

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 940**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2006** **E 06779217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013** **EP 1917349**

54 Título: **Complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva conjugada con una marca cargada negativamente, cuya marca es una microesfera, cuya microesfera no está revestida con proteínas, y usos del mismo**

30 Prioridad:

**26.08.2005 GB 0517382**

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

**27.01.2014**

73 Titular/es:

**PLASTICELL LIMITED (100.0%)**  
**Stevenage Bioscience Catalyst, Gunnels Wood**  
**Road**  
**Stevenage SG1 2FX, GB**

72 Inventor/es:

**CHOO, YEN;**  
**HORNBY, FRASER y**  
**GIRDLESTONE, JOHN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 439 940 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

Complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva conjugada con una marca cargada negativamente, cuya marca es una microesfera, cuya microesfera no está revestida con proteínas, y usos del mismo

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere ampliamente a un cultivo celular -tal como el cultivo de células primarias, estirpes celulares, células pluripotentes, células totipotentes no humanas y células pluripotentes excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas.

**Antecedentes de la invención**

Durante los últimos años el cultivo celular se ha convertido en una tecnología principal en las ciencias de la vida. El cultivo celular se describe en "Basic Cell Culture" Oxford University Press (2002) Ed. J. M. Davis; y "Animal Cell Culture" Oxford University Press (2000) Ed. John R. W. Masters; ambos incorporados en la presente memoria por referencia en su totalidad. El cultivo celular proporciona la base para el estudio de procesos celulares tales como la viabilidad, fenotipo, genotipo, proliferación y diferenciación de células y la formación de moléculas biológicas, intermedios y productos. También se ha proporcionado el medio para el estudio de la proliferación de estos procesos, a partir del nivel genérico -ya sea en aislamiento ya sea en animales completamente transgénicos- en sentido descendente hasta el nivel de moléculas de proteínas individuales. A pesar de su enorme contribución al estado actual de la biología, muchos cultivos celulares conservan una disciplina de desarrollo, a pesar de la ciencia inusualmente interesante que últimamente ofrece la posibilidad de terapia genética e ingeniería tisular.

Un objetivo importante del cultivo celular es la capacidad para generar la proliferación de una amplia variedad de células in vitro. El listado de tipos celulares diferentes que se pueden dejar proliferar en un cultivo es amplio (véase la colección American-Type Culture, <http://www.atcc.org>; European Collection of Cell Cultures, <http://www.ecacc.org.uk>; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-, <http://www.dsmz.de>), incluye ejemplos de la mayoría de los tipos celulares y está aumentando de forma continua a medida que se descubren más y más condiciones de cultivo. A pesar del progreso actual en el campo, el método de determinación de las condiciones de cultivo apropiadas para nuevos tipos celulares sigue siendo totalmente empírico; las condiciones de proliferación se descubren casi siempre por medio de ensayo y error. La elección del punto de partida con frecuencia está basada en las que se han usado previamente por parte de otros para células similares, o incluso en las que se usan actualmente en el laboratorio para diferentes células. Muchas veces, estas son simples y completamente inapropiadas y se debe iniciar un nuevo proceso de ensayo y error. Incluso cuando las condiciones de un nuevo cultivo son satisfactorias, merece la pena recordar que las adaptaciones de los protocolos anteriores han introducido un sesgo histórico al experimento. Por ejemplo, muchos de los experimentos preliminares con cultivos tisulares hicieron extensivo el uso de fibroblastos y hasta la fecha la mayoría de las condiciones normalizadas de cultivos celulares favorecen la proliferación de células procedentes del mesodermo (fibroblastos, endotelio, mioblastos). El desarrollo de un medio de proliferación selectivo para las células epiteliales y otros tipos de células basadas en estas condiciones constituyó un reto. Para algunos de los tipos celulares, se sabe que el suero -un componente normal de muchos medios de cultivo para células mesodérmicas- realmente inhibe la proliferación. Un aspecto de la invención descrito en la presente memoria es un método para desarrollar condiciones de cultivo apropiadas que permitan la viabilidad, proliferación y retención del fenotipo de tipos celulares particulares.

Algunos problemas comunes que todavía se encuentran en los cultivos celulares son la vida útil limitada de las estirpes celulares primarias, el cambio de las características de las estirpes celulares con el paso y su transformación acompañada por la pérdida de características celulares interesantes. Estos efectos limitan en gran medida la utilidad de las células cultivadas para su uso en experimentos o ensayos, por ejemplo los ensayos basados en células descritos a continuación. Las células primarias, es decir, células aisladas de nuevas a partir de tejidos, ofrecen con mucho los modelos de cultivo celular más precisos, ya que se comportan de una forma que se parece ampliamente a su tejido de origen. De manera marcada, aún no se ha desarrollado un método de cultivo fiable de células primarias y por consiguiente estas células exhiben una vida útil limitada in vitro. Esto supone una limitación técnica importante, por ejemplo cuando se intenta ampliar el cultivo primario, o cuando se intenta llevar a cabo un experimento a un plazo más largo. Un problema adicional asociado al uso de cultivos primarios es que debido a que requieren aislamiento nuevo constante, puede resultar difícil disponer de materia primaria como fuente, en particular procedente de humanos y también es difícil obtener estirpes que se comporten de manera consistente. Un tercer aspecto de la invención es por tanto un método para cultivar células primarias con el fin de obtener cultivos viables con una vida útil prolongada.

Si se mantienen los cultivos primarios in vitro durante un periodo amplio, normalmente experimentan una crisis en la que la mayoría de las células perecen, sin embargo las células que sobreviven tienen una vida más larga y se pueden cultivar de forma indefinida. La mayoría de estas estirpes celulares son casi invariablemente representaciones pobres de la células y se descubren en tejidos animales intactos. Un motivo para esto se basa en el hecho de que el proceso que permite a las células convertirse en inmortales también tiene un impacto sobre las características de la célula. Por ejemplo, la mayoría de los cultivos celulares estabilizados han detenido sus genes

específicos tisulares de expresión y en lugar de ello, únicamente expresan genes de verificación necesarios para la proliferación continua en el cultivo celular -como resultado de ello la mayoría de las citadas estirpes celulares son más parecidas unas a otras que el tejido del que proceden de forma original. Por ejemplo, la mayoría de las células hepáticas han detenido la expresión de enzimas que metabolizan fármacos que, normalmente, las convertiría en herramientas interesantes para someter a ensayo la toxicidad del fármaco. Otro aspecto de la invención descrito en la presente memoria es un método de cultivo de células de forma que proporcionen modelos de tejidos más precisos. Esto a su vez mejoraría la fiabilidad y el poder de predicción de los experimentos basados en células y los ensayos.

Las técnicas mejoradas para el cultivo de células y los métodos para descubrir y poner en práctica dichas técnicas para la regulación de procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, actividad metabólica y expresión fenotípica se presentan en la solicitud internacional en trámite junto con la presente WO 2004/031369. Cuando se manejan números grandes de unidades celulares, su identidad y/o historia de cultivo celular (por ejemplo, la cronología y la naturaleza exacta de una serie de condiciones de cultivo a las que un grupo o unidad cualquiera ha podido estar expuesto) se pueden confundir. El documento WO 2004/031369 describe métodos mejorados para determinar la identidad y/o la historia de cultivo celular de las unidades celulares. En un aspecto, se describe el uso de unidades celulares que se pueden manejar de forma apropiada en los experimentos de biología celular, permitiendo por ejemplo la separación y la agrupación de dichas unidades.

La presente invención pretende proporcionar mejoras adicionales que solucionen algunas de las limitaciones de la técnica anterior.

#### Sumario de la invención

En la presente memoria se describe un método para determinar la historia de cultivo celular de una unidad celular marcada con más de una marca (por ejemplo, tipo de marca) que comprende las etapas de: (a) medir uno o más parámetros de cada marca que se usa para marcar la unidad celular; (b) identificar cada marca de la unidad celular; y (c) correlacionar la identidad de cada marca para identificar la unidad celular y/o las condiciones de cultivo celular específicas a las que se ha expuesto la unidad celular.

También se muestra en la presente memoria un producto de programa de ordenador que incluye un programa de ordenador para controlar un ordenador con el fin de llevar a cabo el método descrito.

Se muestra en la presente memoria un aparato para determinar la historia de cultivo celular de una unidad celular que comprende una lógica de procesamiento de datos para llevar a cabo operaciones de procesamiento de datos de acuerdo con el método descrito en la presente memoria.

En un aspecto, se proporciona un complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva conjugada a una marca con carga negativa, siendo la marca una microesfera, no estando la microesfera revestida con proteínas, en el que el microvehículo comprende proteína, celulosa, polietileno, polistírol, vidrio, colágeno-aminoglucano-glucosa y/o gelatina.

También se muestra en la presente memoria un complejo que comprende un microvehículo y una marca con forma de bastoncillo.

De manera ventajosa, se pueden utilizar las calidades de las marcas que se describen en la presente memoria junto con las mejoras que se describen en la presente memoria. Dichas mejoras comprenden por ejemplo la capacidad de marcado mejorada de tipos específicos de marca y tipos específicos de unidades celulares, la separación mejorada de marcas a partir de unidades celulares y el análisis mejorado de marcas.

En otro aspecto, se proporciona un método para separar un complejo de la presente invención, que comprende la etapa de poner en contacto dicho complejo con una proteasa, en el que dicho microvehículo comprende consiste o consiste esencialmente en una proteína.

En otro aspecto, se proporciona un método para separar un complejo de la presente invención, que comprende la etapa de poner en contacto dicho complejo con ácido.

De manera ventajosa, estos métodos se pueden usar para separar una unidad celular y una marca de tal forma que la marca se pueda analizar usando los métodos descritos en la presente memoria. Además, estos métodos no tienen como resultado marcas que se estropean por medio de dicho tratamiento. Aún más, estos métodos abordan el problema de las marcas que se obtienen de forma que se complica seriamente su análisis -tales como las marcas que se dispersan sobre un gran área superficial y/o que flotan sobre una disolución acuosa más densa.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula que comprende el uso del complejo de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de una o más células y exponer dicho primer conjunto de grupos a condiciones de cultivo deseadas; (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación; (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de una o más células; (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas; (e) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(d) iterativamente según se requiera; y (f) evaluar el efecto sobre una célula dada o sobre grupos de células dados de las condiciones de cultivo a las que se ha expuesto, en el que cada grupo de una o más células es adherente o está unido por el complejo de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para exponer un célula a una variedad de condiciones de cultivo, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de una o más células y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas; (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación; (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de una o más células; (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas; y (e) de manera opcional, repetir las etapas (b)-(d) iterativamente según se requiera, en el que cada grupo de una o más células es adherente o está unido por medio del complejo de la presente invención.

Se muestra en la presente memoria un método para identificar un gen que influye en un proceso celular, que comprende las etapas de: (a) determinar el efecto de una o más condiciones de cultivo sobre una unidad celular, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria; b) analizar la expresión del gen en dichas unidades celulares expuestas a dichas condiciones de cultivo; y c) identificar genes que se expresan de manera diferencial en las condiciones de cultivo deseadas.

También se muestra en la presente memoria un método para producir un ácido nucleico que codifica un producto génico que influye en un proceso celular, que comprende identificar un gen de acuerdo con el método descrito en la presente memoria y producir al menos una región de codificación de dicho gen por medio de síntesis de ácido nucleico o replicación biológica.

Se muestra en la presente memoria un método para inducir un proceso celular, que comprende las etapas de: (a) identificar uno o más genes que se expresan de forma diferencial en asociación con el proceso de celular de acuerdo con el método descrito en la presente memoria; y (d) modular la expresión de dicho uno o más genes en la célula.

También se muestran en la presente memoria métodos para identificar el estado de un proceso celular de una célula, que comprenden las etapas de: (a) identificar uno o más genes que se expresan de forma diferencial en asociación con el proceso celular de acuerdo con el método descrito en la presente memoria; y (b) detectar la modulación de expresión de dicho uno o más genes en una célula, determinando de este modo el estado del proceso celular de dichas células.

También se muestra en la presente memoria un método para inducir un proceso celular, que comprende las etapas de: (a) determinar el efecto de una o más condiciones de cultivo sobre una unidad celular, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria; (b) exponer un célula a condiciones de cultivo que incluyen el proceso celular; y (c) aislar la célula deseada.

Se muestra en la presente memoria un método para identificar un agente que es capaz de inducir un proceso celular, que comprende las etapas de: (a) determinar el efecto de uno o más agentes sobre una unidad celular, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria; y (b) identificar ese(esos) agente(s) que induce(n) el proceso celular en las unidades celulares.

También se muestra en la presente memoria un método para preparar un agente que es capaz de inducir un proceso celular, que comprende las etapas de: (a) determinar el efecto de uno o más agentes sobre una unidad celular, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria; (b) identificar ese(esos) agente(s) que induce(n) el proceso celular deseado en las unidades celulares; y c) sintetizar o aislar el(los) agente(s).

En otro aspecto, se proporciona un método para cultivar células pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas o células que proceden de células pluripotentes in vitro, que comprende las etapas de: a) incubar un cultivo de células pluripotentes; y b) separar dicho cultivo en dos o más grupos de células pluripotentes; y cultivar dichas células pluripotentes en dos o más conjuntos diferentes de condiciones de cultivo, en el que las células se cultivan en grupos que comprenden una o más células adheridas o unidas al complejo de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para cultivar células pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, que comprende la proliferación de dichas células pluripotentes adheridas al complejo de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para obtener células diferenciadas a partir de células pluripotentes in

vitro, que comprende las etapas de: (a) proliferar células pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, adherentes al complejo de la presente invención en un medio de cultivo; (b) transferir el complejo desde un medio de cultivo a otro; (c) de manera opcional repetir al etapa (b) según se requiera; y (d) obtener la células pluripotentes diferenciadas unidas al complejo.

5 En otro aspecto, se proporciona un método para proliferar células pluripotentes excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas in vitro que comprende las etapas de: (a) sembrar dichas células sobre el complejo de la presente invención; y (b) propagar las células al tiempo que se mantiene unidas al complejo.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para cultivar células excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas in vitro, que comprende dejar proliferar dichas células adheridas al complejo de la presente invención.

En la presente memoria se muestra un método para identificar una marca obtenida o que puede obtenerse a partir de una unidad celular que comprende las etapas de: (a) separar la unidad celular y la marca; (b) obtener una o más  
15 imágenes de la marca usando una técnica microscópica; y (c) analizar las imágenes para determinar una o más características de la marca.

En otro aspecto, se proporciona el uso del complejo de la presente invención para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula.

20 También se muestra el uso de una marca con forma de bastoncillo -tal como un nanoalambre- para marcar un microvehículo.

También se muestra el uso de una marca con forma de bastoncillo -tal como un nanoalambre- para determinar el  
25 efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula.

## Realizaciones

En algunas realizaciones, el método es un método automatizado.

30 En algunas realizaciones, la unidad celular está unida o adherida a un microvehículo.

En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo poroso o sólido.

35 En algunas realizaciones, el microvehículo poroso está seleccionado entre el grupo que consiste en microvehículo de Cytopore (por ejemplo, un microvehículo de Cytopore 1 o un microvehículo de Cytopore 2), un microvehículo de Cultispher, un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S, un microvehículo de Informatrix, un microvehículo de Microsphere, un microvehículo de Siran y un microvehículo MC Microporous.

40 En algunas realizaciones, el microvehículo sólido está seleccionado entre el grupo que consiste en microvehículo de Cytodex (por ejemplo, un microvehículo de Cytodex 1, Cytodex 2 o Cytodex 3) un microvehículo de Biosilon, un microvehículo de Bioglass, un microvehículo de FACT III o un microvehículo DE 52/53.

45 En algunas realizaciones, el(los) parámetro(s) son el tamaño de las marcas y/o las propiedades ópticas de las marcas.

En algunas realizaciones, las propiedades ópticas están seleccionadas entre el grupo que consiste en: reflectividad de luz, color, longitud(es) de onda de emisión de fluorescencia e intensidad de emisión de fluorescencia.

50 En algunas realizaciones, se mide una o más imágenes de cada marca de la unidad celular en el campo de interés.

En algunas realizaciones, se mide una o más imágenes de cada marca de la unidad celular del campo de interés usando microscopía.

55 En algunas realizaciones, el método de microscopía está seleccionado entre el grupo que consiste en microscopía de campo brillante, microscopía con contraste de fase, microscopía de iluminación oblicua, microscopía de campo oscuro, microscopía de contraste de interferencia diferencial, microscopía de contraste de reflexión, microscopía de contraste de Varel, microscopía de polarización, microscopía de interferencia y microscopía de fluorescencia.

60 En algunas realizaciones, se sacan perfiles de una o más imágenes de cada marca de la célula unitaria en el campo de interés.

En algunas realizaciones, se mide una o más imágenes de fluorescencia de cada marca de la célula unitaria en el  
65 campo de interés.

- En algunas realizaciones, los perfiles de una o más imágenes se cargan sobre una o más imágenes de fluorescencia.
- 5 En algunas realizaciones, se miden una o más imágenes de fluorescencia de cada marca de la célula unitaria en el campo de interés para cada fluoróforo que se usa para llevar a cabo las marcas.
- En algunas realizaciones, se identifica cada marca de la unidad celular haciendo reaccionar uno o más parámetros de la marca dentro de uno o más perfiles.
- 10 En algunas realizaciones, uno o más parámetros de la marca son el área y/o la densidad óptica de la marca
- En algunas realizaciones, uno o más parámetros de la marca se introducen en una hoja de cálculo.
- 15 En algunas realizaciones, el fluoróforo está seleccionado entre el grupo que consiste en un fluoróforo que emite una fluorescencia azul, verde, rojo próximo o rojo lejano.
- En algunas realizaciones, en las que se usan dos o más fluoróforos, los fluoróforos no se inactivan unos con otros.
- 20 En algunas realizaciones, los tamaños están seleccionados entre al menos 3 tamaños diferentes -tales como 4, 5, 6 o 7 tamaños diferentes.
- En algunas realizaciones, los tamaños están seleccionados entre el grupo que consiste en aproximadamente 1,9  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5,8  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 7,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9,7  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 9,8  $\mu\text{m}$ .
- 25 En algunas realizaciones, el fluoróforo está seleccionado entre el grupo que consiste en UV2, Starfire Red y TRITC.
- En algunas realizaciones, la cantidad de fluoróforo está seleccionada entre 5 cantidades diferentes.
- 30 En algunas realizaciones, estas cantidades están indicadas por medio de intervalos (por ejemplo, intervalos de intensidad de fluorescencia).
- En algunas realizaciones, cada cantidad diferente proporciona aproximadamente una diferencia de 5 a 10 veces en cuanto a brillo.
- 35 En algunas realizaciones, hay al menos 2 parámetros diferentes.
- En algunas realizaciones, hay al menos 5 valores enteros diferentes.
- 40 En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo poroso.
- En algunas realizaciones, el microvehículo consiste o consiste esencialmente en proteína, celulosa, polietileno, poliestireno, vidrio, colágeno, volágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina.
- 45 La marca tiene un grupo negativo.
- La marca cargada es una microesfera.
- En algunas realizaciones, la microesfera es de aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro.
- 50 En algunas realizaciones, la microesfera es una microesfera modificada con carboxilato (CML).
- En algunas realizaciones, la marca comprende, consiste o consiste esencialmente en poliestireno.
- 55 En algunas realizaciones, el complejo (por ejemplo, el microvehículo) se adhiere o se une a una unidad celular.
- En algunas realizaciones, al menos un anticuerpo está unido a la célula.
- Una marca con forma de bastoncillo puede ser un nanoalambre.
- 60 El nanoalambre puede ser un nanoalambre de aluminio. El nanoalambre puede ser un nanoalambre de aluminio.
- El nanoalambre puede estar revestido con plata y/o oro.
- 65 El nanoalambre puede ser de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro. El nanoalambre puede ser de

aproximadamente 1  $\mu$ M o menos de diámetro.

El nanoalambre puede ser de aproximadamente 10  $\mu$ M o menos de longitud.

5 En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo poroso.

En algunas realizaciones, el microvehículo comprende, consiste o consiste esencialmente en gelatina.

En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo de Cultispher.

10 En algunas realizaciones, el microvehículo está seleccionado entre el grupo que consiste en un microvehículo de Cultispher, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S.

15 En algunas realizaciones, la proteasa está seleccionada entre el grupo que consiste en proteinasa K, tripsina, termolisina y caspasa.

En algunas realizaciones, la proteinasa K se usa en una cantidad de aproximadamente 0,5  $\mu$ l o menos.

20 En algunas realizaciones, el complejo se pone en contacto con proteinasa K durante al menos 20-60 minutos.

En algunas realizaciones, el complejo se pone en contacto con la proteasa en un volumen de aproximadamente 5  $\mu$ l o menos.

25 En algunas realizaciones, el microvehículo comprende, consiste o consiste esencialmente en celulosa.

En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo de Cytopore.

En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo de Cytopore 2.

30 En algunas realizaciones, el ácido está seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico e hipoclorito de sodio.

En algunas realizaciones, el ácido es ácido clorhídrico de 37 % (~ 12M).

35 En algunas realizaciones, el ácido es ácido sulfúrico concentrado.

En algunas realizaciones, el complejo se pone en contacto con ácido en un volumen de aproximadamente 5  $\mu$ l o menos.

40 En algunas realizaciones, el complejo se calienta en presencia del ácido.

En algunas realizaciones, las células se cultivan en unidades celulares, comprendiendo cada unidad celular una o más células.

45 En algunas realizaciones, las unidades celulares son células individuales.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo son medios a los que se expone la célula.

En algunas realizaciones, el medio contiene uno o más agentes específicos que influyen en un proceso celular.

50 En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar a una o más temperaturas específicas.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar en uno o más sustratos específicos.

55 En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo deseadas influyen en un proceso celular.

En algunas realizaciones, la modulación de la expresión del gen en las células comprende transfección de dicho uno o más genes en el interior de la célula.

60 En algunas realizaciones, la modulación de la expresión del gen comprende la administración exógena de un producto de gen.

En algunas realizaciones, dichos uno o más genes codifican un marcador.

65

En algunas realizaciones, dicho marcador se puede detectar por medio de un inmunoensayo.

En algunas realizaciones, el proceso celular es diferenciación o proliferación celular.

