

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 889**

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09170329 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2299259**

54 Título: **Método y uso de un aparato para análisis in vitro de células biológicas y/o microorganismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2013

73 Titular/es:

**TETEC TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGIES
AG (100.0%)
Aspenhastrasse 18
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

**JOSEPH, HEINZ WALTER y
LEMBERT, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 430 889 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

Método y uso de un aparato para análisis in vitro de células biológicas y/o microorganismos

5 La presente invención se refiere en líneas generales a un método de espectroscopía de infrarrojos (IR) para análisis in vitro de características de células biológicas y microorganismos. Más particularmente, el método de la presente invención permite el análisis específico y rápido de individuos donantes. Además, la invención se refiere al uso de un aparato para análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes. Además, la invención se refiere al uso de este método y dicho aparato en el campo de los trasplantes/injertos e ingeniería tisular, medicina clínica, industria farmacéutica, control de calidad y/o seguridad de fármacos.

15 En la pasada década la aplicación de diferentes técnicas médicas y no médicas ha avanzado enormemente en áreas de estudio clínico. Es bien sabido que la facilidad de un tratamiento médico depende en gran medida de la velocidad del diagnóstico. Por tanto, la sensibilidad y la naturaleza discriminatoria precisa de los métodos tempranos de diagnóstico son muy importantes en el tratamiento médico eficaz de los pacientes. El potencial de las técnicas de exploración y diagnóstico de enfermedades en entornos clínicos así como en el área médica relacionada con los trasplantes ya los han investigado diversos grupos de investigación. Se han aplicado varias de estas técnicas en los últimos años para estudiar diferentes objetos biológicos tales como fluidos biológicos y tejidos. Muchos de ellos están enfocados específicamente a identificar ciertas afecciones patológicas o a determinar, diferenciar y tipificar diferentes células biológicas o microorganismos.

25 Hasta ahora el método más convencional para controlar, identificar, tipificar, cuantificar, clasificar y controlar objetos biológicos tales como diferentes tipos de células biológicas y microorganismos así como materiales de partida y los productos acabados usados, por ejemplo, en la medicina de los trasplantes es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para un método emergente de identificación basado en genes, se aplican cebadores de PCR o sondas nucleotídicas específicos de género o específicos de especie a un objeto de interés. Sin embargo, existen algunas limitaciones al uso de PCR tales como (i) mayor coste que una PCR inicial ya se usa mucho más de dos veces la cantidad de enzima y reactivos, (ii) no puede programarse manipulaciones adicionales ni la duración del ensayo como bloques de ciclado para todos los ciclos desde el inicio, (iii) sirve solamente para cortos fragmentos de ADN. Además, dichas determinaciones llevan mucho tiempo y requieren aparatos sofisticados para realizar los diferentes ensayos.

35 Un concepto muy común adicional es el uso de marcadores específicos de tipo celular. A este respecto, es muy difícil encontrar marcadores específicos de tipo celular dirigidos solamente a un tipo celular específico. Este concepto tiene el problema de que solamente pueden determinarse cantidades en la expresión pero no se da una respuesta a si está presente un tipo de célula diferente o no.

Otros métodos convencionales para interpretar sistemas biológicos, en particular células o microorganismos, son por ejemplo técnicas fluorescentes y quimioluminiscentes de formación de imágenes así como espectroscopía de RMN:

40 (i) Los métodos fluorescentes y quimioluminiscentes de formación de imágenes requieren el marcaje de un componente por un marcador y habitualmente detectan solamente la concentración de la molécula marcadora.

45 (ii) Aunque la espectroscopía de RMN en solución proporciona una imagen detallada de la estructura de un bio-objeto, el método de RMN es mucho más complejo. Además, para los análisis de RMN se necesitan grandes cantidades de las muestras que tienen que marcarse adicionalmente mediante isótopos de carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), oxígeno (^{17}O), e hidrógeno (^2H).

50 La espectroscopía de infrarrojos (IR) es una técnica usada rutinariamente por químicos, bioquímicos, y científicos de materiales como método de análisis convencional. Las señales espectroscópicas observadas se deben a la absorción de la radiación infrarroja que es específica para grupos funcionales de la molécula. Estas frecuencias de absorción están asociadas con los movimientos de vibración de los núcleos de un grupo funcional y muestran distintos cambios cuando se modifica el entorno químico del grupo funcional. La espectroscopía de infrarrojos proporciona esencialmente una huella molecular y por tanto siempre tiene potencial como herramienta de diagnóstico y control en biología y medicina. Los espectros de infrarrojos contienen abundante información sobre la molécula, en particular se usan para la identificación y cuantificación de especies moleculares, las interacciones entre moléculas adyacentes, su estado de hidratación, su forma global, etc. Los espectros infrarrojos pueden usarse como marcador sensible de cambios estructurales de células y de la reorganización que sucede en células. El potencial diagnóstico de la espectroscopía de infrarrojos se está manifestando en muchos programas de investigación médica basados en la premisa fundamental de que en cualquier proceso patológico, el cambio químico debe preceder a la manifestación morfológica o sintomática. Las aplicaciones orgánicas de la espectroscopía IR afectan casi completamente a las frecuencias en el intervalo de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (infrarrojo medio). Frecuencias inferiores a 400 cm^{-1} se llaman infrarrojo lejano y aquellas mayores de 4000 cm^{-1} se llaman infrarrojo cercano.

65 Por tanto, existen varias ventajas importantes en el uso de esta técnica: se obtienen resultados de forma relativamente rápida con menos trabajo que muchas otras técnicas. El uso de espectroscopía IR puede proporcionar

información más precisa sobre la naturaleza exacta de, por ejemplo, una enfermedad en base al muestreo de un fluido biológico o tejido. El método también permite controlar la dinámica del cambio característico, que es importante en la determinación de la fase exacta de un objeto biológico, tal como células o microorganismos, o de una enfermedad.

5 Erukhimovitch et al. (Photochemistry and Photobiology, 2002, 76(4), 446-451) desvelan un método para el diagnóstico y caracterización de patologías celulares y tisulares. En particular, Erukhimovitch et al. desvelan el uso de microespectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) en lugar de espectroscopía FT-IR convencional ya que tiene ventajas en el diagnóstico de neoplasias. Para este fin se comparan microespectros FT-IR de dos tipos de células malignas transformadas con retrovirus con aquellos de células primarias no transformadas y con aquellos de dos tipos de líneas celulares. Erukhimovitch et al. sugieren el uso de, por ejemplo, una banda correspondiente al modo de extensión simétrica de PO_2^- para controlar los niveles de fosfato y otros metabolitos. Erukhimovitch et al. desvelan el uso de microespectroscopía FT-IR para la investigación del metabolismo en células de ratones y humanas comparando los microespectros FT-IR de dos tipos de células malignas transformadas con retrovirus con aquellos de células primarias no transformadas y con aquellos de dos tipos de líneas celulares. Por tanto, Erukhimovitch et al. se refieren al estudio del metabolismo de células que puede considerarse como una imagen instantánea del estado de la célula y puede usarse adicionalmente para la clasificación de la actividad metabólica de la célula y el estado metabólico de la célula.

