

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 674**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008 E 08847813 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2215472**

54 Título: **Métodos para medir la viabilidad celular sin usar células de control**

30 Prioridad:

09.11.2007 US 986751 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2014

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

WANG, YONGZHONG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 498 674 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para medir la viabilidad celular sin usar células de control

Esta invención se refiere al campo de la biología celular así como al cultivo celular y manipulación de tejidos mediante ingeniería. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para medir la fracción de células viables en una población celular mantenida en un medio de cultivo celular.

El campo de la manipulación de tejidos mediante ingeniería (revisado en Langer y Vacanti, *Science*, 260:920-926 (1993)) se centra en el uso de matrices o armazones para apoyar el crecimiento y mantenimiento de células. Por ejemplo, la implantación de condrocitos autólogos inducida por matriz (implantes MACI®) es un procedimiento de implantación de condrocitos autólogos (ACI) de segunda generación usado para reparar cartílago. En un implante MACI®, los condrocitos expandidos en cultivo se siembran sobre una matriz de membrana a base de colágeno, la cual facilita más tarde la implantación quirúrgica. Los implantes MACI® se pueden usar para tratar defectos del cartílago artroscópicamente o a través de cirugía mínimamente invasiva.

El uso de matrices en productos manipulados mediante ingeniería de tejidos presenta retos significativos a los investigadores que intentan medir la viabilidad de las células constituyentes de los productos manipulados mediante ingeniería. Los métodos existentes para medir la viabilidad celular se basan en al menos uno de dos rasgos de las células viables: la presencia de una membrana plasmática intacta, y/o su actividad metabólica. In vitro, la muerte celular está acompañada por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Este fenómeno se puede observar fácilmente en un microscopio usando colorantes vitales. En el ensayo de colorante vital más habitual, el colorante azul de tripán se añade a una suspensión de células. El colorante es excluido de células viables con una membrana intacta, pero tiñe a células muertas o que están muriendo con una membrana destruida. Como alternativa, la viabilidad celular se puede evaluar midiendo uno o más marcadores de la actividad metabólica de las células. Uno de tales enfoques es cuantificar metabolitos clave (por ejemplo, ATP, NADH), que están presentes en células viables pero agotados o ausentes en células muertas. Un enfoque complementario es evaluar las actividades enzimáticas específicas liberadas a partir de células con membrana comprometida. Por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad Cytox-Fluor (Promega, Madison, WI, nº de Cat. G9260) detecta proteasas, tales como tripeptidil peptidasa, liberadas de células muertas usando el sustrato peptídico fluorogénico internamente extinguido bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110.

Cuando se aplica a productos manipulados mediante ingeniería genética de tejidos, la mayoría de los ensayos de viabilidad celular existentes requieren que las células se aislen (recuperen) antes del ensayo. El procedimiento de aislamiento, sin embargo, es a menudo complicado, algunas veces duro, y nunca 100% eficiente. Durante el procedimiento, pueden surgir artefactos de medida a medida que se pierden o mueren células viables, o a medida que se pierden células muertas. Por ejemplo, cuando se evalúan mediante exclusión con azul de tripán, las células recuperadas siempre tienen una viabilidad próxima al 100%, que fracasa al reflejar la viabilidad verdadera de la muestra original a partir de las que se obtuvieron. Los intentos para usar ensayos de viabilidad a base de la actividad metabólica sin recuperar primeramente las células son igualmente un fracaso debido a la interferencia de la matriz, a la unión no específica, al límite superior bajo de detección, al intervalo inadecuado, o a la mala precisión en diferentes tipos de medios. Además, los ensayos de viabilidad celular a base de la actividad metabólica existentes comparten todos ellos una desventaja fundamental, es decir, el requisito de un control positivo y/o negativo, con un número y viabilidad celulares conocidos, a fin de medir la viabilidad de la muestra de ensayo. Para obtener una comparación válida, las células usadas en el control y en las muestras de ensayo tienen que tener el mismo tipo de células procedentes del mismo donante o cepa, y también deben tener el mismo perfil metabólico. Este enfoque no es aplicable a productos de manipulación de tejidos mediante ingeniería, en los que las células, sembradas en matrices tridimensionales, requieren a menudo un perfil metabólico muy diferente de las mismas células que se hacen crecer en suspensión o sobre una superficie bidimensional. Adicionalmente, a menudo no es práctico obtener células extra y preparar controles apropiados en la práctica de la fabricación industrial en la que se evalúa a diario para determinar la viabilidad y el control de calidad un gran número de lotes.