- 5 En algunas realizaciones, las unidades celulares son células individuales.

En algunas realizaciones, dichas células pluripotentes se someten a al menos un cambio de las condiciones de cultivo.

- 10 En algunas realizaciones, dicho cambio de las condiciones de cultivo comprende un cambio de medio.

En alguna realización, se aíslan las células diferenciadas por medio de desligado enzimático o químico a partir del complejo.

- 15 En algunas realizaciones, se aíslan las células diferenciadas por medio de digestión del complejo.

### Descripción de las figuras

- 20 La figura 1 ilustra una muestra de microperlas de Duke coloreadas vistas al microscopio con luz con marcas Negro, Rojo y Azul en dos tamaños diferentes (5,4  $\mu\text{m}$  y 7,6  $\mu\text{m}$ ).

La figura 2 ilustra microvehículos de Cultispher-G atrapados en un filtro de 70  $\mu\text{m}$  durante los lavados para retirar las microperlas no ligadas (intervalos de tamaño de 4,4  $\mu\text{m}$ -9,8  $\mu\text{m}$ ), que pasan a través del mismo.

- 25 La figura 3 ilustra la digestión de microvehículos de Cultispher-G con 2U/ml de proteinasa k (las figuras muestran el mismo microvehículo durante un período de 15 minutos, como viene indicado).

La figura 4 ilustra la digestión de microvehículos de Cytopore 2 con HCl de 37 % (~ 12 M) (las figuras muestran el mismo microvehículo durante un período de 1 h y 30 minutos, como viene indicado).

- 30 La figura 5 ilustra un Diagrama de Flujo de Análisis de Marca Imagepro para el análisis al microscopio con el fin de identificar una o más áreas y/o valores de densidad óptica para una microperla. Las imágenes están tomadas usando varias exposiciones y filtros: filtro UV2: Ex 340-380 nm; Em 435-485 nm; filtro TRITC: Ex 540/25 nm; Em 605/55 nm; Rojo Starfire: Ex 620/60 nm; Em 700/75 nm.

- 35 La figura 6 ilustra muestra un Diagrama de Flujo de ID de Marca en el que las microperlas (marcas) son de 2 tamaños diferentes, cada uno de ellos con 4 niveles de fluoróforo A  $\pm$  fluoróforo B. El fluoróforo A es UV2 y el Fluoróforo B es TRITC. F1 -medición de densidad óptica media para la marca usando un canal UV2; F2 -medición de densidad óptica media para marca usando un canal de Rojo de Starfire; F3 -medición de densidad óptica media para marca usando un canal de TRITC; f1 -límite inferior para fluorescencia de la marca 1; f2 -límite superior para la fluorescencia de la marca 1; f3 -valor umbral inferior para fluorescencia de TRITC de todas las marcas; f4 -límite inferior para fluorescencia de la marca 2; f5 -límite superior de fluorescencia de Tor de la marca 2 etc.; Área -medición de área; a1 -límite inferior de área para la marca de tamaño 1; a2 -límite superior de área para la marca de tamaño 1; a3 -límite inferior de área para la marca de tamaño 2; a4 -límite superior de área para la marca de tamaño 2 etc.; Y = si; N = no.

- 50 En un detalle adicional, la caja (a) muestra que el límite inferior para un primer parámetro es menor que la medición media para un primer parámetro y el límite superior para un primer parámetro es mayor que la medición media para un primer parámetro; la caja (b) muestra que el límite inferior para un segundo parámetro es menor que la medición media para un segundo parámetro y el límite superior para un segundo parámetro es mayor que la medición media para un segundo parámetro; las cajas (c), (f), (i), (k), (o), (q), (t) y (v) muestran cada una que la medición media para un tercer parámetro es mayor que el límite inferior para el tercer parámetro; la caja (e) muestra que si el resultado de la caja (b) es negativo entonces se miden las mediciones superior, inferior y media para un valor entero adicional de un parámetro. En particular, la caja (e) muestra que el límite inferior de área para un valor entero de un parámetro es menor que la medición media del parámetro y que el límite superior del área para el valor entero del parámetro es mayor que la medición media del parámetro. Esto se repite para valores enteros adicionales de un parámetro en las cajas (h), (j), (n), (p), (s) y (u).

- 60 La figura 7 muestra un diagrama de flujo alternativo en el que se examinan uno o más valores enteros de un parámetro en serie, de tal forma que las decisiones "No" de la figura 6 continúan para interrogar a esos valores enteros para un parámetro adicional. El fluoróforo A es Rojo de Starfire y el Fluoróforo B es TRITC. Por ejemplo, se pueden examinar F1 y F2 en serie, de manera que las decisiones "No" de la figura 6 continúan para interrogar los valores de Rojo de Starfire para la marca de tamaño relevante. F1 -medición de densidad media para el canal UV2; F2 -medición de densidad media para el canal Rojo de Starfire; F3 -medición de densidad media para los canales TRITC, f18 -límite inferior para la fluorescencia de la marca 9; f19 -límite superior para la fluorescencia de la marca



9; f3 -umbral límite inferior para la fluorescencia TRITC de todas las marcas 1; Y = si; N = No.

La figura 8 muestra microvehículos de gelatina de Cultispher-G macroporosos (PerCell Byolytica AB) sembrados con células ES de ratón y teñidos con un kit que muestra actividad de fosfatasa alcalina, un marcador de pluripotencia.

La figura 9 ilustra una muestra de 140.000 microvehículos procesada por un Cultivo Celular Combinatorio a través de la matriz que se muestra en la Tabla 1 e incubada sobre D13 con el reactivo de ensayo de macrófago DQ-ovoalbúmina (Sondas Moleculares). El panel izquierdo superior muestra un imagen de contraste de fase de los microvehículos. La imagen derecha superior muestra el mismo campo usando un conjunto de filtro FITC, por medio del que los macrófagos se pueden distinguir fácilmente como células redondeadas de gran tamaño marcadas internamente con fluorescencia verde. La imagen izquierda inferior muestra el mismo campo -usando un conjunto de filtro FITC- que revela marcas cargadas con UV2 asociadas a los microvehículos.

La figura 10 es como la figura 9 pero para un campo diferente.

La figura 11 representa gráficos que muestran el número y la identidad de todas las marcas de los microvehículos que portan micrófago a) C5, b) A22 y c) E6. Las barras marcadas con un asterisco en b) y c) indican las condiciones que se determinaron finalmente para dar como resultado la diferenciación reproducible del macrófago.

La figura 12 es un ejemplo de un microvehículo que porta un gran número de macrófagos teñidos con DQ-ovoalbúmina (Sondas Moleculares).

La figura 13 es una representación gráfica de las 50 marcas de microesfera encargados en Bangs Laboratories (Fishers, IN). El tamaño de las microesferas fue entre 1,87  $\mu\text{m}$  y 9,77  $\mu\text{m}$  y se secaron con cinco utensilios distinguibles del fluoróforo Rojo de Starfire o alternativamente UV2.

La figura 14 es una muestra de calibración de marcas de microesferas teñidas con Rojo de Starfire analizadas de acuerdo con el tamaño de la marca y la intensidad de fluorescencia a un ajuste de exposición concreto. Se usó una muestra de calibración similar para determinar parámetros (indicados por óvalos) para la clasificación de las marcas unidas a los microvehículos.

La figura 15 muestra imágenes de control de calidad de partículas con forma de bastoncillo usadas en el experimento, obtenidas usando iluminación a 430 nm y un objetivo de 63X. Imagen izquierda 101010; Imagen Derecha 100001 (en la que 1 = Ag y 0 = Au).

La figura 16 es una imagen de una unidad celular marcada teñida con un tinte vital rojo neutro para mostrar células vivas y que muestra las partículas con forma de bastoncillo asociadas (indicadas por flechas), obtenidas usando iluminación de campo brillante y un objetivo de 20X.

La figura 17 es una imagen de las partículas con forma de bastoncillo tras la digestión de proteinasa K de una unidad celular marcada, obtenida por medio del uso de iluminación de campo brillante y un objetivo de 20X.

La figura 18 es un imagen que muestra la discriminación de dos partículas diferentes liberadas tras la digestión de proteinasa K de una unidad celular marcada, obtenida usando un conjunto de filtro CFP (Ex. 436/10; Em 465/30) con un objetivo de inmersión en aceite de 100x. La partícula de la izquierda es 100001 y la partícula de la derecha es 101010.

## Descripción detallada de la invención

### DEFINICIONES

**Condiciones de cultivo** Según se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones de cultivo" se refiere al entorno en el que se colocan las células o al que se exponen las células para favorecer la proliferación o la diferenciación de dichas células. De este modo, la expresión se refiere al medio, temperatura, condiciones atmosféricas, sustrato, condiciones de agitación y similares que pueden afectar a la proliferación y/o diferenciación de las células. Más particularmente, la expresión se refiere a agentes específicos, que se pueden incorporar al medio de cultivo y que pueden afectar a la proliferación y/o diferenciación de las células.

**Célula** Una célula, según se hace referencia en la presente memoria, se define como la unidad estructural más pequeña de un organismo que es capaz de funcionar de manera independiente, o un organismo denominado individual, que consiste en uno o más núcleos, citoplasma y varios orgánulos, todos ellos rodeados por una membrana celular semipermeable o pared celular. La célula puede ser procariota, eucariota o arqueobacteriana. Por ejemplo, la célula puede ser una célula eucariota. Se prefieren las células de mamíferos, especialmente las células humanas. Las células pueden ser naturales o modificadas, tal como por medio de manipulación genética o paso en un cultivo, para lograr las propiedades deseadas. Se define una célula madre con más detalle a continuación y es una célula multipotente o pluripotente o totipotente capaz de proporcionar más de un tipo celular diferenciado. Las

células pluripotentes se pueden diferenciar in vitro para dar lugar a células diferenciadas, que pueden ser por sí mismas multipotentes, o pueden estar diferenciadas de forma terminal. Las células diferenciadas in vitro son células que se han creado artificialmente por medio de exposición de las células pluripotentes a uno o más agentes que favorecen la diferenciación celular.

5

Proceso celular Un proceso celular es cualquier efecto, causa, evento, proceso o función característica, intracelular o extracelular, que ocurre o que se observa o que se puede atribuir a una célula. Ejemplos de procesos celulares incluyen, pero sin limitarse a, viabilidad, senescencia, muerte, pluripotencia, morfología, señalización, unión, reconocimiento, producción de moléculas o destrucción (degradación), mutación, plegado de proteínas, transcripción, translación, catálisis, transmisión sináptica, transporte vesicular, función de orgánulo, ciclo celular, metabolismo, proliferación, división, diferenciación, fenotipo, genotipo, expresión génica o el control de estos procesos.

10

Unidad celular Un grupo de células, que puede ser un grupo de una vez. Las agrupaciones de unidades celulares se pueden clasificar, subdividir y manipular sin sustancialmente disociar las propias unidades celulares, de manera que la unidad celular se comporta en forma de colonia de células y cada célula de la unidad celular está expuesta a las mismas condiciones de cultivo. Para algunas realizaciones, una unidad celular puede comprender un microvehículo o una perla a la que se adhiere un grupo de células.

15

Totipotente Una célula totipotente es una célula con el potencial para diferenciarse dando lugar a cualquier tipo de célula somática o germinal que se encuentra en el organismo. De este modo, se puede derivar cualquier células deseada, por determinados medios, a partir de una célula totipotente.

20

Pluripotente Una célula pluripotente es una célula que se puede diferenciar para dar lugar a más de un tipo celular, pero no a todos.

25

Marca En un aspecto, el término "marca", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier marca que se usa para identificar una unidad celular y/o determinar una condición de cultivo, o una secuencia de condiciones de cultivo, a las que se ha expuesto la unidad celular. En otro aspecto, el término "marca" se refiere a cualquier marca que se añade a una unidad celular como medio para marcar específicamente esa unidad celular, facilitando de este modo la identificación de una unidad celular y/o la determinación de una condición de cultivo y/o una secuencia de condiciones de cultivo, a la que se ha expuesto la unidad celular. De manera apropiada, la marca existe en un número de variantes relacionadas pero distintas que se distinguen fácilmente, como se describe en detalle adicional en la presente memoria. La marca forma parte de un complejo con un microvehículo -tal como un microvehículo de Cultispher-G o un microvehículo de Cytopore 2. La marca es una microesfera o una microperla. Según se hace referencia en la presente memoria, el término "marca" es sinónimo del término "etiqueta".

30

35

Exposición a condiciones de cultivo Se expone una célula a condiciones de cultivo cuando se pone en contacto con un medio, o se deja proliferar en condiciones que afectan a uno o más proceso(s) celular(es) tales como la proliferación, la diferenciación o el estado metabólico de la célula. De este modo, si las condiciones de cultivo comprenden cultivar la célula en un medio, se coloca la célula en el medio durante un período de tiempo suficiente para que tenga un efecto. De igual forma, si las condiciones son condiciones de temperatura, las células se cultivan a la temperatura deseada.

40

Agrupación La agrupación de uno o más grupos de unidades celulares implica la mezcla de los grupos para crear un grupo individual o agrupación que comprende unidades celulares de más de un fondo, es decir, que se ha expuesto a más de un conjunto diferente de condiciones de cultivo. Se puede subdividir una agrupación en grupos, bien al azar o bien no al azar; dichos grupos no son "agrupaciones" por sí mismos para los fines presentes, sino que se pueden agrupar por sí mismos por medio de combinación, por ejemplo tras la exposición a diferentes conjuntos de condiciones de cultivo.

45

50

Proliferación Se usa crecimiento celular y proliferación celular intercambiamente para indicar la multiplicación de los números celulares sin diferenciación en tipos celulares o linajes. En otras palabras, los términos indican un aumento de los números de células viables. En algunas realizaciones, la proliferación no viene acompañada de cambios apreciables en el fenotipo o genotipo.

55

Diferenciación La diferenciación celular es el desarrollo, a partir de un tipo celular, de un tipo de celular diferente. Por ejemplo, una célula bipotente, pluripotente o totipotente se puede diferenciar en una célula neural. La diferenciación puede venir acompañada de proliferación o puede ser independiente de la misma. El término "diferenciación" generalmente hace referencia a la adquisición de un fenotipo de un tipo celular maduro a partir de un tipo celular menos definido desde el punto de vista de desarrollo, por ejemplo una neurona, o un linfocito, pero no excluye la transdiferenciación, por medio de la que un tipo celular maduro se convierte en otro tipo celular maduro, por ejemplo, una neurona en un linfocito.

60

Estado de diferenciación El estado de diferenciación de una célula es el nivel en el que la célula se ha diferenciado a lo largo de un mecanismo o linaje particular.

65

Estado de proceso celular El estado de un proceso celular se refiere a si el proceso celular está ocurriendo o no y en los procesos celulares complejos puede indicar una etapa particular de ese proceso celular. Por ejemplo, un mecanismo de diferenciación celular de una célula puede estar inactivo o se puede inducir y puede comprender un número de etapas discretas o componentes tales como eventos de señalización que caracterizan la presencia de un conjunto característico de enzimas o intermedios.

Gen Un gen es un ácido nucleico que codifica un producto de un gen, es un polipéptido o un producto génico de ARN. Según se usa en la presente memoria, un gen incluye al menos la secuencia de codificación que codifica el producto génico; de manera opcional, puede incluir una o más regiones reguladoras necesarias para la transcripción y/o translación de la secuencia de codificación.

Producto génico Un producto génico es normalmente una proteína codificada por un gen de manera convencional. No obstante, el término también engloba productos génicos que no son de polipéptido, tal como ácidos ribonucleicos, que están codificados por el gen.

Síntesis de ácido nucleico Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar de acuerdo con cualquier técnica disponible. En algunas realizaciones, la síntesis de ácido nucleico está automatizada. Además, los ácidos nucleicos se pueden producir por medio de replicación biológica, tal como por medio de clonación y replicación en células bacterianas o eucariotas, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

Expresión diferencial Los genes que se expresan a diferentes niveles en respuesta a las condiciones de cultivo celulares se pueden identificar por medio de análisis de expresión génica, tal como en una matriz génica, por medio de métodos conocidos en la técnica. Los genes que se expresan diferencialmente muestran una cantidad mayor o menor de ARNm o producto génico en la célula en las condiciones de ensayo que en condiciones alternativas, con respecto a los niveles de expresión génica totales.

Transfección Los genes se pueden someter a transfección en células por cualquier medio apropiado. El término se usa en la presente memoria para hacer referencia a transfección convencional, por ejemplo usando fosfato de calcio, pero también para incluir otras técnicas para transferir ácidos nucleicos a una célula, incluyendo transformación, transducción vírica, electroporación y similares.

Modulación El término modulación se usa para hacer referencia a un aumento y/o disminución del parámetro objeto de modulación. De este modo, la modulación de la expresión génica incluye tanto el aumento de la expresión génica como la disminución de la expresión génica.

Valor entero Esta expresión se refiere a una entidad individual de un parámetro. A modo de ejemplo, si el parámetro es el tamaño de la marca, entonces el valor entero será uno o más de los tamaños específicos dentro del parámetro.

## IDENTIFICACIÓN DE MARCAS ASOCIADAS A UNA O MÁS UNIDADES CELULARES

En la presente memoria se describe un método para determinar la historia de cultivo celular de una unidad celular marcada con una o más marcas (por ejemplo, más de un tipo de marca) que comprende las etapas de: (a) medir uno o más parámetros de cada marca que se usa para marcar la unidad celular; (b) identificar cada marca en la unidad celular; y (c) correlacionar la identidad de cada marca con la identidad de la unidad celular y las condiciones de cultivo celular específicas a las que se ha expuesto la unidad celular.

También se muestra en la presente memoria un método para determinar la historia de cultivo celular de una unidad celular marcada con uno o más tipos de marca que comprenden las etapas de: (a) obtener las marcas a partir de las unidades celulares en una forma apropiada para el análisis; (b) medir uno o más parámetros de cada marca que se usa para marcar una unidad celular; (c) identificar cada marca en la unidad celular; y (d) correlacionar la identidad de cada marca con la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celular a las que se expone la unidad celular.

El(los) parámetro(s) pueden ser el tamaño de las marcas y/o las propiedades ópticas de las marcas. Ejemplos de propiedades ópticas de las marcas incluyen, pero sin limitarse a, reflectividad de luz, color, longitud(es) de onda de fluorescencia y/o intensidad de emisión de fluorescencia.

La(s) unidad(es) celulares a analizar se pueden separar de una muestra que puede contener muchas unidades celulares diferentes.

Las marcas de la unidad(es) celular(es) objeto de análisis se pueden aislar de la unidad celular. En algunas realizaciones, esto se consigue por medio de digestión enzimática y/o hidrólisis ácida de la unidad celular. En algunas realizaciones, esto se consigue usando los métodos descritos en la presente memoria. De manera ventajosa, en determinadas realizaciones esto tiene como resultado la destrucción de la unidad celular pero las marcas se obtienen intactas.

En una realización de la presente invención, se miden una o más marcas diferentes para una unidad celular -tal como una unidad celular presente en una muestra que comprende una pluralidad de unidades celulares.

En algunas realizaciones, será de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 o más (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones será de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular.

En algunas realizaciones, será de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 o más (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones será de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 35 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 45 a aproximadamente 50 (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, se espera que sea de aproximadamente 50 o más (tipos de) marcas diferentes por unidad celular.

En algunas realizaciones, será de aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75 o incluso 80 o más (tipos de) marcas diferentes por unidad celular. En algunas realizaciones, será de aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75 o incluso 80, 90, 100, 250, 500, 750 o 1000 o más (tipos de) marcas diferentes por unidad celular.

Cada uno de los parámetros descritos anteriormente puede tener un número diferente de valores enteros. En algunas realizaciones, existen al menos 2, 3, 4 o 5 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 10 valores enteros diferentes de cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 15 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 20 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 25 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 30 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 35 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 40 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 45 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 50 valores enteros diferentes para cada parámetro.

En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y más de 5 valores enteros diferentes para cada parámetro.

En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y más de 5 y menos de 50 valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 50 o menos valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 50 o más valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 40 o menos valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 30 o menos valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 20 o menos valores enteros diferentes para cada parámetro. En algunas realizaciones, existen al menos 2 parámetros diferentes y 10 o menos valores enteros diferentes para cada parámetro.

Cada unidad celular puede contener más de una marca (por ejemplo, múltiple) de cada especie.

De manera ventajosa, este método se puede automatizar de tal forma que se pueden procesar muchas unidades celulares y/o muchas muestras. Esto es particularmente ventajoso, ya que cada muestra puede tener muchas marcas diferentes (por ejemplo cientos) en la misma, generando de este modo una gran cantidad de datos.

Para algunas realizaciones de la presente invención, existe un máximo de 50 marcas diferentes. A modo de ejemplo, el uso de microperlas hidrófilas CML como se describe en la presente memoria normalmente tiene como resultado este número de microperlas. Se pueden usar las microperlas hidrófilas CML juntas con uno o más microvehículos. En algunas realizaciones, se usan las microperlas hidrófilas CML junto con un microvehículo Cytapore 2.

Las marcas de la muestra pueden ser todas diferentes o pueden ser todas iguales. Las marcas pueden ser de tamaños diferentes -tales como entre aproximadamente 1-10  $\mu\text{m}$ , de modo preferido de aproximadamente 1,9  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 5,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 5,8  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 7,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 9,7  $\mu\text{m}$  y/o aproximadamente de 9,8  $\mu\text{m}$ . Estas marcas pueden ser microesferas -tales como

microesferas de CML- y los diámetros de dichas microesferas pueden estar entre 1-10  $\mu\text{m}$ , de modo preferido de aproximadamente 1,9  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5,8  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 7,4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente de 9,7  $\mu\text{m}$  y aproximadamente de 9,8  $\mu\text{m}$ .

5 En una realización, se correlaciona una marca particular con una condición conocida de cultivo celular. Por consiguiente, una vez que se ha marcado la célula con esta marca y se ha cultivado en las condiciones correspondientes, es posible identificar o seleccionas esas condiciones de cultivo que han dado lugar a una unidad particular de interés.

10 Aunque varios métodos de análisis de imágenes se encuentran disponibles en la técnica, se puede usar una combinación de soporte lógico de formación de imágenes Image Pro Plus de Media Cybernetics ([www.mediacy.com](http://www.mediacy.com)), un microscopio de fluorescencia Nikon TE2000-S y una cámara monocroma enfriada Evolution VF, suministrados por Media Cybernetics.

