El análisis se llevó a cabo durante 96 horas. Se observa en las imágenes correspondientes a este ensayo que no hay ninguna diferencia en la morfología celular de los cultivos expuestos a poli-L-lisina con respecto a la morfología de las células no expuestas a contacto con dicha molécula.

- 25 La figura 11a muestra las imágenes correspondientes a los cultivos de las células SK-N-MC; la figura 11b muestra las células MDCKII-MDR1; las células que aparecen en la figura 11c son células mesenquimatosas humanas; y finalmente, la morfología de condrocitos articulares humanos puede observarse en la figura 11d.

- 30 Puede determinarse a partir de estas imágenes que no se observan diferencias en la morfología celular de los cultivos sometidos a ensayo tras su contacto con poli-L-lisina. Por tanto, puede concluirse que el contacto con las superficies tratadas ni modifica ni altera la morfología celular normal de los cultivos de las células de neuroblastoma SK-N-MC, células MDCK-II-MDR1, y también los cultivos primarios de células mesenquimatosas y condrocitos, todos de origen humano.

Ejemplo 3.- Transporte celular en una placa de 96 pocillos para selección de fármacos.

- 35 Las células SK-N-MC se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 40.000 células por pocillo en 200 µl de medio. Estas células se cultivan en su medio específico que consiste en medio MEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50 mg/ml de gentamicina y antibiótico al 1%. Se cultivan a 37°C y el 5% de CO₂.

Al día siguiente a la siembra, se aplica la cobertura del medio de transporte y se simulan las condiciones de transporte de la placa tal como se describió en los ejemplos anteriores.

- 40 Una vez transcurrido el periodo de recuperación de las células transportadas, dichas células están listas para tratarse con diferentes moléculas o fármacos y puede analizarse si estos compuestos tienen efecto sobre la proliferación celular, o citotoxicidad de las células sembradas en dicha placa mediante la prueba MTT, descrita en ejemplos anteriores.

Ejemplo 4.- Transporte células AMSC en una placa de 12 pocillos para el análisis de la expresión de marcadores de membrana en procesos de diferenciación celular.

- 45 Las células AMSC se siembran en placas de 12 pocillos, a una densidad de 80.000 células por pocillo y se cultivan con el medio de cultivo MesenPro especial a 37°C y el 5% de CO₂.

Al día siguiente a la siembra, se aplica la cobertura del medio de transporte con una concentración de agarosa del 0,5% y la concentración final de agarosa de 30 U/ml, que se prepara según lo descrito en el ejemplo 2 y se simulan las condiciones de transporte de la placa tal como se describió en los ejemplos anteriores.

Una vez transcurrido el periodo de recuperación, las células mesenquimatosas se someten al tratamiento específico para la inducción de la adipogénesis, que promueve la diferenciación celular. Tras el tratamiento y tiempo estimados, se analizarán los marcadores específicos y se estudiará la diferenciación.

5 Procedimiento para la inducción de la adipogénesis en las células mesenquimatosas transportadas por el sistema de la invención:

- Las células se mantienen en cultivo con el medio de crecimiento MesenPro durante el tiempo necesario para la formación de la monocapa.

10 - Una vez formada la monocapa, se aplica al cultivo el medio de diferenciación específico (adipogénico) que consiste en medio de crecimiento MesenPro complementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM, dexametasona 1 μ M, 10 μ g/ml de insulina (Sigma I-2767), 200 μ de indometacina y antibiótico al 1%. El medio se cambia cada 3-4 días.

- Después del tercer tratamiento con el medio de diferenciación adipogénica, empiezan a formarse vacuolas lipídicas dentro de las células mesenquimatosas tratadas. Estas vacuolas se detectan por medio de la tinción Oil-red-O.

15 Por lo tanto, tras el periodo de incubación de las células mesenquimatosas con el medio diferenciador específico para la inducción de la adipogénesis, se analizan marcadores específicos y se estudia la diferenciación de las células mesenquimatosas a adipocitos.

El procedimiento del marcaje con Oil-red-O consiste en:

- Retirar de cada uno de los pocillos el medio con cuidado para no arrastrar las células.

20 - Fijar las células con una disolución de paraformaldehído al 4% durante 40 minutos a temperatura ambiente.

- Aspirar con cuidado la disolución fijadora y lavar las células 3 veces con PBS 1X (5 minutos por lavado).

- Aspirar el PBS 1X y aclarar las células 2 veces con agua destilada.

25 - Aspirar el agua y añadir a cada pocillo la cantidad suficiente de una disolución Oil-red-O al 2% (500 μ l-1 ml por pocillo) e incubar durante 50 minutos a temperatura ambiente.

- Transcurridos los 50 minutos retirar el Oil-red-O de los pocillos con las células y lavar las células 3 veces con 1 ml de agua.

30 - Teñir los núcleos celulares con una disolución de hematoxilina (500 μ l) desde 5 hasta 15 minutos a temperatura ambiente.

- Analizar la presencia de las vacuolas lipídicas al microscopio. Los adipocitos tienen cúmulos o gotas de aceite rojo como consecuencia del colorante Oil-red-O, mientras que los núcleos celulares estarán teñidos en negro o azul debido a la hematoxilina

Ejemplo 5.- Transporte de células CHO en tubo para el análisis de la expresión génica:

35 Para el transporte en tubo no es necesaria la siembra de las células sobre ningún soporte, placa, frasco, cámara de cultivo o de otro tipo, sino que se prepara directamente el medio de transporte (agarosa-agarosa).

El medio en el que se cultivan las células CHO es medio F12 de Ham complementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%.

40 Se funde la disolución de agarosa al 2% preparada en PBS 1X en un microondas y se toma el volumen apropiado para preparar una disolución con una concentración final de agarosa del 0,4%, y se mezcla con medio F12 de Ham. Tras la agarosa, se añade la agarosa que se prepara a una concentración de 0,2-2 mg/ml (255,6-2556 U/ml) en tampón de fosfato de potasio pH 6,0, y cuya concentración final en la mezcla será de 24 U/ml; se mezcla bien el contenido del tubo, atemperándolo a 37°C y a continuación se añade un pequeño volumen de medio que contiene 0,5-1 x 10⁶ células CHO por ml de la mezcla.

45 A continuación se lleva el tubo a un contenedor con hielo hasta que la mezcla adquiere la consistencia deseada, lo cual se producirá tras 15-30 minutos de incubación en hielo. Se sella el tubo con Parafilm y se envía para el transporte.

Una vez que el tubo está en el destino, debe desenvolverse con cuidado y desinfectarse con una pequeña cantidad de EtOH al 70% antes de seguir con su manipulación.

5 Para iniciar la digestión del medio de transporte, y la posterior recuperación celular, el tubo debe introducirse en una estufa o incubador a 37-40°C. La incubación en estas condiciones tarda aproximadamente 2 horas. Una vez transcurridas las dos horas de la primera incubación, se saca el tubo de la estufa o incubador y se añade 1 ml de medio o PBS (1X) atemperado a 37°C sobre el volumen de cada tubo, y se mezcla el contenido del tubo con ayuda de una pipeta P1000 para agitar los restos de agarosa que todavía pueden no estar digeridos. El tubo se devuelve a la estufa o incubadora 37-40°C durante otra hora para permitir la completa digestión de la agarosa por la agarasa de la mezcla.

10 Tras la última hora de incubación, se retira el tubo de la estufa o incubador de 37-40°C y se mezcla su contenido con ayuda de una pipeta P1000. Se someten las muestras a una centrifugación suave (800-1000 g) en el mismo tubo en el que se realizó el envío y se retira el sobrenadante resultante de la centrifugación. El sedimento resultante que contiene las células CHO se lava con 1-2 ml de PBS 1X fría (4°C), y tras otra centrifugación se obtiene el sedimento celular limpio y listo para añadir sobre el mismo TRIZOL, un reactivo seleccionado para la extracción de los ácidos nucleicos.

15 Trizol LS es una disolución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina usada para la extracción de ARN. Durante la homogenización o lisis de las muestras, el Trizol LS provoca la ruptura de las células y disuelve los componentes celulares manteniendo la integridad del ARN. La adición de cloroformo seguida por centrifugación separa la disolución en una fase acuosa superior y en una fase orgánica inferior. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa. El ARN total aislado está libre de contaminación con ADN y proteínas.

El procedimiento para el aislamiento de ARN por medio del TRIZOL es el siguiente:

20 - Obtener un sedimento celular por centrifugación. Desechar el sobrenadante y eliminar completamente los restos líquidos con una pipeta. Añadir en una campana de extracción de gases 750 µl de Trizol por cada 5-10·10⁶ células. Transferir a un microtubo y lisar las células con Trizol pipeteando repetidamente. En este punto pueden almacenarse las muestras a -80°C.

- Incubar las muestras durante 5 min a TA para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Añadir 200 µl de cloroformo en la campana de extracción de gases por cada 750 µl de Trizol añadido. Agitar los tubos vigorosamente durante 15 segundos e incubarlos durante 15 minutos a TA.

25 - Centrifugar las muestras en una microcentrífuga a 12000 g 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se observarán diferentes fases: el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa superior. El volumen de esta fase debe ser de aproximadamente el 75% del volumen de Trizol usado para realizar la lisis celular.

30 - En una campana de extracción de gases, transferir la fase acuosa a otro microtubo y precipitar el ARN añadiendo 500 µl de alcohol isopropílico por cada 750 µl de Trizol usado. Mezclar e incubar durante 10 minutos a TA. Transcurrido ese tiempo, centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se observará un precipitado o sedimento de ARN en el fondo del microtubo.

- Eliminar el sobrenadante volcando el microtubo y lavar el sedimento de ARN con etanol al 75% en H₂O tratada con DEPC. Homogeneizar y centrifugar la muestra a 7500 g durante 5 minutos a 4°C.