La viabilidad de las células que se transplantan sigue siendo un determinante importante en el tratamiento exitoso con productos manipulados mediante ingeniería de tejidos. Promega Corporation: "Technical Bulletin TB350: "CytoTox-Fluoro™ Cytotoxicity Assay" Promega Technical Bulletins, no. TB350, junio 2006, páginas 1-12, Madison WI, USA, describe un ensayo que mide el número relativo de células muertas en poblaciones celulares. A la luz de las limitaciones de los ensayos de viabilidad existentes, existe la necesidad de métodos fáciles, rápidos y exactos para medir la viabilidad de células en productos manipulados mediante ingeniería de tejidos. Tales métodos deben operar a lo largo de un amplio intervalo de densidades celulares, y con muchos tipos diferentes de células, medios y matrices. Además, tales métodos de viabilidad celular funcionan ventajosamente sin la necesidad de una población de células de control.

La presente invención proporciona métodos para medir fácil, rápida y exactamente la viabilidad de células en una variedad de condiciones y sin la necesidad de células de control. Los métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que la viabilidad de células en un producto de ingeniería tisular cultivado se puede determinar detectando la fracción de una o más actividades enzimáticas de las células cultivadas que están presentes en el sobrenadante del cultivo.

Se teoriza, pero sin depender de ello para los fines de la invención, que con la pérdida de la integridad de la membrana que acompaña a la muerte celular, los contenidos de la célula normalmente unidos por la membrana plasmática se hacen detectables en el sobrenadante del cultivo celular. Los métodos de la invención se basan en la detección de una proteína o enzima estable a la muerte celular, es decir, una proteína o enzima que se puede detectar tanto si está presente en células vivas o muertas. La viabilidad celular del cultivo se puede determinar entonces detectando la cantidad relativa de la proteína o enzima estable a la muerte celular en el medio acondicionado que no contiene células (por ejemplo sobrenadante, o matriz o armazón de soporte) y el medio acondicionado que contiene células (por ejemplo, las células de membrana intacta y el medio acondicionado asociado). La cantidad de proteína o enzima estable a la muerte celular en solamente las células del medio acondicionado que contiene células se puede determinar interrumpiendo la integridad de la membrana de células con membrana intacta, por ejemplo mediante lisis parcial o completa, midiendo la actividad enzimática total en la porción que contiene las células (es decir, células destruidas y medio acondicionado asociado), y restando entonces cualquier actividad enzimática contribuida por el medio acondicionado asociado. El valor que se resta se mide ensayando el medio acondicionado libre de células.

Un aspecto de la invención proporciona métodos para medir la fracción de células viables en una población celular mantenida en un medio de cultivo detectando la actividad de una proteína o enzima estable a la muerte celular en una porción del medio acondicionado que no contiene células (por ejemplo, medio acondicionado), detectando una actividad de una proteína o enzima estable a la muerte celular en una porción del medio que contiene células (por ejemplo, células y medio acondicionado), y comparando el nivel de actividad de una proteína o enzima estable a la muerte celular en las dos porciones. Mediante este método, la fracción de células viables en la población es proporcional a la diferencia entre el nivel de actividad de una proteína o enzima estable a la muerte celular en la porción que contiene células y aquel de la porción que no contiene células.

En algunas realizaciones, las células evaluadas se pueden hacer crecer en un sustrato de cultivo celular bidimensional tradicional, por ejemplo vidrio o plástico de cultivo tisular. En otras realizaciones, las células se soportan sobre o en un armazón tridimensional o matriz, es decir, las células son parte de un producto de ingeniería tisular. En ciertas realizaciones, las células se hacen crecer sobre una matriz derivada de colágeno porcino.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención incluyen además una etapa de proporcionar una porción de muestra de la población celular y una cantidad proporcional del medio acondicionado de cultivo que no contiene células. La porción demuestras se divide entonces en una fracción que contiene células (es decir, células más medio acondicionado) y una fracción que no contiene células (medio acondicionado solamente), y se procesa según los métodos de la invención.