15 En una realización se miden una o más imágenes de cada marca en la unidad celular en el campo de interés. Normalmente, esto se puede conseguir usando microscopía -tal como microscopía de campo brillante, microscopía con contraste de fase, microscopía de iluminación oblicua, microscopía de campo oscuro, microscopía de contraste de interferencias diferencial, microscopía de contraste de reflexión, microscopía de contraste de Varel, microscopía de polarización, microscopía de interferencia y microscopía de fluorescencia. De manera apropiada, se pueden  
20 sacar perfiles para una o más imágenes de cada marca de la unidad celular en el campo de interés y/o se miden una o más imágenes de cada marca en la unidad celular en el campo de interés. El fluoróforo puede emitir, por ejemplo, una fluorescencia azul, verde, rojo próximo o rojo lejano. De manera apropiada, el fluoróforo está seleccionado entre el grupo que consiste en UV2, Rojo Starfire y TRITC. La cantidad de fluoróforo puede estar seleccionada entre 5 intervalos diferentes (por ejemplo, intervalos de intensidad de fluorescencia) y cada intervalo diferente es discreto.  
25 En algunas realizaciones, los intervalos pueden diferir en aproximadamente 2 a 5 veces o más en cuanto a brillo. En algunas realizaciones los intervalos pueden diferir en aproximadamente 5 a 10 veces o más en cuanto a brillo. En algunas realizaciones, los intervalos pueden diferir en aproximadamente 2 a 100 veces o más en cuanto a brillo. En algunas realizaciones, los intervalos pueden diferir en aproximadamente 2 a 1000 veces o más en cuanto a brillo.  
30 a brillo.

De manera apropiada, los perfiles para una o más imágenes se añaden sobre una o más imágenes de fluorescencia y se pueden medir una o más imágenes de fluorescencia de cada marca de la unidad celular del campo de interés para cada fluoróforo que se usa para llevar a cabo las marcas. Cada marca de la unidad celular puede identificarse  
35 por medio de lectura de uno o más parámetros tales como el área y/o la densidad óptica -de la marca dentro de uno o más perfiles.

De este modo, a modo de ejemplo, se pueden analizar las marcas por medio de microscopía usando un microscopio epifluorescente Nikon TE2000-S invertido equipado con conjuntos de filtros para la visualización de los fluoróforos -  
40 tales como TRITC, DAPI (UV2), GFP-B (todos de Nikon) y Cy5 (Chroma Technology). Las imágenes se pueden capturar en una cámara monocroma enfriada Evolution VF y se puede llevar a cabo el análisis de imágenes usando Image Pro Plus (ambos de Media Cybernetics).

Normalmente, los perfiles de las microesferas individuales se capturan usando métodos de microscopía y se  
45 calculan las áreas dentro de los mismos para ajustar el tamaño de las marcas. Se pueden usar las intensidades de fluorescencia de los diferentes canales para especificar de forma adicional la identidad de cada marca por medio de comparación con las muestras de referencia que contienen marcas conocidas.

De manera apropiada, los métodos de microscopía están seleccionados entre el grupo que consiste en microscopía de campo brillante, microscopía con contraste de fase, microscopía con iluminación oblicua, microscopía de campo oscuro, microscopía de contraste de interferencia diferencial, microscopía de contraste de reflexión, microscopía de  
50 contraste de Varel, microscopía de polarización, microscopía de interferencia y microscopía de fluorescencia.

En una realización, el método de microscopía es microscopía de campo brillante.

55 De manera opcional, los datos que se obtienen se pueden procesar usando métodos adicionales descritos en la presente memoria, que proporcionan la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celulares a las que se ha expuesto una unidad celular de una muestra objeto de determinación. De manera ventajosa, este proceso se puede automatizar permitiendo de este modo el procesamiento rápido de una gran cantidad de datos.

60 De manera ventajosa, el proceso utiliza un soporte lógico que cuenta el número de cada tipo de marca y posteriormente proporciona estos datos en forma de un listado, un gráfico o un diagrama.

De manera ventajosa, se pueden introducir los datos en una hoja de cálculo para análisis de alto rendimiento.

65 En un aspecto, el método de análisis de estos datos comprende una primera etapa de comparar los límites superior

- e inferior de al menos un parámetro de una marca con la medición media de al menos un parámetro de la marca. En una realización de la presente invención, los límites superior e inferior de cualquier parámetro se obtienen por medio de análisis de una pluralidad de marcas de referencia de las mismas especies. Si el límite inferior es menor que la \*medición media y el límite superior es más elevado que la medición media, entonces el método compara los límites superior e inferior de un segundo parámetro de una marca con la medición media del segundo parámetro de la marca. Si el límite inferior del segundo parámetro es menor que la medición media del parámetro y el límite superior del segundo parámetro es más elevado que la medición media de ese parámetro, entonces el método compara uno o más parámetros relativos al límite inferior del correspondiente parámetro.
- 5 Si algún punto de la medición media de cualquier parámetro no se encuentra dentro de los límites superior e inferior determinados para ese parámetro, entonces el método compara la medición media con respecto al segundo intervalo que comprende los límites diferentes para ese mismo parámetro.
- 10 En la presente memoria se muestra un método para determinar la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celular a las que se ha expuesto la unidad celular que comprende la etapa de: comparar los límites superior e inferior de al menos un parámetro de una marca con la medición media de al menos un parámetro de la marca.
- 15 En la presente memoria también se describe un método para determinar la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celular a las que se ha expuesto la unidad celular que comprende las etapas de: (a) comparar los límites superior e inferior de al menos un parámetro de una marca con la medición media de al menos un parámetro de la marca; (b) comparar la medición media de al menos un parámetro de la marca con el límite más inferior de al menos un parámetro de la marca; y (c) correlacionar la medición de al menos un parámetro de la marca con la identidad de la marca asociada a la unidad celular.
- 20 En una realización, si el límite inferior es menor que la medición media y el límite superior es mayor que la medición media, entonces el método compara los límites superior e inferior de un segundo parámetro de una marca con la medición media del segundo parámetro de la marca. Por ejemplo, el primer parámetro puede ser el tamaño y el segundo parámetro puede ser la intensidad o nivel de fluorescencia.
- 25 En una realización, si el límite inferior del segundo parámetro es menor que la medición media para ese parámetro y el límite superior del segundo parámetro es mayor que la medición media de ese parámetro, entonces el método compara uno o más parámetros relativos a un límite inferior del correspondiente parámetro.
- 30 En una realización, si el límite inferior no es menor que la medición media y la medición media no es menor que el límite superior, entonces se miden los límites superior e inferior de al menos un valor entero adicional del mismo parámetro de la marca. A modo de ejemplo, el valor entero adicional puede incluir, pero sin limitarse a un tamaño diferente, un fluoróforo diferente o un intervalo diferente de intensidad de fluorescencia. Por consiguiente, el parámetro para cada uno de estos valores enteros es tamaño, tipo de fluoróforo e intensidad de fluorescencia, respectivamente.
- 35 En una realización, si el límite inferior es menor que la medición media y la medición media es menor que el límite superior, entonces se mide al menos un parámetro adicional para la marca -tal como el tamaño, tipo de fluoróforo y/o nivel de fluoróforo en la marca.
- 40 En una realización, si la medición media para al menos un parámetro de la marca es mayor que el límite más bajo para al menos un parámetro de la marca, entonces el resultado se correlaciona con una o más marcas que poseen uno o más parámetros.
- 45 En una realización, si la medición media para al menos un parámetro de la marca no es mayor que el límite más bajo para uno o más parámetros de la marca, entonces el resultado se correlaciona con una marca que posee el parámetro.
- 50 En una realización, si el límite inferior no es menor que la medición media y la medición media no es menor que el límite superior para al menos un parámetro adicional, entonces se miden los límites superior e inferior de al menos un valor entero adicional del mismo parámetro de la marca.
- 55 En una realización, el método se puede repetir para uno o más valores enteros adicionales del mismo parámetro de la marca. En otra realización, el método se pueden incluso repetir para todos los valores enteros del mismo parámetro de la marca.
- 60 En una realización, si el límite inferior es menor que la medición media y la medición media es menor que el límite superior para al menos un parámetro adicional y la medición media para al menos un parámetro de la marca es mayor que el límite más bajo para al menos un parámetro de la marca, entonces el resultado se correlaciona con una o más marcas que poseen uno o más parámetros.
- 65 En una realización, si el límite inferior es menor que la medición media y la medición media es menor que el límite

superior para al menos un parámetro adicional y la medición media para al menos un parámetro de la marca no es mayor que el límite más bajo para al menos uno o más parámetros de la marca, entonces el resultado se correlaciona con una marca que posee el parámetro.

- 5 En una realización, si la medición de al menos un parámetro de la marca no se puede correlacionar con la identidad de la marca asociada a la unidad celular, entonces el método comprende las etapas adicionales de, por ejemplo, examinar los fluoróforos en serie, de manera que las decisiones finales "No" continúen para interrogar los valores de los fluoróforos en cuanto a la marca de tamaño relevante.

- 10 De manera apropiada, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo usando uno o más de los complejos descritos en la misma.

También se muestra un método para identificar una o más áreas y/o valores de densidad para una marca que comprende las etapas de: (a) obtener una o más imágenes de una marca que se usa para marcar una unidad celular; (b) sacar perfiles para una o más imágenes de la marca; (c) introducir los perfiles para una o más imágenes de la marca; y (d) leer el área y/o la densidad dentro de uno o más perfiles.

- 15

En una realización, la imagen puede ser un imagen de fase.

## 20 DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LA HISTORIA DE CULTIVO CELULAR DE UNA UNIDAD CELULAR

Como ya se ha comentado anteriormente, cuando se manipulan grandes números de unidades celulares, se puede confundir su identidad y/o historia de cultivo celular (por ejemplo la cronología y la naturaleza exacta de una serie de condiciones de cultivo a las que se ha podido exponer un grupo o unidad cualquiera). Por ejemplo, el protocolo de separación-agrupación de cultivos celular necesariamente implica la mezcla de unidades celulares en cada ronda, lo que complica el seguimiento de las unidades individuales. En ocasiones, la determinación de la historia de cultivo celular en una mezcla de unidades celulares, que se han sometido a múltiples condiciones de cultivo, se denominada "desconvolución" de la historia de cultivo celular.

- 25
- 30 Un método para determinar la historia de cultivo celular de una unidad celular en una mezcla de unidades celulares, consiste en marcar las unidades celulares y por tanto, resulta ventajoso marcar las unidades celulares. Como se ha descrito en la presente memoria, las marcas -tales como partículas con forma de bastoncillo, microperlas y/o microesferas se pueden usar como etiquetas o marcas que se conjugan con un microvehículo -tal como microvehículo asociado a una célula. La detección e identificación posteriores proporciona un registro de la cronología y la identidad de las condiciones de cultivo celular a las que se ha expuesto de la unidad celular.
- 35

## MICROVEHÍCULOS

Una variedad de microvehículos se encuentra disponible, variando en cuanto a forma y tamaño y se prepara a partir de diferentes materiales.

- 40
- 45 A modo de ejemplo, el microvehículo puede ser un microvehículo poroso seleccionado entre el grupo que consiste en microvehículos de Cytopore (por ejemplo, un microvehículo de Cytopore 1 o un microvehículo de Cytopore 2), un microvehículo de Cultispher, un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S, un microvehículo de Informatrix, un microvehículo de Microsphere, un microvehículo de Siran y un microvehículo de Microporous MC.

A modo de ejemplo adicional, el microvehículo puede ser un microvehículo sólido - tal como un microvehículo de Cytodex (por ejemplo, un microvehículo Cytodex 1, Cytodex 2 o Cytodex 3), un microvehículo de Biosilon, un microvehículo de Bioglass, un microvehículo de FACT III o un microvehículo de DE 52/53.

- 50

El cultivo de microvehículo tiene ventajas significativas, que incluyen el aumento de escala de cultivos y también permite la exposición de unidades de células para seleccionar las condiciones de cultivo según se requiera con el fin de obtener las condiciones deseadas de proliferación y/o diferenciación.

- 55
- Se pueden modificar de manera adicional las superficies de los microvehículos por medio de tratamientos físicos o químicos, tales como adsorción o reticulación covalente de entidades moleculares con una carga deseada o con una característica deseada.

- 60 En una realización amplia, por tanto, la invención proporciona un método para cultivar células in vitro, que comprende hacer proliferar dichas células adheridas a los complejos de microvehículo descritos en la presente memoria.

- 65 En un aspecto, se proporciona un complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva conjugado con una etiqueta cargada negativamente que es una microesfera que no está revestida con proteínas, en el que dicho microvehículo comprende proteína, celulosa, polietileno, polistirolo, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-

aminoglucano y/o una marca de gelatina, siendo la marca una microesfera que no está revestida con proteínas, en el que dicho microvehículo comprende una proteína, celulosa, polietileno, poliestirolo, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina. En otras palabras, se proporciona un microvehículo conjugado o marcado con un microesfera negativamente cargada.

También se describe un microvehículo y una marca con forma de bastoncillo. También se describe un microvehículo conjugado o marcado con una marca con forma de bastoncillo.

#### *Microvehículos de Cultispher*

CultiSpher se fabrica a partir de gelatina porcina de calidad farmacéutica por medio de un proceso que da como resultado una matriz de gelatina altamente reticulada con elevada estabilidad mecánica y térmica. Cuando se usa en cultivos celulares, las células se pueden unir tanto a las superficies externas como las superficies internas de la matriz. El mayor área superficial de la matriz junto con la protección frente a la tensión, permite que las células del interior de la matriz tengan como resultado capacidades mejoradas de producción de células. Una ventaja adicional del producto es que la matriz se puede disolver con enzimas proteolíticas que tienen como resultado la recogida de células con casi 100 % de viabilidad.

En una realización, el microvehículo es un microvehículo de Cultispher-G. Cultispher-G tiene un diámetro de partícula de 130-380  $\mu\text{m}$ , un volumen de 12-18  $\text{ml/g}$  seco, una densidad de 1,04  $\text{g/ml}$  con un diámetro medio de poro de 20  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de preparar y usar microvehículos de Cultispher-G, se puede hacer referencia, entre otros, a Biotech. Bioeng. (2000) 68, 1 p59-70; Brit. J. Cancer. Suppl. XXVII, S-78-S82 (1996); y la página web del fabricante en [www.percell.se](http://www.percell.se).

#### *Microvehículo de Cytopore 2*

Los microvehículos de Cytopore están disponibles en GE Healthcare (anteriormente Amersham) ([www.microcarriers.com](http://www.microcarriers.com)). Cytopore está formado por 100 % de celulosa, que no es tóxica para las células y es biodegradable. Está cargado positivamente, debido a los grupos N,N-dietilaminoetilo. Tiene una distribución de tamaño de partícula muy precisa y una estructura de red, siendo la proporción de área superficial con respecto a material de partícula más de 95 a 1. La estructura de red permite observar muy de cerca las células teñidas a medida que proliferan en el interior de los microvehículos. El diámetro típico de partícula es de 200-280  $\mu\text{m}$  y el área superficial eficaz es de 1,1  $\text{m}^2/\text{g}$  seco. La densidad relativa es de 1,03  $\text{g/ml}$ , el diámetro medio de las aberturas de poro es de 30  $\mu\text{m}$  y el volumen es de 40  $\text{ml/g}$  seco. Con el fin de preparar y usar microvehículos de Cytopore se hace referencia, entre otros, a Applied Microbiology and Biotechnology (1997) 47, 4 p352-7; Cytotechnology (1999) 30 p143-147; Chinese Journal of Biotechnology (1999), 15, 4 p239-44 y Acta Oto-Laryngologica (2002) 122, 5 p541-5.

Cytopore 2 se ha optimizado para células que dependen de la unión que requieren una densidad de carga alrededor de 1,8  $\text{meq/g}$ .

En algunas realizaciones, el microvehículo es un microvehículo de gelatina porcina.

En algunas realizaciones, el microvehículo está formado por 100 % de celulosa.

De manera ventajosa, los microvehículos con carga positiva intensa son óptimos con las marcas que transportan una carga negativa intensa.

#### MARCAS

Como se ha descrito anteriormente, las marcas se pueden usar como etiquetas o marcas que se conjugan a un microvehículo (tal como un microvehículo asociado a células). La identificación y detección posteriores proporcionan un registro ambiguo de la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celulares a las que se ha expuesto la unidad celular.

Se pueden usar varias marcas moleculares y macromoleculares en combinación con los microvehículos con tal de que se puedan detectar. Normalmente, las marcas comprenden objetos de forma única u objetos modificados con marcas y/o compuestos coloreados y/o fluorescentes.

En una realización, las marcas que se usan para marcar las unidades celulares tienen una o más de las cualidades siguientes (preferentemente todas):

i. Son de tamaño pequeño con respecto al microvehículo que marcan y/o más pequeños que el tamaño medio de poro de un microvehículo poroso.



ii. Son capaces de formar un complejo con el microvehículo de manera que la unión persiste durante todo el experimento y de este modo se pueden separar las marcas no unidas del complejo sin que ello afecte a las unidades celulares marcadas.

5 iii. Se pueden separar de las unidades celulares con las que han formado un complejo en condiciones que no perjudiquen a las cualidades únicas de las marcas.

iv. Están formados por una o más sustancias inertes que no afectan sustancialmente a la biología de la unidad celular y que, a su vez, no se ven afectadas por la unidades celulares o su biología.

10 v. Se pueden obtener en números grandes y además en forma de muchas variantes relacionadas pero distintas que se pueden distinguir fácilmente usando una técnica apropiada.

vi. Se distinguen por medio de un método que es apropiado, altamente fiable y que se puede automatizar.

15 En una realización, la marca es una microesfera fluorescente y/o coloreada. Más de 2000 microesferas diferentes formadas por medio de polimerización en emulsión o suspensión, precipitación, etc. y formadas por poliestireno, otros polímeros, copolímeros, terpolímeros y/o sílice etc., se encuentran disponibles en una variedad de formas, densidades, colores etc., por ejemplo en Duke Scientific Corporation (Palo Alto CA, EE.UU.) o Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, EE.UU.).

25 Un tipo común de microesfera es una microesfera de copolímero de poliestireno (PS) y estireno/divinilbenceno (S/DVB). Otros polímeros incluyen polimetilmetacrilato (PMMA), poliviniltolueno (PVT), copolímero de estireno/butadieno (S/B), copolímero de estireno/viniltolueno (S/VT). Muchas de estas microesferas se pueden funcionalizar, por ejemplo por medio de grupos carboxilo como en las microesferas de CML, o por medio de compuestos que contienen nitrógeno o funcionalizados con amino, tal como aminas alifáticas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, aminas aromáticas y piridinas, que ofrecen reacciones de acoplamiento alternativas a las perlas de COOH.

30 De manera apropiada, la microesfera es una microesfera hidrófila. De manera más apropiada, la microesfera es una microesfera de poliestireno. De la manera más apropiada, la microesfera es una microesfera con superficie modificada tal como una microesfera modificada con carboxilato (CML) de Duke Scientific Corporation (Palo Alto CA, EE.UU.).

35 En una realización, se someten a formación de complejo una o más microesferas de CML junto con uno o más microvehículos de cytopore 2.

40 Las microesferas de CML tienen una superficie altamente cargada de grupos carboxilo procedentes de un proceso de copolimerización. La superficie es bastante porosa y relativamente hidrófila, pero retiene las propiedades hidrófobas. La densidad de carga de estas partículas varía de aproximadamente  $10\text{-}125\text{ A}^2$ -por grupo carboxilo y son estables a concentraciones elevadas de electrolito (sal univalente hasta 1M). El látex CML absorbe proteínas y otras biomoléculas, pero mucho menos que las microesferas hidrófobas.

45 Por ejemplo, se pueden preparar conjugados con microesferas de CML como se muestra a continuación. Se pueden activar las microesferas usando un reactivo de carbodiimida soluble en agua que hace que los grupos carboxilo reaccionen con aminas primarias sobre las proteínas objeto de acoplamiento. Se prepara un tampón de reacción 50 mM a pH 6,0. Acetato de sodio y ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) son tampones apropiados. La proteína se disuelve en el tampón de reacción a una concentración de 10 mg/ml. Se prepara una suspensión de microesferas de 1 % (peso/volumen) en el tampón de reacción. Se prepara una disolución de proteína en volumen hasta diez volúmenes de suspensión de microesferas y se deja incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se prepara una disolución de 10 mg/ml (52  $\mu\text{mol/ml}$ ) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en agua desionizada y se usa de forma inmediata. Se añade una cantidad calculada de disolución de EDAC a la suspensión de microesferas y se ajusta el pH de la reacción a  $6,5 \pm 0,2$  con NaOH 0,1N. Se incuba la mezcla en un oscilador o rueda de mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retira la proteína no ligada y se almacena en tampón de almacenamiento.

50 De manera ventajosa, se pueden obtener microesferas CML y otras en varios formatos tal como diferentes colores (por ejemplo, azul, rojo, verde, amarillo, negro), varios fluoróforos (por ejemplo, Fluoresceína (verde), Fluoresceína (rojo) o Fluoresceína y Rodamina (verde rojizo) y varios tamaños (por ejemplo,  $5,4\text{ }\mu\text{m}$  ( $1,14 \times 10^{10}$  perlas/gramo) y  $7,6\text{ }\mu\text{m}$  ( $4,10 \times 10^9$  perlas/gramo)).

Se pueden preparar microesferas de CML y otras de manera que incorporen uno o más colorantes visibles y/o fluoróforos.

65 Las marcas de microesferas no están revestidas con proteínas.

De manera ventajosa, las microesferas de CML no revestidas con proteínas (por ejemplo, estreptavidina) tienen una carga altamente negativa y se adhieren de manera extremadamente intensa a los microvehículos de Cytopore, que portan una elevada carga positiva. La proporción de microesfera(s) de CML:microvehículo(s) de Cytopore necesaria para proporcionar complejos voluminosos puede ser tan baja como de aproximadamente 1:1. En los sistemas anteriores que han usado los autores de la presente invención, se requería una proporción de aproximadamente 1:250 con el fin de obtener incluso unas pocas marcas unidas en cada complejo tras múltiples lavados.