20 Sin embargo, el problema principal en la microespectroscopía FT-IR es la presencia de luz dispersada debido a la difracción que limita la resolución espacial aumentando el ruido. La difracción es significativa cuando las dimensiones de apertura se acercan a la longitud de onda de la radiación IR. El efecto principal de la difracción es que a pequeños tamaños de apertura, la luz se propaga fuera del área especificada en la región adyacente. Cuando se busca una mayor resolución espacial, el problema aumenta, ya que las aperturas son más pequeñas, lo que conduce finalmente a la pérdida de la calidad espectral y la precisión fotométrica. Por lo tanto, el espectro obtenido no siempre corresponde exactamente al área que se observa visualmente y está definida por la apertura remota. Esto es especialmente cierto cuando las dimensiones de la muestra son muy pequeñas. Además, siempre que se hacen mediciones cuando el tamaño de la muestra que se está observando es igual a, o ligeramente mayor que, el límite de difracción, se transmite algo de radiación al detector desde fuera de la región que se seleccionó por la apertura remota.

30 Oberreuter et al. (Letters in Applied Microbiology, 2000, 30, 85-89) desvela la determinación por FT-IR de las proporciones de diferentes microorganismos en mezclas que comprenden un sistema de levadura asociado a alimentos de dos componentes y un sistema de bacterias ácido lácticas de yogur de dos componentes. En particular, Oberreuter et al. sugieren usar espectroscopía FT-IR para la evaluación de las curvas de calibrado de componentes individuales y una mezcla que comprende *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora uvarum* así como una mezcla que comprende *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus salivarius*, que puede usarse adicionalmente para la cuantificación de estos microorganismos en una mezcla. Oberreuter et al. usan espectroscopía FT-IR para la diferenciación entre especies individuales presentes en una población mixta.

40 Se requieren métodos para la determinación, especialmente tipificación y comprobación del estado de células de mamífero bien o completamente diferenciadas, especialmente en el campo de la medicina de trasplantes. Por ejemplo, es posible producir tejido de remplazo recogiendo células intactas del tipo tisular adecuado del receptor del trasplante, cultivándolas in vitro y reintroduciéndolas en el paciente después de haber alcanzado el necesario recuento celular. Esto puede realizarse en forma de soluciones o partes tisulares cultivadas o cultivando las células en una matriz (que preferiblemente pueden absorberse biológicamente) e implántándolas junto con la matriz. Por ejemplo, se describen métodos, matrices y medios de cultivo adecuados en las solicitudes alemanas 101 62 205.8, 101 62 960.5, 102 20 368.7, 102 22 896.5 (corresponde a AU 2003240618 A1) y la bibliografía citada en las mismas.

50 El documento DE 103 26 966 A1 y su equivalente US 2006/0008795 A1 se refieren a un método para la determinación in vitro, especialmente tipificación, de células de mamífero bien o completamente diferenciadas usando espectroscopía de infrarrojos, especialmente su transformada de Fourier (FT-IR). En particular, el documento DE 103 26 966 A1 desvela el uso de espectroscopía FT-IR para la diferenciación entre células de mamífero bien o completamente diferenciadas de una especie específica. Este método comprende:

- 55 (a) irradiar las células con luz infrarroja y registrar el espectro de absorción obtenido;
 (b) realizar una transformada de Fourier del espectro de absorción a partir de (a) para obtener el espectro FT-IR;
 (c) calcular la primera derivada y, opcionalmente, derivadas superiores del espectro FT-IR; y
 60 (d) comparar la derivada o derivadas de la etapa (c) en un intervalo de número de onda preseleccionado con la misma derivada o derivadas de espectros FT-IR de referencia determinadas previamente.

65 Todos los métodos de espectroscopía IR sugeridos en la técnica previa tienen limitaciones similares: permiten la determinación selectiva o identificación solamente de algunos objetos biológicos tales como bacterias, levaduras o células de mamífero.

Especialmente en el campo de ingeniería tisular, medicina de trasplantes así como en cuestiones de reglamentación y seguridad de fármacos de células cultivadas in vitro y/o microorganismos existe la necesidad de asegurar la calidad, pureza y origen de las células biológicas y/o microorganismos.

5 Sin embargo, hoy en día no existe una técnica universal que permita un rápido y amplio examen de diversos objetos biológicos tales como células biológicas y/o microorganismos así como para distinguir sus características. Por lo tanto, aún existe la necesidad de un método mejorado para el análisis in vitro de diversas células biológicas y/o microorganismos y para la caracterización de sus cambios estructurales/químicos tras condiciones variables.

10 Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un método rápido y no destructivo para el análisis de células biológicas de individuos donantes que evite las desventajas de la técnica previa.

La presente invención proporciona un método para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes como se define en la reivindicación 1 adjunta.

15 Se describen realizaciones preferidas del método de la presente invención en las reivindicaciones dependientes.

20 Se ha descubierto sorprendentemente que el objeto de la invención puede conseguirse mediante el uso de espectroscopía de infrarrojos. La irradiación con infrarrojos de una muestra tal como células biológicas de individuos donantes produce un espectro de mayor complejidad, porque el haz IR está dirigido hacia todos los componentes de la muestra, por ejemplo, celulares o no celulares, de modo que el espectro final representa los espectros promedio de todos los componentes de la muestra. Para identificar cambios estructurales/químicos de una muestra biológica, el método de acuerdo con la presente invención especialmente proporciona la transformada de Fourier de los espectros obtenidos y su siguiente derivación que aumenta significativamente la sensibilidad y fiabilidad del análisis espectral IR de las anteriores células biológicas.

25 La importancia y ventaja del método de la presente invención es en la utilización del hecho recién descubierto de que un tipo específico de células biológicas de individuos donantes tiene intervalos particulares y distintos de frecuencia en que cambian los espectros de absorbancia IR. Por lo tanto, una vez se detecta un cambio o derivación a partir de una norma establecida, el intervalo de frecuencia en que ha sucedido el cambio estructural señala las células de un individuo donante en cuestión.

30 Por lo tanto se ha descubierto inesperadamente que el método de acuerdo con la presente invención tiene características mejoradas en comparación con los métodos conocidos, incluso cuando se usa la misma técnica espectroscópica. El método para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes de acuerdo con la presente invención evita la alteración química o separación física de los componentes de la muestra biológica.

35 De acuerdo con la divulgación, el término "*análisis*" significa el examen, determinación, clasificación, identificación, tipificación, diferenciación, distinción, control, cuantificación y diagnóstico de una muestra biológica.