En ciertas realizaciones, la integridad de la membrana de las células de la porción de muestra se destruye, por ejemplo, mediante cizallamiento, ultrasonidos, presión barométrica baja, temperatura elevada, baja temperatura, lisis química o enzimática, o agentes de desacoplamiento de la membrana. En algunas realizaciones, la integridad de la membrana se puede destruir mediante la adición de una molécula anfifílica. En ciertas realizaciones, el anfifilo es saponina.

Otros aspectos de la invención proporcionan métodos para medir la fracción de condrocitos humanos viables presentes en la matriz de un producto manipulado mediante ingeniería genética de tejidos que tiene una densidad celular entre $1,5 \times 10^4$ y 6×10^6 células/cm² mantenidos en un medio de cultivo. Las etapas incluyen proporcionar una porción del producto de ingeniería tisular que contiene células y una cantidad proporcional del medio acondicionado de cultivo, proporcionar una porción del medio acondicionado de cultivo que no contiene células del producto de ingeniería tisular, añadir saponina y bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 a las porciones, y detectar las señales fluorescentes de bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 escindido en las dos porciones. En algunas realizaciones, Ala-Ala-Phe-AMC, u otro sustrato con un grupo saliente conjugado, puede sustituir a bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 en estos métodos. La fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular es proporcional a la diferencia en la intensidad de la señal fluorescente entre las porciones que contienen células y que no contienen células, dividida entre la cantidad total de la señal fluorescente en ambas porciones.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar la citotoxicidad de un tratamiento de ensayo (por ejemplo, tratamiento con compuestos farmacológicos o biológicos; o exposición a diversas condiciones, por ejemplo de osmolaridad, pH, temperatura, o presión barométrica; o tratamientos fóticos, eléctricos o mecánicos; o combinaciones de estos) a una población de ensayo de células cultivadas. El método supone aplicar el tratamiento de ensayo a la población de ensayo, medir la fracción de células viables en la población de ensayo mediante los métodos de la invención, y comparar la viabilidad medida de la población de ensayo con la viabilidad de una población no tratada ("población de control") de las células cultivadas.

Los métodos de la invención se pueden usar con una variedad de células en una variedad de condiciones. En algunas realizaciones, las células pueden ser de mamífero (por ejemplo, humanas, de primate, ovina, bovina, porcina, equina, felina, canina, o de roedor). En ciertas realizaciones, las células son humanas. En los métodos de la invención se pueden usar células derivadas de cualquier tejido fuente. En realizaciones particulares, las células son condrocitos.

Los métodos de la invención se pueden usar con células en un amplio intervalo de densidades. En algunas realizaciones, las células están presentes a una densidad de entre $1,5 \times 10^4$ y 6×10^6 células/cm². En otras realizaciones, las células pueden estar presentes a una densidad de entre $2,2 \times 10^4$ y $2,8 \times 10^6$ células/cm², entre $3,5 \times 10^4$ y $2,8 \times 10^6$, o entre 5×10^4 y 1×10^6 células/cm². En ciertas realizaciones, las células pueden estar presentes a una densidad elevada de al menos $2,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$, 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 células/cm², o incluso densidades mayores.

En algunas realizaciones de la invención, la actividad de la enzima estable a la muerte celular se mide poniendo en contacto una porción de muestra con un sustrato de la actividad de la enzima estable a la muerte celular, en el que el sustrato está conjugado a un grupo saliente detectable, y detectando entonces el grupo saliente. Mediante este método, la cantidad de grupo saliente detectado es proporcional al nivel de actividad de la enzima estable a la muerte celular presente en la porción de muestra. En diversas realizaciones, el grupo saliente puede ser cromogénico, luminogénico, o fluorogénico. En realizaciones particulares, el grupo saliente es fluorescente. En ciertas realizaciones, el grupo saliente es rodamina-110. En otras realizaciones, el grupo saliente es un derivado de cumarina, por ejemplo 7-amino-4-metilcumarina (AMC).