35 - Desechar el etanol volcando el tubo una vez, es importante eliminar completamente el etanol ya que si quedan restos éstos pueden interferir en reacciones posteriores como la PCR. Eliminar los restos de etanol que quedan en el fondo del microtubo con una pipeta de 10 µl. Una vez eliminado completamente el etanol, secar el sedimento de ARN durante al menos 20 minutos en hielo. No dejar secar el sedimento completamente ya que esto dificultaría su solubilidad y el ARN parcialmente disuelto presenta unas razones de absorbancia $A_{260}/A_{280} < 1,6$. Disolver en 12 µl de H₂O tratada con DEPC e incubarlo durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente centrifugar y almacenar a -80°C durante al menos 12 h antes de proceder a su cuantificación.

Tras la extracción del ARN se realiza la cuantificación, y a continuación se transforma parte de este ARN en ADNc por medio de transcripción inversa. Este proceso de transcripción inversa se lleva a cabo con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScriptTM III.

45 El sistema de síntesis de primera cadena SuperScriptTM III está optimizado para sintetizar ADNc monocatenario a partir de ARN poli-A purificado o ARN total. Mediante este sistema pueden detectarse moléculas de ARN de desde 100 pb hasta más de 12 kb. La cantidad de ARN total de partida puede oscilar entre 1 pg y 5 µg de ARN total. La transcriptasa inversa SuperScriptTM III es una versión de M-MLV RT que se ha mejorado para reducir la actividad de ARNasa H y garantizar una mayor estabilidad térmica. Este enzima se usa para sintetizar ADNc en un intervalo de temperaturas de 42-55°C, garantizando una máxima especificidad, obteniendo una mayor cantidad de ADNc, y más productos de ADNc con toda su extensión en comparación con otras transcriptasas inversas. Dado que la transcriptasa inversa SuperScriptTM III no se inhibe por la presencia de ARN ribosómico y de transferencia, puede usarse para sintetizar ADNc monocatenario a partir de preparaciones de ARN total.

55 El procedimiento a seguir para la obtención de ADNc a partir del ARN extraído por el procedimiento del TRIZOL es el siguiente:

ES 2 398 805 T3

- En un criotubo de PCR se mezclan hasta 5 µg de ARN total junto con una mezcla de cebadores y nucleótidos. Específicamente, se añade al criotubo cebadores oligo dT 50 µM (concentración final) y 1 µl de cebador específico de gen 2 µM y 50 ng/µl de hexámeros aleatorios y el volumen de H₂O tratada con DEPC necesario para alcanzar el volumen final de 10 µl, por microlitro de ARN, hasta un total de 10 µl.
- 5 - Incubar a 65°C 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo dejar en hielo durante al menos 1 minuto.
- Preparar la mezcla de síntesis de ADNc formada por: 2 µl de tampón 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNaseOUT™ (40U/µl) y 1 µl de SuperScript™III RT (200 U/µl).
- Añadir 10 µl de la mezcla de síntesis de ADNc a la mezcla de 10 µl realizada anteriormente con el ARN y los cebadores. Mezclar mediante centrifugación e incubar de la siguiente manera:
- 10 - Cebador oligo dT o específico de gen: 50 minutos a 50°C
- Hexámeros aleatorios: 10 minutos a 25°C seguido por 50 minutos a 50°C
- Terminar la reacción a 85°C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo enfriar en hielo.
- Centrifugar y añadir 1 µl de ARNasa H a cada tubo e incubar durante 20 minutos a 37°C.
- El ADNc sintetizado puede usarse inmediatamente o puede almacenarse a -20°C.
- 15 El kit incluye un ARN control: ARN de HeLa (10 ng/µl), y cebadores para amplificar el gen de β-actina a partir de este ARN. Como reacciones control para garantizar el correcto funcionamiento del kit, debe realizarse lo siguiente:
- Diluir el ARN de HeLa hasta 100 pg/µl con H₂O tratada con DEPC.
- Preparar la mezcla de ARN y cebadores en microtubos de PCR.

| reactivo | Control +RT | Control -RT |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| ARN de HeLa diluido | 1 µl | 1 µl |
| Oligo dT | 1 µl | 1 µl |
| mezcla de dNTP 10 mM | 1 µl | 1 µl |
| H ₂ O tratada con DEPC | 7 µl | 7 µl |

- 20 - Incubar las muestras a 65°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo incubar en hielo durante al menos 1 minuto. Centrifugar y añadir lo siguiente:

| Reactivo | Control +RT | Control -RT |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Tampón 10X | 2 µl | 2 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 4 µl | 4 µl |
| DTT 0,1 M | 2 µl | 2 µl |
| RNaseOUT™ (40U/µl) | 1 µl | 1 µl |
| SuperScript™III RT (200 U/µl) | 1µl | 1 µl |
| H ₂ O tratada con DEPC | – | 1 µl |

- Centrifugar e incubar las muestras a 50°C durante 50 minutos.
- 25 - Terminar la reacción a 85°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo enfriar en hielo.
- Centrifugar. Añadir 1 µl de ARNasa H a cada tubo e incubar durante 20 minutos a 37°C.

- Preparar un microtubo de PCR para cada reacción control añadiendo: 38,1 µl de H₂O tratada con DEPC, 5 µl de tampón de PCR 10X sin Mg, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de mezcla de dNTP, 1 µl de β-actina directa (10 µM), 1 µl de β-actina inversa (10 µM), 2 µl de ADNc, 0,4 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl), siendo el volumen final de la reacción de 50 µl.
- 5
- Centrifugar e introducir los microtubos de PCR en el termociclador. Llevar a cabo la PCR siguiendo el siguiente programa: 2 minutos a 94°C y 40 ciclos formaos por tres etapas de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C.
 - Una vez terminada la PCR, mantener los microtubos a 4°C.
- 10
- Analizar 10 µl de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa. Debe observarse una banda correspondiente en el control +RT a la altura de 353 pb de al menos 25 ng del producto. No debe observarse ninguna una banda en el control –RT.

Esta muestra de ADNc permite el análisis de la expresión génica por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de cualquier gen para el cual se diseñen los oligos o cebadores específicos.

El procedimiento de PCR se describe a continuación:

- 15
- Descongelar todos los reactivos necesarios para realizar la PCR, y una vez descongelados mantenerlos en hielo.
 - Preparar la mezcla de PCR: (tener en cuenta el número total de muestras que van a amplificarse + control positivo + control negativo + 1).

| Reactivo | 1 reacción (1X) | Concentración final |
|--------------------------|-----------------|---------------------|
| H ₂ O | 39,3 µl | |
| tampón 10X | 5 µl | 1X |
| MgCl ₂ 100 mM | 1,5 µl | 3 mM |
| dNTP 100 mM | 1 µl | 200 µM |
| cebador F 10 µM | 1 µl | 0,2 µM |
| cebador R 10 µM | 1 µl | 0,2 µM |
| ADNc (1:10) | 1 µl | 1:500 |
| Taq polimerasa | 0,2 µl | 1 OR |

20

El programa de PCR usado fue el siguiente: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C seguido por varios ciclos específico para cada gen que va a amplificarse, que consistirá en las siguientes etapas: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación específica del gen que va a amplificarse y 60 segundos 72°C y un último ciclo de 10 minutos a 72°C.

El resultado de la amplificación del gen específico por PCR se detecta por electroforesis en gel de agarosa.

25

Ejemplo 6.- Protección del sistema de transporte frente a la agitación mecánica:

30

Con el fin de demostrar que el sistema de mezcla de transporte de agarosa-agarosa de la presente invención proporciona protección al cultivo transportado frente a oscilaciones y movimientos durante el transporte, el cultivo de células SK-N-MC se sometió a movimientos mecánicos inducidos durante determinados periodos de tiempo: 2, 4, 6 y 8 horas.

Siembra de las células:

Las células SK-N-MC se sembraron en placas de 24 pocillos, disponiendo 200.000 células en cada uno de los pocillos, y en su correspondiente medio de cultivo.

Adición del medio de transporte sobre el cultivo celular:

- 5 Cuando el cultivo alcanzó la confluencia adecuada (60-70%, tras 2 días), el medio de cultivo de parte de los pocillos se sustituye por la cobertura de agarosa más agarasa, y en los pocillos restantes se sustituye por medio nuevo sin la mezcla de transporte.

- 10 Una vez que el medio de transporte se mezcla bien y se atempera a 37°C, se retira el volumen de medio de los pocillos de la placa de 24 pocillos en la que la mezcla se añade gradualmente, cubriendo todo el cultivo celular. El medio en los pocillos en los que sólo va a sustituirse el medio de cultivo, también se sustituye por medio nuevo.

Por tanto, 1 ml de la mezcla se añade sobre las células sembradas en cada uno de los pocillos y la placa se mantiene en hielo de modo la mezcla adquiere la consistencia deseada, aproximadamente 15-30 minutos tras añadirse a la placa.

Preparación de la placa para el transporte y condiciones de transporte:

- 15 La placa se sella entonces completamente con Parafilm y se mantiene a la temperatura de transporte, 18-23°C, preferiblemente, 22°C, durante 24 horas.

- 20 Una vez que han transcurrido 24 horas después de preparar las placas, las placas se transfieren al agitador y comienza el tiempo de exposición a los movimientos. Antes de situar las células en agitación, parte de los pocillos se cuentan para determinar el número de partida de células/pocillo ($t = 0$ h). Las células se mantienen en agitación durante 2, 4, 6 y 8 horas. Tras completarse estos periodos de tiempo, se extraen las placas correspondientes de la agitación, y las células adheridas se desprenden entonces y se cuentan. Entonces, tras el recuento celular, se determina el grado de adhesión de las células dependiendo de la presencia o no de la cobertura de agarosa más agarasa.

En la figura 12 se muestra el número de células recogidas de los pocillos que contenían medio (control) y los que contenían la mezcla de transporte (agarosa+agarasa) durante el periodo de agitación (horas). Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

- 25 En la figura 12 se muestra el número de células que se mantuvieron adheridas a la superficie de cultivo durante el tiempo en agitación. En esta figura se muestra cómo el número de células recuperadas de los pocillos en los que se aplicó la cobertura durante la agitación (agarosa+agarasa) era mayor que las recogidas de los pocillos que contenían sólo medio de cultivo (sin la cobertura de agarosa más agarasa) en los que se completó la agitación.