40 La expresión "*individuo donante*" se refiere a organismos vivos, preferiblemente a un mamífero, que proporciona células originadas a partir de un órgano u otro tejido biológico o sangre para el análisis. Esta expresión también se refiere a la distinción del individuo donante en base a la información estructural específica contenida en las células biológicas.

45 El término "*diferenciación*" se refiere a una diferenciación celular donde una célula menos especializada se convierte en un tipo celular más especializado.

50 La expresión "*grado de diferenciación*" se refiere a una proporción entre células bien o completamente diferenciadas y células inalteradas (no diferenciadas).

El término "*característica*" se refiere a propiedades biológicas de células biológicas y/o microorganismos y se basa en la información estructural y/o química contenida en estas células y/o microorganismos.

55 La expresión "*características naturales*" se refiere a un estado original (inalterado) de una célula biológica y/o microorganismo. Esta expresión se refiere adicionalmente a una función de una célula y/o microorganismo para especificarlo/tipificarlo en el tiempo o en condiciones aplicadas.

60 La expresión "*ausencia de característica natural*" se refiere a una característica natural de un objeto biológico analizado que muestra ausencia de alguna característica original.

La expresión "*característica adicional en comparación con característica natural*" se refiere a una característica natural de un objeto biológico analizado que muestra una característica adicional en comparación con características naturales/originales.

65

La expresión "*condiciones de cultivo*" se refiere a una composición de un medio que tiene propiedades específicas donde se cultivan las células biológicas y/o microorganismos. Además, esta expresión se refiere a la influencia combinada de condiciones ambientales, por ejemplo, temperatura, intensidad de la luz, humedad, y presencia de algunas sustancias específicas, por ejemplo, electrolitos, moléculas orgánicas o inorgánicas, inhibidores, etc., que pueden influir significativamente en el crecimiento y/o modificación de los objetos biológicos tales como células biológicas y/o microorganismos. Como ejemplo, el término también comprende la concentración específica del suero del medio de cultivo, por ejemplo suero al 5% o 10%.

El término "*pureza*" se refiere a materiales que cumplen los requisitos de pureza de los productos químicos admitidos en el sector farmacéutico, para investigación y análisis biológico/bioquímico. Además, en el campo de la medicina de trasplantes/injertos y la ingeniería tisular el término "*pureza*" se refiere a la integridad del trasplante/injerto lo que significa que las células del trasplante/injerto no están infectadas por ninguna bacteria o virus perjudicial y no están contaminadas por células de tejido o individuos donantes indeseados. Los parámetros críticos implicados son la ausencia de inhibidores tales como trazas de metales pesados, enzimas u otros objetos biológicos como bacterias y virus que podrían interferir en el análisis así como algunos agentes auxiliares deshidratados del medio de cultivo. Además, el término "*pureza*" se refiere al grado de integridad requerido en el control de calidad de los trasplantes, productos sanguíneos y fármacos y/o productos farmacéuticos relativo a la reglamentación así como a la seguridad de los fármacos. A este respecto casi cada país tiene sus propias leyes que proporcionan los requisitos gubernamentales respectivos.

La expresión "*tipo celular*" se refiere a una forma morfológica o funcional distinta de una célula, por ejemplo a una célula diferenciada, que puede estar completamente o bien diferenciada o no diferenciada.

El método de la invención permite el análisis de células biológicas de individuos donantes - de un modo simple y fiable mediante la irradiación de las células o una alícuota de las mismas con luz infrarroja y el registro del espectro de absorción obtenido, la realización de la transformada de Fourier sobre este espectro de absorción para obtener un espectro FT-IR, el cálculo de la primera derivativa y/o derivadas múltiples (superiores) del espectro FT-IR y la comparación de dicha derivada o derivadas en un intervalo de número de onda preseleccionado con una o más derivadas del mismo orden de los espectros FT-IR de referencia obtenidos previamente. Los espectros FT-IR de referencia o los espectros determinados previamente, adquiridos en las mismas condiciones espectroscópicas experimentales que los espectros de la muestra, generalmente se obtienen partiendo de preparaciones de muestra purificada, que preferiblemente es la célula biológica deseada del individuo donante. En caso de trasplantes de cartílago, por ejemplo, los espectros FT-IR de referencia se obtienen de preparaciones purificadas de condrocitos. Las derivadas de los espectros FT-IR del trasplante a determinar entonces se comparan con las derivadas de este espectro FT-IR de referencia.

Las derivadas de los espectros, especialmente la segunda derivada de los espectros originales, ofrecen un medio directo para identificar las frecuencias máximas de los componentes característicos y por tanto permiten estudios cualitativos y, finalmente, cuantitativos muchos más detallados. Como un espectro infrarrojo es una función matemática, por lo tanto puede calcularse y determinarse la pendiente de dicha función sacando la derivada. El propósito principal de obtener las derivadas es enfatizar los rasgos espectrales débiles que están enterrados por debajo de los rasgos espectrales dominantes. En particular, la parte inferior del rasgo dirigido hacia abajo determina el número de onda exacto de la absorbancia máxima del pico. Estos números de onda entonces pueden usarse a su vez para estimar el número de bandas solapantes en el compuesto y para localizar sus posibles posiciones de pico.

Usando espectrómetros FT-IR, es posible aplicar los que se conoce como derivación de Fourier. Durante este proceso, el espectro primero se transforma en un interferograma. Después se multiplica por una función de ponderación apropiada y finalmente se "re-transforma" para dar la derivada. Esta técnica proporciona más sensibilidad que la derivación convencional.

Debe apreciarse que los errores en la manipulación de la muestra, los márgenes espectrales, los desplazamientos en la línea basal, las variaciones entre lotes, la presencia de residuos no diagnósticos y todos los demás factores afectan de forma adversa a la discriminación.

Para mejorar la resolución, se prefiere medir varias muestras del mismo tipo celular procesado del mismo modo y estandarizar los espectros obtenidos. La estandarización, la transformada de Fourier y la derivación se realizan por métodos conocidos para los especialistas en la técnica. Preferiblemente, todos los cálculos se hacen por un ordenador. De acuerdo con la invención, pueden usarse derivadas de segundo orden y, opcionalmente, de orden superior. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la derivada múltiple usada para la identificación de desviaciones es una segunda derivada.

El cultivo in vitro requiere, por un lado, que se cultiven solamente los tipos celulares deseados de cualquier biopsia tisular del paciente y, por otro lado, que se trasplante solamente este tipo celular en el paciente. Para conseguir esto, es necesario un estricto control de la preparación a partir del material de partida, del cultivo celular y del producto celular acabado a trasplantar.