Un sustrato para una actividad enzimática puede ser cualquier molécula procesable por la enzima. En ciertas realizaciones, el sustrato es un tripéptido. En algunas realizaciones, el sustrato es bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110. En otras realizaciones, el sustrato es Ala-Ala-Phe-AMC.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir además la etapa de añadir un agente que modula (por ejemplo, potencia/incrementa, o atenúa/disminuye) la señal de un grupo saliente. En algunas realizaciones, el agente puede modular la señal en al menos 5, 10, 15, 20, 40, 60, u 80%; o más de 1, 2, 3, 5, 10, 50, o 100 veces. En ciertas realizaciones, el agente que modula la señal del grupo saliente actúa atenuando la señal del grupo saliente. En realizaciones particulares, el agente que atenúa la señal del grupo saliente es rojo de fenol. En algunas realizaciones, el rojo de fenol puede estar presente a una concentración de hasta 10, 20, 40, 60, 70, 100, 150, 200 mg/l, o más.

En diversas realizaciones de la invención, la actividad de la enzima estable a la muerte celular detectada puede ser, por ejemplo, anabólica o catabólica, una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, cinasa, fosfatasa, isomerasa, o ligasa. En algunas realizaciones la actividad de la enzima estable a la muerte celular puede ser proteolítica, por ejemplo una o más tripeptidil peptidasas, quimi tripsina, o enzimas semejantes a quimi tripsina, tales como calpaína.

En algunas realizaciones, la actividad de la proteína o enzima estable a la muerte celular es una actividad de proteína o enzima que es estable tras la muerte necrótica, la muerte celular programada, o ambas (y preferiblemente estable tras cualquiera de las formas de muerte celular). En otras realizaciones, la actividad de la proteína o enzima estable a la muerte celular es una actividad de proteína o enzima necróticamente estable. En todavía otras realizaciones, la actividad de la proteína o enzima estable a la muerte celular es una actividad de proteína o enzima estable a la muerte celular programada.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir un ensayo de control de calidad. En tales realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir además la etapa de detectar una actividad enzimática específica del contaminante ya sea en la porción que contiene células o en la porción que no contiene células, o en ambas. La detección de una actividad enzimática específica del contaminante es indicativa de contaminación del cultivo.

Los dibujos que se acompañan, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de un ensayo de viabilidad celular.

La Figura 2A es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la actividad enzimática presente en las células y en el sobrenadante de una muestra está relacionada linealmente con la densidad de la población celular.

La Figura 2B es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la actividad enzimática presente en el sobrenadante de una muestra está relacionada linealmente con la densidad de la población celular.

La Figura 3 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que el ensayo descrito predice de forma exacta la viabilidad.

La Figura 4 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la adición de rojo de fenol no afecta a la exactitud del ensayo descrito.

La Figura 5 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la exactitud del ensayo descrito no se ve afectada por el uso de una matriz alternativa.

La Figura 6 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la exactitud del ensayo descrito no se ve afectada por la ausencia de una matriz.

5 La Figura 7 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que la exactitud del ensayo descrito no se ve afectada por el uso de células no humanas.

La Figura 8 es una representación gráfica de un experimento que demuestra que el ensayo descrito puede usar sustratos con grupos salientes distintos de rodamina.

Definiciones

10 Las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia en plural, excepto que el contexto dicte claramente otra cosa.

Excepto que se indique de otro modo, la expresión “alrededor de” significa $\pm 10\%$.

“Área superficial”, como se usa aquí, por ejemplo área cuadrada, cm^2 , se refiere al área superficial macroscópica de un sustrato, es decir, la proyección del eje Z de la superficie sobre el plano bidimensional.

15 “Densidad”, como se usa aquí, significa un número medio de alguna sustancia, por ejemplo una célula u otro objeto, por unidad de área o volumen. Más frecuentemente en esta solicitud, la densidad estará en el contexto de una densidad celular: el número de células por unidad de área superficial. Esta cantidad media se aproxima dividiendo el número de células sembradas entre el área superficial macroscópica de la superficie sobre la que se hacen crecer. Esta definición contempla tanto superficies bidimensionales como estructuras o redes cristalinas tridimensionales.

20 El término “medio”, como se usa en esta solicitud, se refiere a todos los componentes que apoyan el crecimiento o mantenimiento de células en el cultivo. Esto puede incluir medio de cultivo celular líquido tradicional, y cualesquiera factores adicionales que dicho medio puede contener. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, suero, antibióticos, factores de crecimiento, agentes farmacológicos, tampones, indicadores del pH, y similares. El medio no se referirá generalmente a ninguna matriz o soporte sobre o en el que las células se mantienen o se hacen crecer, excepto que se indique claramente de otro modo. En consecuencia, en un producto de ingeniería tisular, la matriz es típicamente parte de la porción que contiene células.