- 30 Estos resultados de este ensayo demuestran que la cobertura de agarosa más agarasa proporciona al cultivo protección frente a los movimientos mecánicos y las oscilaciones que pueden producirse durante el periodo de transporte.

Ejemplo 7.- Análisis de la integridad de la monocapa celular tras retirarse la cobertura

- 35 El objetivo de este ensayo consiste en verificar/demostrar que la integridad de la monocapa celular no se ve afectada tras la exposición del cultivo a la mezcla de agarosa más agarasa y especialmente que la retirada de la cobertura no altera la disposición en monocapa del cultivo. Este ensayo refuerza la validez del sistema en su aplicación como un sistema de cultivo tridimensional (3D).

Para ello, se usa la línea celular MDCK-II-MDR1. Debido a sus características y propiedades, estas células se usan como un modelo *in vitro* para determinar la integridad de la monocapa ya que forman una fuerte monocapa polarizada en un corto periodo de tiempo (2-3 días).

Siembra de las células:

- 40 Las células MDCK-II-MDR1 se siembran en placas Transwell multipocillo de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células/pocillo. El volumen del pocillo en la posición basal es de 800 μ l, mientras que el volumen del pocillo en la posición apical (en la que se sembraron las células) es de 400 μ l. La placa se mantiene en el incubador a 37°C y el 5% de CO₂.

Determinación de la formación de la monocapa:

- 45 El día tras la siembra, la resistencia (TEER, en Ω) de la monocapa se determina con el equipo MilliCell RS (Millipore) para iniciar la monitorización diaria de la formación de la monocapa; se registran los valores de resistencia. Entonces el medio de los pocillos en ambas posiciones apical y basal se sustituye para retirar las células que no se adhirieron a superficie la de cultivo.

La resistencia de la monocapa se mide diariamente para obtener los valores descritos como indicadores de la monocapa integral ($40-80 \Omega \times \text{cm}^2$). Estos valores se alcanzan tras 2 ó 3 días en cultivo.

Adición del medio de transporte sobre el cultivo celular:

- 5 Una vez que se obtienen los valores de TEER que indican que se forma la monocapa, el medio de la mitad de los pocillos de la placa en posición apical se sustituye por la cobertura de agarosa más agarasa para recubrir el cultivo. La composición de la cobertura de transporte consiste en una mezcla de agarosa al 0,5% y 60-80 U/ml de agarosa en agarasa al 1%. Cuando la mezcla se solidifica, la placa se mantiene a 22°C durante 24 horas simulando el periodo de transporte.

Preparación de la placa para el transporte y condiciones de transporte:

- 10 La placa se sella entonces completamente con Parafilm y se mantiene a la temperatura de transporte, 18-23°C, preferiblemente, 22°C.

Recepción de la placa, retirada del medio de transporte:

- 15 Tras el periodo de transporte necesario para alcanzar su destino, en este caso se han sometido a prueba 24 horas de transporte, la placa debe desenvolverse por completo y su superficie desinfectarse con EtOH antes de introducirse en el incubador de cultivo celular a 37°C para comenzar la digestión de la cobertura de agarosa más agarasa y la posterior verificación de la integridad de la monocapa.

- 20 Por tanto, la placa se introduce en un incubador a 37°C y el 5% de CO₂. La incubación en estas condiciones debe ser durante aproximadamente 2 horas. Una vez que han transcurrido las dos horas de la primera incubación, la placa se saca del incubador y se añaden 400 µl de medio de cultivo celular atemperado a 37°C a cada uno de los pocillos, y la placa se devuelve al incubador durante otra hora.

- 25 Tras la última hora de incubación, se retira la cobertura de agarosa más agarasa. El contenido del pocillo se mezcla de forma muy suave y cuidadosa con la ayuda de una pipeta P1000, y el medio de cultivo mezclado con medio de cultivo se retira de forma cuidadosa de modo que no arrastre y desprenda las células que están adheridas al fondo del pocillo. Se añade entonces medio nuevo atemperado. En este punto, es necesario intentar retirar la máxima cantidad de medio con agarosa, pero sin poner en riesgo el cultivo.

Análisis de la integridad de la monocapa tras retirarse la cobertura de agarosa más agarasa

Una vez que se completan todos los pocillos de la placa, cuando todos contienen medio nuevo, se verifica el estado de la monocapa. Para ello, la resistencia de la monocapa se medirá en primer lugar por medio de TEER y luego se somete a ensayo la medición del paso de dextrano de 4 KDa a través de la monocapa celular.

- 30 Medición de TEER de la placa tras el transporte:

La medición de TEER se toma tanto en los pocillos en los que se añadió la cobertura de agarosa más agarasa durante el transporte como en los pocillos que se mantuvieron sólo con medio de cultivo durante todo el proceso.

- 35 Los valores de resistencia obtenidos en los pocillos expuestos a la mezcla se compararon con los obtenidos en los pocillos sometidos a ensayo sólo con medio. Se compararon además con los valores de resistencia antes de la disposición de la mezcla de agarosa más agarasa sobre parte del cultivo.

Verificación de la cohesión e integridad celular de la monocapa por medio del análisis del paso de dextrano tras el transporte:

- 40 El ensayo de dextrano se usa para determinar el grado de cohesión celular del cultivo sembrado en las placas Transwell, que es un indicador directo del estado de la monocapa. El polímero de dextrano se une a moléculas de isocianato de fluoresceína (FITC), de manera que se detecta midiendo la fluorescencia. Cuanto más integral sea la monocapa celular, permitirá un menor paso de la disolución de dextrano y será menor la fluorescencia detectada en la posición basal; en cambio, si la monocapa no tiene una coherencia adecuada, el dextrano la atravesará más fácilmente y será mayor la fluorescencia detectada en la posición basal. Por tanto, el ensayo de paso de dextrano se llevó a cabo tras el periodo de transporte tanto en los pocillos sometidos a la mezcla de transporte de agarosa más agarasa como en los pocillos no expuestos a la cobertura (sólo medio).

Para llevar a cabo el análisis, el medio de cultivo de los pocillos en la posición basal se sustituye por 1 ml de medio nuevo y el medio de los pocillos en la posición apical se sustituye por una disolución de dextrano de 1 mg/ml preparada en medio de cultivo.

Tras una incubación de 3 horas a 37°C y en la oscuridad, se tomaron muestras tanto de los pocillos en la posición apical como en la posición basal, y la fluorescencia de cada una de las disoluciones se mide adecuadamente ($\lambda_{ex} = 485$, $\lambda_{em} = 538$).

- 5 Los valores de fluorescencia de los pocillos en la posición basal de las células tratadas con la mezcla de agarosa más agarosa y las células cultivadas sólo con el medio de cultivo se compararon durante el análisis.

Una vez que se tomó la medición de la fluorescencia del dextrano, la disolución de dextrano contenida en los pocillos analizados se sustituye por medio nuevo para permitir el cultivo durante 24 horas más y para analizar de nuevo la integridad de la monocapa tras ese periodo.

10 Integridad de la monocapa 24 horas tras retirarse la cobertura de agarosa más agarosa:

24 horas tras retirar la cobertura de agarosa más agarosa, la integridad de la monocapa se verifica de nuevo para asegurarse de que el cultivo aún es estable. Este control incluye medir la resistencia de la monocapa por medio de TEER y analizar la cohesión celular por medio del paso de dextrano tal como se realizó en el día anterior tras retirarse la cobertura.

- 15 En la figura 13a se muestran los valores de resistencia (TEER) obtenidos a partir de la medición de los pocillos control que se expusieron a la mezcla. Muestra tres medidas diferentes que corresponden al momento antes de añadir la cobertura de agarosa más agarosa sobre el cultivo (antes), el momento inmediatamente después de retirarse la cobertura (0 h) y 24 horas tras retirarse la agarosa más agarosa (24 h). La lectura se realizó en 12 pocillos para cada una de las dos condiciones diferentes; pocillos control con medio y pocillos con cobertura de agarosa más agarosa.

- 20 En la figura 13b se muestra el porcentaje del dextrano detectado en los pocillos en posición basal, es decir, el porcentaje de dextrano que atravesó la monocapa celular. Se realizaron dos lecturas, la primera correspondiente al momento inmediatamente después de retirarse la cobertura (0 h) y la segunda a 24 horas tras retirarse la mezcla de agarosa más agarosa (24 h). El análisis se llevó a cabo en 12 pocillos para cada una de las dos condiciones diferentes; pocillos control con medio y pocillos con cobertura de agarosa más agarosa.

- 25 A partir de los resultados obtenidos, tal como se muestra en las figuras 13a y 13b, los valores de TEER obtenidos de los pocillos tratados con la mezcla y las condiciones de transporte no mostraron ninguna diferencia con respecto a los registrados para los pocillos control en los que sólo se añadió medio de cultivo.

El porcentaje del paso de dextrano a través de la monocapa detectado para los pocillos expuestos a la mezcla y las condiciones de transporte permanecieron inalterados con respecto al porcentaje detectado para los pocillos control.

- 30 Los resultados demuestran que la aplicación de la mezcla de transporte formada por agarosa más agarosa no afecta a la integridad de la monocapa.

REFERENCIAS

- 35 1 - Wang L, Verbruggen G, Almqvist K.F, Elewaut D, Broddez C, Veys E.M. 2001. "Flow cytometry analysis of the human articular chondrocyte phenotype in vitro". *Osteoarthritis and Cartilage*, 9: 73-84.

2 - Wang L, Almqvist K.F, Broddez C, Veys E.M, Verbruggen G. 2001. "Evaluation of chondrocyte cell-associated matrix metabolism by flow cytometry". *Osteoarthritis and Cartilage*, 9: 454-462.

- 40 3 - Zimrin A.B, Pepper M.S, McMahon G.A, Nguyen F, Montesano, Maciag T. 1996. "An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro". *The Journal of Biological Chemistry*, 271(51):32499-502.