Un problema esencial encontrado tanto en la recuperación de las biopsias como en el tratamiento del cultivo es el hecho de que las células en un tejido a menudo no están presentes en su forma pura, sino en forma de una mezcla de diferentes tipos celulares. Además de condrocitos o células de cartílago el cartílago, por ejemplo, contiene fibroblastos que también se hallan en la mayoría de los demás tejidos. Los fibroblastos constituyen una contaminación indeseable de los cultivos celulares ya que habitualmente crecen más rápido que las células específicas deseables, bien o completamente diferenciadas. Como resultado, pueden formar la mayoría de las células en los cultivos después de un tiempo muy corto de modo que este cultivo ya no corresponde al tipo tisular deseado. De acuerdo con la invención, preferiblemente las células biológicas de individuos donantes se usan en forma purificada. En una realización preferida adicional, las células anteriores de acuerdo con la presente invención están sustancialmente libres de residuos no diagnósticos.

El método de la invención se útil para determinar células de un individuo donante específico en un grupo que consiste en células de un tipo celular específico, donde las células de este tipo celular proceden de diferentes individuos donantes. En general, esto se aplica para todos los tipos de células. Por ejemplo, cada uno de los tipos celulares condrocitos, osteocitos, células del periostio, células del estómago, células epiteliales, fibroblastos, melanocitos y/o células musculares forman un tipo de grupo que tiene subgrupos específicos dentro del grupo. Ahora se ha descubierto sorprendentemente que dentro de un subgrupo que comprende tipos celulares específicos de diferentes individuos donantes, pueden determinarse los individuos donantes. Cada individuo tiene un patrón específico basado en diferentes intensidades a longitudes de onda seleccionadas que pueden determinarse generando la transformada de la primera o múltiple, preferiblemente la segunda, derivada del espectro FT-IR del método como se describe en la primera reivindicación. Las longitudes de onda seleccionadas incluyen el intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , preferiblemente de 1500 cm^{-1} a 700 cm^{-1} y más preferiblemente de 1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1} .

Este método es especialmente útil en el campo de los trasplantes/injertos e ingeniería tisular. En caso de que mezclen diversos matraces de cultivo, entonces sería posible determinar las células del individuo donante.

El agua tiene una gran absorción en la región del infrarrojo medio y contribuye a cambios en la intensidad a varias frecuencias. Por tanto, en objetos biológicos, las frecuencias de resonancia más interesantes de las vibraciones C=N, C=O, N-H o O-H a menudo están ocultas por la fuerte absorción IR del agua a aproximadamente 3400 y 1600 cm^{-1} . Por lo tanto, experimentos en sistemas acuosos son posibles solamente con capas acuosas muy delgadas y con elevada concentración de las moléculas de interés. Para reducir la influencia del agua sobre los espectros IR obtenidos, habitualmente, las muestras se secan antes de su uso y se aplica un régimen de escaneo múltiple con alta resolución.

De acuerdo con el método de la invención, se toma una muestra de interés y se procesa de un modo conocido para permitir el registro de los espectros IR. Un modo habitual de preparar una muestra celular es recubrir con una suspensión celular un sustrato adecuado y secar dicha suspensión celular a una temperatura de 20°C a 25°C (temperatura ambiente o temperatura ambiental). Este ejemplo de técnica de preparación permite un fácil transporte de la muestra al laboratorio de IR así como una fácil manipulación y almacenamiento posteriores.

Como norma, el método de la invención se realiza en células en suspensión. Para este fin, las células pueden retirarse directamente de la formación tisular y someterse a determinación de acuerdo con la invención. Como alternativa, las células primero pueden cultivarse y examinarse alícuotas del cultivo mediante el método de la invención, opcionalmente después de tratamiento con tripsina para desprender las células cultivadas de su sustrato. Opcionalmente, primero pueden congelarse alícuotas de la solución de muestra y después descongelarse para el ensayo. La cantidad de sustancia requerida para los espectros IR puede ser muy pequeña. Dependiendo de las condiciones establecidas tales como espectroscopía con o sin enfoque del haz, la cantidad de muestra puede usarse en intervalos de mg a ng. Como norma, son suficientes de 10 a 500 ml de la suspensión celular a recuentos celulares de 1×10^3 a 2×10^5 células por ml para la determinación. Las células pueden disolverse en un disolvente adecuado, tal como agua, medio de cultivo, tampón, solución salina fisiológica, etc. No es necesario separar aditivos tales como albúminas séricas, especialmente suero humano etc., de este disolvente. Sin embargo, los mejores resultados se consiguieron investigando células puras. En caso algún aditivo, puede determinarse opcionalmente un espectro FT-IR de referencia previamente para determinar las desviaciones apropiadamente. En este caso también puede registrarse un espectro FT-IR de uno o más aditivos para establecer el espectro final en correlación con el espectro determinado previamente de los aditivos.

La suspensión se deposita sobre un vehículo adecuado para la medición IR. Después del recubrimiento, el disolvente preferiblemente se evapora de modo que se obtenga una muestra seca. De acuerdo con la invención, esta muestra se irradia con luz IR y se registra el espectro de adsorción de acuerdo con el método de la invención. Preferiblemente, se toman al menos tres, generalmente de tres a cinco mediciones paralelas sobre una muestra. El vehículo puede consistir en cualquier material adecuado para IR, preferiblemente vidrio, silicio o espejo de plata. Por ejemplo, se describen vehículos adecuados en la solicitud de patente alemana DE 100 60 560.

En una realización preferida adicional, el procedimiento de preparación de una muestra de acuerdo con la invención comprende:

- (i) depositar una suspensión de las células de determinar sobre un vehículo adecuado;
- (ii) evaporar el disolvente de la suspensión para obtener una muestra seca.

De acuerdo con una realización preferida adicional, la muestra celular se seca previamente a la producción de los espectros infrarrojos en la etapa (a).

Una vez en el laboratorio, se pasa la radiación IR que incluye una cantidad seleccionada de longitudes de onda a través de la muestra, se registran los espectros IR y se comparan con el espectro de referencia. Se usa la presencia o ausencia de ciertos elementos gráficos (bandas IR) en comparación con el espectro de referencia para analizar la muestra.

En la etapa (e) del método de la invención, las derivadas de los espectros FT-IR obtenidos de la muestra se comparan con la misma derivada de un espectro FT-IR de referencia obtenido previamente. Para esta comparación, de acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, los espectros de referencia se obtienen partiendo de cultivos puros del tipo celular de los individuos donantes de interés y/o partiendo de cultivos mixtos conocidos del anterior tipo celular de interés con uno o más tipos celulares adicionales. Preferiblemente, los espectros de referencia se preparan partiendo de cultivos puros del tipo celular del individuo donante de interés en diversos disolventes. Uno de estos disolventes es idéntico al disolvente de la muestra.

Si se desea, los espectros de referencia también pueden prepararse partiendo de cultivos mixtos del tipo celular del individuo donante de interés con uno o más tipos celulares diferentes. Ejemplos son cultivos mixtos de las células deseadas anteriores y, por ejemplo, los fibroblastos contaminantes ubicuos. Mediante una comparación con dichos espectros de referencia mixtos, el método de la invención hace posible determinar la contaminación de un cultivo celular o muestra del individuo donante y, opcionalmente, la proporción entre el tipo celular deseado anterior y el tipo celular contaminante.