Por medio de la variación de diferentes parámetros en el proceso de fabricación, los suministradores de microesferas comerciales -tales como Bangs Laboratories- pueden fabricar conjuntos de perlas que se pueden distinguir en base a diferentes tamaños (por ejemplo, conjuntos de perlas de 4,4  $\mu\text{m}$  y 5,5  $\mu\text{m}$  de diámetro). Además, las perlas dentro de cada grupo de tamaño se pueden distinguir unas de otras en base a la intensidad de fluorescencia diferente debido a la carga diferencial con un colorante fluorescente individual. Es posible usar muchos colorantes diferentes con características diferentes de emisión o absorción, que se pueden unir a los microvehículos descritos en la presente memoria. Por consiguiente, la diversidad de marcas pueden proceder de la variación del tamaño de la marca y/o la carga de fluoróforo (es decir, intensidad de flúor) y/o la combinación fluoróforo/identidad. En particular, la diversidad de marca puede proceder del tipo de fluoróforo que puede transportar (por ejemplo, se pueden introducir perlas bien con UV2 o bien con Rojo de Starfire); tamaño (por ejemplo para cada fluoróforo existen 5 tamaños de perlas diferentes: 1,87, 4,41, 5,78, 5,37 y 9,77 micrómetros) y/o la cantidad de fluoróforo que transportan (5 intensidades diferentes de cada colorantes se encuentran disponibles). Se pueden usar otros fluoróforos -tales como TRITC.

Posteriormente se pueden usar filtros para detectar al menos 4 colorantes diferentes en cualquier perla concreta -tal como el filtro de TRITC (ex 540/25; dm 565; ba 605/55) para la visualización de TRITC de Nikon; el filtro DAPI (ex 340-380; dm 400; ba 435-485) para visualización UV2 de Nikon; el filtro GFP-B (ex 460-500; dm 505; ba 510-560) para visualización de FITC de Nikon y el conjunto de filtro Cy5 (n.º cat. 41008 de Chroma Technology) para la visualización de Rojo de Starfire.

Se pueden colorear las microesferas interna o externamente, con colorantes fluorescentes visibles. El coloreado interno tiene lugar cuando el colorante se integra en el interior de la masa de la microesfera, normalmente sumergiendo la microesfera en una disolución que contiene un colorante o un fluoróforo. La modificación externa tiene lugar cuando se conjuga un colorante a la superficie de la microesfera, por ejemplo, modificación de una microesfera CML con un derivado de isotiocianato como se describe en la presente memoria.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la microesfera se puede colorear interna o externamente, con colorantes visibles o fluorescentes.

Además es posible usar "puntos cuánticos" para obtener un número muy elevado de diferentes etiquetas fluorescentes que se puedan leer de forma apropiada. De este modo, en una realización adicional de la presente invención, se usan puntos cuánticos en lugar de fluoróforos. En determinadas realizaciones, se prefieren los puntos cuánticos debido al hecho de que no se decoloran (foto-blanqueo) cuando se exponen a la luz. Por ejemplo, se sabe que el fluoróforo FITC experimenta foto-blanqueo y las células unitarias tratadas con marcas que contienen FITC se manipulan de forma ideal en la oscuridad y son difíciles de analizar de forma fiable. Se pueden incorporar los puntos cuánticos en las microesferas en el momento de la polimerización de poliestireno dando como resultado cargas uniformes de marcas. Los puntos cuánticos se encuentran disponibles en muchos colores y se pueden excitar en la misma longitud de onda para permitir la visualización de múltiples colores sin filtros, por medio del uso de una cámara CCD de color. Información adicional de antecedentes sobre puntos cuánticos se encuentra disponible en los documentos US 6.322.901, US 6.576.291, US 2003/0017264, US 6.423.551, US 6.251.303, US 6.319.426, US 6.426.513, US 6.444.143, US 2002/0045045, US 5.990.479, US 6.207.392, US 6.251.303, US 6.319.426, US 6.426.513 y US 6.444.143.

De manera ventajosa, las marcas se protegen frente a la degradación por medio de los componentes del cultivo celular, por ejemplo por medio de modificación química u otra o mediante encapsulado. El encapsulado de marcas puede tener lugar en muchos medios diferentes, por ejemplo en perlas como ya se ha descrito en la presente memoria -tal como las de Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, EE.UU.) y se puede usar en encapsulado para normalizar la dosificación de marca además de proporcionar componentes para la amplificación de la marca y/o la detección (por ejemplo, proporcionando cebadores de PCR para su uso con una marca de ADN).

La detección de marcas se puede conseguir por medio de una variedad de métodos familiares para los expertos en la técnica. Los métodos incluyen espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, secuenciación, hibridación, detección de antígenos, electroforesis, espectroscopia, microscopía, análisis de imágenes, detección de fluorescencia, etc. En algunas realizaciones, debido a que las marcas normalmente contienen un color o un fluoróforo, entonces se usan microscopía, espectroscopia, análisis de imágenes y/o detección de fluorescencia.

La marca es una marca negativamente cargada. Por consiguiente, se proporciona un complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva -tal como un microvehículo poroso-y una marca negativamente cargada, siendo la marca una microesfera que no está revestida con proteínas.

El microvehículo tiene una carga positiva. Comprende o puede consistir esencialmente en proteína, celulosa, polietileno, polistírol, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina. Por consiguiente, se puede seleccionar el microvehículo entre el grupo que consiste en un microvehículo de Cytopore, un microvehículo de Cytopore 1, un microvehículo de Cytopore 2, un microvehículo de Cultispher, un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S, microvehículos de Informatrix, un microvehículo de Microsphere, un microvehículo de Siran y un microvehículo de Microporous MC.

De manera apropiada, la marca cargada es una microesfera que es de aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro. La microesfera puede ser una microesfera modificada con carboxilato (CML).

Una marca puede ser una partícula con forma de bastoncillo. De manera apropiada, la marca con forma de bastoncillo es un nanoalambre. El nanoalambre puede comprender, consistir o consistir esencialmente en varios metales -tal como aluminio. El nanoalambre puede estar revestido con varios metales -tales como plata y/o oro. De manera apropiada, el nanoalambre es 1  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro y/o es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o menos de longitud.

El nanoalambre puede ser un nanoalambre como se describe en Science vol. 294, p. 137-141 (2001). Por consiguiente, en otro aspecto, se proporciona un complejo que comprende un microvehículo y un nanoalambre. Brevemente, los nanoalambres son microbastoncillos multimetálicos intrínsecamente codificados con tiras submicrométricas. Se pueden generar patrones complejos por medio de deposición electroquímica secuencial de iones metálicos sobre matrices con poros de tamaño uniforme. De manera ventajosa, los nanoalambres son suficientemente pequeños para ser usados como marcas que se pueden añadir después de cada división. Esto resulta más conveniente ya que es necesario leer marcas únicamente en los microvehículos positivos.

Los parámetros de las partículas con forma de bastoncillo tal como el nanoalambre incluyen, pero sin limitarse a, tamaño, propiedad óptica y/o composición metálica. Las propiedades ópticas pueden estar seleccionadas entre el grupo que consiste en: reflectividad de luz, tal como reflectividad de luz de una longitud de onda particular, color, longitud(es) de onda de emisión de fluorescencia e intensidad de emisión de fluorescencia.

La partícula con forma de bastoncillo tal como el nanoalambre puede colorearse externamente.

El microvehículo que se usa junto con la marca con forma de bastoncillo puede ser un microvehículo poroso, tal como un microvehículo neutro de carga.

El microvehículo puede comprender, consistir o consistir esencialmente en proteína, celulosa, polietileno, polistírol, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina. El microvehículo puede estar seleccionado entre el grupo que consiste en un microvehículo de Cytopore, un microvehículo de Cytopore 1, un microvehículo de Cytopore 2, un microvehículo de Cultispher, un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S, un microvehículo de Informatrix, un microvehículo de Microsphere, un microvehículo de Siran y un microvehículo de Microporous MC.

El microvehículo que se usa junto con el microvehículo con forma de bastoncillo pueden ser microvehículos de Cultispher, tal como un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL o un microvehículo de Cultispher-S. En una realización, el microvehículo que se usa junto con el microvehículo con forma de bastoncillo es un microvehículo de Cultispher-G.

De manera ventajosa, se ha descubierto que el uso de marcas con forma de bastoncillo y microvehículos porosos neutros de carga es mejor que el uso de marcas sobre los mismos microvehículos. Sin pretender ligarse a teoría particular alguna, se piensa que las marcas más pequeñas penetran en los poros de los microvehículos mejor y llega a atascarse (presumiblemente debido a la asimetría de tamaño). Por consiguiente, la unión de los nanoalambres es mejor que, por ejemplo, la unión de las marcas de microesfera y tiene como resultado un nivel más elevado de marcado permanente.

En otra realización, una o más microperlas de poliestireno se someten a formación de complejos junto con uno o más microvehículos de Cultispher-G.

En algunas realizaciones, la marca es una marca coloreada externamente.

## CÉLULAS PLURIPOTENTES

Se describen las células pluripotentes con detalle en Stem Cells: Scientific-Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. Junio 2001. <http://www.nih.gov./news/stemcell/scireport.htm>.

Existe un debate considerable sobre lo que constituye una célula pluripotencial, no obstante para la finalidad de la presente discusión una características clave es la capacidad de diferenciarse para dar lugar a un tipo celular

diferente. Ejemplos de células pluripotentes se proporcionan a continuación.

Varios factores que se han usado para inducir la diferenciación dirigida de células pluripotentes incluyen: ácido retinoico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), activina-A, factor de crecimiento de transformación beta-1 (TFG  $\beta$ -1), factor de crecimiento de hepatocito, factor de crecimiento de nervios, erizo sonic (SHH), interleucina 3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina, vitamina D3, dexametasona,  $\beta$ -mercaptoetanol, hidroxianisól butilado, 5-azacitidina, DMSO, insulina, hormona tiroidea (T3), LIF, suero de ternera fetal, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de Steel, variaciones en la concentración de oxígeno, ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato, nicotinamida, factor de crecimiento procedente de plaquetas (PDGF), cAMP, diversas moléculas de adhesión celular y sustratos y otros. Además de estos factores definidos, es probable que los extractos no definidos, tales como el medio condicionado, las fracciones homogéneas de tejidos humanos y animales, o los extractos de plantas se puedan usar para dirigir la diferenciación de células pluripotentes. La separación progresiva de estos extractos no definidos puede dar como resultado fracciones activas o incluso componentes puros con elevado potencial. Estos factores se pueden añadir al medio de proliferación usado en un experimento particular, bien solos, o bien en combinación, o en un orden definido que es crucial para el resultado del experimento.

#### FORMACIÓN DE UNIDADES CELULARES

Se pueden dejar proliferar los grupos de células (colonias de células) en varias condiciones y la colonia puede mantener en gran medida su integridad en diferentes condiciones, cuando se ve alterada y cuando se mezcla con otras colonias. Dichos grupos o colonias se denominan en la presente memoria unidades celulares. Se puede conseguir la formación de unidades celulares, a modo de ilustración, por medio de la proliferación de células como cultivos adherentes sobre sustratos sólidos tales como vehículos. Si la proliferación celular tiene lugar tras la siembra sobre los vehículos, las células hijas se unen al mismo vehículo y forman parte de la misma colonia. En general, las células adherentes no se disocian fácilmente de su sustrato de proliferación y de esta forma persiste la colonia celular a pesar de cualquier manipulación mecánica del vehículo, agitación del medio de cultivo, o transferencia al interior de otro sistema de cultivo tisular. Similarmente, si se colocan múltiples vehículos en cualquier momento en el mismo recipiente (por ejemplo, se agrupan las perlas) entonces no existirá transferencia sustancial de células de una perla a otra.

Una ventaja importante de formar unidades celulares sobre sustratos sólidos es que el sustrato -y por tanto las células unidas por motivos de asociación- se puede marcar como se ha descrito anteriormente.

Cuando se dejan proliferar las células sobre vehículos pequeños se pueden tratar como cultivo en suspensión. Un método común de proliferación de células sobre vehículos pequeños es denominado como cultivo celular de microvehículo (véase "Microcarrier cell culture, Principles and Methods", Edición AA, disponible en Amersham Biosciences (18-1140-62); incorporado en la presente memoria en su totalidad por referencia). Los cultivos de microvehículos se usan comercialmente para la producción de anticuerpos e interferones en fermentadores de hasta 4000 litros.

Como las propiedades físicas de los vehículos son bien conocidas es fácil calcular el número de vehículos usados en un experimento. Los vehículos pueden estar disponibles como productos secos, que se pueden pesar de forma precisa y posteriormente se preparan por medio de hinchamiento en un medio líquido. Además el número de células usadas para inocular un cultivo de microvehículo se puede trabajar y variar.

La recogida de las células proliferadas en los microvehículos descritos en la presente memoria, o la liberación de las etiquetas a partir de los microvehículos, se puede conseguir por medio de desligado enzimático de las células, y/o por medio de digestión del vehículo cuando se aplica como se ha descrito en la presente memoria.

#### SEPARACIÓN DE MARCAS DE LAS UNIDADES CELULARES MARCADAS

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos mejorados para la separación de las marcas de las unidades celulares (por ejemplo, unidades celulares complejadas con microvehículos).

De manera ventajosa, cuando se separan las marcas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, se obtienen en un estado intacto de tal forma que se pueden medir los parámetros únicos de cada marca de manera fiel.

De manera ventajosa, cuando se separan las marcas con el fin de analizarlas por medio de un método óptico -tal como por medio de microscopía- se obtienen además en estrecha proximidad unas con otras de forma que pueden formar imágenes de manera apropiada (por ejemplo, usando justo uno o dos campos de imágenes).

En un aspecto, se proporciona un método para separar un complejo que comprende un microvehículo y una marca, que comprende la etapa de poner en contacto dicho complejo con una proteasa, en el que dicho microvehículo

comprende, consiste o consiste esencialmente en proteína.

De manera apropiada, el microvehículo comprende, consiste o consiste esencialmente en colágeno y/o gelatina - tal como un microvehículo de Cultispher (por ejemplo, un microvehículo de Cultispher-G, un microvehículo de Cultispher-GL y un microvehículo de Cultispher-S).

La proteasa puede ser proteinasa K, tripsina, termolisina y/o caspasa.

Si la proteasa es proteinasa K entonces en algunas realizaciones, se usa una cantidad de aproximadamente 0,5 U/ml o más. De manera apropiada, el complejo se pone en contacto con proteinasa K durante al menos aproximadamente 20-60 minutos. De manera apropiada, el complejo se pone en contacto con la proteasa en un volumen de aproximadamente 5 µl o menos.

En otro aspecto, se proporciona un método para separar un complejo de la presente invención que comprende la etapa de poner en contacto dicho complejo con un ácido.

De manera apropiada, el microvehículo tiene una carga positiva y puede comprender, consistir o consistir esencialmente en celulosa. De este modo, a modo de ejemplo, el microvehículo puede ser un microvehículo de Cytopore -tal como un microvehículo de Cytopore 2.

En algunas realizaciones, la marca es una microesfera -que comprende, consiste o consiste esencialmente en poliestireno.

Se puede preparar una partícula con forma de bastoncillo -tal como un nanoalambre.

Se pueden usar varios reactivos para la liberación de las marcas de los microvehículos -tales como un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico y/o ácido sulfúrico) o hipoclorito de sodio y/o hidróxido de sodio además de otros reactivos -tales como tripsina-EDTA, celulasa, proteinasa K y cloruro de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio 5 M).

En algunas realizaciones, el reactivo es ácido clorhídrico, preferentemente ácido clorhídrico al 37 % (aproximadamente 12 M).

En algunas realizaciones, el reactivo es hipoclorito de sodio.

En algunas realizaciones, el reactivo es proteasa.

En algunas realizaciones, el reactivo es una proteinasa K.

De manera apropiada, la digestión de uno o más microvehículos se lleva a cabo sobre una superficie ópticamente transparente -tal como un portaobjetos de vidrio de microscopio. Esto permite una formación de imágenes apropiada in situ que es ventajosa ya que no se pierde material.

De manera apropiada, se trata la superficie para evitar la dispersión de un líquido que contiene el microvehículo, por ejemplo usando un agente de formación de siliciación (silanizado).

De manera apropiada, los microvehículos objeto de digestión se lavan en agua destilada para retirar cualesquiera trazas de medio y/o sales y se aplican a la superficie de un volumen mínimo de líquido.

De manera apropiada, se calienta la superficie para conseguir la deshidratación completa de los microvehículos y para adherir las marcas a la superficie, evitando de este modo la dispersión.

Con el fin de llevar a cabo la digestión del microvehículo en un volumen animal, preferentemente menos que 5 µl y más preferentemente menos que 2 µl, la digestión se lleva a cabo en una caja humidificada.

En algunas realizaciones -la digestión se consigue usando una o más proteasas. Normalmente la disolución de proteasa se suministra directamente sobre los microvehículos secos -y se coloca en la caja humidificada. Una vez que se han disuelto los microvehículos (normalmente, 30-60 minutos) se retiran los portaobjetos de la caja humidificada para comprobar la digestión completa. Se evapora la disolución de proteasa y se proporciona el secado completo de las marcas liberadas sobre el portaobjetos para permitir el análisis de las marcas.

En algunas realizaciones, se lleva a cabo la digestión de uno o más microvehículos en una microcentrífuga o tubo PCR tal como los fabricados por Eppendorf. Se puede tratar el interior de los tubos para evitar que las marcas se adhieran al mismo una vez que se han liberado de los microvehículos.

En algunas realizaciones, los tubos se colocan en una máquina de PCR que permite el control de temperatura preciso.

En algunas realizaciones, la máquina de PCR opera una tapa térmica, permitiendo el uso de volúmenes mínimos de líquido.

- 5 De manera apropiada, una vez que se han separado una o más marcas de la unidad(es) celular(es) y la(s) marca(s), se puede(n) obtener una o más imágenes del(de las) marca(s) (usando, por ejemplo, una técnica microscópica). Posteriormente, se pueden analizar las imágenes para determinar una o más características de la marca.

- 10 También se muestra en la presente memoria un método para identificar una o más de las marcas que se obtienen o se pueden obtener a partir de una o más unidades celulares que comprende las etapas de: (a) separar la(s) unidad(es) celular(es) y la(s) marca(s); (b) obtener una o más imágenes del(de las) marca(s) (por ejemplo, mediante el uso de una técnica microscópica); y (c) analizar las imágenes para determinar una o más características de la marca. De manera apropiada, se pueden usar una o más características de la marca para determinar la historia de cultivo celular de la(s) unidad(es) celular(es) a partir de la(s) que se procede(n) o de la(s) que se obtiene(n) el(las) marca(s).

### CULTIVO COMBINATORIO EN SERIE DE CÉLULAS

#### Cultivo celular de separación-agrupación

- 20 La formación de unidades celulares (en particular de unidades celulares microscópicas) es además útil para la toma de muestras de múltiples condiciones de cultivo ya que cada unidad celular constituye una unidad manipulada de forma fácil que se puede exponer a una variedad de condiciones de cultivo. De acuerdo con la presente invención, normalmente se producen agrupamientos celulares por medio de células en proliferación en un cultivo de microvehículo y los términos unidad celular, grupo celular, colonia y perla se usan de forma intercambiable. Un método particularmente eficaz para la toma de muestras de un gran número de condiciones de cultivo celular es denominado como Cultivo Celular Combinatorio o cultivo celular de separación-agrupación y en una realización implica la subdivisión en serie y la combinación de grupos de unidades celulares con el fin de tomar muestras de múltiples combinaciones de las condiciones de cultivo celular. En un aspecto de la invención el método opera
- 25 tomando un cultivo de iniciador preliminar (o diferentes cultivos iniciadores) de unidades celulares dividido en un número  $X_1$  de alícuotas que contienen cada una múltiples perlas (grupos/colonias/vehículos) que se proliferan por separado en diferentes condiciones de cultivo. Tras el cultivo celular durante un tiempo apropiado, se pueden almacenar las unidades celulares por medio de combinación y mezcla de las perlas procedentes de diferentes alícuotas. Este almacenamiento se puede separar de nuevo en un número  $X_2$  de alícuotas, cultivando cada una en diferentes condiciones durante un período de tiempo y posteriormente también se almacenan. Este procedimiento iterativo de separación, cultivo y almacenamiento (o almacenamiento, separación y cultivo; dependiendo de donde se produce la entrada en el ciclo) de unidades celulares permite la toma de muestras sistemática de muchas combinaciones diferentes de condiciones de cultivo celulares. La complejidad del experimento, o en otras palabras el número de combinaciones diferentes de las condiciones de cultivo celular sometidas a ensayo, es igual al producto
- 30 del número de condiciones diferentes ( $X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n$ ) sometidas a toma de muestra en cada ronda. Nótese que la etapa de almacenamiento de todas las unidades celulares antes de la separación posterior puede ser opcional - una etapa en la que se almacena un número limitado de unidades celulares puede tener el mismo efecto. La invención por tanto se refiere a un número de métodos relacionados de toma de muestra de forma sistemática de múltiples combinaciones de condiciones de cultivo celulares en las que se manipulan grupos de unidades celulares en masa.