4 - Ernst M, Oates A, Dunn A.R. 1996. "Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/motigen-activated protein kinase pathways". *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (47): 30136-43.

- 45 5 - Laurance M.E, Kwok R.P, Huang M.S, Richards J.P, Lundblad J.R, Goodman R.H. 1997. "Differential activation of viral and cellular promoters by human T-cell lymphotropic virus-1 tax and cAMP-responsive element modulator isoforms". *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5): 2646-51.

6 - Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams P.J, Bauss F, Of Clerck Y.A, Mundy G.R. 1997. "Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronat and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2" *The Journal of Clinical Investigation*, 99(10): 2509-17.

- 7 - Kirsc K.H, Georgescu M.M, Ishimaru S, Hanafusa H. 1999. "CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11): 6211-6.
- 8 - Ivankovic-Diki I, Grönroos E, Blaukat A, Barth B.U, Dikic I. 2000- "Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins". *Nature Cell Biology*, 2(9): 574-81.
- 5 9 - Miller K.A, Chung J, Lo D, Jones J.C, Thimmapaya B, Weitzmen S.A- 2000. "Inhibition of laminin-5 production in breast epithelial cells by overexpression of p300". *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11): 8176-82.
- 10 10 - Leventhal P.S, Feldman E.L 1996. "Tyrosine phosphorylation and enhanced expression of paxillin during neuronal differentiation in vitro". *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11): 5957-60.
- 11- Khademhosseini A, May A, Sefton M.V. 2005. "Conformal coating of mammalian cells immobilized onto magnetically driven beads". *Tissue Engineering*, 11(11-12): 1797-806.
- 12 - Jones K.S, Sefton M.V, Gorczynski R.M. 2004. "in vivo recognition by the host adaptive immune system of microencapsulated xenogeneic cells". *Transplantation*, 78(10): 1454-62.
- 13 - Rahforth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Bräuer R. 1998. transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits". *Osteoarthritis and cartilage*, 6(1): 50-65.
- 15 14 - Ling Y, Rubin J, Deng Y, Huang C, Demirci U, Karp J.M, Khademhosseini A. 2007. "A cell-laden microfluidic hydrogel" *Lab on a Chip*, 7(6): 756-62.
- 15 - Balgude A.P, Yu X, Szymansky R.V, Bellamkonda R.V. 2001. "Agarose gel stiffness determines ratio of DRG neurite extension in 3D cultures". *Biomaterials*, 22(10): 1077-84.
- 20 16 - Lin P-W, Wu C-C, Chen C-H, Ho H-O, Chen Y-C, Sep M-T. 2005. "Characterization of cortical neuron outgrowth in two- and three-dimensional culture systems". *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 75(1): 146-57.
- 17 - Mauck R.L, Byers B.A, Yuan X, Tuan R.S. "Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSC in 3D culture in response to dynamic loading". *Biomechanics and Modelling in Mechanobiology*, 6(1-2): 13-25.
- 25 18 - Martin B.C, Miner. E.J, Wiseman S.L, Klank R.L, Gilbert R.J. 2008. "Agarose and methylcellulose hydrogel blends for nerve regeneration applications". *Journal of Neural Engineering*, 5(2): 221-31.
- 19 - Luo Y, Shoichet M.S. 2004. "Light-activated immobilization of biomolecules to agarose hydrogels for controlled cellular response". *Biomacromolecules*, 5(6): 2315-23.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de transporte celular caracterizado porque comprende un soporte celular, células y una mezcla homogénea de agarosa y agarasa, que garantiza la integridad y viabilidad celular durante el proceso de transporte.
- 5 2. Sistema de transporte celular según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas células pertenecen a cualquier tipo celular
3. Sistema de transporte celular según la reivindicación 1-2, caracterizado porque dichas células se seleccionan del grupo de células adherentes, células semi-adherentes y células no adherentes.
- 10 4. Sistema de transporte según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las células son de origen animal.
5. Sistema de transporte según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las células se seleccionan del grupo de células humanas, murinas, caninas, bovinas y/u ovinas.
- 15 6. Sistema de transporte según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las células se seleccionan del grupo de células nerviosas, células del sistema nervioso central, células del sistema nervioso periférico, células del sistema dermo-epitelial, células del sistema osteoarticular, células progenitoras pluripotenciales embrionarias, células progenitoras pluripotenciales adultas, células progenitoras multipotenciales embrionarias, células progenitoras multipotenciales adultas, células del sistema hematopoyético, células del sistema inmunitario y/o células del sistema muscular.
- 20 7. Sistema de transporte según las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque las células se seleccionan del grupo de neuronas, células de la glía, células no gliales, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, células glandulares, células corneales, células retinianas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células epiteliales, plaquetas, timocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, miocitos, hepatocitos, células renales, células uretrales, cardiomiocitos, mioblastos y/o células germinales.
- 25 8. Sistema de transporte según las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque las células son células tumorales o líneas celulares establecidas a partir de cualquiera de los tipos celulares mencionados anteriormente.
9. Sistema de transporte según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque las células están genéticamente modificadas.
- 30 10. Sistema de transporte según las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque las células son neuronas.
11. Sistema de transporte según las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque las células son neuronas genéticamente modificadas.
- 35 12. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las células se cultivan en forma de monocapa sobre la cual se añade la mezcla de agarosa y agarasa.
13. Sistema de transporte celular que comprende células según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las células se cultivan en suspensión incluidas en la mezcla de agarosa y agarasa.
14. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte celular presenta cualquier formato de cultivo celular.
- 40 15. Sistema de transporte celular según la reivindicación 14, caracterizado porque dicho formato se selecciona del grupo que comprende placas, frascos, tubos, cámaras de cultivo, botellas o sistemas asimétricos de tipo Transwell (cultivo tridimensional).
16. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones 12-15, caracterizado porque la superficie del soporte celular opcionalmente incluye componentes de la matriz extracelular que aumentan la capacidad de adherencia de las células al soporte, permitiendo el cultivo celular monocapa.
- 45 17. Sistema de transporte celular según la reivindicación 16, caracterizado porque dicho componente de la matriz extracelular que aumenta la capacidad de adherencia de las células al soporte es poli-L-lisina a una concentración de 10 – 75 µg/ml.
18. Sistema de transporte celular según la reivindicación 17, caracterizado porque la concentración de poli-L-lisina en el soporte celular es de 50 – 75 µg/ml.

19. Sistema de transporte celular según la reivindicación 18, caracterizado porque la concentración de poli-L-lisina en el soporte celular es de 60 µg/ml.
- 5 20. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de agarosa en el medio de transporte es de entre 60 y 90 unidades por mililitro de agarosa al 1%.
21. Sistema de transporte celular según la reivindicación 20, caracterizado porque la concentración de agarosa en el medio de transporte es preferentemente de 80 unidades por mililitro de agarosa al 1%.
22. Sistema de transporte según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la agarosa usada es agarosa de bajo punto de fusión
- 10 23. Sistema de transporte según la reivindicación 22, caracterizado porque el punto de fusión de la agarosa es próximo a 42°C.
24. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración final de agarosa en el medio de transporte es del 0,2 al 0,6%.
- 15 25. Sistema de transporte celular según la reivindicación 24, caracterizado porque la concentración final de agarosa en el medio de transporte es del 0,5%.
26. Sistema de transporte celular según la reivindicación 25, caracterizado porque comprende una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 0,5% y agarosa a una concentración de 80 unidades por mililitro de agarosa al 1%.
- 20 27. Sistema de transporte que comprende una mezcla de agarosa y agarasa según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la mezcla de agarosa y agarasa permanece en estado semi-sólido a temperaturas no superiores a 25°C.
28. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la mezcla de agarosa y agarasa permanece en estado líquido cuando se digiere la agarosa por la agarasa.
- 25 29. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la mezcla de agarosa y agarasa se retira del soporte celular dejando el cultivo celular listo para usarse en diferentes aplicaciones.
- 30 30. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque permite la extracción de las células del sistema de transporte mediante técnicas de cultivo celular básicas.
31. Sistema de transporte celular según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque garantiza la viabilidad e integridad celular de al menos el 85% de las células cultivadas.
32. Método para el transporte de células que implica la preparación del sistema de transporte según las reivindicaciones 1-26, el transporte y la recuperación de las células.
33. Método para el transporte de células según la reivindicación 32, caracterizado porque la etapa de preparación del sistema de transporte celular comprende las siguientes etapas:
- 35 a. sembrar el cultivo celular,
- b. preparar la mezcla de agarosa y agarasa según las reivindicaciones 20-26,
- c. añadir la mezcla de la etapa b al cultivo celular,
- d. solidificar la mezcla de agarosa y agarasa,
- e. sellar el sistema de transporte.
- 40 34. Método para el transporte de células según la reivindicación 33, caracterizado porque la etapa b implica las siguientes etapas:
- 45 i.mezclar la disolución de agarosa en el medio de cultivo específico para el tipo del cultivo celular que va a transportarse a la concentración establecida según las reivindicaciones 24-25,
- ii.añadir la agarasa a la concentración establecida según las reivindicaciones 20-21, a la disolución de agarosa de la etapa i,
- iii.homogenizar la mezcla y atemperarla a 37°C.