De acuerdo con la invención, se usa luz infrarroja de una longitud de onda adecuada para irradiar las células. Como norma, puede usarse cualquier tipo de luz infrarroja, es decir luz en el intervalo de longitud de onda de 760 nm a 500 μm . Es adecuada luz infrarroja del intervalo de IR cercano, mediano (medio) o lejano. Preferiblemente, se usa luz infrarroja que tiene una longitud de onda de 760 nm a 2.000 nm y más preferiblemente luz infrarroja del intervalo medio de 800 nm a 1.500 nm.

Puede seleccionarse una o varias regiones espectrales por inspección visual de los espectros, es decir, seleccionando los intervalos que muestran los cambios más fuertes y más característicos en comparación con los espectros de referencia, o mediante un método multivariado generalmente conocido para seleccionar características espectrales.

En una realización preferida adicional, el espectro infrarrojo se obtiene en la región espectral del infrarrojo medio entre 400 y 4000 cm^{-1} , preferiblemente entre 700 y 1500 cm^{-1} , más preferiblemente entre 800 y 1400 cm^{-1} , en particular entre 900 y 1300 cm^{-1} . Se descubrió que las marcadas diferencias espectrales entre el espectro de la muestra y el espectro de referencia se detectaban en el intervalo de 900 a 1200 cm^{-1} , y que este intervalo es particularmente adecuado para el análisis.

Existen cambios espectrales debidos a la diferenciación en la banda de la proteína Amida I (1700-1600 cm^{-1}) y en la región de absorción de los ácidos nucleicos (1050-850 cm^{-1}) indicando que estaba teniendo lugar traducción de ARN y se estaban produciendo proteínas específicas, lo que refleja la aparición de un nuevo fenotipo. Estos cambios espectrales pueden detectarse por el desplazamiento de una banda de interés.

En bio-moléculas, las frecuencias de resonancia interesantes responsables de la desviación de los espectros de absorbancia de las células son vibraciones C=N, C=O (Amida I), N-H (Amida II) u O-H.

La expresión "*desviación*" o "*desviación de espectros*" se refiere a una diferencia entre los espectros o sus derivadas de la muestra de referencia y la muestra de análisis.

Las posiciones de las bandas de amida que dependen de la estructura secundaria de la proteína o péptido se muestran a continuación:

conformación	Frecuencia de vibración, ν (cm^{-1})		
	Amida A (tramo N-H)	Amida I (tramo C=O)	Amida II (deformación N-H)
hélice α	3290-3300	1648-1660	1540-1550
lámina β	3280-3300	1625-1640 (fuerte) 1690 (débil)	1520-1530
giros β		1660-1685	

conformación	Frecuencia de vibración, ν (cm^{-1})		
	Amida A (tramo N-H)	Amida I (tramo C=O)	Amida II (deformación N-H)
Espiral aleatoria (no ordenada, sin enlaces de hidrógeno)	3250	1625-1660	1520-1545
hélice 3_{10}		1660-1670	
Hebras agregadas		1610-1628	

Las desviaciones de los espectros de absorción de las células así como sus derivadas se deben a cambios del grupo fosfato PO_2^- en fosfodiésteres de ácido nucleico que pueden analizarse a las siguientes frecuencias: $\nu_s \text{PO}_2^-$ (1080 cm^{-1}) y $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ (1245 cm^{-1}).

5 Los parámetros físicos tales como la resolución espectral y la cantidad de espectros promedio pueden variarse dentro de los intervalos típicos en espectroscopía IR. Cuando se determinan los parámetros para obtener los espectros y preparar la muestra, tienen que seleccionarse parámetros idénticos para todas las mediciones incluyendo las mediciones de referencia. Es muy importante que todos los parámetros para las mediciones de referencia y de la muestra sean idénticos. En una realización preferida adicional, la resolución espectral es entre 2 cm^{-1} y 10 cm^{-1} , preferiblemente es entre 4 cm^{-1} y 8 cm^{-1} , y para cada espectro se obtienen de 16 a 120 escaneos, preferiblemente de 32 a 64 escaneos y se co-añaden. En general, los espectros se normalizan ajustando la absorbancia mínima a 0,0 y la absorbancia máxima a 1,0 en la región de frecuencia entre 400 y 4000 cm^{-1} . Sin embargo, en algunas realizaciones, las técnicas de la invención se ponen en práctica sin normalizar los espectros. 10 En una realización preferida adicional, los datos espectrales se suavizan y/o derivan. Por tanto, de acuerdo con una realización preferida, los primero se suavizan y después se derivan. De acuerdo con otra realización preferida, los datos primero se derivan y después se suavizan.

20 Regiones espectrales más estrechas incluso en el intervalo del infrarrojo cercano (NIR) de 4000 cm^{-1} a $10\,000 \text{ cm}^{-1}$ también pueden proporcionar información satisfactoria, ya que los espectros NIR consisten en el trasfondo y las combinaciones basadas en las vibraciones fundamentales observadas en el IR medio. Por tanto, se espera que el NIR contenga la misma información que es útil en la realización del análisis en el IR medio.

25 La comparación de los datos de absorción y los espectros de absorción de referencia se hace usando cualquier técnica o instrumentación conocida para los especialistas en la técnica para comparar series de datos espectrales. En una realización preferida adicional, la comparación de los datos de absorción en el infrarrojo para la muestra y los datos para la serie de referencia utiliza análisis de componentes principales en la región de frecuencia de 400 a 4000 cm^{-1} , de forma especialmente preferida la comparación se realiza en el intervalo de 700 a 1500 cm^{-1} , más preferiblemente entre 800 y 1400 cm^{-1} , en particular entre 900 y 1300 cm^{-1} .

30 De acuerdo con el método de la invención, puede irradiarse una muestra de interés usando cualquier modo conocido para permitir el registro de espectros IR. En una realización preferida adicional de la presente invención, la radiación infrarroja en la etapa (a) interacciona con la muestra, y la radiación característicamente alterada se detecta en una configuración de transmisión/absorción o reflexión total atenuada.

35 La presente invención se refiere a un método para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes que puede realizarse de un modo simple y, preferiblemente, automatizado, produce resultados rápidamente y permite la determinación/detección fiable de cambios estructurales entre una muestra biológica y una muestra de referencia.

40 Los métodos clásicos para el análisis de células biológicas y/o microorganismos tales como métodos morfológicos e histológicos y la determinación genética mediante PCR típicamente requieren hasta 48 horas o más hasta poder obtener resultados concretos. Por otro lado, las células recuperadas cuando se obtienen muestras tisulares de un paciente deben transferirse a un cultivo inmediatamente para mantener las células viables. Asimismo, el trasplante/injerto debe reintroducirse en el paciente lo antes posible, con la condición de que se haya alcanzado el recuento celular deseado. Además, el control o tipificación del material celular a trasplantar debe realizarse en un corto periodo de tiempo antes de y lo más cerca posible al momento del trasplante en lugar de los métodos ya conocidos de la técnica previa, por ejemplo, PCR, marcación específica, métodos de espectroscopía RMN, donde el intervalo de análisis de unos pocos días, por ejemplo de dos días, es aplicable.