- 45 Independientemente de la forma precisa en la que se toman muestras de una diversidad de condiciones de cultivo celulares por este medio, el procedimiento resulta eficaz porque múltiples unidades celulares pueden compartir un único recipiente, en el que se cultivan en condiciones idénticas y se pueden llevar a cabo únicamente usando unos pocos recipientes de cultivo al mismo tiempo (el número de recipientes de cultivo que se usa es igual al número de muestras separadas). En muchos aspectos, el principio de este procedimiento se parece al de la síntesis de separación de bibliotecas químicas de gran tamaño (conocido como química combinatoria), que toma muestras de todas las combinaciones posibles de unión entre grupos químicos de formación de bloques (véase por ejemplo: Combinatorial Chemistry, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor)). Se puede repetir el cultivo celular de separación-agrupación cualquier número de rondas y se pueden tomar muestras de cualquier número de
- 50 condiciones en cada ronda. Con tal de que el número de unidades celulares (o perlas colonizadas en este ejemplo) sea mayor o igual que el número de condiciones diferentes en las que se toman muestras en todas las rondas y asumiendo que la separación de la unidad celular tiene lugar de forma totalmente al azar, se espera que exista al menos una unidad celular que se haya cultivado de acuerdo con cada una de las diferentes combinaciones de condiciones de cultivo que se someten a toma de muestras en el experimento. Se puede usar este procedimiento para las condiciones de diferenciación o proliferación de muestras de cualquier tipo celular, o la eficacia de la producción de biomoléculas (por ejemplo, la producción de eritropoyetina o interferón) por parte de cualquier tipo celular. Debido a que el procedimiento es iterativo, se adapta de forma ideal para someter a ensayo los protocolos de cultivo tisular de multietapa -por ejemplo los descritos anteriormente en relación con la diferenciación de células pluripotentes. Las variables que se pueden someter a toma de muestras que usan esta técnica incluyen el tipo
- 60 celular-agrupamiento celular (por ejemplo, cultivo de microvehículo, encapsulado celular, organismo completo), sustrato de proliferación (por ejemplo, fibronectina sobre un microvehículo), duración de la ronda de cultivo celular,

temperatura, medio de cultivo diferente (incluyendo diferentes concentraciones de constituyentes), factores de proliferación, medios acondicionados, co-cultivo con varios tipos celulares (por ejemplo células de alimentador), extractos de plantas o animales, fármacos, otras sustancias químicas sintéticas, infección con virus (incluyendo virus transgénicos), adición de transgenes, adición de moléculas antisentido o anti-gen (por ejemplo, ARNi, triple hélice), información sensorial (en el caso de organismos), estímulos eléctricos, de luz o redox y otros.

#### Cultivo celular de separación-separación

La finalidad de llevar a cabo proceso de separación-almacenamiento sobre unidades celulares es exponer sistemáticamente estos a combinaciones de condiciones pre-definidas. La persona experta en la técnica apreciará muchos medios diferentes para lograr este resultado. Además de los procesos de separación-almacenamiento y sus variaciones, merece la pena discutir brevemente los procesos de separación-separación. Un proceso de separación-separación implica subdividir un grupo de unidades celulares al menos dos veces, sin intervención del almacenamiento de las unidades celulares. Si se usan procesos de separación-separación durante un número grandes de rondas, el número de muestras separadas que se generan aumenta de forma exponencial. En este caso, es importante emplear cierto nivel de automatización, por ejemplo el uso de una plataforma robótica y sistemas sofisticados de seguimiento de muestras. La ventaja de las etapas de separación-separación es que (debido a que las unidades celulares no se combinan) es posible segregar linajes de varias unidades celulares basándose en su historia de cultivo celular. Por consiguiente, se pueden usar etapas de separación-separación para deducir si una condición particular de cultivo celular es responsable de un proceso celular concreto y por tanto se usan para deducir la historia del cultivo de las unidades celulares.

#### Protocolos predeterminados

Se puede conseguir la separación y/o el agrupamiento de las unidades celulares de forma totalmente al azar o se puede seguir un protocolo predeterminado. Cuando se dividen y/o se agrupan al azar las unidades celulares, la segregación de una unidad celular concreta para dar lugar a cualquier grupo no está predeterminada o prejuizada en modo alguno. Con el fin de obtener como resultado una elevada probabilidad de que al menos una unidad celular se haya expuesto a cada una de las posibles combinaciones de condiciones de cultivo celular, resulta ventajoso emplear un número de unidades celulares más grande que el número total de combinaciones de condiciones de cultivo celular que se están sometiendo a ensayo. En determinadas circunstancias, por tanto, resulta ventajoso separar y/o agrupar unidades celulares de acuerdo con un protocolo predeterminado, siendo el efecto total que se evitan duplicaciones u omisiones de combinaciones que son perjudiciales. De manera opcional, se puede planear por adelantado la manipulación predeterminada de unidades celulares y se puede anotar en una hoja de cálculo o programa de ordenador y se pueden ejecutar operaciones de separación y/o agrupamiento usando protocolos automatizados, por ejemplo de tipo robótico. La marca de las unidades celulares (véase a continuación) puede ser por medio de cualquier número de medios, por ejemplo, marcado por RFID, marcado óptico o codificación espacial. Se han descrito los dispositivos robóticos capaces de determinar la identidad de la muestra y por tanto llevar a cabo la separación de las muestras de acuerdo con un protocolo predeterminado (véase "Combinatorial Chemistry, A practical Approach", Oxford University Press (2000), Ed. H. Fenniri). De manera alternativa, la manipulación de líquidos de laboratorio normalizados y/o la robótica de cultivos tisulares (por ejemplo, tal como la fabricada por: Bechman Coulter Inc, Fullerton, CA; The Automation Partnership Royston, Reino Unido) es capaz de codificar espacialmente la identidad de múltiples muestras y de añadir, retirar o translocar estas de acuerdo con protocolos pre-programados.

#### Análisis y/o separación de unidades celulares

Siguiendo cada ronda de cultivo celular, o después de un número definido de rondas, se pueden estudiar las unidades celulares para observar cualquier proceso celular que se ha podido ver afectado por las condiciones de cultivo tisular.

A continuación, se describe más la invención por medio de los Ejemplos, que se pretende que sirvan para ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se pretende que limiten en modo alguno el alcance de la invención.

### **Ejemplos**

#### EJEMPLO 1

##### *Conjugación de biotina de microvehículos de Cultispher-G*

Las microesferas fluorescentes (marcas) procedentes de laboratorios Bangs están revestidas con estreptavidina y de ese modo los microvehículos de Cultispher-G (CSG) se someten a tratamiento con biotina con el fin de facilitar la unión de los dos durante el transcurso de un experimento de separación-agrupación. Se suministran los CSG secos y se hidratan en PBS estéril en exceso durante la noche (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se someten a tratamiento en autoclave.

EJEMPLO 2*Reactivo de tratamiento con biotina*

Se usa el reactivo de tratamiento de con biotina, éster N-hidroxisuccinimida de ácido biotinamidoheptanoil-6-amino hexanoico (*Sigma B3295 10 mg*). Se disuelven 10 mg del reactivo en 400 µl de dimetilformamida (DMF) y se añaden a 5 ml de volumen sedimentado de CSG hidratado (volumen sedimentado de 5 ml en un tubo de 50 ml) y se mezcla bien haciendo uso de una pipeta (se tomó y expulsó con pipeta BSA al 0,1 % volumen/volumen/PBS con puntas de pipeta de antemano evitando la adhesión de CSG al interior de la superficie de las puntas).

Se deja incubar el reactivo de tratamiento con biotina con CSG durante la noche a temperatura ambiente antes de varios lavados en PBS estéril retirando el reactivo en exceso de tratamiento con biotina (el lavado se lleva a cabo en un tubo de 50 ml dejando sedimentar CSG entre lavados y con aspiración cuidadosa a vacío).

Ahora el CSG biotinilado está listo para usarse en un experimento. Se almacenan en condiciones estériles en un volumen conocido de PBS y se calcula la concentración en la suspensión mezclada en base a este volumen y la masa seca de CSG añadida al tubo de forma inicial (normalmente se dispone de 2000 CSG en 100 µl).

EJEMPLO 3*Métodos de marcado en pocillos y columnas*

Tras la siembra de CSG con células ES, se añaden las marcas fluorescentes marcando cada etapa de la matriz de separación-agrupación. Se usa el método siguiente para la marca de CSG sometida a tratamiento con biotina con marcas revestidas con estreptavidina.

Los experimentos se llevan a cabo en una placa de cultivo celular de 5 x 5 pocillos (10 cm x 10 cm) (por tanto cada pocillo mide 2 cm x 2 cm). Normalmente, cada pocillo contiene 7000 complejos celulares CSG/ES.

Se añaden marcas fluorescentes al pocillo en concentración conocida de marcas/CSG. Se homogeneiza la mezcla intensamente con ayuda de una pipeta (usando puntas tratadas con BSA/PBS de 0,1% evitando la adherencia) y posteriormente se inclina la placa de 5 x 5 facilitando el contacto estrecho de CSG y las marcas.

Se coloca la placa en un incubador a 37 °C durante aproximadamente 1 hora y posteriormente se coloca plana hasta la siguiente etapa del experimento de separación-agrupación.

EJEMPLO 4*Métodos de lavado y tamizado*

Se agrupan juntos suavemente y se lavan los contenidos de los pocillos que han recibido el mismo tratamiento a través de un tamiz de 70 µm. El CSG es mayor que 70 µm y queda retenido en el tamiz (véase la figura 2). Se lava un volumen mínimo de PBS (normalmente 5 ml) a través del tamiz retirando las marcas fluorescentes no ligadas y posteriormente se invierte el tamiz y se hacen pasar < 3 ml de medio basal a través del mismo recogiendo los complejos de CSG/marca.

Se lavan por separado los contenidos de todos los pocillos que contienen diferentes condiciones de cultivo por separado antes del almacenamiento antes de la separación para la próxima ronda de condiciones de cultivo.

EJEMPLO 5*Digestión de CSG y Cytopore 2*

Se usan los siguientes métodos digiriendo las perlas antes del análisis de las marcas de Bang fluorescentes unidos o marcas de Duke no fluorescentes (como se muestra en la figura 1) sobre Cytopore 2 o CSG.

## (a) CSG

La incubación de perlas de CSG individuales en 2U/ml de proteinasa K (Sigma P4850) en pocillos de placas de microvaloración de 384 pocillos de fondo redondo da como resultado una digestión completa de la perla de CSG al tiempo que deja intactas las marcas fluorescentes de poliestireno. Normalmente, la digestión se completa en 20 minutos y entonces las marcas fluorescentes permanecen en la disolución de proteinasa k de manera indefinida, sin inactivación de la proteinasa k, sin efecto negativo alguno sobre las marcas o su fluorescencia (véase la figura 3).

## (b) Cytopore 2



La incubación de microvehículos de cytopore 2 (fabricados de celulosa) en HCl 37 % (~ 12M) da como resultado la digestión completa del microvehículo en 90 minutos al tiempo que deja intactos las marcas de Duke coloreados unidos. Como en el caso de CSG, las marcas permanecen en el medio de digestión de forma indefinida, sin inactivación y sin efecto negativo sobre las marcas (véase la figura 4).

#### EJEMPLO 6

##### *Diagrama de flujo*

Se prepara una hoja de cálculo que examina las marcas en paralelo para fluorescencia UV2 (y rodamina) y Rojo Starfire (y fluoresceína), es decir, se duplica el diagrama de flujo que se muestra en la figura 5 en paralelo con todas las referencias a Fluorescencia 1 sustituidas por Fluorescencia 4 y Fluorescencia 3 por Fluorescencia 2. Para este sistema las decisiones "No" finales de las páginas 2 y 4 pasan a "Sin señal".

El sistema puede dar como resultado una marca que permanece indefinida, o proporcionada por dos identidades. Lo último puede ocurrir si los valores umbral para las marcas de intensidad más baja se fijan de manera incorrecta, de manera que se identificar una marca de fluorescencia baja como UV2 y Starfire positivo. Otro ejemplo de una señal doble es cuando se identifican las marcas asociadas intensamente como por una macro "Configuración" debido a una estrechez insuficiente del ajuste de Proporción de Radio. Se han usado funciones COUNT y IF/AND adicionales marcando dichos estados de Doble y Sin Señales.

Como diagrama de flujo alternativo se podría examinar los Flúores 1 y 4 en serie, de manera que las decisiones "No" finales de las páginas 2 y 4 continúan interrogando los valores de Rojo de Starfire en cuando a la marca de tamaño relevante como se explica en la figura 6. Este sistema también puede dar como resultado una marca insuficientemente identificada si su tamaño y/o fluorescencia no se encuentran dentro de los intervalos definidos. No hay señales dobles con este diagrama de flujo, pero este se encuentra en riesgo de identificación errónea de las marcas de intensidad o dobles como se ha descrito anteriormente.

#### EJEMPLO 7

##### *Diferenciación de células ES usando Cultivo Celular Combinatorio y desconvolución de los resultados usando métodos de marcado*

En el Cultivo Celular Combinatorio, se barajan colonias celulares ES que proliferan sobre perlas microscópicas a través de múltiples combinaciones de condiciones de proliferación usando una metodología de separación-almacenamiento aleatoria acompañada de marca concomitante. Al final del proceso, se identifican y aíslan cualesquiera perlas que portan la progenie diferenciada; y se analizan las marcas aisladas deduciendo la historia de cultivo celular.

Un ejemplo de este proceso se describe usando diferenciación hematopoyética de células ES de ratón como sistema modelo. El mapa de carreteras de desarrollos para hematopoyesis se expresa relativamente bien en forma de diagrama y se conocen muchos factores de proliferación recombinante que influyen en el destino celular y se encuentran fácilmente disponibles, no obstante la diferenciación dirigida que se presenta en la bibliografía ha usado materiales y métodos (cuerpos embrionarios; medios de cultivo semisólidos; complemento con suero animal) que son incómodos e indefinidos y que se pretenden eliminar usando la potencia experimental de la nueva técnica.

En particular, los autores de la invención exponen la diferenciación de células ES de ratón hasta el linaje monocito-macrófago (fagocito mononuclear) (Gordon S. & Taylor P.R., Nature Rev. Immunol. 2005 5:953-964), ya que se ha informado de su presencia in vitro y es posible llevar a cabo una detección funcional simple para estas células basada en la fagocitosis de antígenos fluorescentes.

#### Materiales y métodos

##### *Reactivos*

factor de células pluripotentes murinas (SCF) (R&D Systems, 455-MC)

trombopoyetina murina (TPO) (R&D Systems, 488-TO)

eritropoyetina humana (EPO) (R&D Systems, 287-TC)

interleucina 6 humana (IL-6) (R&D Systems, 260-IL)

factor de crecimiento de transformación humano  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ 1) (R&D Systems, 240-B)

factor estimulador de colonias de macrófago murinas (M-CSF) (R&D Systems, 416-ML)

interleucina murina 3 (IL-3) (R&D Systems, 403-ML)

5 proteína 2 morfogenética ósea humana (BMP2) (R&D Systems, 355-BM)

factor de crecimiento de fibroblastos humanos (bFGF) (R&D Systems, 233-FB)

ácido retinoico (Sigma, R265)

10 insulina bovina (Ins) (Sigma, I2516)

insulina/transferrina/complemento de selenio (ITS) (Sigma, I3146)

15 *Microcultivo*

Se hidrataron microvehículos Cultispher-G (Percell Biolytica AB) y se esterilizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo el tratamiento con biotina por medio de adición de 10 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido biotinamidohexanoil-6-amino-hexanoico (Sigma), disueltos en 0,4 ml de N,N-dimetilformamida (Sigma), a 5 ml de PBS libres de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (CMF-PBS) que contenían  $3 \times 10^5$  microvehículos y se incubó durante la noche a temperatura ambiente, seguido de 5 lavados usando un exceso de PBS. Se almacenaron los microvehículos sometidos a tratamiento con biotina en CMF-PBS.

25 Se dejaron proliferar células ES D3 (ATTC N.º CRL-1934) sobre plástico revestido con gelatina en KO-DMEM que contenía sustitutivo de suero de desactivación al 15 % (KOSR), amino ácidos no esenciales al 1 % (NEAA), Glutamax al 1 %, penicilinaal 0,5 %/estreptomicina,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM ( $\beta$ -ME; Sigma) y 1000 U/ml de Factor Inhibidor de Leucemia (LIF; Chemicon); todos ellos de Invitrogen a menos que se especifique lo contrario.

30 En el día anterior al día 1 del experimento, se añadieron aproximadamente  $1,4 \times 10^5$  microvehículos biotinilados equilibrados en un medio A (IMDM (Gibco), KOSR al 15 %, NEAA al 1 %, pen. al 0,5 %/strep.,  $\beta$ -ME 0,1 mM, 1000 U/ml de LIF y 1-tioglicerol  $1,4 \times 10^{-4}$  M (MTG; Sigma)) a 100 ml de medio A que contenía  $3 \times 10^7$  células ES, repartido en alícuotas iguales en pocillos de una placa de petri cuadrada de 100 mm (25 pocillos, Bibby Sterilin) y se incubó durante la noche.

35 Se fijó una alícuota de microvehículos sembrados (~ 100 perlas) en paraformaldehído al 4 % (Sigma) durante 10 minutos a TR, se lavaron y se re-suspendieron en PBS y se sometieron a tinción con Vector-Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III (Vector Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### *Cultivo Celular Combinatorio*

40 Se transfirieron microvehículos sembrados al interior de una criba celular de nailon de 70  $\mu\text{m}$  (Falcon) y se lavaron con 13 ml de PBS, posteriormente se transfirieron a un exceso de medio B (Medio de Expansión Hematopoyético Stemline™ (Sigma) que contenía  $1,5 \times 10^{-4}$  M de MTG). En los días, 1, -4, 6, 8 y 10 se separaron igualmente microvehículos según se requirió por medio del plan experimental y se incubó cada muestra en pocillos de una placa de petri cuadrada de 100 mm, 25 pocillos, de manera que se introdujeron aproximadamente 5000 perlas en cada pocillo en 4 ml de medio B que contenía las sustancias químicas relevantes y/o los factores de proliferación relevantes y  $1 \times 10^6$  marcas de microesferas de estreptavidina. Se siguió este procedimiento para cada ciclo de separación y agrupación salvo tras la separación D10, en la que no se marcaron los microvehículos. Tras D10, se procesaron los microvehículos por separado (es decir, no agrupados) de manera que no fue necesaria la marca.

50 En el día 13 del experimento, se constituyó un mg de reactivo DQ de ensayo de macrófago-ovoalbúmina (Molecular Probes) en 0,4 ml de PBS y se añadió a cada muestra a una dilución de 1:100. Tras la incubación durante al menos 4 horas, se aspiró el medio y se sustituyó por PBS. Se examinaron las muestras en un microscopio epifluorescente invertido Nikon TE2000-S usando un filtro FITC ajustado identificando microvehículos que portaban células redondeadas de gran tamaño marcadas internamente con fluorescencia verde.

60 Se transfirieron los microvehículos positivos por medio de pipeta al pocillo de una placa de ensayo de fondo de vidrio de 384 pocillos (Bibby Sterilin) que contenía una disolución de proteinasa K (2 U/ml; Sigma) en PBS y se incubó a 37 °C durante 30 minutos, después de lo que se pudieron observar las marcas fluorescentes desplegadas sobre la superficie de vidrio.

#### *Marcas*

65 Se encargó un conjunto de 50 marcas (figura 13), que comprendía cada uno una población de microesfera de poliestireno revestida con estreptavidina fluorescente en Bangs Laboratories (Fishers, IN). La diferencia entre los 50

conjuntos fue una función del diámetro de la microesfera (tamaño de 1,87  $\mu\text{m}$ , 4,41  $\mu\text{m}$ , 5,78  $\mu\text{m}$ , 7,37  $\mu\text{m}$  o 9,77  $\mu\text{m}$ ) y emisión de fluorescencia/brillo (teñidos con cinco intensidades bien de Rojo de Starfire o bien UV2). Se conjugaron de manera adicional alícuotas de estos 50 conjuntos con tetrametilrodamina-5-(y-6)-isotiocianato (TRITC; Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, produciendo un máximo de 100 marcas discreto. Entre estos, se usó un conjunto de 28 marcas altamente distintivas en el experimento (Tabla 1).

#### *Análisis de marcas*

Se analizaron las marcas por medio de microscopía usando un microscopio epifluorescente invertido Nikon TE2000-S equipado con conjuntos de filtros para visualización de los fluoróforos TRITC, DAPI (UV2), GFP-B (todos de Nikon) y Cy5 (Chroma Technology). Se capturaron imágenes usando una cámara monocromo enfriada Evolution VF y se llevó a cabo el análisis de imágenes usando Image Pro Plus (ambos de Media Cybernetics). Se capturaron los perfiles de microesferas individuales usando iluminación de campo brillante y se calcularon las áreas dentro de estos ajustando el tamaño de las marcas. Se usaron los intensidades de fluorescencia de las áreas en los canales UV2, Cy5 y TRITC especificando más cada marca por medio de comparación con las muestras de referencia que contenían marcas conocidas (por ejemplo, la figura 14).

#### Resultados

Se previó una matriz experimental de condiciones de cultivo celular que los autores de la invención supusieron que contenía uno o más mecanismos capaces de dirigir la diferenciación de células ES a macrófago (Tabla 1). La matriz estaba formada por seis condiciones de cultivo alternativas el primer día del experimento (D1), seguido de seis condiciones alternativas en D4 y otras ocho en D6, ocho más en D8 y finalmente seis alternativas en D10. El número total de mecanismos posibles a través de esta matriz, es decir, el número de combinaciones diferentes de condiciones de cultivo celular sometidas a ensayo fue de 13.824 ( $= 6 \times 6 \times 8 \times 8 \times 6 =$  la "complejidad experimental"). Todas las condiciones estuvieron basadas en un medio comercialmente disponible que permite la proliferación de progenitores hematopoyéticos humanos, pero variaron en el complemento con factores de proliferación diferentes y morfógenos conocidos por influir en la formación de mesodermo, desarrollo hematopoyético y compromiso con el linaje del macrófago (Kaushansky K., N. Engl. J. Med. 2006 354: 2034-2045; Godin I. y Cumano A. 2002 2: 593-603).

Se sembraron células ES de ratón pluripotentes sobre perlas de microvehículo de gelatina-macroporoso sometida a tratamiento con biotina en presencia de LIF, donde formaron colonias que presentaron tinción positiva para actividad de fosfatasa alcalina (figura 8). Tras la extracción de LIF, se hicieron pasar sistemáticamente las perlas a través de todas las combinaciones posibles de condiciones especificadas en la matriz experimental usando un metodología iterativa de separación-agrupación como se describe en el documento WO 04013969.

Al comienzo del experimento se separaron al azar aproximadamente  $1,4 \times 10^5$  perlas de microvehículo sembradas dando lugar a seis conjuntos, cada uno de los cuales se cultivó por separado en uno de los seis medios diferentes especificados para D1 en la matriz. Cuatro días más tarde se lavaron las perlas, se agruparon y se separaron de nuevo al azar dando lugar a seis conjuntos, cada uno de los cuales se cultivó en una de los medios especificados en D4; y se repitió este procedimiento de separación-agrupación en D6, D8 y D10. Se cultivó una alícuota en cada momento en un medio diferente, se marcaron esas perlas con una única marca; salvo en D10, después de lo que se manipularon las alícuotas separadas, independientemente unas de otras y por tanto no fue necesaria la marca. De este modo, fue posible deducir el movimiento de una perla concreta a través de varios medios de cultivo por medio del análisis de la colección de marcas asociada a la misma. La estrategia de marcado empleada por los autores de la invención implicó una matriz de marcas de microesfera fluorescentes revestidas de estreptavidina, únicamente distintivas que se unieron al sustrato de microvehículo sometido a tratamiento con biotina.