35. Método para el transporte de células según las reivindicaciones 32-34, caracterizado porque la etapa c implica recubrir las células cultivadas en monocapa con la mezcla de la etapa b preparada según la reivindicación 34.
- 5 36. Método para el transporte de células según las reivindicaciones 32-34, caracterizado porque la etapa c implica la mezcla homogénea de las células en suspensión con la mezcla de la etapa b preparada según la reivindicación 34.
37. Método para el transporte de células según las reivindicaciones 32-34, caracterizado porque la etapa d se lleva a cabo a temperatura inferior a 37°C en un periodo de 15-30 minutos.
- 10 38. Método para el transporte de células según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la etapa de transporte se lleva a cabo a temperaturas no superiores a 25°C, siendo el tiempo de transporte no superior a 60 horas.
39. Método para el transporte de células según la reivindicación 38, caracterizado porque el transporte se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de entre 18 y 23°C, siendo el tiempo de transporte no superior a 48 horas.
- 15 40. Método para el transporte de células según la reivindicación 39, caracterizado porque el transporte se lleva a cabo a una temperatura de 22°C.
41. Método para el transporte de células según las reivindicaciones 32-40, caracterizado porque el transporte se realiza en el interior de dispositivos de acondicionamiento portátiles que pueden mantener los intervalos de temperatura durante el tiempo adecuado independientemente de la temperatura ambiente.
- 20 42. Método para el transporte de células según las reivindicaciones 38-40, caracterizado porque la viabilidad de las células transportadas es de al menos el 85%.
43. Método para el transporte de células según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la recuperación de las células comprende las siguientes etapas:
- 25 f. digerir la mezcla de agarosa y agarasa,
- g. retirar el medio de transporte y sustituirlo por medio de cultivo,
- h. restablecer el cultivo celular.
44. Método para el transporte de células según la reivindicación 43, caracterizado porque la etapa f comprende las siguientes etapas:
- 30 1 incubar el sistema de transporte a 37°C durante un periodo de tiempo de entre 1,5-2 horas,
- 2 añadir medio de cultivo atemperado,
- 3 incubar el sistema durante una hora adicional a 37°C.
45. Método para el transporte de células según la reivindicación 43, caracterizado porque cuando las células están en suspensión, la etapa f comprende una etapa 4 adicional que consiste en centrifugar el sistema a 800-1000 g.
- 35 46. Método de transporte de células según la reivindicación 43, caracterizado porque el restablecimiento del cultivo celular implica la incubación de las células a 37°C y el 5% de CO₂.
47. Método para el transporte de células según la reivindicación 43, caracterizado porque las células se extraen del soporte que las transportaba.
- 40 48. Método para el transporte de células según la reivindicación 43, caracterizado porque las células permanecen en el propio soporte que las transportaba.
49. Uso del sistema de transporte según las reivindicaciones 1-31, para llevar a cabo ensayos de biología celular y/o molecular.
- 45 50. Uso del sistema de transporte según la reivindicación 49, para llevar a cabo ensayos seleccionados del grupo que comprende las pruebas de fármacos, biomateriales y nanopartículas, ensayos funcionales, estudios morfológicos, estudios para caracterizar la expresión génica, estudios para caracterizar la expresión de proteínas.