50 La diferencia estructural entre la muestra y la muestra de referencia puede surgir de cualquier proceso conocido por causar cambios estructurales en la muestra, por ejemplo cambios en una estructura química, grupo funcional u orientación de la secuencia molecular. Diferentes tipos celulares biológicos y/o microorganismos pueden poseer diferencias estructurales/químicas inherentes que son espectroscópicamente accesibles. Los cambios espectroscópicos observados se refieren a cambios en la concentración y orientación conformacional de los grupos funcionales asociados con proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. En una realización preferida adicional 55

de la invención, las desviaciones de acuerdo con las etapas (e) y (f) surgen de la diferencia estructural de la muestra. Preferiblemente, las diferencias químicas surgen como resultado de una patología en la célula o tejido en estudio, por ejemplo cáncer, displasia, diabetes, hipertrofia, etc. La patología es una causada por un patógeno, por ejemplo, bacterias o virus, o puede aparecer debido a anomalía genética. Las diferencias químicas en las células también pueden surgir debido a las condiciones de cultivo, es decir, un medio celular, sobre la célula.

Es bien sabido que como medio celular se usa una solución que comprende suero como componente fluido obtenido tras la separación de sangre completa en sus componentes sólidos y líquidos, que contiene anticuerpos, electrolitos y proteínas solubles. Por lo tanto, dependiendo de las condiciones de cultivo tales como el medio celular, las células biológicas pueden crecer con diferente grado de modificación tal como, por ejemplo, el grado de diferenciación. Por tanto, es muy importante analizar las condiciones de cultivo tales como la concentración del suero en una solución usada como medio celular, el pH, el tipo de electrolito, impurezas orgánicas e inorgánicas. De acuerdo con la presente divulgación, también se describe una etapa para analizar qué condiciones de medio aplicar a las células biológicas o microorganismos en base a dichas desviaciones. Por ejemplo, la invención también se refiere a un método para el análisis in vitro de las condiciones de cultivo de células biológicas, donde se analiza el contenido de suero del medio de cultivo usado, por ejemplo si las células se cultivaban en un medio que comprendía suero al 5% o 10%.

El método de la invención permite el análisis de células biológicas de individuos donantes. De acuerdo con la invención, las células anteriores son preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente células humanas, seleccionadas entre el grupo que consiste en (i) células sanguíneas, por ejemplo eritrocitos, reticulocitos, leucocitos, trombocitos, megacariocitos, mastocitos, células dendríticas; (ii) células inmunes, por ejemplo células linfoides: células B, células T (células T citotóxicas, células T citolíticas naturales, células T reguladoras, células T auxiliares), células citolíticas naturales; células mieloides: granulocitos (granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos neutrófilos/neutrófilos hipersegmentados) monocitos/macrófagos; (iii) células del sistema endocrino: células tiroideas (células epiteliales de la tiroides, células parafoliculares), células paratiroides (células principales de la paratiroides, células oxífilas), células adrenales (células cromafines), células pineales (pinealocito); (iv) células del sistema nervioso: por ejemplo células gliales: glioblastos (astrocito, oligodendrocito), microglia, células neurosecretoras magnocelulares, células estrelladas, células de Boettcher, células de la pituitaria (células gonadotropas, corticotropas, tirotropas, somatotropas, lactotropas); (v) células del sistema respiratorio, por ejemplo neumocitos (neumocitos Tipo I, neumocitos Tipo II), células de Clara, células de Goblet, macrófagos alveolares; (vi) células del sistema circulatorio, por ejemplo miocardiocitos, pericitos; (vii) células del sistema digestivo, por ejemplo células del estómago (células principales gástricas, células parietales), células de Goblet, células de Paneth, células G, células D, células ECL, células I, células K, células S, células enteroendocrinas, células enterocromafines, células APUD, células hepáticas (hepatocitos, células de Kupffer); (viii) células de cartílago, hueso y músculo: células de hueso: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células dentarias (cementoblastos, ameloblastos), células de cartílago: condroblastos, condrocitos, (ix) células de piel y cabello: tricocitos, queratinocitos, melanocitos (células de Nevus); (x) células del músculo: miocitos, otras células: adipocitos, fibroblastos, células del tendón; (xi) células del sistema urinario, por ejemplo podocitos, células juxtaglomerulares, células mesangiales intraglomerulares, células mesangiales extraglomerulares, células del borde en cepillo del túbulo proximal renal, células de la mácula densa; (xii) células del sistema reproductor, por ejemplo células masculinas (espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig) y células femeninas (óvulos).

Preferiblemente las células humanas se seleccionan entre el grupo que consiste en condrocitos, osteocitos, células del periostio, células del estómago, células epiteliales, fibroblastos, melanocitos y células musculares.

En cultivos mixtos, los fibroblastos están habitualmente presentes como tipo celular adicional.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención por tanto proporciona el uso de un aparato para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes como se define en la reivindicación 10.

Se hace referencia a las memorias de patente alemana DE 199 49 953 (corresponde al documento US 6.493.080 B1) o DE 199 40 981.

Los espectros de referencia ya están almacenados en el aparato y por lo tanto es posible una comparación automática de las derivadas deseadas con las derivadas de los espectros FT-IR de referencia.

La presente invención proporciona el uso de un método y un aparato de acuerdo con el método descrito anteriormente en el campo de los trasplantes/injertos e ingeniería tisular, medicina clínica, industria farmacéutica, control de calidad y/o seguridad de fármacos.

La invención se describirá ahora en más detalle a modo de ejemplos y con referencias a las figuras adjuntas:

La Figura 1 muestra los espectros FT-IR de condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2).

La Figura 2 muestra los espectros FT-IR de condrocitos medidos como una célula individual (1) y como un

aglomerado celular (2).

La Figura 3 muestra la segunda derivada de los espectros de la Figura 1 en el intervalo de número de onda de 850 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} : condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2).

5 La Figura 1 muestra que hay diferencia significativa en los espectros FT-IR de condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2), especialmente en la región huella entre 900 y 1500 cm^{-1} . Las bandas IR específicas/características de esta región se usan para la identificación y clasificación adicional de dichos objetos biológicos.