En consecuencia, “una porción del medio de cultivo celular que no contiene células” incluye una porción líquida del medio, y no ninguna matriz que contiene células. De forma similar, “una porción del medio de cultivo celular que contiene células” incluye células aisladas o células asociadas a la matriz, en asociación con medio.

30 Por “medio acondicionado” se quiere decir medio que se ha puesto en contacto con las células para permitir que la composición del medio se modifique, por ejemplo mediante la captación o liberación de uno o más metabolitos, nutrientes, o factores, por ejemplo una o más actividades de proteínas o enzimas estables a la muerte celular. Excepto que se indique de otro modo, medio acondicionado significa generalmente medio que se ha puesto en contacto con una población celular para recoger actividad de proteína o enzima estable a la muerte celular a partir de células con la integridad de la membrana comprometida.

Como se usa en esta solicitud, “grupo saliente detectable” se refiere a un producto de una reacción enzimática que se puede usar para monitorizar el progreso de una reacción enzimática.

Por “proteoma” se quiere decir el conjunto de todas las proteínas expresadas en un grupo de células.

40 “Recombinante” se refiere aquí a moléculas biológicas no nativas, por ejemplo ácidos nucleicos, a sus productos transcripcionales o traduccionales, o a células que contienen cualesquiera de los anteriores.

Por “actividad intrínseca” se una enzima se quiere decir su V_{max} , es decir, la velocidad de producción de producto cuando solamente la capacidad de la enzima para procesar sustrato es limitante; las condiciones de reacción se optimizan de otro modo para la actividad enzimática.

45 “Membrana intacta”, como se usa en esta solicitud, significa la capacidad para excluir el colorante azul de tripán en condiciones de laboratorio estándar.

Por “factor de aumento de escala” se quiere decir una constante numérica determinada para una condición particular de ensayo.

“Medida relativa” se refiere en esta solicitud a expresar una cantidad en función de un valor de referencia, por ejemplo expresar un valor como una fracción de otro.

50 “Medida absoluta” significa en esta solicitud el valor numérico real de alguna cantidad, es decir, no una medida

relativa.

Realizaciones ejemplares

5 La invención proporciona métodos para calcular la viabilidad basándose en la medida relativa de una actividad de proteína o enzima estable a la muerte celular en dos fracciones de una muestra. A diferencia de los ensayos con colorantes vitales, no es necesario recuperar las células de la matriz. En consecuencia, los métodos de la invención pueden eliminar los artefactos de medida asociados con métodos previos, por ejemplo pérdida de células durante el procedimiento, subestimación o sobreestimación de la viabilidad.

Determinación de la viabilidad celular

10 La invención proporciona métodos para medir la fracción de células viables en una población mantenida en un medio de cultivo. Esto se hace comparando la cantidad de una actividad enzimática estable a la muerte celular en una porción del medio acondicionado que no contiene células con la cantidad de la proteína o enzima estable a la muerte celular en una porción del medio acondicionado que contiene células. En general, los métodos de la invención comprenden tres etapas:

- 15 (1) una muestra se divide en dos porciones, una porción que contiene células ("X") y una porción que no contiene células ("Y");
- (2) las células de la porción que contiene células (o una muestra tomada de la porción que contiene células) se lisan; y
- 20 (3) se detecta o se mide la cantidad de la proteína o enzima estable a la muerte celular en cada porción ("X" e "Y"). El experto puede convertir de muchas maneras estas medidas en la fracción de células viables en la población celular.

25 En un ejemplo, el medio acondicionado se divide en primer lugar por igual en dos porciones (es decir, mitades), una porción que contiene células ("X") y una porción que no contiene células ("Y"). Como se muestra en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1, cuando la porción que contiene células ("Y") tiene la mitad del medio acondicionado de la muestra, y la mitad restante está en la porción que no contiene células ("X"), entonces la viabilidad fraccional es simplemente la diferencia dividida entre la suma de las actividades, es decir,

$$\frac{X - Y}{X + Y} = \frac{\text{actividad de células vivas}}{\text{actividad total}}$$