Al final del experimento. D13, se expusieron los microvehículos a un antígeno de ovoalbúmina (auto-inactivado) hiper-tratado con fluoresceína. Se sabe que este reactivo se internaliza específicamente y se digiere por medio de macrófagos fagocíticos, dispersando de este modo el fluoróforo y dando lugar a una señal intracelular brillante (figuras 9 y 10). En la detección de las perlas los autores de la invención encontraron aproximadamente 100 (es decir, un 0,07 % de  $1,4 \times 10^5$  perlas de entrada) células internamente fluorescentes, redondeadas de superficie interior grande. Se asumió que se había hecho pasar estas perlas a través de condiciones que bien fueron permisivas o bien fueron instructivas para la diferenciación de células ES hasta el macrófago. Se analizaron las perlas que transportaban grandes números de macrófagos sometiendo a desconvolución su historia de cultivo celular; se aislaron estas perlas y se sometió a proteólisis el sustrato de gelatina liberando las marcas unidas, que posteriormente se clasificaron en categorías usando microscopía de fluorescencia seguida de análisis de imágenes.

Se marcaron algunos microvehículos con números grandes de marca, pudiéndose clasificar todos ellos de manera no ambigua en cuatro especies diferentes, que revelan el mecanismo de estas perlas a través de la matriz experimental. Por ejemplo, se comprobó que la perla C5 tenía marcas que correspondían al mecanismo  $1,2 \rightarrow 4,2 \rightarrow 6,1 \rightarrow 8,2$  y se aisló a partir del grupo de perlas finalmente separadas en la condición 10,5 (figura 11a).

Se marcaron algunas otros microvehículos (por ejemplo, la perla A22) con números grandes de marcas, de los que

la mayoría estuvieron dentro de las cuatro especies diferentes adquiridas a través de la marca y pareció que una pequeña minoría se adquiría a través de una transferencia adventicia entre los microvehículos diferentes (figura 11b). En la mayoría de estos últimos casos, hubo un exceso grande de una clase de marca, que permitió una medida de la confianza a la hora de someter a desconvolución la historia del cultivo celular. En unos pocos casos (normalmente en los que el total de la marca resultó insuficiente, por ejemplo la perla E6) hubo números iguales de marcas a partir de dos especies diferentes añadidas el mismo día, dando lugar a ambigüedad (figura 11c). Se resolvieron fácilmente estos tipos de ambigüedades con experimentación adicional validando los resultados y se describen a continuación.

Se dividió un lote de células ES pluripotentes sembradas sobre microvehículos en una serie de alícuotas, cada una de las cuales se usó evaluando un mecanismo de diferenciación putativo como se define por medio de Cultivo Celular Combinatorio. Se sometieron a ensayo los mecanismos ambiguos (por ejemplo A22 y A6) por medio de ensayo de cada alternativa en paralelo. Usando este método, se determinó que la perla A22 había pasado a través de las condiciones 1,2→4,2→6,4→8,2→10,3. Similarmente, la ruta de la perla E6 a través de la matriz fue 1,2→4,2→6,3→8,4→10,5.

Es interesante que estos mecanismos que produjeron macrófago tuvieron determinadas condiciones en común. En particular, el tratamiento en D1 y D4 fue inconsistente en los tres, lo que posiblemente revela un requisito para esas condiciones en la generación de progenitores hematopoyéticos que usan este sistema. Cuando se reproducen, estos mecanismos tienen como resultado de forma consistente un 10-25 % de todos los microvehículos revestidos con números sustanciales de macrófagos (figura 12). Se comprobó que, generalmente, las desviaciones de los mecanismos óptimos eran perjudiciales para la diferenciación de macrófagos. Similarmente, cuando se sometieron a ensayo mecanismos aleatorios a través de la matriz en cuanto a la capacidad de producir macrófago, no se encontraron protocolos eficaces que sugirieran que estos son relativamente raros.

## Conclusiones

Se describe un ejemplo de diferenciación de células mES usando Cultivo Celular Combinatorio que caracteriza el uso de etiquetas o marcas. Se usó el proceso detectando una matriz experimental que comprende casi 14.000 protocolos de cultivo celular diferentes para las condiciones que conducen a la diferenciación hasta el linaje de monocito-macrófago. Por medio de la detección de un gran número de mecanismos potenciales y usando una estrategia de marca apropiada, fue posible identificar protocolos de diferenciación múltiples y solucionar el uso de cuerpos embrioides y suero animal, requiriéndose normalmente uno o ambos para el desarrollo de monocito-macrófago en vitro.

## EJEMPLO 8

*Digestión de microvehículos Cultispher-G sobre portaobjetos de vidrio para desconvolución de marcas*

### Reactivos y equipo

- Proteinasa K (Sigma P4850 1 ml)
- Sigmacote (Sigma SL-2)
- Portaobjetos de vidrio de microscopio
- Horno 68 °C
- Caja humidificada casera
- Glicerol (o Citifluor)
- Pinzas
- Cubreobjetos de 13 mm de diámetro

### Métodos

Se sometieron a digestión individual microvehículos revelando el complemento de las marcas que se unen. Se lleva a cabo la digestión en un portaobjetos de vidrio de microscopio (se pueden someter a digestión hasta 6 microvehículos en un portaobjetos).

Revestir portaobjetos de microscopio de vidrio con Sigmacote en campana de humos: colocar el portaobjetos horizontalmente, tomar con precaución 1 ml de Sigmacote con la pipeta y depositar sobre la parte superior del

portaobjetos, asegurarse de que cubre toda la superficie del vidrio. Dejar en reposo durante aproximadamente 30 s y posteriormente inclinar con precaución el portaobjetos retirando el Sigmacote del borde con una pipeta. Se puede reusar el sigmacote e introducirlo de nuevo en la botella. La mayoría del Sigmacote se retira de este modo pero no se permite que el Sigmacote que queda se evapore por completo. Si hay algunas trazas de Sigmacote que quedan sobre el portaobjetos o si hay cualesquiera manchas, se frota las superficies del portaobjetos con guantes limpiando la superficie del portaobjetos.

Asegurarse de que los microvehículos objeto de digestión se han lavado con precaución en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> retirando cualesquiera trazas de medio y/o sales. Usando una punta de pipeta de 20 µl, retirar con precaución los microvehículos individuales del H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> en un volumen mínimo (1-2 µl máx) y depositar sobre el portaobjetos de vidrio. No siempre es necesario poner con la pipeta todo el volumen de 1-2 µl sobre el portaobjetos; simplemente usar la pipeta depositando el microvehículo suficiente sobre el portaobjetos (asegurarse de que los microvehículos están suficientemente espaciados permitiendo la adición posterior de un cubreobjetos sin solapamiento -se pueden conseguir 5-6 microvehículos por portaobjetos con precaución).

Colocar con precaución los portaobjetos en un horno de 68 °C logrando la deshidratación completa de los microvehículos y la adhesión al portaobjetos (10 minutos deberían ser suficientes).

Preparar una disolución nueva de 5U/ml de proteinasa k en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (nótese que la preparación de la reserva de proteinasa K varía entre lotes de manera que la dilución se debería calcular con cada nuevo lote (por ejemplo, la disolución de reserva 1230 U/ml hasta 5 U/ml =  $5/1230 = 1/246$ , es decir dilución de 1 en 246 de la disolución de reserva en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>).

Preparar una caja humidificada en la que se lleva a cabo la reacción de digestión (un placa de Petri de cultivo de células de 10 cm x 10 cm funciona bien con pipetas de plástico desechables -cortar hasta un tamaño que ajuste a lo largo de los dos lados. Colocar tejido humedecido en agua entre las pipetas).

Colocar de forma rápida pero con precaución 0,5 µl de disolución de 5 U/ml de proteinasa k, haciendo uso de la pipeta, sobre microvehículos secos (esto puede resultar bastante complicado ya que 0,5 µl es un volumen muy pequeño y se evapora rápidamente fuera de la caja humidificada). Una vez que se ha añadido proteinasa K a todos los microvehículos, colocar el portaobjetos en la caja humidificada y cubrir con una tapa. Dejar a temperatura ambiente, protegido de la luz tanto como resulte posible, hasta que se hayan disuelto los microvehículos (normalmente 30-60 minutos). Es necesario retirar los portaobjetos de la caja humidificada comprobando que la digestión ha sido completa y es necesario que esto se lleve a cabo de la manera más rápida posible antes de introducir de nuevos los portaobjetos en la caja evitando la evaporación de la disolución de proteinasa k).

Una vez que los microvehículos se han disuelto por completo, retirar los portaobjetos de la caja y dejar reposar a temperatura ambiente permitiendo la evaporación de la disolución de proteinasa k (esto tendrá lugar de forma bastante rápida). Colocar los portaobjetos en un horno a 68 °C durante aproximadamente 10 minutos garantizando el secado completo de las marcas liberadas sobre el portaobjetos).

Añadir con precaución una gota de 6 µl de glicerol directamente sobre las marcas secas, teniendo precaución de evitar burbujas de aire (si existen burbujas de aire presentes en la gota, con frecuencia es necesario retirarlas pinchándolas con una pequeña aguja). Usando unas pinzas, colocar con precaución un cubreobjetos de 13 mm de diámetro limpio de polvo sobre la gota de glicerol, teniendo precaución extrema evitando burbujas de aire (es casi imposible retirar las burbujas de aire de debajo del cubreobjetos una vez que se encuentra en su sitio). Dejar que se asiente el cubreobjetos (el glicerol se dispersa por todo el cubreobjetos. Proteger los portaobjetos de la luz tanto como resulte posible pero con cuidado de no alterar los cubreobjetos demasiado y dispersar el glicerol sobre la superficie.

Analizar las marcas usando un microscopio.

#### EJEMPLO 9

##### *Digestión de los microvehículos de Cytopore 2*

#### Reactivos y equipo

- Guantes, gafas de seguridad, bata de laboratorio

- Ácido clorhídrico, 37 %\*

- Placa de Petri

- Tubos de PCR de pared fina

- Sigmacote (n.º de cat. de Sigma SL-2)
- Medio de montaje Citifluor (Agar scientific)

5

### Método

Tras un experimento de separación-agrupación, se someten a digestión los microvehículos revelando el complemento de las marcas que se unen. Se lleva a cabo la digestión de los microvehículos individuales en un tubo de PCR de pared fina en un dispositivo de ciclado térmico o bloque calentador a 65 °C.

10

1. tomar microvehículo de cytopore 2 + marcas (+ células) con la punta de la pipeta en el volumen más pequeño posible, normalmente < 2 µl (pipeta de 20 µl y punta funcionan bien) y depositar en una gota de 5 µl de HCl de 37 % en una placa de petri. Pasar rápidamente a la siguiente etapa.

15

2. Extraer rápidamente el microvehículo con una punta de pipeta ajustada a 1 µl y depositar en la parte inferior de un tubo de PCR de pared fina y cerrar la tapa.

20

3. Colocar el tubo en un dispositivo de ciclado térmico o bloque calentador ajustado a 65 °C durante 7 minutos (comprobar que el vehículo se ha disuelto por medio de inspección a través de la pared del tubo usando un microscopio e incrementado el tiempos otros 2 minutos si fuese necesario. El vehículo se debería haber disuelto trascurridos 7-9 minutos).

25

4. Tratar el portaobjetos de vidrio del microscopio con Sigmacote

5. Tratar la punta de pipeta de 2 µl con Sigmacote, garantizando que se seca por completo, antes de retirar con precaución el HCl en del tubo de PCR que contiene las marcas.

30

6. Depositar una gota de 1 µl sobre el portaobjetos de microscopio, invertir de manera que dicha gota sea una gota que cuelga e incubar a 68 °C hasta lograr el secado completo (15-30 minutos) Añadir una gota de Citifluor y colocar el cubreobjetos. Analizar las marcas usando un microscopio.

### EJEMPLO 10

35

#### *Marcado de unidades celulares con marcas con forma de bastoncillo*

Se sembraron microvehículos de Cultispher G 3500 con células de ES de ratón D3 en una suspensión celular individual a una densidad de 50 células por vehículo en 2 ml de medio de proliferación que comprendía KO-DMEM + 15 % de KO-SR, 100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, GlutaMAX 2 mM, NEAA 1X, 1000 U/ml LIF, βME 100 µM y se cultivaron las células durante la noche a 37 °C.

40

Se llevó a cabo una tinción vital de rojo neutro sobre las unidades celulares antes de la adición de partículas con nano-código de barras confirmando la viabilidad de las células antes de la adición de partículas.

45

Se obtuvieron suspensiones de partículas con forma de bastoncillo que comprendían nanoalambres de aluminio revestido con Ag/Au de 6 micrómetros de largo (Nicewamer-Pena, S.R. y col., Science 294: 137-141, 2001) a partir de Oxonica Healthcare (Kidlington, Reino Unido) a una concentración de  $1 \times 10^9$  partículas por ml. Se usaron dos códigos de barras designados 101010 y 100001 (en los que 1 = Ag y 0 = Au) marcando las unidades celulares.

50

Se retiró una muestra de las partículas con forma de bastoncillo de la reserva y se esterilizó con etanol al 95 % durante 1 hora antes del lavado y re-suspensión en PBS estéril. Se añadió una mezcla de las dos partículas con nano-código de barras a ~ 875 unidades celulares en un medio de 2 ml en un pocillo de una placa de cultivo celular de 25-weH a una proporción de 1000 partículas por unidad celular. Se incubó a placa de cultivo celular a 37 °C durante la noche en un agitador orbital.

55

Trascurridas 24 horas en el cultivo, se colocaron las unidades celulares marcadas en un filtro de 70 µm retirando las partículas con forma de bastoncillo no ligadas y se lavó 5 veces con 5 ml de PBS. Se retiraron las células individuales y se continuó la viabilidad de las células D3 en presencia de las partículas con forma de bastoncillo evaluadas por medio de tinción vital con rojo neutro.

60

Se depositaron las células individuales en portaobjetos de microscopio de vidrio tratados con Sigmacote y se colocaron a 68 °C durante 10-95 minutos garantizando la deshidratación completa. Se prepararon 5 U/ml de proteinasa k en H<sub>2</sub>O y se depositaron 0,5 µl directamente sobre el material deshidratado. Se colocaron los portaobjetos inmediatamente en una cámara humidificada hasta que se hubo digerido el material de gelatina (normalmente 30-60 minutos) y posteriormente se retiró a un incubador a 68 °C permitiendo la evaporación completa

65

de la disolución de proteinasa k (normalmente 10 minutos).

Se aplicó directamente una gota de 5 µl de glicerol al punto deseado y se aplicó un cubreobjetos redondo de 13 mm. Se capturaron imágenes microscópicas de las partículas liberadas con forma de bastoncillo usando iluminación de campo brillante con un microscopio epifluorescente invertido Nikon TE2000S.

Se logró la discriminación de las partículas con forma de bastoncillo en la muestra usando un microscopio Deltavision RT equipado con un lámpara de Hg y un ajuste de filtro Chroma CFP (Ex. 436/10; Em. 465/30) con un objetivo de inmersión en aceite de 100 aumentos.

Tabla 1

| Marca | Ø   | Flúor | [Flúor] | ± TRITC | Adiciones a medio basal                                               |
|-------|-----|-------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1,1   | 4,4 | UV    | 4       | -       | RA 10 nM                                                              |
| 1,2   | 4,4 | SR    | 2       | -       | DMSO 0,1 % (v/v)                                                      |
| 1,3   | 4,4 | UV    | 2       | -       | LIF 1000 U/ml + TGF β1 + 5 ng/ml de BMP2                              |
| 1,4   | 7,4 | SR    | 5       | +       | LIF 1000 U/ml + 10 ng/ml de bFGF                                      |
| 1,5   | 7,4 | UV    | 4       | +       | LIF 1000 U/ml + 20 ng/ml de TPO                                       |
| 1,6   | 7,4 | UV    | 2       | +       | LIF 1000 U/ml                                                         |
| 4,1   | 4,4 | SR    | 2       | +       | 2,5 ng/ml de TGF β1                                                   |
| 4,2   | 9,8 | UV    | 2       | -       | 10 µg/ml de Ins                                                       |
| 4,3   | 9,8 | UV    | 2       | +       | 2,5 ng/ml de TGF β1 + 5 ng/ml de BMP2                                 |
| 4,4   | 4,4 | SR    | 4       | -       | 40 ng/ml de SCF                                                       |
| 4,5   | 7,4 | SR    | 4       | +       | 20 ng/ml de TPO                                                       |
| 4,6   | 9,8 | UV    | 1       | +       | 10 µg/ml de ITS                                                       |
| 6,1   | 4,4 | SR    | 1       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6                                     |
| 6,2   | 7,4 | UV    | 4       | -       | 30 ng/ml IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 3 U/ml de EPO + 10 ng/ml de M-CSF    |
| 6,3   | 9,8 | UV    | 3       | +       | 10 µg/ml de ITS + 3 U/ml de EPO                                       |
| 6,4   | 7,4 | uv    | 1       | +       | 10 µg/ml de ITS + 10 ng/ml de M-CSF                                   |
| 6,5   | 4,4 | UV    | 5       | -       | 20 ng/ml de TPO + 3 U/ml de EPO                                       |
| 6,6   | 7,4 | SR    | 3       | +       | 20 ng/ml de TPO + 10 ng/ml de M-CSF                                   |
| 6,7   | 4,4 | UV    | 3       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 3 U/ml de EPO                     |
| 6,8   | 9,8 | uv    | 5       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 10 ng/ml de M-CSF                 |
| 8,1   | 4,4 | SR    | 3       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6                                     |
| 8,2   | 7,4 | SR    | 5       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 3 U/ml de EPO + 10 ng/ml de M-CSF |
| 8,3   | 9,8 | UV    | 1       | -       | 10 µg/ml de ITS + 3 U/ml de EPO                                       |
| 8,4   | 7,4 | UV    | 2       | -       | 10 µg/ml de ITS + 10 ng/ml de M-CSF                                   |
| 8,5   | 7,4 | SR    | 3       | -       | 20 ng/ml de TPO + 3 U/ml de EPO                                       |
| 8,6   | 4,4 | SR    | 5       | -       | 10 ng/ml de TPO + 10 ng/ml de M-CSF                                   |
| 8,7   | 9,8 | UV    | 3       | -       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 3 U/ml de EPO                     |
| 8,8   | 4,4 | uv    | 4       | +       | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml IL6 + 10 ng/ml de M-CSF                    |
| 10,1  |     |       |         |         | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6                                     |
| 10,2  |     |       |         |         | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml IL6 + 3 U/ml de EPO + 10 ng/ml de M-CSF    |
| 10,3  |     |       |         |         | 20 ng/ml de TPO + 3 U/ml de EPO                                       |
| 10,4  |     |       |         |         | 20 ng/ml de TPO + 10 ng/ml de M-CSF                                   |

|      |  |  |  |  |                                                       |
|------|--|--|--|--|-------------------------------------------------------|
| 10,5 |  |  |  |  | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 3 U/ml de EPO     |
| 10,6 |  |  |  |  | 30 ng/ml de IL3 + 20 ng/ml de IL6 + 10 ng/ml de M-CSF |

Leyenda de la tabla 1

5 Listado de condiciones que comprenden la matriz experimental y las correspondientes marcas usadas marcando los microvehículos expuestos a estas condiciones. La nomenclatura de la marca indica el día del experimento y la condición experimental (día.condición). Las columnas 2-5 listan las características de la marca correspondiente, es decir, el tamaño (diámetro); identidad del fluoróforo (UV2 o Rojo Starfire); intensidad del fluoróforo (1 la más baja-5 la más alta) y si la marca se modificó con TRITC. Para cada condición de matriz, las concentraciones finales de los diferentes factores de proliferación y/o morfógenos presentes en el medio basal vienen indicados en la columna final.



## REIVINDICACIONES

1. Un complejo que comprende un microvehículo que tiene una carga positiva conjugada a una marca con carga negativa, marca que es una microesfera, microesfera que no está revestida con proteínas, en el que dicho microvehículo comprende proteína, celulosa, polietileno, polistírol, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina.
2. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microvehículo es un microvehículo poroso.
3. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el microvehículo consiste esencialmente en proteína, celulosa, polietileno, polistírol, vidrio, colágeno, colágeno-glucosa-aminoglucano y/o gelatina.
4. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la microesfera tiene un diámetro de aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  o menos.
5. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la marca comprende, consiste o consiste esencialmente en poliestireno y/o látex.
6. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el complejo se adhiere o se une a al menos una célula.
7. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que al menos un anticuerpo está ligado a la célula.
8. Un método para separar el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende las etapas de poner en contacto dicho complejo con un ácido, una proteasa o una celulasas.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el ácido está seleccionado entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o hipoclorito de sodio.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que se detecta la marca separada.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la marca se somete a análisis de imágenes.
12. Un método para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula que comprende el uso de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Un método para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula, que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de una o más células y exponer dicho primer conjunto de grupos a condiciones de cultivo deseadas,
  - (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación,
  - (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de una o más células,
  - (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas,
  - (e) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(d) iterativamente según se requiera, y
  - (f) evaluar el efecto de las condiciones de cultivo a las que se ha expuesto una célula o grupo de células concreto; en el que cada grupo de una o más células es adherente a, o se une por medio de, un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
14. Un método para exponer un célula a una variedad de condiciones de cultivo celular, que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de una o más células y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas,
  - (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación,
  - (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de una o más células,

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

(e) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(d) iterativamente según se requiera;

5 en el que cada grupo de una o más células es adherente a, o se une por medio de, un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que las condiciones de cultivo son medios a los que se ha expuesto la célula.

10 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el medio contiene uno o más agentes específicos que influyen en un proceso celular.

15 17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en el que las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar a una o más temperaturas específicas.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en el que las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar sobre uno o más sustratos específicos.