10 La Figura 2 muestra los espectros FT-IR de condrocitos medidos como una célula individual (1) (estado no agregado) y como un aglomerado celular (2) (estado agregado). La amplia banda compleja de la región de vibración de hidroxilo vOH a aproximadamente 3300 cm^{-1} que corresponde al espectro (2) se atribuye al efecto combinado de grupos hidroxilo asociados de forma diferente, es decir, enlaces de hidrógeno entre hidroxilo y grupos hidroxilo/carbonilo de diferente fuerza y enlaces de hidrógeno de moléculas de agua. La comparación del espectro
15 (1) y (2) demuestra claramente este efecto. La amplia banda a aproximadamente 1550-1700 cm^{-1} corresponde con las vibraciones combinadas de las bandas de Amida I (tramo C=O) y Amida II (deformación N-H) así como la vibración de deformación de las moléculas de agua.

20 La Figura 3 muestra las diferencias características de los espectros de segunda derivada de condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2) en el intervalo de número de onda de 850 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . Por consiguiente, la invención usa la primera derivación y/o una o más derivaciones superiores de este espectro para la diferenciación inequívoca. La segunda derivada del espectro FT-IR de la Figura 1 se muestra para el intervalo de la luz IR media en la Figura 2. La Figura 2 muestra claramente que se observan diferencias distintas y características de los espectros en el intervalo de la segunda derivación. Éstas se usan para analizar las células biológicas de individuos
25 donantes.

La invención se ilustrará ahora en detalle con referencia a los siguientes ejemplos no restrictivos:

Ejemplo 1

30 Se usó un espectrómetro FT-IR que mide los infrarrojos Thermo Nicolet Nexus EURO para realizar el método de la invención. Éste es un aparato que mide el IR que ya contiene el software para la medición, evaluación - es decir la transformada de Fourier - y documentación así como la derivación de los espectros de absorción registrados. Las mediciones se realizaron en el intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} .

35 La suspensión celular se depositó sobre los puntos de medición individuales del espejo de plata (Thermo Spectra-Tech). Después del recubrimiento, estas suspensiones se dejaron secar a temperatura ambiente. La medición se tomó inmediatamente después del secado en un intervalo de longitud de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Se realizaron diversas determinaciones paralelas para cada muestra.

40 Antes de las mediciones, se registraron los espectros de referencia del patrón de poliestireno (patrón NIST) para verificar las condiciones de trabajo del equipo.

Los espectros obtenidos para condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2) se muestran en la Fig. 1.

45 La Fig. 3 muestra las segundas derivadas de los espectros de la Figura 1 en el intervalo de número de onda de 850 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} : condrocitos (1) y células cancerosas del estómago (2).

Ejemplo 2

50 De acuerdo con el ejemplo 1, se examinaron muestras de condrocitos de una célula única (individual) y un aglomerado celular recién preparadas. Los espectros correspondientes se muestran en la Figura 2.

55 Por lo tanto, la invención proporciona un método tanto simple como rápido para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes y por lo tanto es adecuado para la comprobación rutinaria de preparaciones celulares usadas en la medicina de los trasplantes/injertos. Una de las razones principales para eso es que es posible un análisis rápido y económico con cantidades mínimas de muestra.

60 La presente invención no está limitada al asunto de las muestras mostrado anteriormente. Un especialista en la técnica reconocerá que son posibles modificaciones del método de la invención sin alejarse del ámbito de protección de la solicitud definida por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) proyectar radiación infrarroja sobre una muestra de células biológicas naturales, incluyendo dicha radiación una cantidad seleccionada de longitudes de onda;
 - (b) registrar las características espectrales después de la interacción con dicha muestra;
 - (c) derivar un espectro de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) a partir de las características espectrales recogidas;
 - 10 (d) generar la transformada de la primera derivada o múltiple del espectro FT-IR adecuada para el análisis en un ordenador;
 - (e) comparar dicha derivada con la derivada de un espectro FT-IR de referencia de las células biológicas naturales determinado previamente;
 - (f) identificar desviaciones de dicha derivada a partir de dicha derivada de referencia;
 - 15 (g) determinar si las células biológicas naturales de un tipo dado analizadas in vitro corresponden o no a las determinadas previamente y por tanto son del mismo individuo donante en base a la presencia de dichas desviaciones.
2. El método de la reivindicación 1, donde la derivada múltiple es una segunda derivada.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde las desviaciones surgen de la diferencia estructural de las muestras.
4. El método de las reivindicaciones 1 a 3 que incluye adicionalmente una etapa de determinar qué condiciones de medio se aplicaron a las células biológicas en base a dichas desviaciones.
- 25 5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, donde las longitudes de onda seleccionadas incluyen el intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .
- 30 6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, donde las longitudes de onda seleccionadas incluyen el intervalo de 1500 cm^{-1} a 700 cm^{-1} .
7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, donde las células biológicas son células de mamífero, preferiblemente células humanas seleccionadas entre el grupo que consiste en células sanguíneas, células inmunes, células del sistema endocrino, células del sistema nervioso, células del sistema respiratorio, células del sistema circulatorio, células del sistema digestivo, células del cartílago, células óseas y musculares, células cutáneas y capilares, células musculares, células del sistema urinario así como células del sistema reproductor.
- 35 8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, donde los espectros de referencia para la comparación en la etapa (e) se preparan partiendo de cultivos puros del tipo celular de interés y/o cultivos mixtos conocidos del tipo celular de interés con uno o más tipos celulares adicionales.
- 40 9. El método de las reivindicaciones 1 a 8, donde la radiación infrarroja interacciona con la muestra, y la radiación característicamente alterada se detecta en uno de una configuración de transmisión/absorción o reflexión total atenuada.
- 45 10. Uso de un aparato para el análisis in vitro de células biológicas de individuos donantes, comprendiendo dicho aparato:
 - 50 (a) un dispositivo que recibe la muestra para una suspensión de células biológicas y/o microorganismos;
 - (b) un medio para irradiar una muestra de células biológicas naturales con luz infrarroja y un medio para registrar el espectro de absorción obtenido;
 - (c) un medio para realizar una transformada de Fourier del espectro de absorción obtenido en un espectro FT-IR;
 - (d) un medio para calcular la primera y, opcionalmente, las derivadas múltiples del espectro FT-IR; y
 - 55 (e) un medio para comparar la derivada o derivadas de la etapa (d) en un intervalo de número de onda preseleccionado con la misma derivada o derivadas de los espectros FT-IR de referencia de las células biológicas naturales preparados previamente y almacenadas en el aparato.
- 60 11. Uso del método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 para el control de calidad farmacéutica y la seguridad de fármacos de células biológicas.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 para controlar los cambios en tipos o características celulares en el tiempo.

13. Uso del método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 para el diagnóstico de diversas enfermedades.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde las diversas enfermedades son enfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en infección vírica o bacteriana, enfermedades por priones, diabetes y cáncer.

5 15. Uso del método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 para analizar la pureza de células biológicas usadas en un trasplante/injerto.