30 El numerador de esta expresión es la actividad enzimática presente en las células con membranas intactas (la cantidad en la porción que contiene células, es decir, células y medio acondicionado menos la cantidad presente en el medio acondicionado solo), mientras que el denominador es la cantidad total de actividad enzimática presente en la muestra. Si la actividad enzimática medida presente en la porción que contiene células y en la porción que no contiene células de la muestra es 500 y 50, entonces la viabilidad fraccional es

$$\frac{500 - 50}{500 + 50} = \frac{450}{550} \approx 0,82.$$

35 Por supuesto, en la primera etapa de los métodos de la invención, el medio acondicionado en la muestra no necesita dividirse por igual entre la porción que contiene células y la porción que no contiene células. Cuando la fracción del medio acondicionado total en la muestra no se divide por igual entre las dos porciones, la viabilidad fraccional se da entonces mediante

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

en la que

$$c = \frac{1 - f}{f}.$$

40 En la primera expresión, c es un factor de escala que ajusta el volumen de medio acondicionado en la porción libre de células ensayada, con respecto al volumen de medio acondicionado en la porción que contiene células ensayada. Este factor de escala es una función de la fracción decimal no nula f del medio acondicionado de la muestra total presente en la porción Y, la porción de muestra que no contiene células. En un ejemplo ilustrativo, una muestra de un producto de ingeniería tisular se divide en:

- 45 (1) una porción X, que contiene las células y 25% del medio acondicionado de la muestra; y

(2) una porción Y, que no contiene células, que contiene 75% del medio acondicionado de la muestra.

Aquí, c es

$$\frac{1-0,75}{0,75} = \frac{0,25}{0,75} = \frac{1}{3}$$

Si la actividad enzimática medida es 400 y 30 para X e Y, entonces

5

$$\text{viabilidad} = \frac{400 - \frac{1}{3} \cdot 30}{400 + 30} = \frac{390}{430} \approx 0,91.$$

La discusión anterior incluye medios detallados para calcular la viabilidad usando métodos proporcionados por la invención. Esto puede estar en el contexto de un cultivo que se hace crecer solamente para ensayo, o con el fin de estimar la viabilidad de cierta población más grande. Por ejemplo, en un ensayo de “liberación de lote” para un producto de ingeniería tisular, la viabilidad de las células constituyentes del producto se determina tomando una muestra del producto (es decir, una biopsia), y algo del medio acondicionado que se encuentra encima. En su forma más simple, el porcentaje del medio acondicionado total que se encuentra encima del producto y el porcentaje del área superficial o volumen total del producto (y por lo tanto células) biopsiado son iguales. Por ejemplo, si una biopsia incluye alrededor de 2% de las células del producto, también debería estar presente en la muestra alrededor de 2% del volumen de medio acondicionado que se encuentra encima del producto. El muestreo se puede realizar tomando las células y el medio acondicionado juntos, o en serie (en cualquier orden), o alguna combinación de las dos técnicas (por ejemplo, tomando células y algo de medio acondicionado, después eliminando medio acondicionado adicional), usando cualquier número de etapas contempladas por el experto. Las ecuaciones anteriores suponen implícitamente esta relación 1:1 de porcentaje de células a porcentaje de volumen en la muestra.

El experto apreciará que la relación de muestreo 1:1 de célula a volumen se puede variar, y que tipos celulares, productos, o condiciones de cultivo particulares pueden ser susceptibles de, o incluso requerir, relaciones alteradas de células y medio acondicionado en una muestra. Como sería manifiesto para el experto, las modificaciones particulares a los cálculos presentados anteriormente deberían emplearse dependiendo de la estrategia de muestreo usada. Por ejemplo, la relación de porcentaje de volumen de medio acondicionado a porcentaje de células en una muestra se desvía de 1, entonces la viabilidad de la muestra se puede dar mediante

25

$$\text{viabilidad} = \frac{X - Y}{X + Y + 2Y(\alpha - 1)} = \frac{\text{actividad de células vivas}}{\text{actividad total corregida}}$$

en la que α = la relación de porcentaje de las células totales a porcentaje del volumen de medio acondicionado total en la muestra. De este modo, si una muestra incluye 2% de las células totales y 4% del volumen total de medio acondicionado (es decir, la relación del porcentaje de células totales a porcentaje de medio acondicionado es menor que 1), y la actividad en las porciones “X” e “Y” de la muestra son 1000 y 200, respectivamente, entonces