FIGURA 1

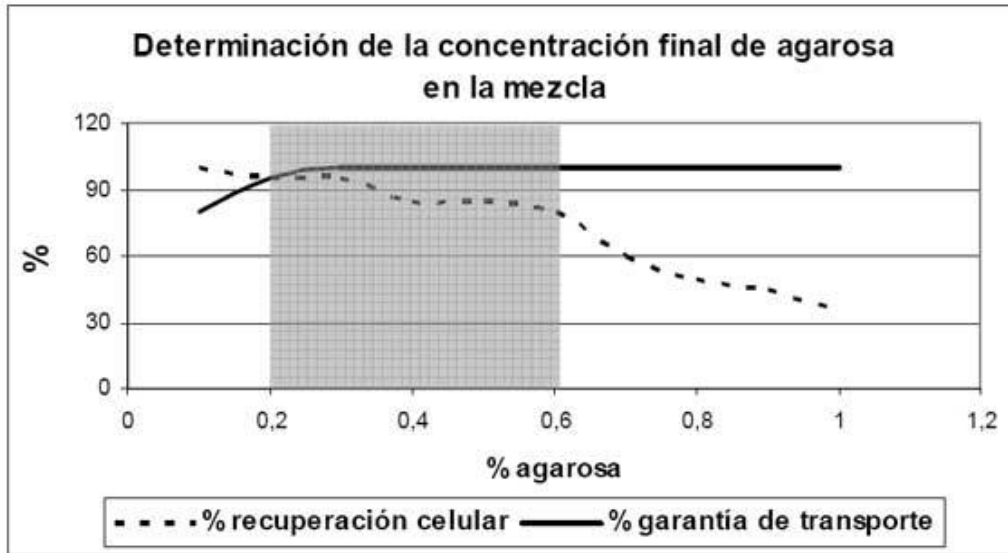


FIGURA 2

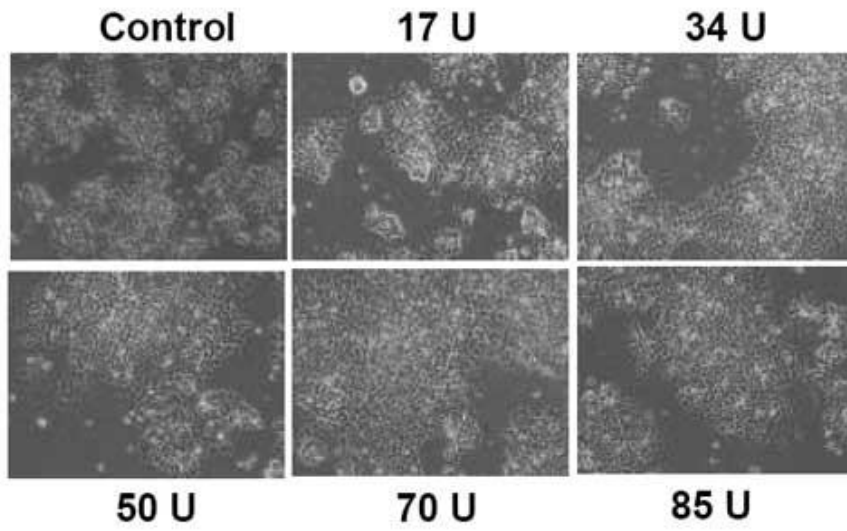


FIGURA 3

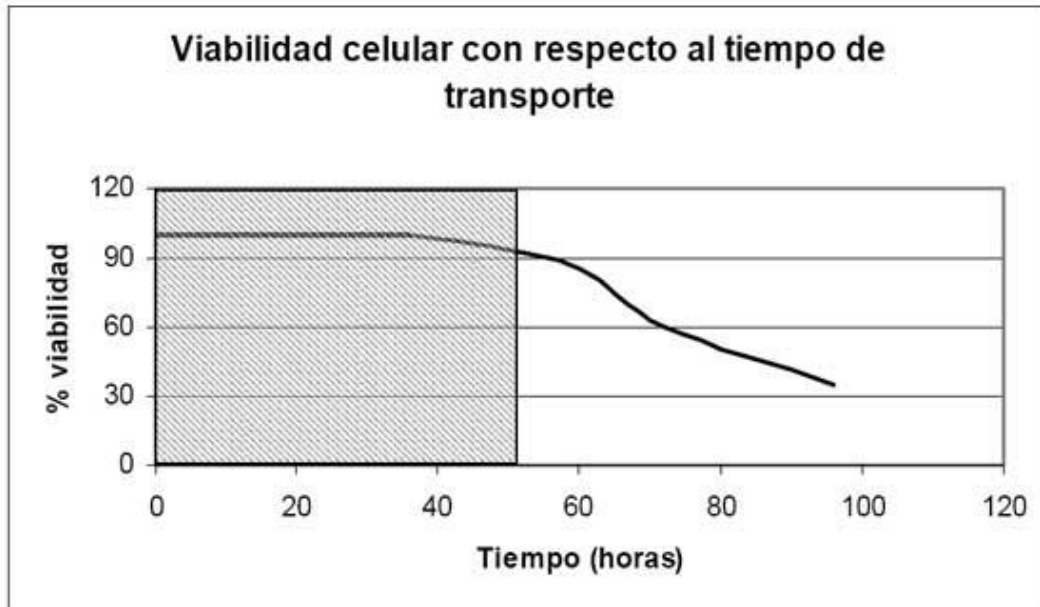


FIGURA 4

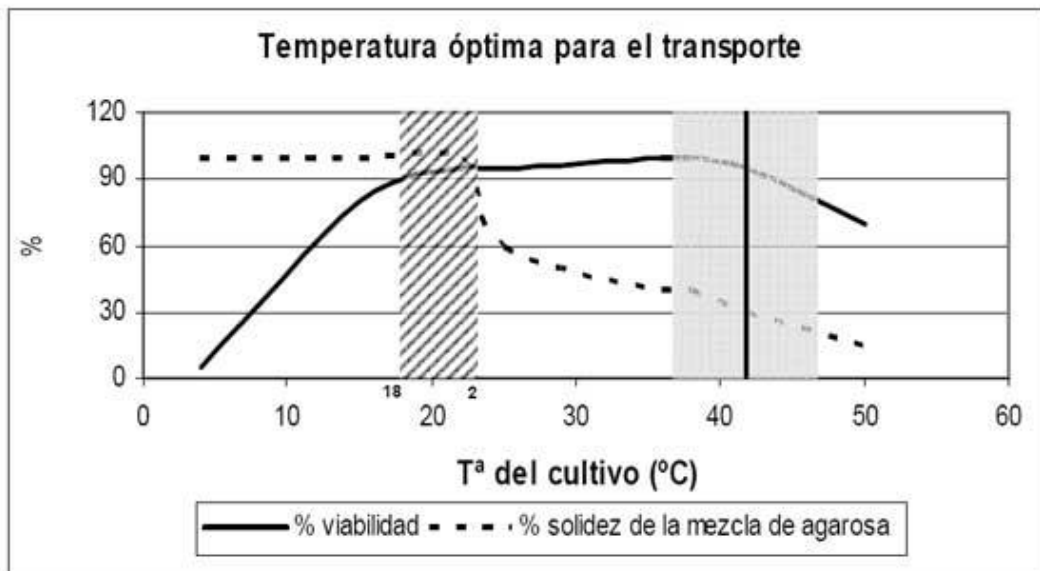


FIGURA 5

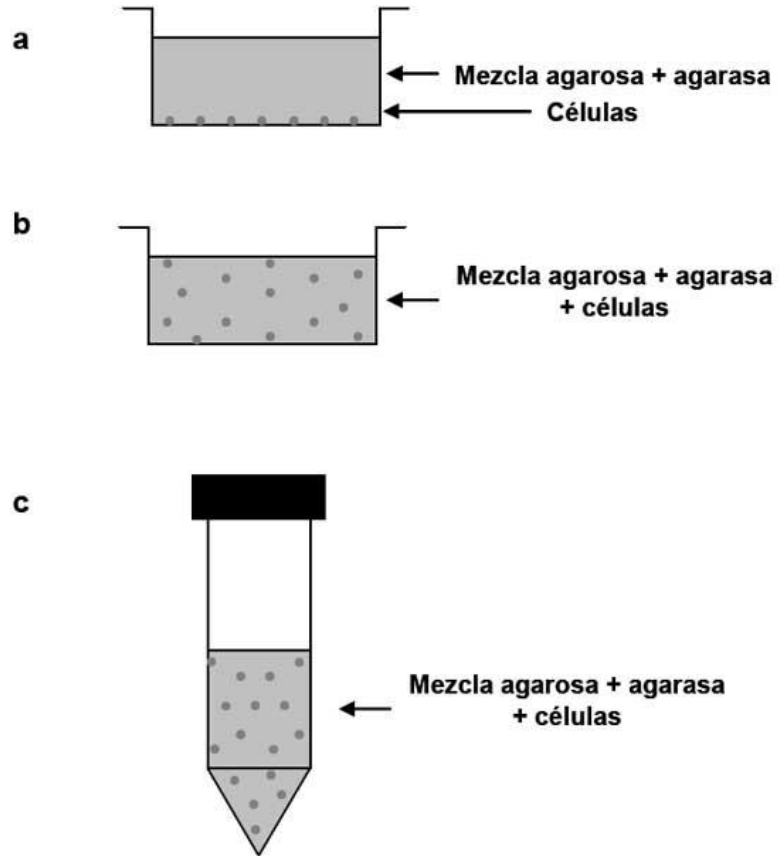


FIGURA 6

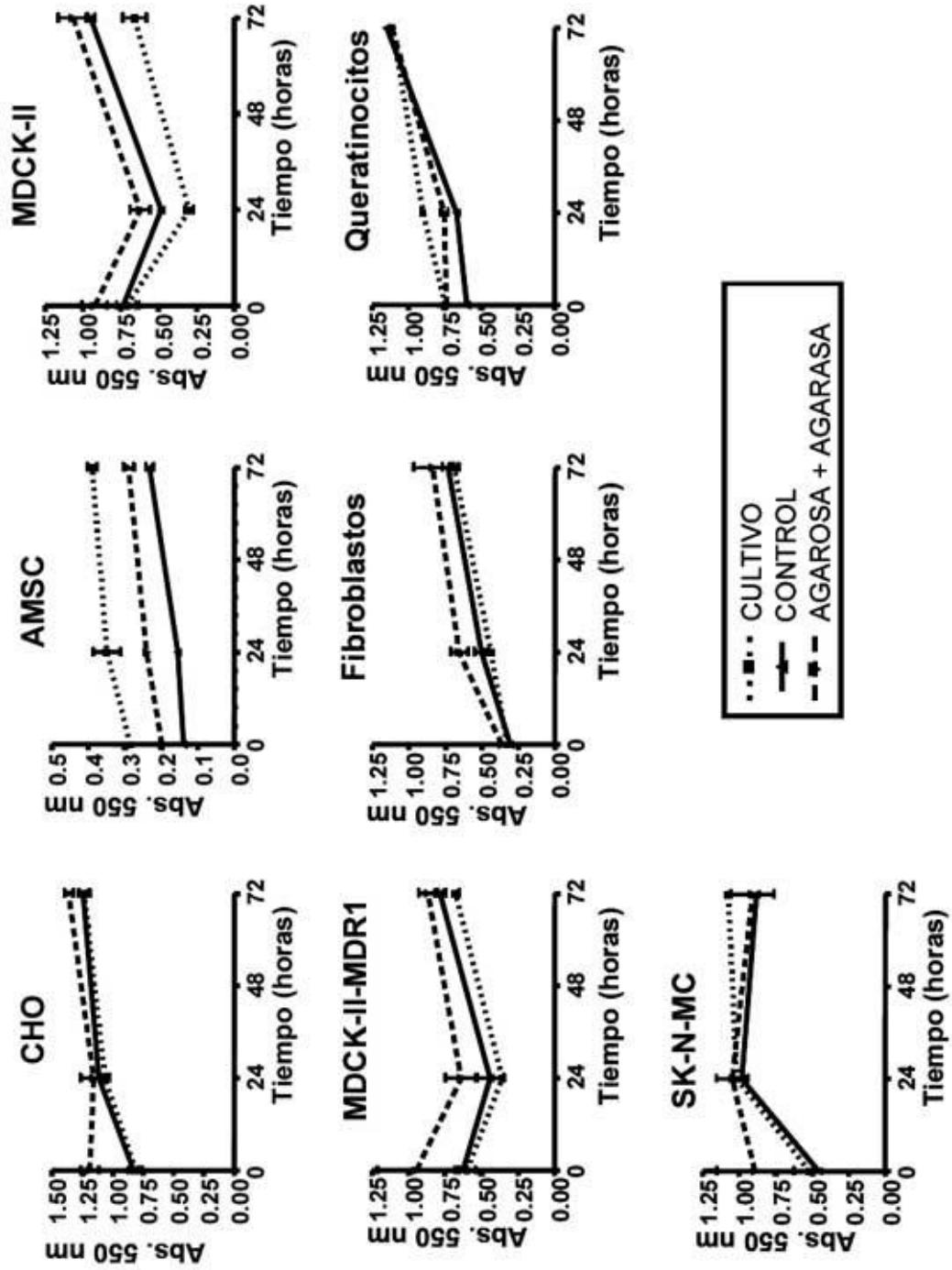


FIGURA 7a

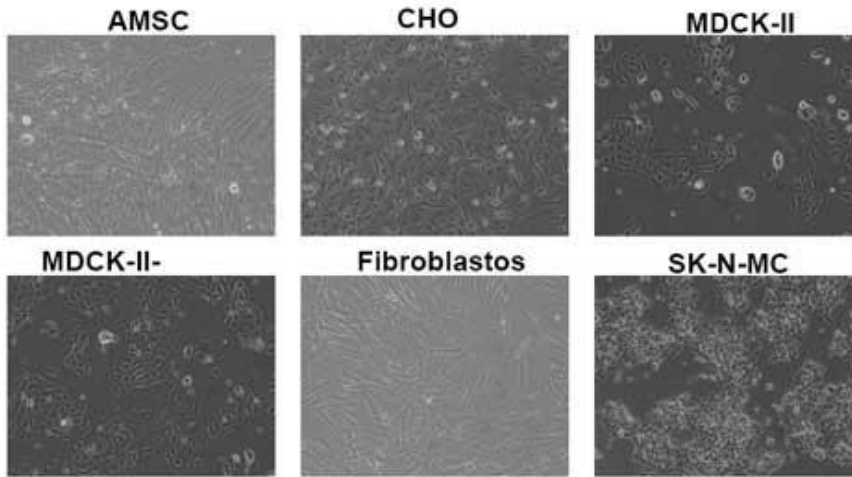