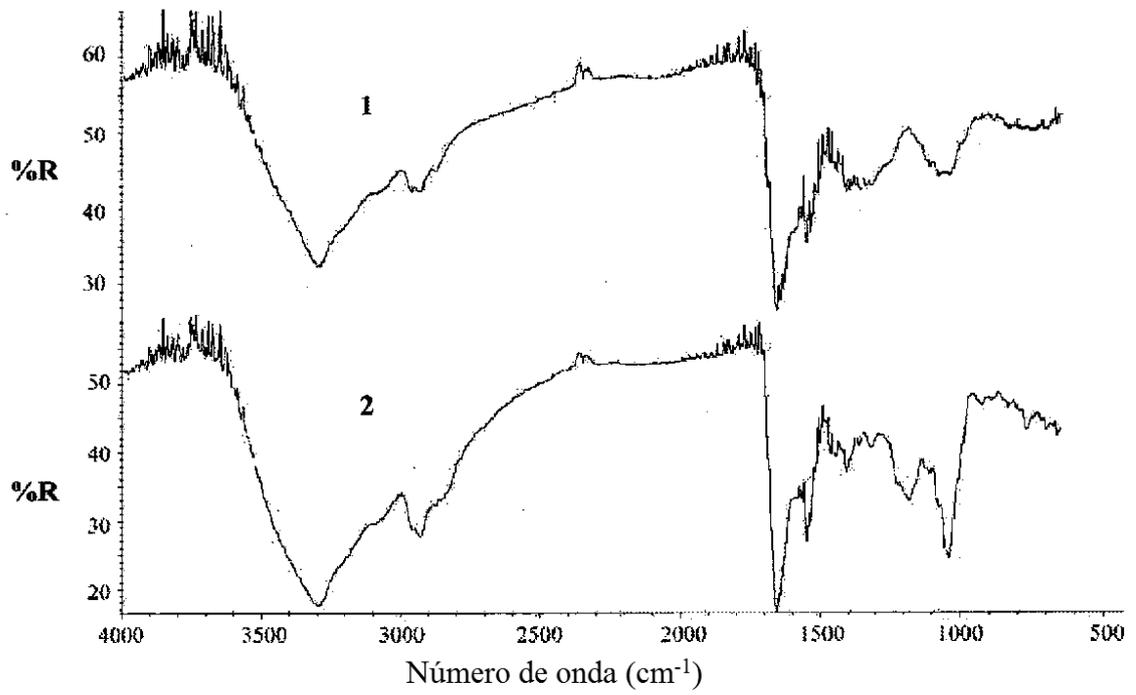


Fig. 1

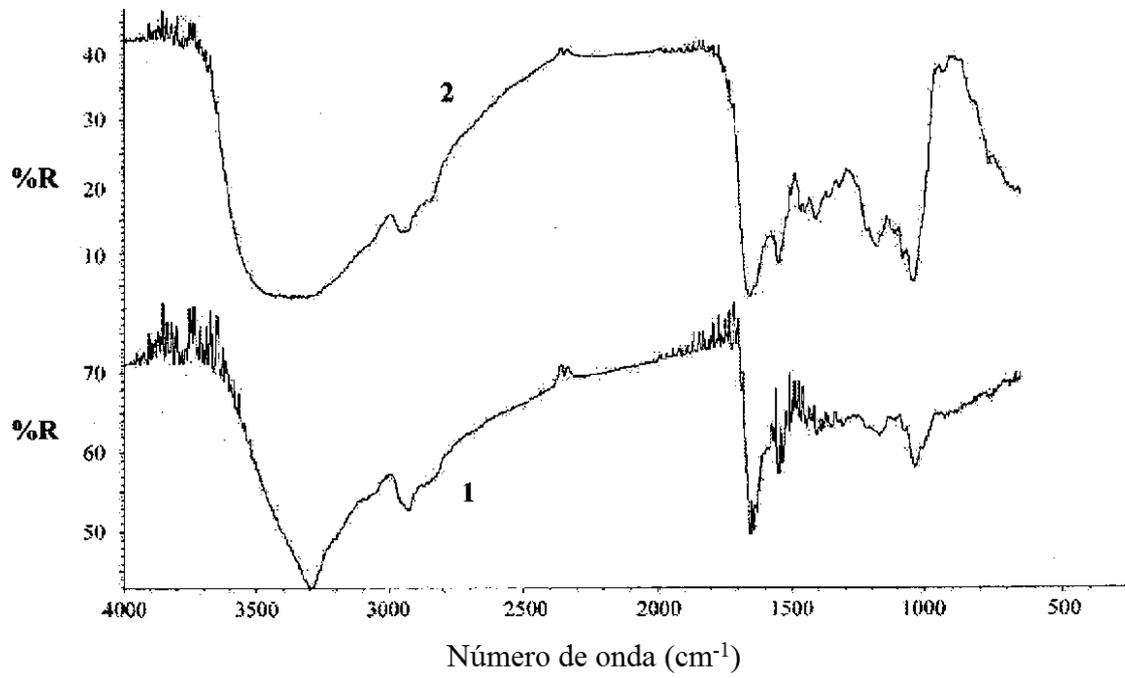


Fig. 2

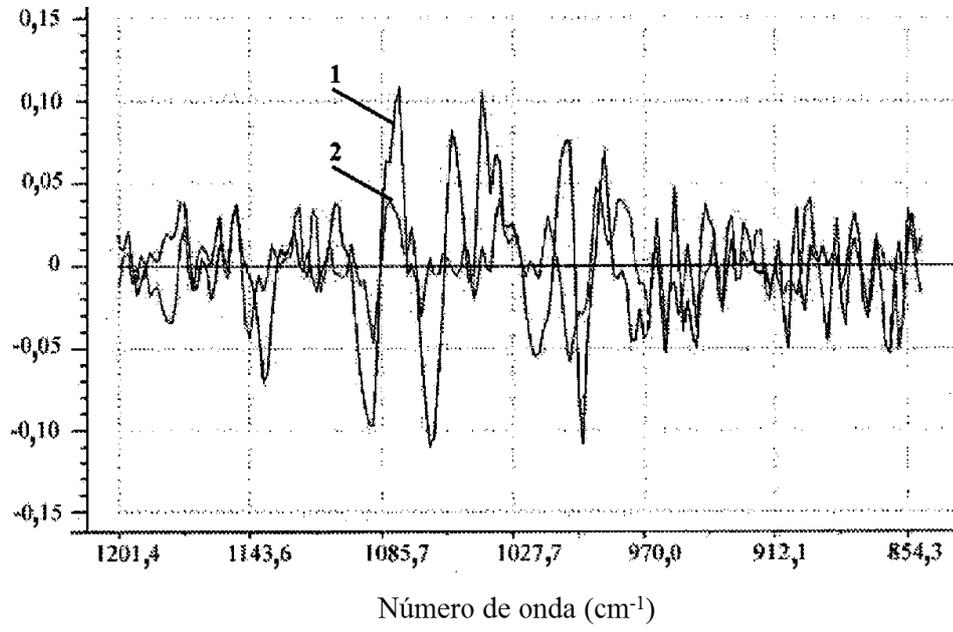


Fig. 3