20 19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-18, en el que el proceso celular es proliferación o diferenciación celular.

20. Un método para cultivar células pluripotentes excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas o células que proceden de células pluripotentes in vitro que comprende las etapas de:

25 a) incubar un cultivo de células pluripotentes, y

b) separar dicho cultivo en dos o más grupos de células pluripotentes y cultivar dicho grupo de células pluripotentes en dos o más conjuntos diferentes de condiciones de cultivo;

30 en el que las células se cultivan en grupos que comprenden una o más células adheridas o unidas en el complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

35 21. Un método para cultivar células pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, que comprende dejar proliferar dichas células pluripotentes adheridas al complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dichas células pluripotentes se someten a al menos un cambio de las condiciones de cultivo.

40 23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho cambio de las condiciones de cultivo comprende un cambio de medio.

45 24. Un método para obtener células diferenciadas a partir de células pluripotentes in vitro, que comprende las etapas de:

(a) dejar proliferar las células pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, adherentes al complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un medio de cultivo;

50 (b) transferir el complejo de un medio de cultivo a otro;

(c) opcionalmente repetir la etapa (b) según se requiera; y

(d) obtener las células diferenciadas unidas al complejo.

55 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que las células diferenciadas se aíslan por medio de desligado enzimático o químico del complejo.

60 26. El método de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en el que las células diferenciadas se aíslan por medio de digestión del complejo.

27. Un método para dejar proliferar células pluripotentes pluripotentes, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, in vitro que comprende las etapas de:

65 (a) sembrar dichas células sobre el complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y

(b) propagar las células mientras se encuentran unidas al complejo.

28. Un método para cultivar células, excluyendo células pluripotentes embrionarias humanas, in vitro, que comprende dejar proliferar dichas células adheridas al complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

29. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-28 que comprende adicionalmente separar las marcas del complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

30. El método de la reivindicación 29, en el que las marcas se separan exponiendo al complejo a un ácido, una proteasa o una celulasa.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en el que las marcas separadas se someten a análisis de imágenes.

32. Uso de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende adicionalmente separar las marcas del complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que las marcas se separan exponiendo el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 a un ácido, una proteasa o una celulasa.

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, en el que las marcas separadas se someten a análisis de imágenes.

36. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que la microesfera es una microesfera modificada con carboxilato.

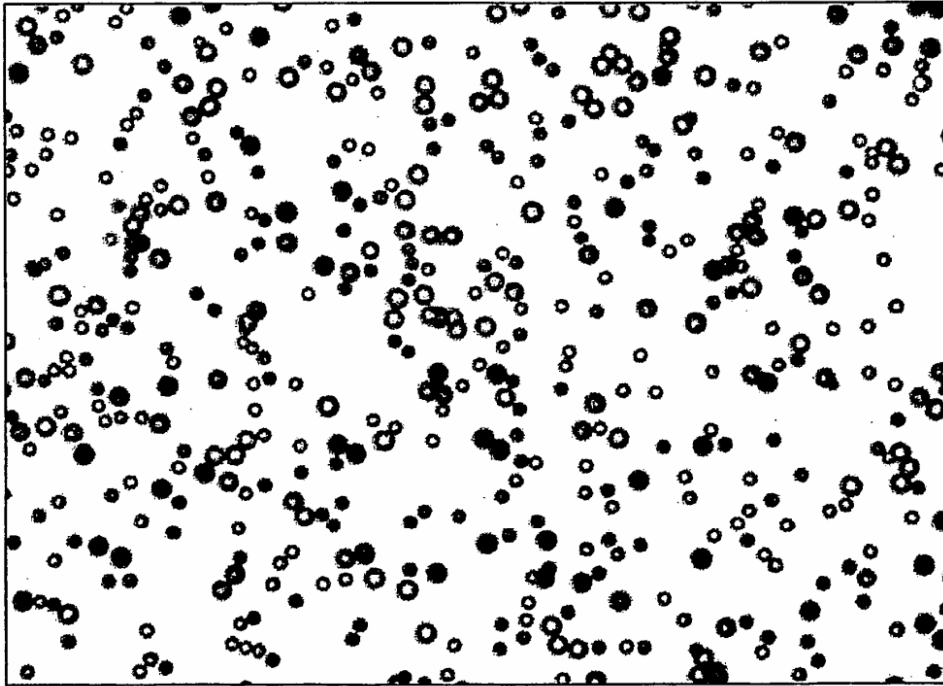


FIG. 1

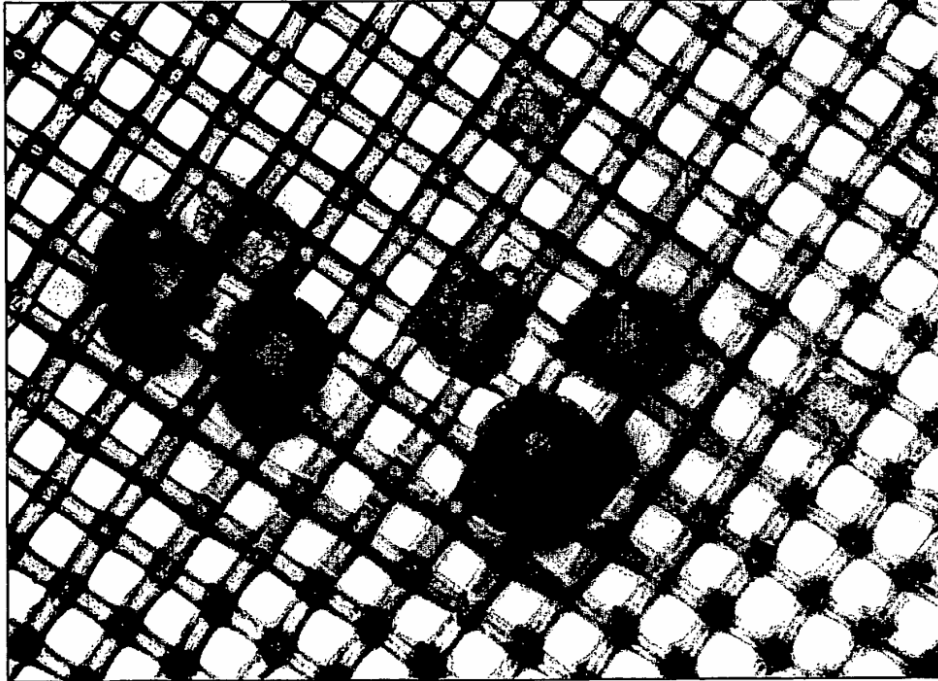


FIG. 2

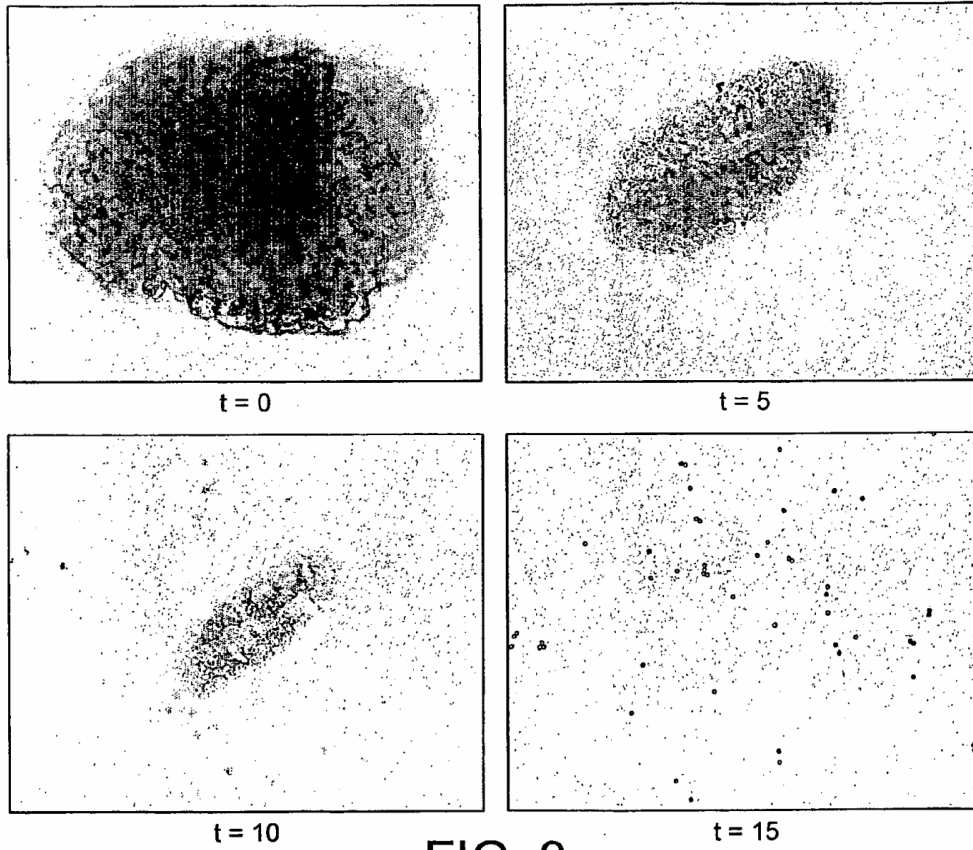
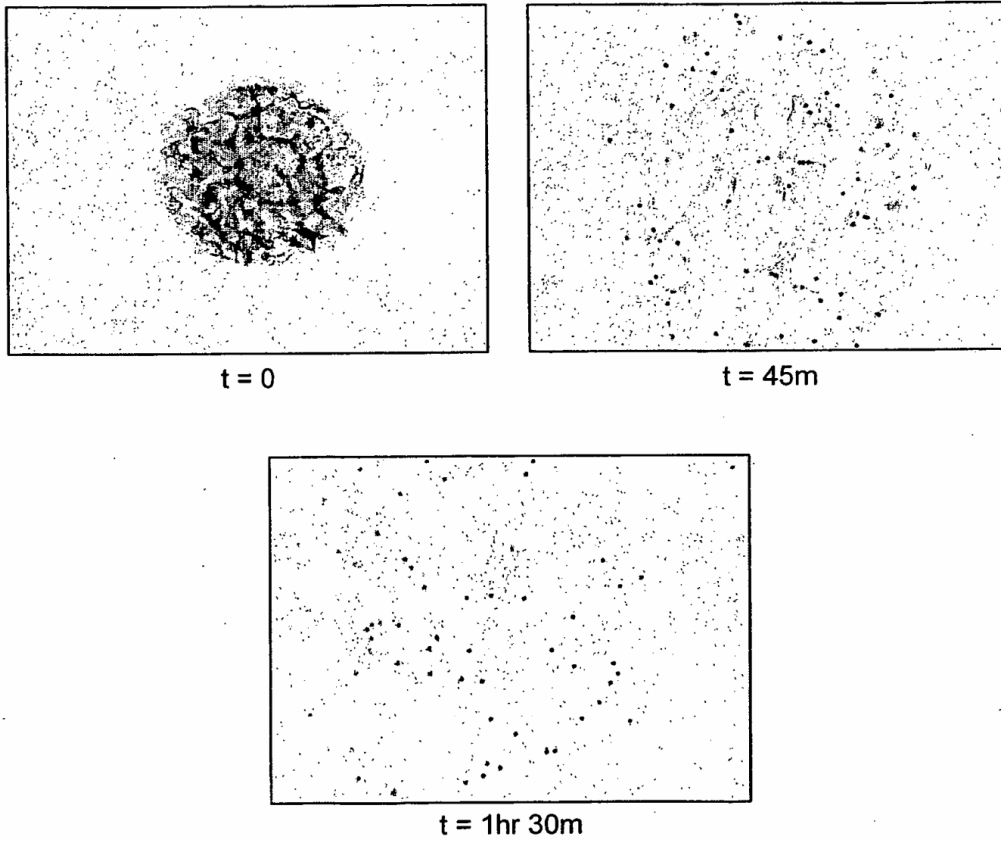


FIG. 3



**FIG. 4**

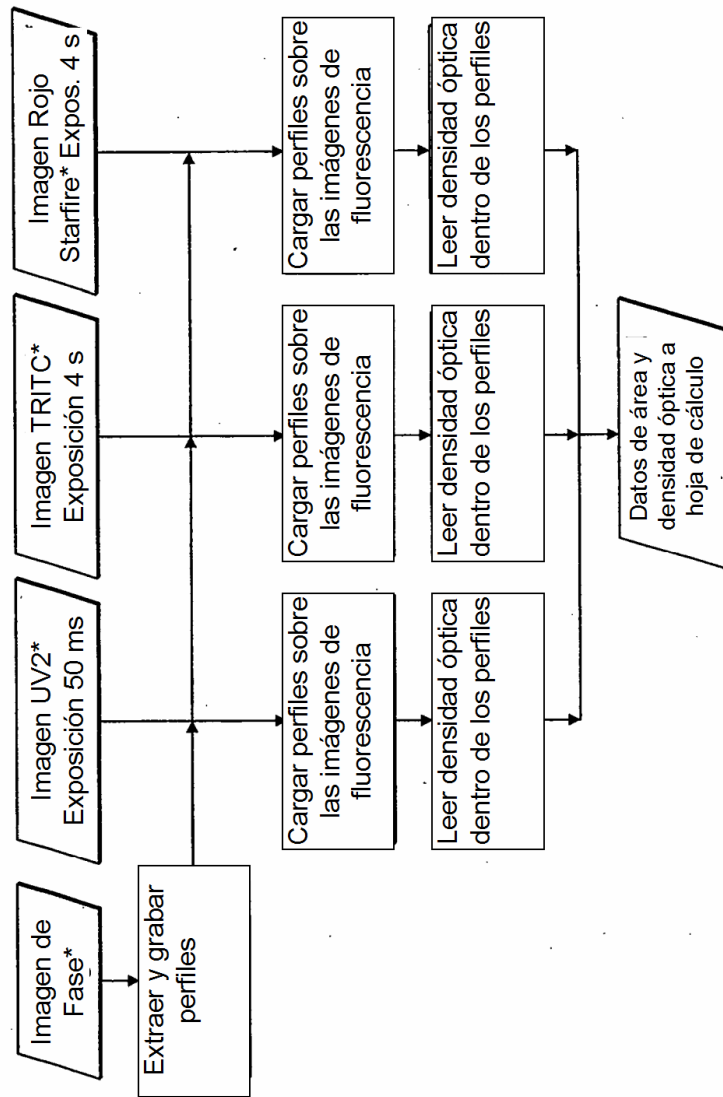


FIG. 5



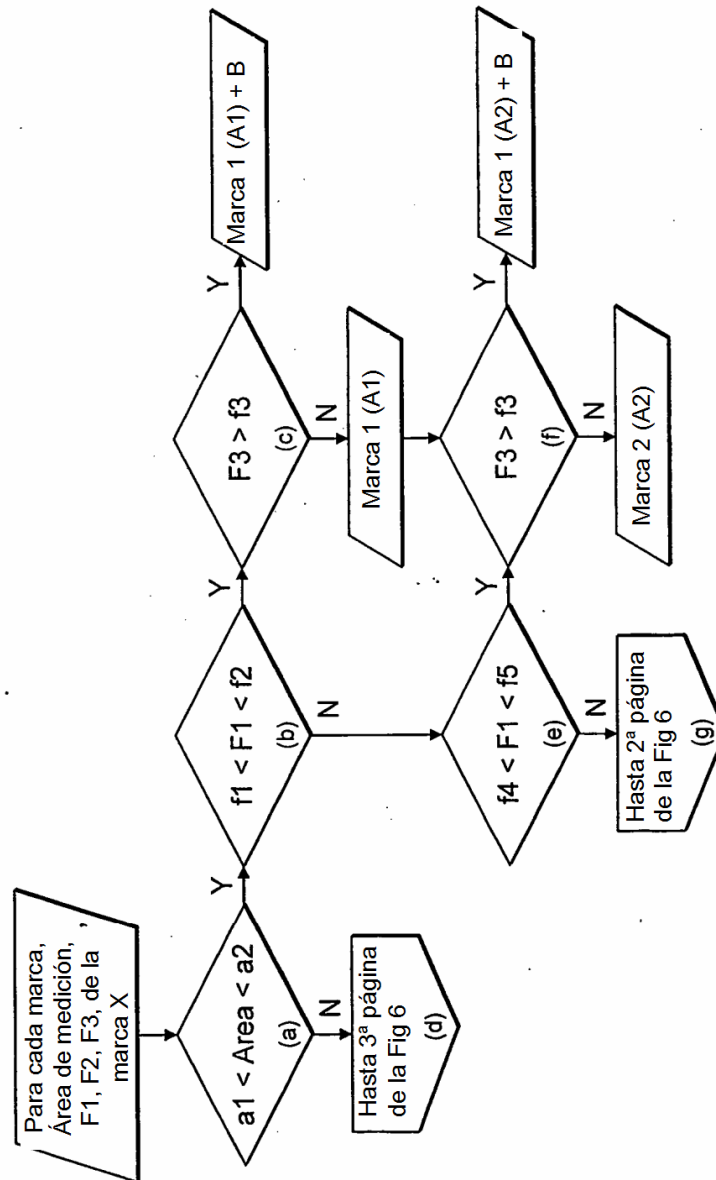


FIG. 6

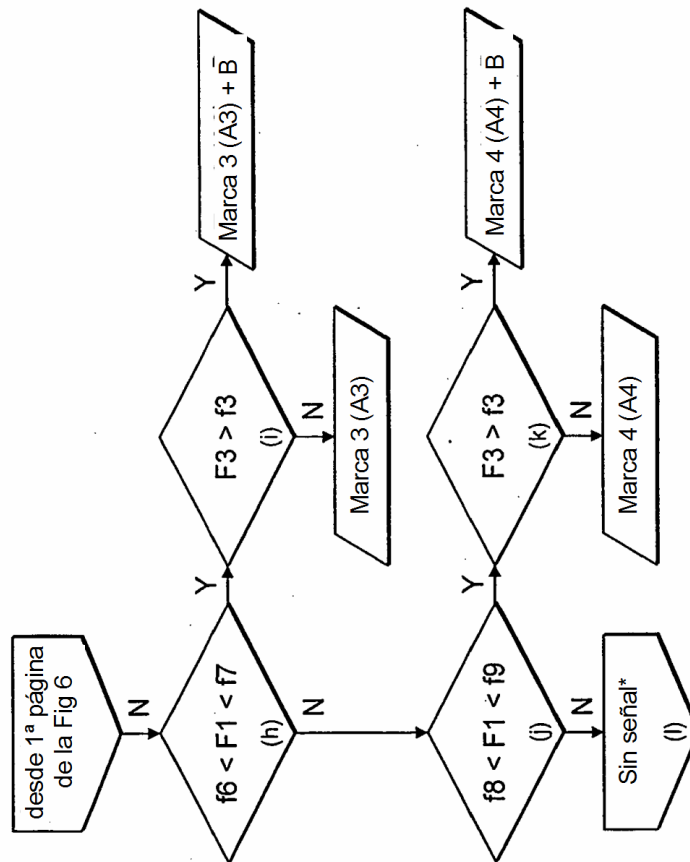


FIG. 6 continuación

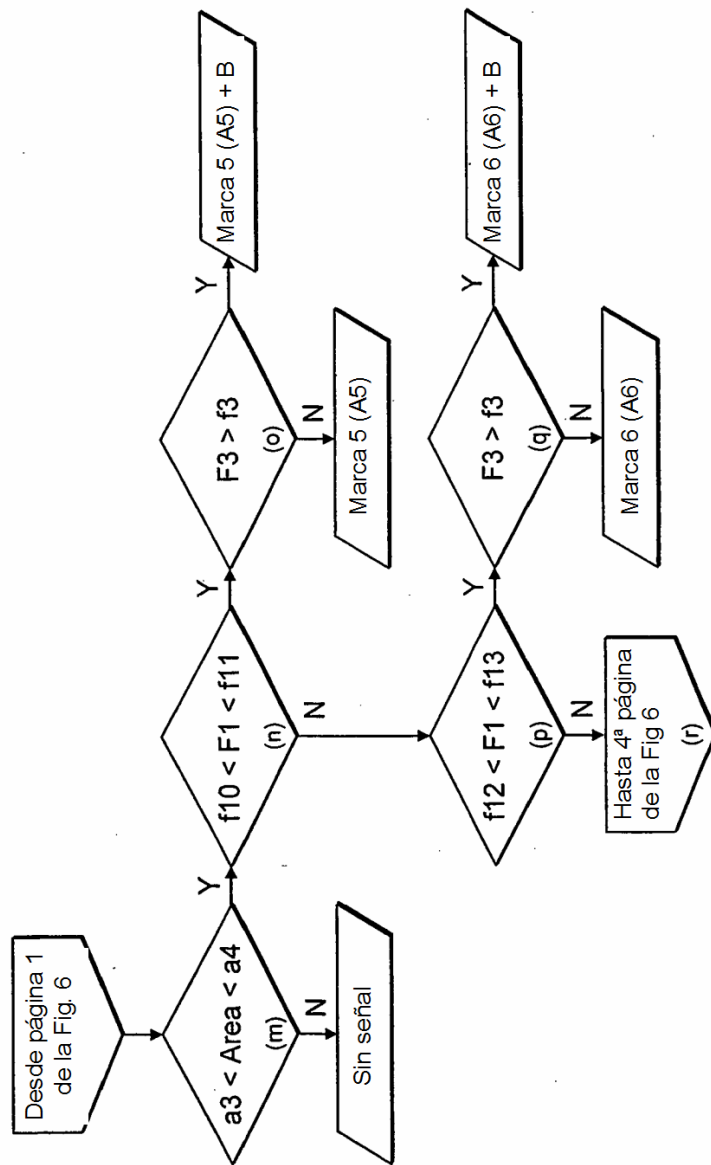
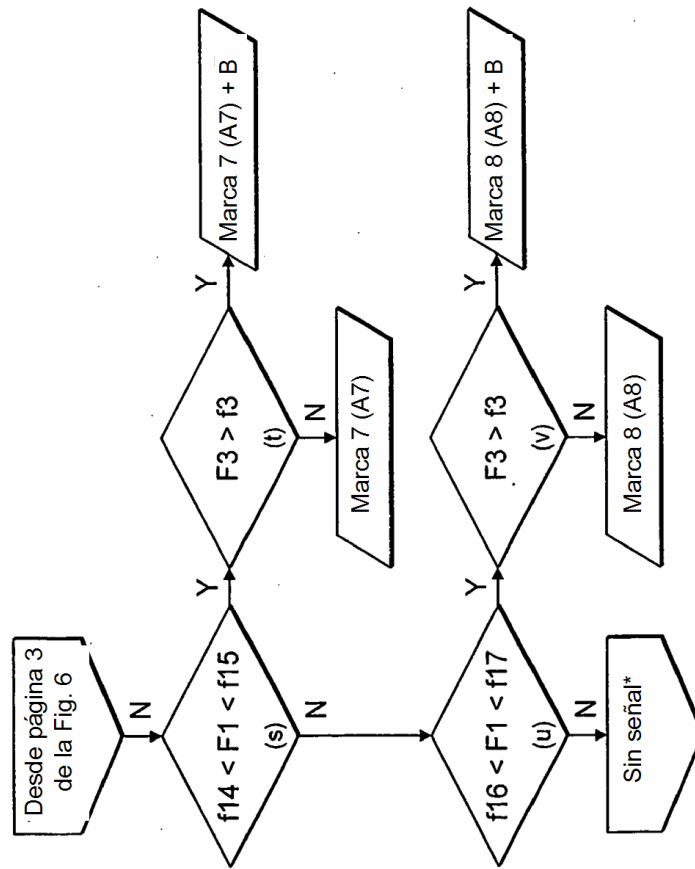