30

$$\text{viabilidad} = \frac{1000 - 200}{1000 + 200 + 2 \times 200 \left(\frac{1}{2} - 1 \right)} = 0,8$$

Como alternativa, la relación de porcentaje de células a porcentaje de volumen de medio acondicionado en una muestra puede ser mayor que 1. De este modo, si una muestra incluye 5% de las células totales y 1% del medio acondicionado total, y la actividad en las porciones “X” e “Y” de la muestra son 820 y 20, respectivamente, entonces

$$\text{viabilidad} = \frac{820 - 20}{820 + 20 + 2 \times 20 \times (5 - 1)} = 0,8$$

De forma importante, en estos ejemplos, la corrección sólo es necesario hacerla en los denominadores de las ecuaciones ya presentadas anteriormente. Esta ecuación revisada supone que el volumen total de medio acondicionado presente en la muestra se divide por igual entre las porciones “X” e “Y” evaluadas. Cuando el medio acondicionado no se divide por igual, se puede aplicar esta misma corrección del denominador a la ecuación, ya proporcionada, para situaciones en las que el medio acondicionado no se divide por igual entre las porciones “X” e “Y” de una muestra.

Los métodos para determinar la viabilidad celular proporcionados por la invención eliminan la necesidad de células de control. Las células de control se usan para calibrar un ensayo a base de enzimas para un medio de cultivo, matriz, o tipo celular particular. Esto es debido, en parte, a que los ensayos existentes realizan medidas absolutas de la actividad enzimática o proteica. Las medidas absolutas de la proteína o actividad enzimática pueden estar

afectadas por la presencia o ausencia de, por ejemplo, suero, suplementos, vitaminas, rojo de fenol, o matriz/sustrato. Además, las medidas absolutas de la proteína o actividad enzimática pueden verse afectadas por variabilidades intrínsecas de donante a donante, cepa a cepa, y pasada celular a pasada celular.

- 5 Adicionalmente, los métodos existentes a menudo se saturan incluso en el extremo bajo de densidades usadas en aplicaciones tales como ingeniería tisular. Los métodos proporcionados por la invención son útiles para medir la viabilidad en aplicaciones con densidad celular elevada, tales como ingeniería tisular.

Proteína y actividades enzimáticas estables a la muerte celular, condiciones del ensayo, y destrucción de la célula

- 10 Una proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular es aquella que persiste a niveles detectables a lo largo de la muerte celular que se produce por diversos mecanismos, por ejemplo muerte celular programada (un proceso que requiere energía) o necrosis (un proceso que no requiere energía). Debido a que los diversos procesos de muerte celular afectan a diferentes proteínas en diversos grados, una proteína estable a la muerte celular puede ser estable a la muerte celular programada, estable necróticamente, o ambas. Para un resumen de muerte celular, véanse, por ejemplo, Guimaraes y Linden, Eur. J. Biochem., 271:1638-1650 (2004), y Hengartner, Nature, 407:770-6 (2000).

- 15 En algunas realizaciones, la concentración relativa de proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular no se ve afectada, o cambia no más de 5, 10, 15, 20, 40, 60, u 80%, o no más de 1, 2 ó 3 veces en células que han sufrido un proceso de muerte celular, con respecto a células que no han sufrido el proceso de muerte celular. En ciertas realizaciones, la semivida de una proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular puede ser
20 alrededor de 30, 60, 90, ó 120 minutos; alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, ó 12 horas; o hasta alrededor de 1, 2, 3, 4 días, o más.

- El experto apreciará que las proteínas o actividades enzimáticas que pueden ser adecuadas para la presente invención se pueden identificar por diversos medios. Por ejemplo, se puede usar el análisis del perfil de expresión
25 génica de células que sufren un proceso de muerte celular, con respecto a aquel de células que no sufren un proceso de muerte celular, para identificar genes cuyos productos proteicos son proteínas o actividades enzimáticas estables a la muerte celular. Tales genes se pueden expresar diferencialmente no más de 5, 10, 15, 20, 40, 60, u 80%, o no más de 1, 2 ó 3 veces en células que sufren un proceso de muerte celular, con respecto a células que no sufren un proceso de muerte celular. El experto reconocerá que los genes identificados de esta manera deben ser evaluados posteriormente para determinar la estabilidad del producto proteico o actividad enzimática en diferentes procesos de muerte celular.