FIGURA 7b

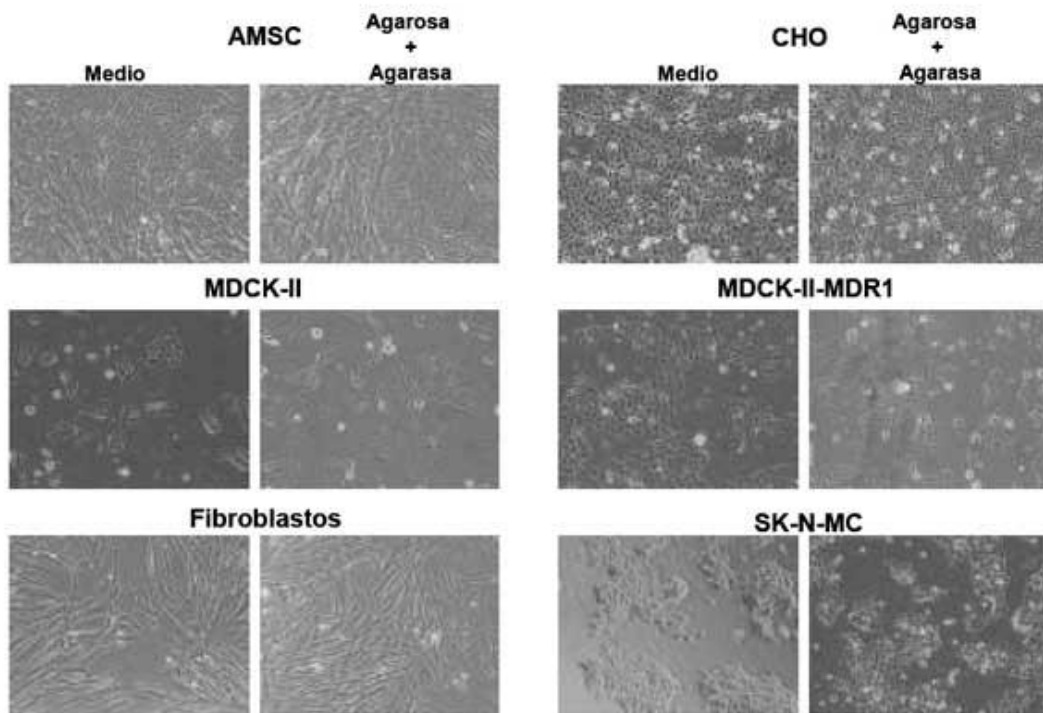


FIGURA 7c

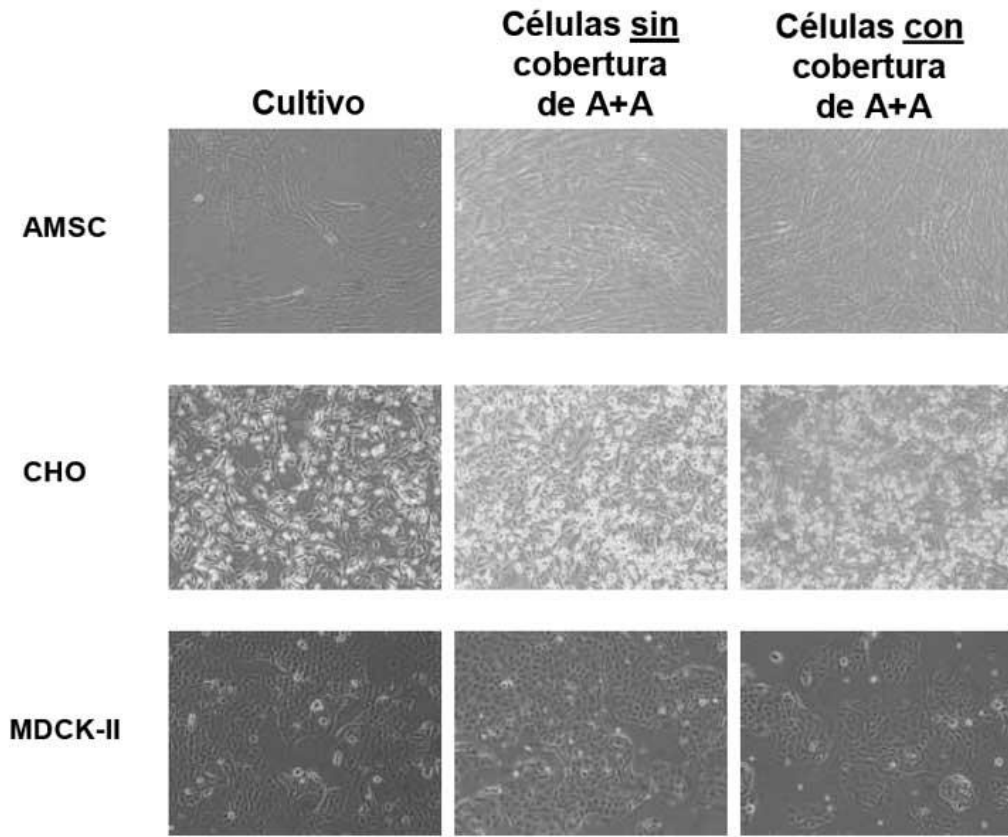


FIGURA 8a

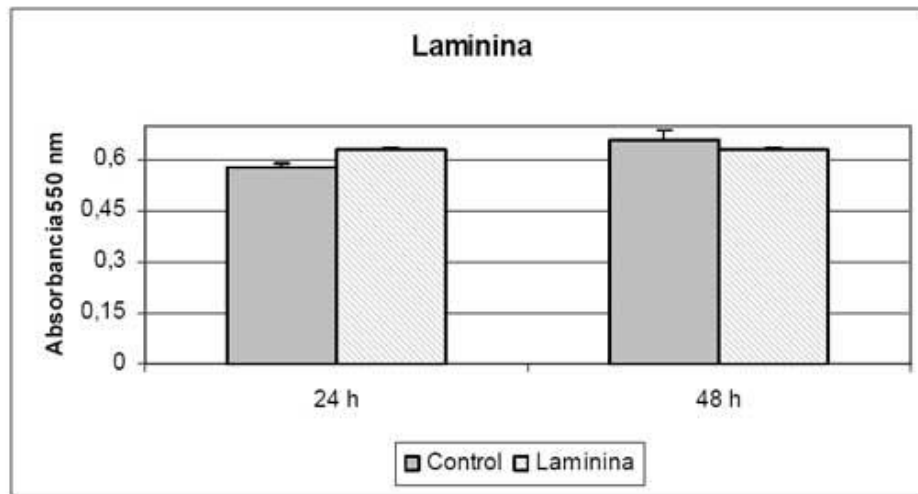


FIGURA 8B

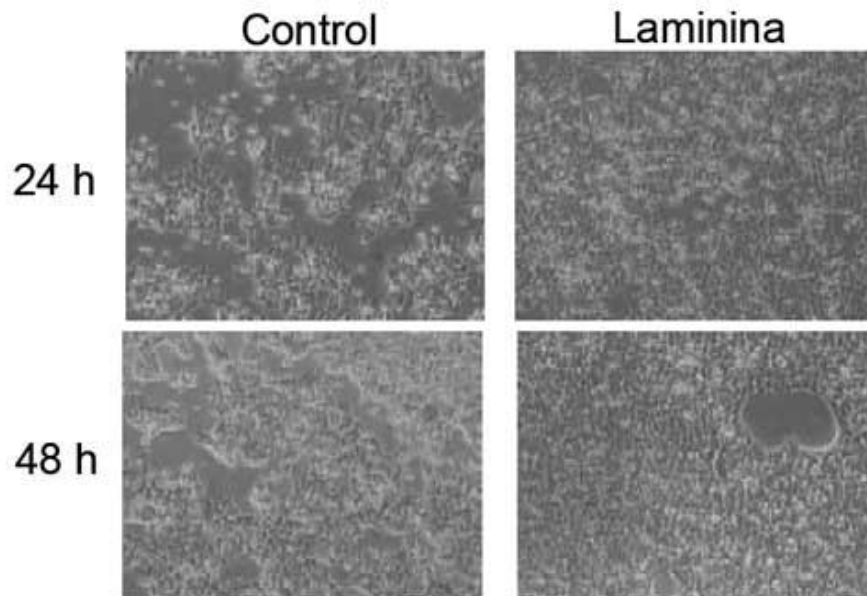


FIGURA 9

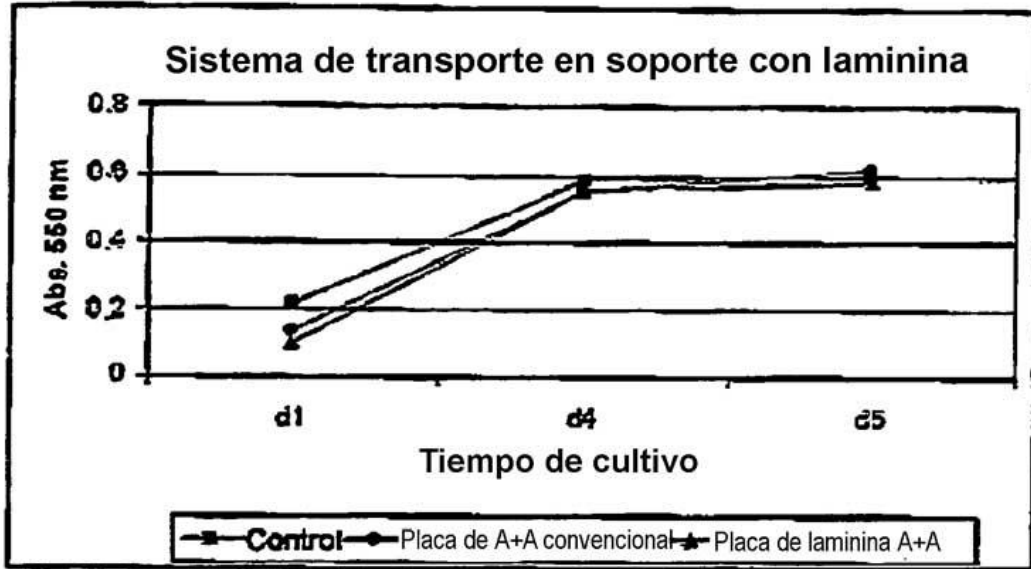


FIGURA 10a

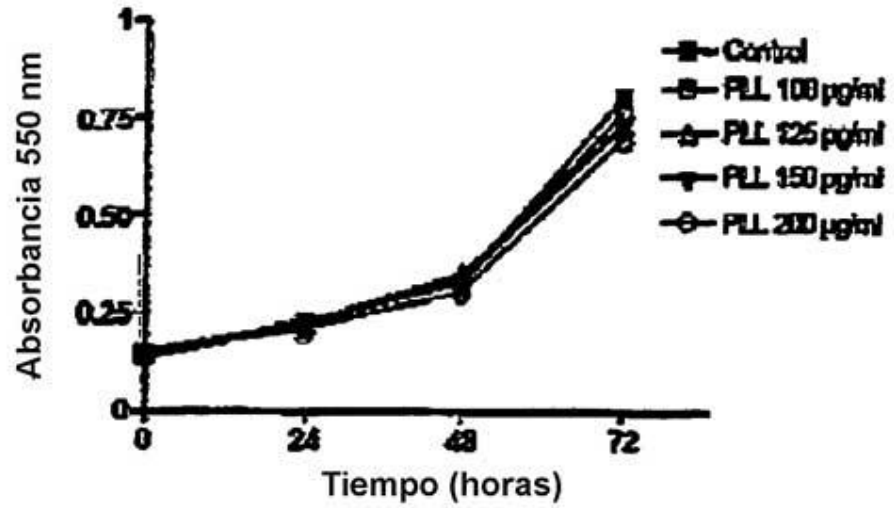


FIGURA 10b