FIG. 6 continuación



**FIG. 6** continuación

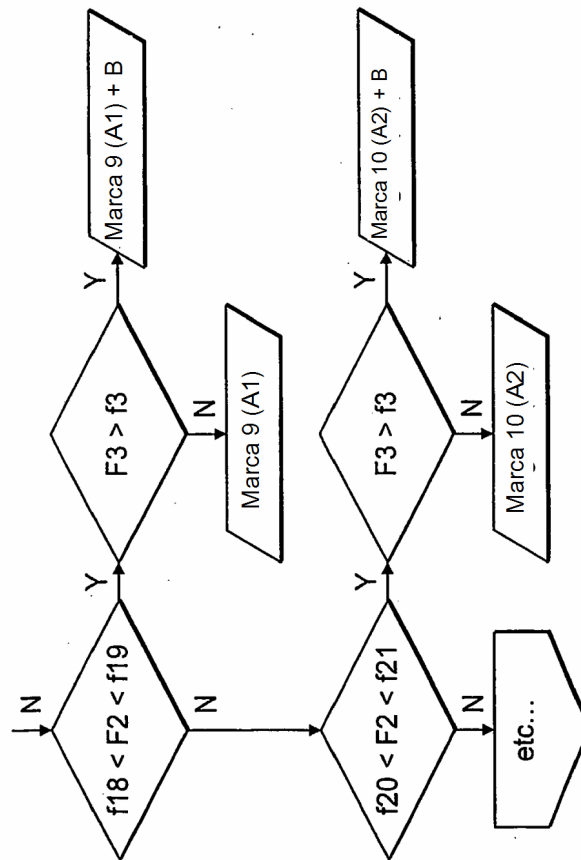


FIG. 7

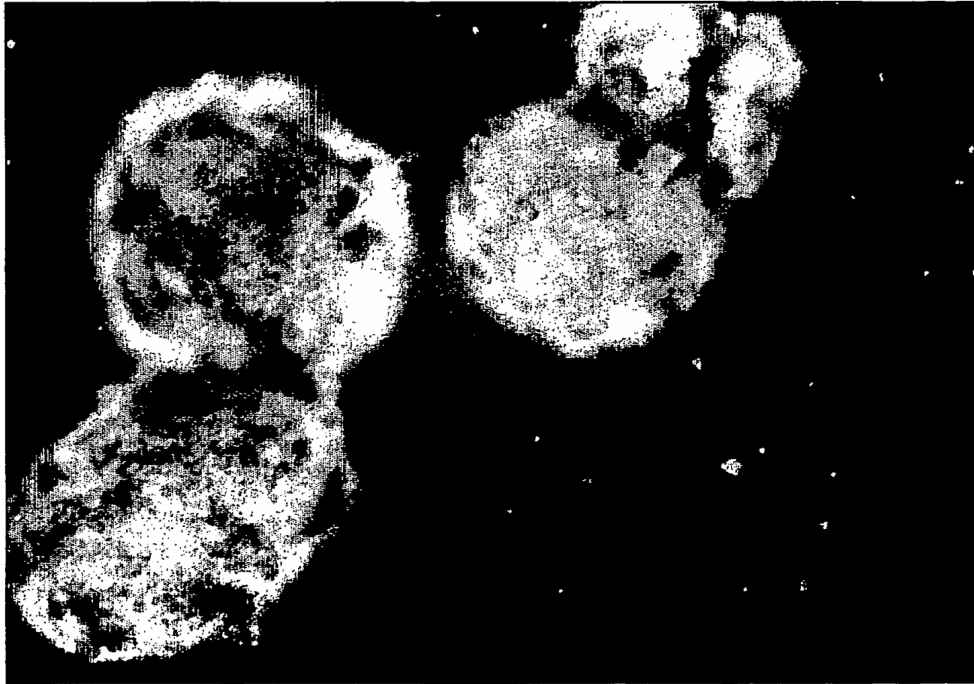


FIG. 8

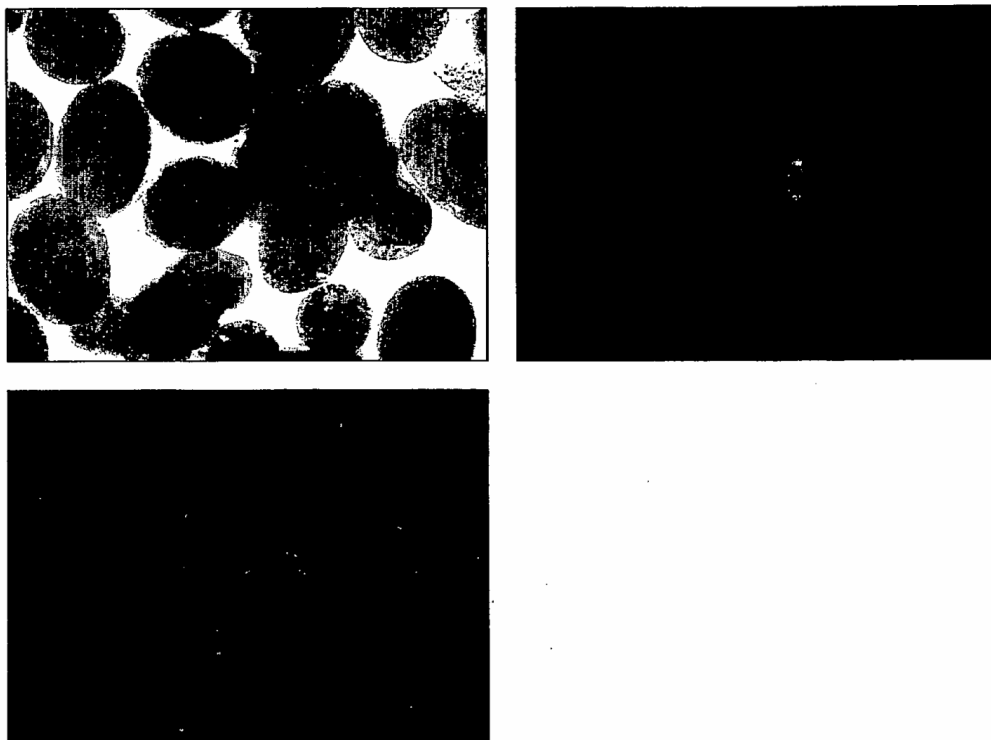


FIG. 9

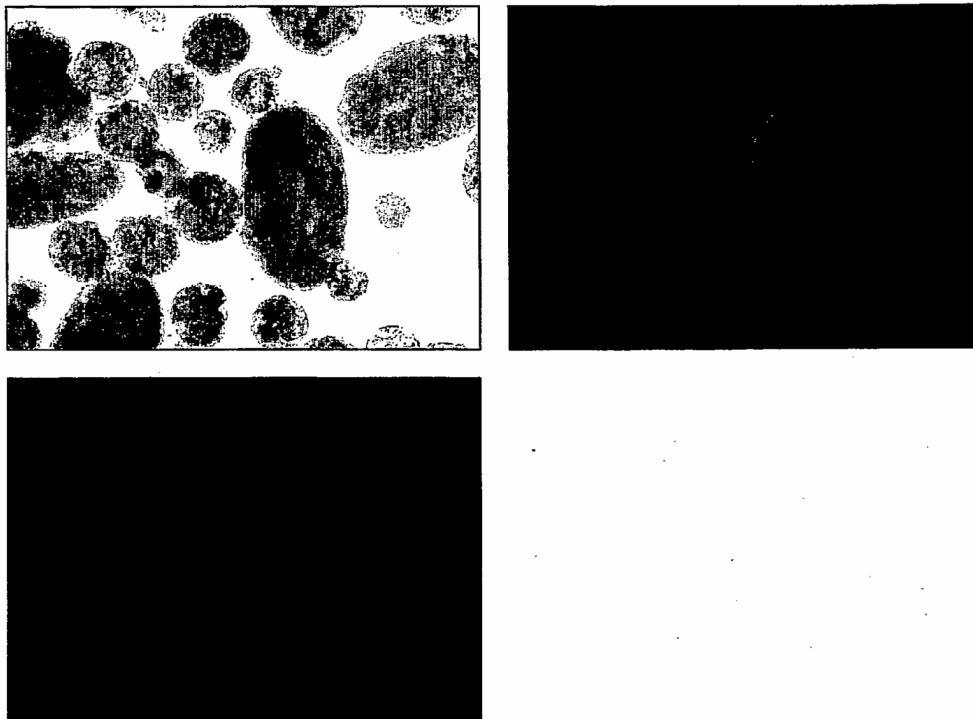


FIG. 10



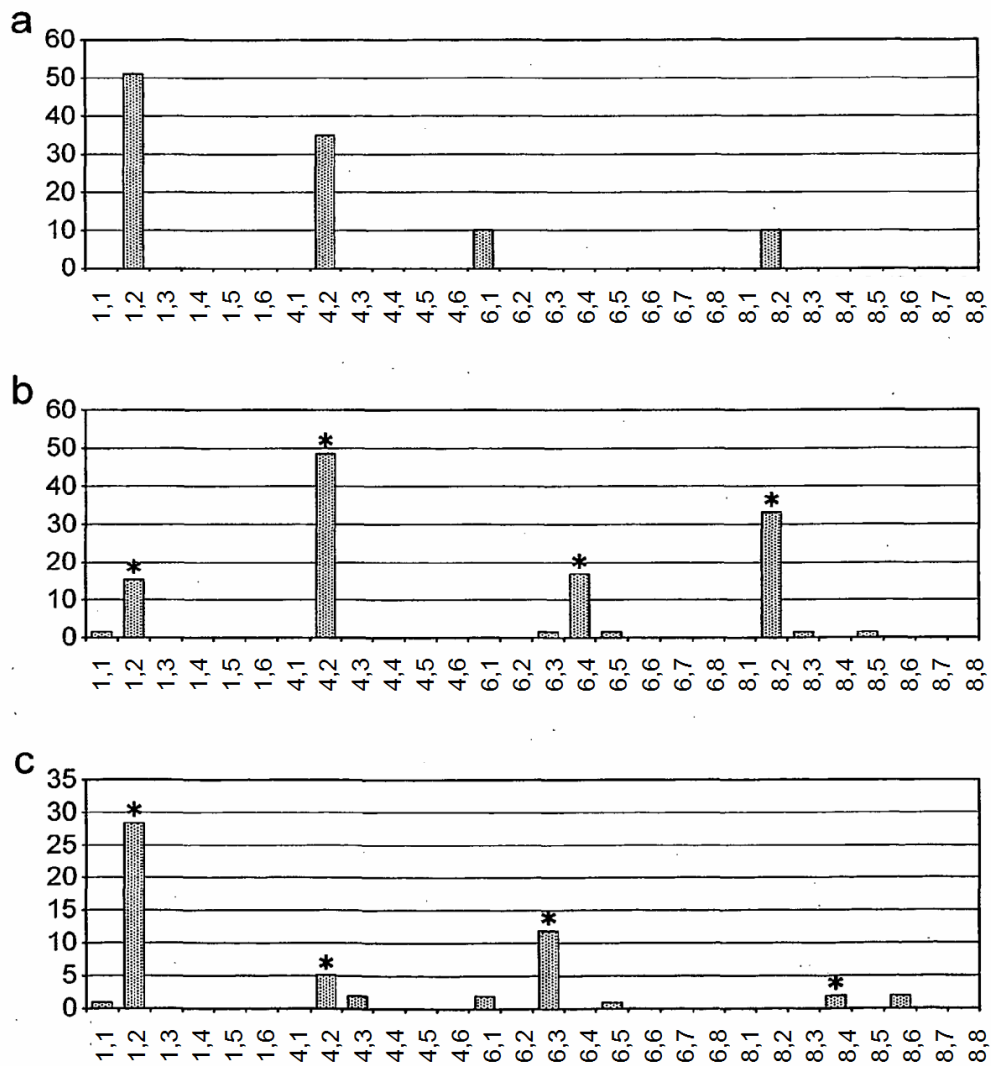


FIG. 11

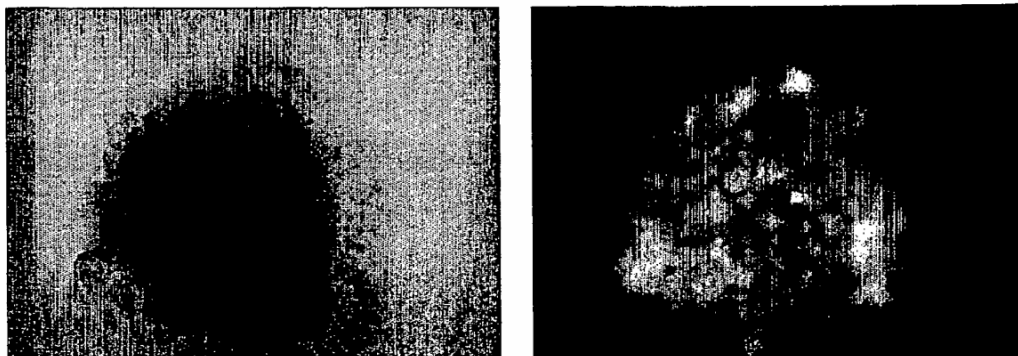


FIG. 12

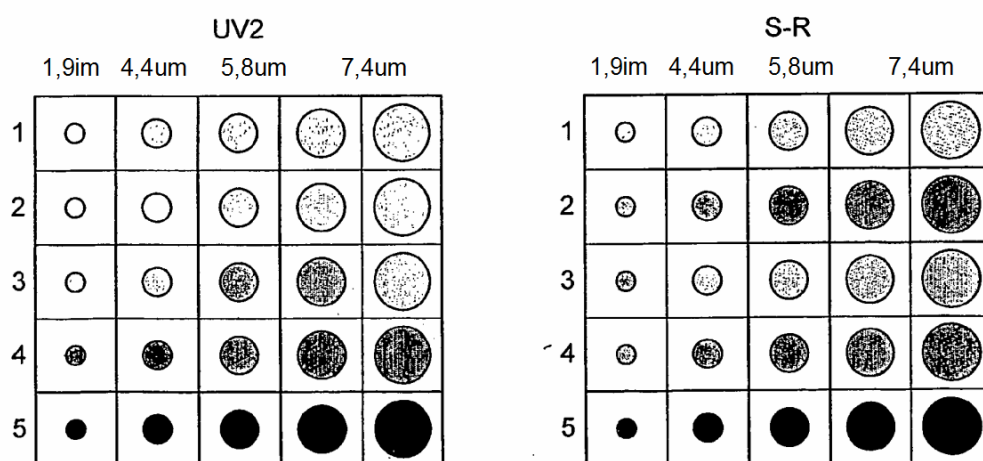


FIG. 13

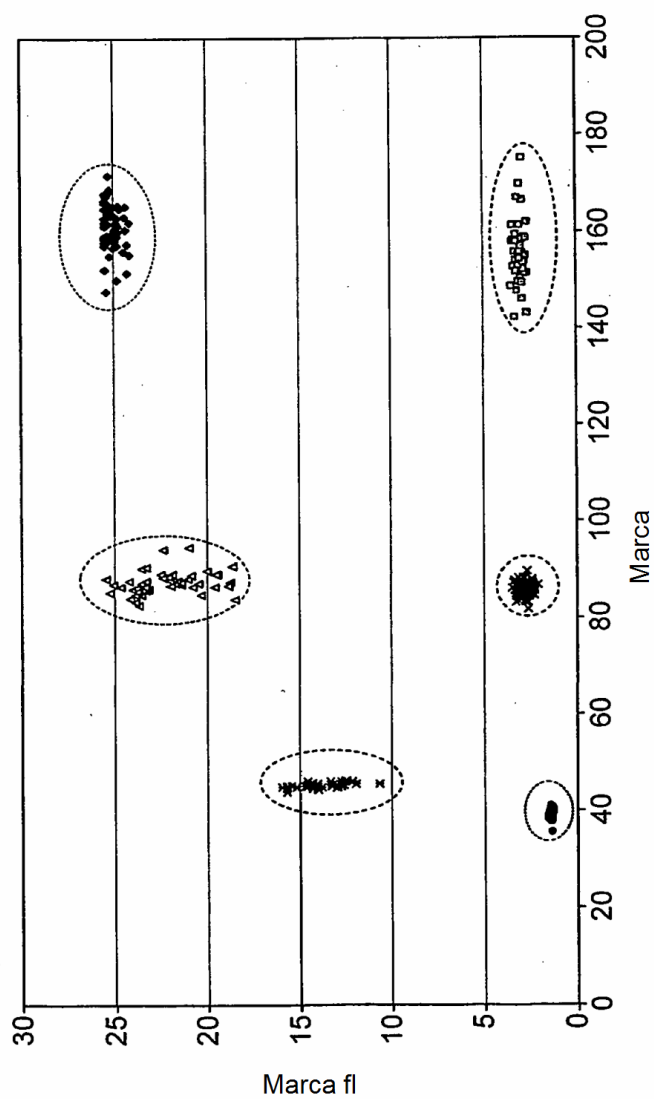


FIG. 14

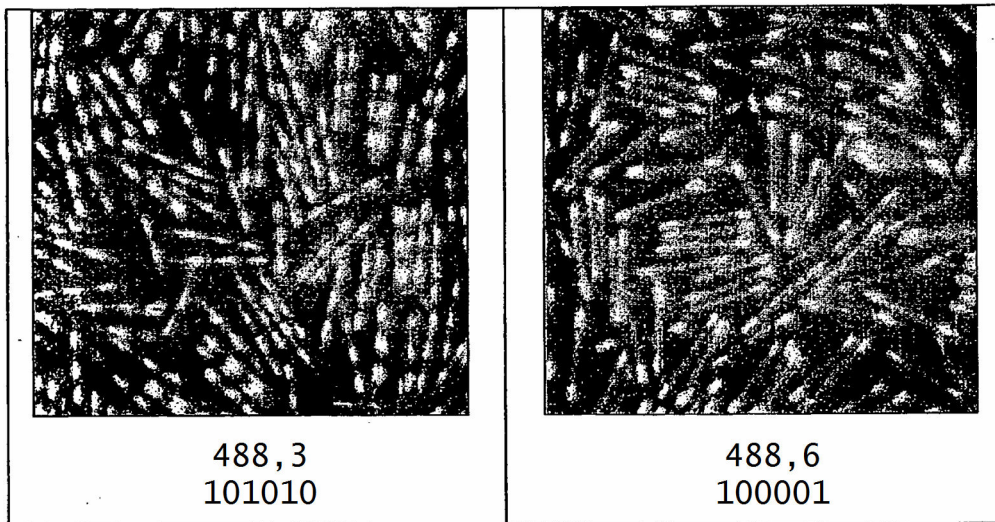


FIG. 15

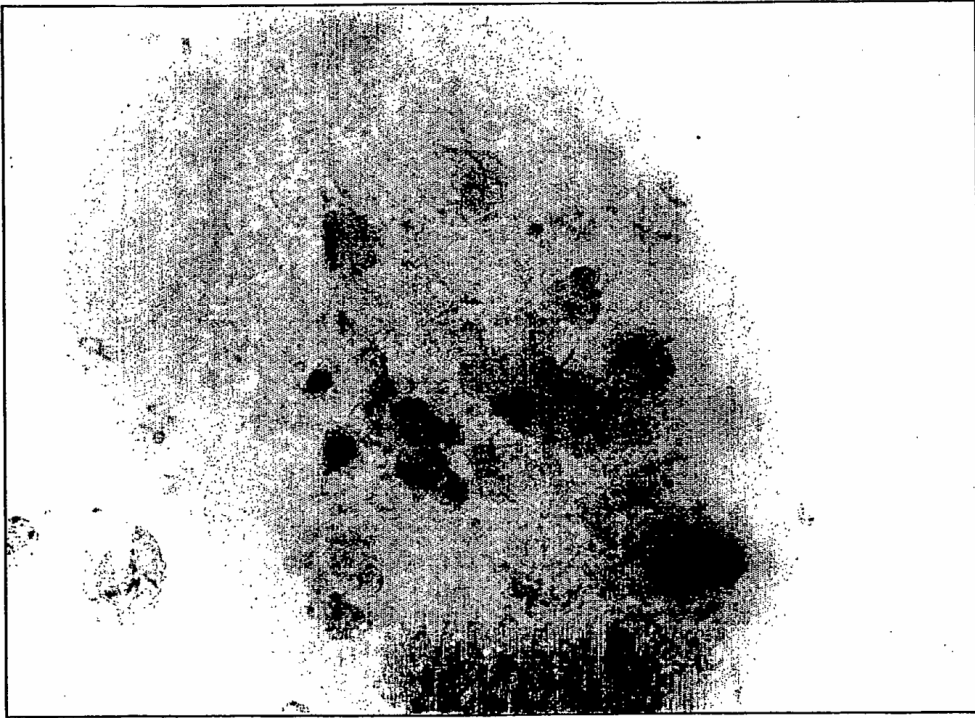


FIG. 16



FIG. 17



FIG. 18