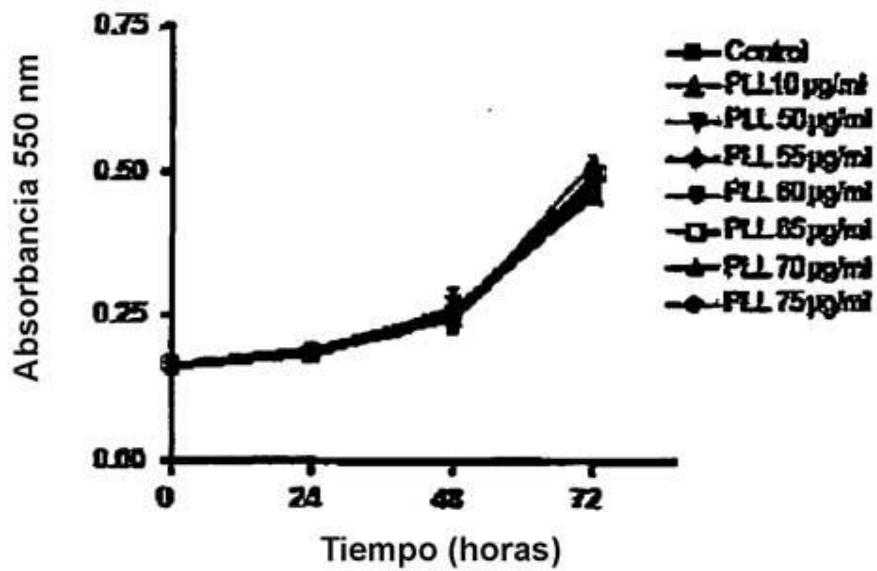


FIGURA 11a

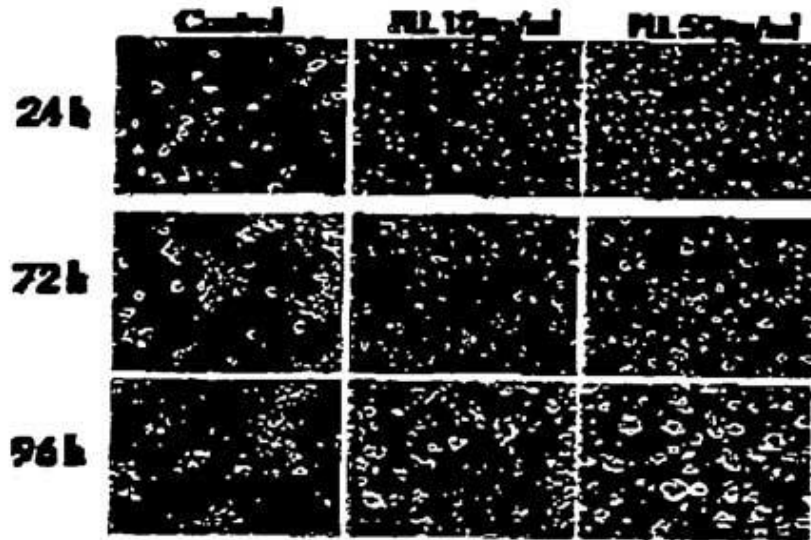


FIGURA 11b

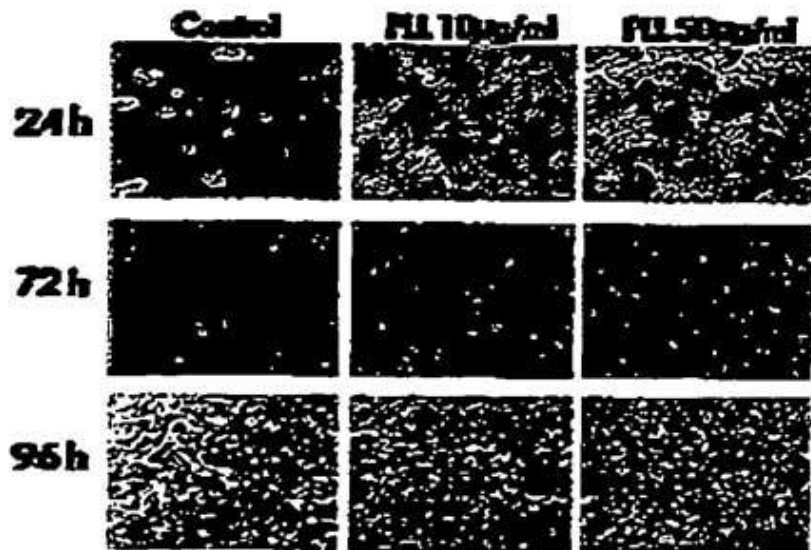


FIGURA 11c

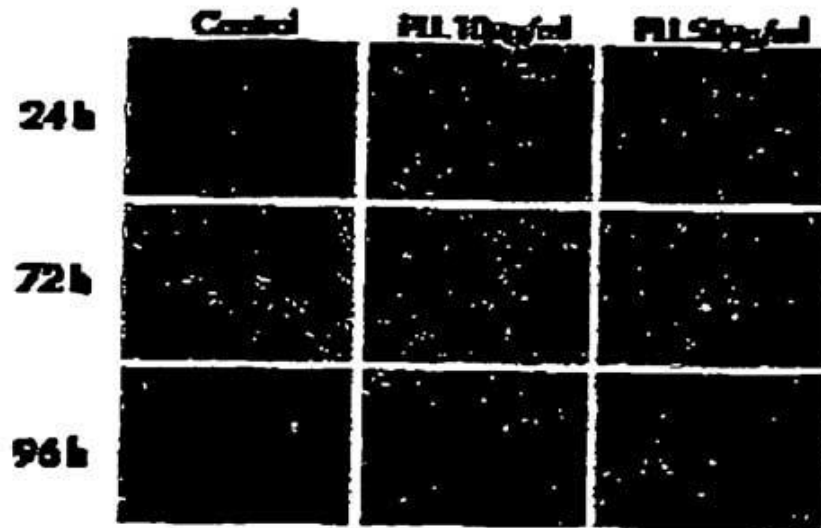


FIGURA 11d

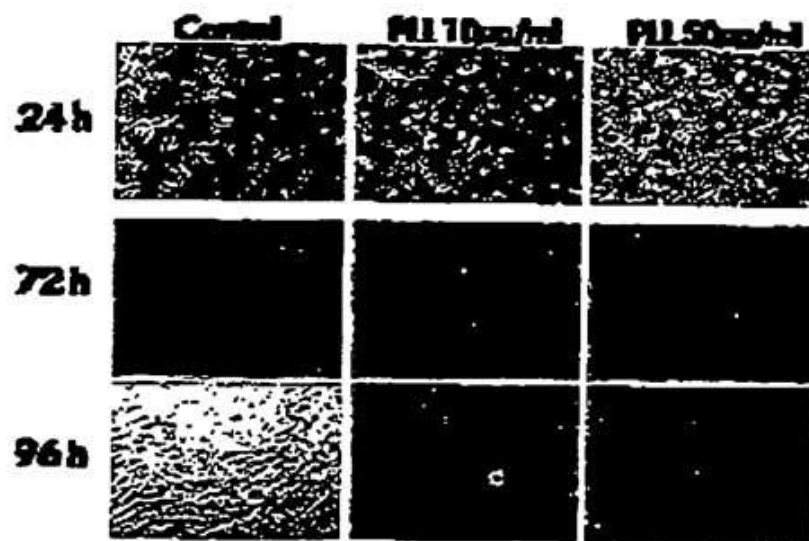


FIGURA 12

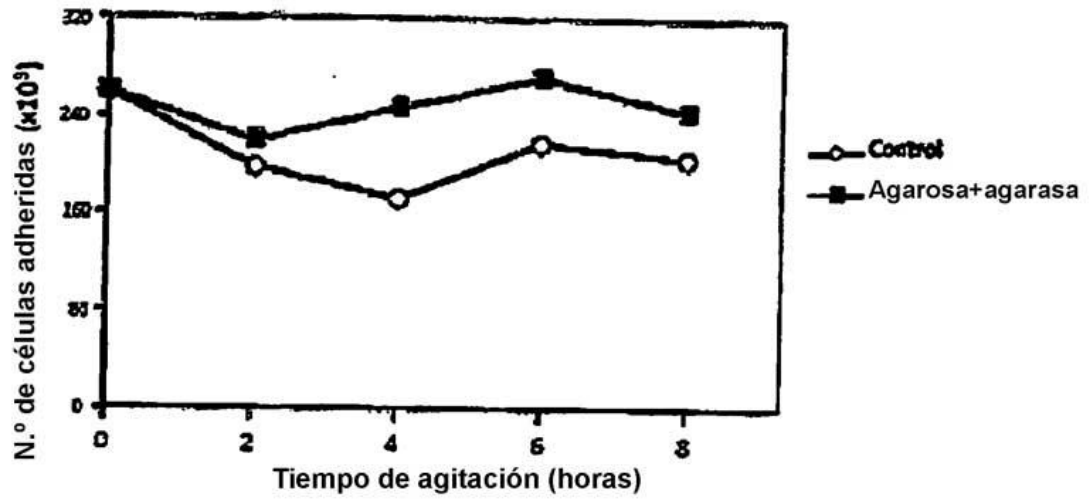


FIGURA 13a

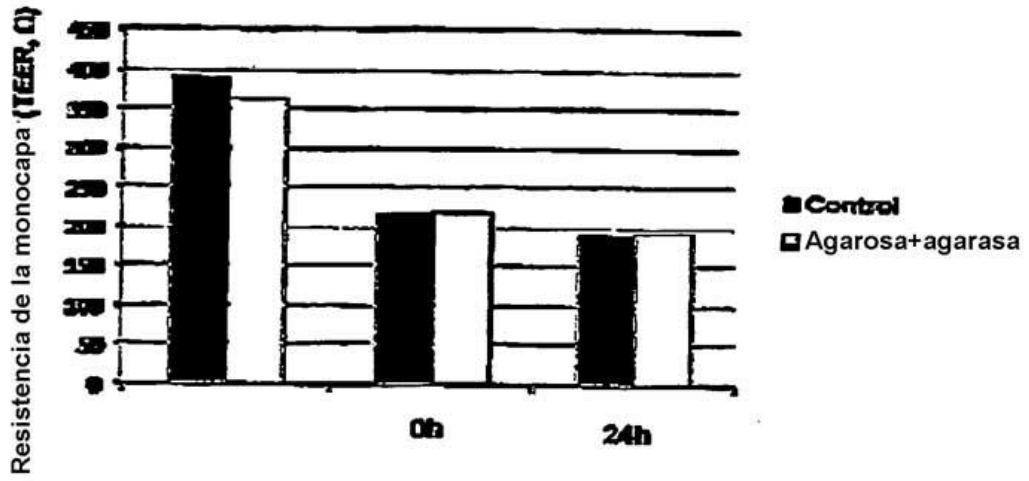


FIGURA 13b