- 30 Las proteínas o actividades enzimáticas estables a la muerte celular deben confinarse en la periferia de la célula, por ejemplo en o dentro de la membrana plasmática, en el citosol, o dentro de un orgánulo unido a la membrana. Las moléculas diana no deberían segregar proteínas, debido a que el origen de tal proteína o actividad enzimática, es decir, si proceden de células viables o no viables, no se puede determinar fácilmente. La proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular, si está confinada dentro de la membrana plasmática, debe hacerse
35 ensayable al perder la integridad de la membrana.

- La integridad de la membrana de las células en la población celular se puede interrumpir mediante una variedad de medios conocidos por el experto. Tales medios deberían preservar toda o la mayoría de la proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular. Por ejemplo, la integridad de la membrana celular se puede interrumpir mediante
40 cizallamiento, ultrasonidos, vacío, temperatura elevada, temperatura baja (por ejemplo, congelación), lisis química o enzimática, o agentes de desacoplamiento de la membrana. La lisis química se puede lograr mediante incubación con moléculas anfífilas tales como jabones, detergentes, o ciertos glucósidos (por ejemplo, saponina). La cantidad de agente de lisis química se puede ajustar para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, se puede usar saponina a una concentración final de entre 0,01% y 2% (p/v), por ejemplo entre 0,05% y 0,5%.

- La proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular puede ser un componente de origen natural del proteoma de la población de células, o un componente que no es de origen natural, por ejemplo una proteína o
45 proteínas o actividad enzimática recombinantes expresadas. Tales moléculas recombinantes se pueden introducir por métodos habituales conocidos en la técnica, y se pueden expresar de forma estable o transitoriamente, es decir, se pueden integrar en el genoma, o pueden estar basadas en plásmidos. Véase, por ejemplo, Joseph Sambrook y David Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª edición (2001).

- 50 Se entenderá que más de una enzima puede ser responsable de una actividad enzimática estable a la muerte celular. Por ejemplo, un grupo de enzimas relacionadas puede compartir un sustrato. En algunas realizaciones, una actividad enzimática está catalizada por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, o más, enzimas diferentes.

Métodos de detección

- 55 Una proteína estable a la muerte celular se puede detectar mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo transferencia Western, ELISA, espectrometría de masas, cromatografía, o inmunohistoquímica. Como alternativa, una proteína estable a la muerte celular se puede detectar mediante una actividad enzimática característica estable a la muerte celular. Esto es, una proteína se puede detectar indirectamente mediante su

función, por ejemplo una reacción que cataliza. La destrucción de la integridad de la membrana permite la detección de la actividad enzimática previamente inaccesible a moléculas en el medio extracelular, por ejemplo, mediante difusión de la enzima hacia fuera de la célula, entrada de un sustrato al interior de la célula, o ambas.

5 El experto reconocerá que se pueden identificar combinaciones de sustratos y grupos salientes para uso en los métodos de la invención, sin conocer necesariamente la enzima o enzimas responsables de catalizar la liberación del grupo saliente. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de ensayo a partir de cantidades conocidas de células viables y no viables (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1), y se pueden incubar con un sustrato candidato según los métodos de la invención. El grupo saliente se detecta entonces y se representa gráficamente la intensidad frente a la relación conocida de células viables y no viables. Los sustratos útiles serán aquellos que posean una correlación lineal con la proporción conocida de células viables y no viables. Ensayando de esta manera los sustratos, no es necesario conocer la fuente o fuentes de la actividad enzimática estable a la muerte celular.

10 Los conjugados de sustrato enzimático/grupo saliente son bien conocidos en la técnica. Una propiedad útil de tales compuestos es la extinción interna del grupo saliente detectable. Esto es, el grupo saliente no es detectable en absoluto, o sólo de forma pobre, cuando se conjuga a un sustrato enzimático, pero se hace rápidamente detectable con la disociación del sustrato, por ejemplo tras el procesamiento enzimático del sustrato enzimático. Las clases de grupos salientes que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas cromogénicas, fluorescentes, y luminiscentes.

15 Las moléculas cromogénicas para la detección de la actividad enzimática son bien conocidas en la técnica. Las sales de tetrazolio y los formazanos fueron algunos de los primeros sustratos usados para detectar la actividad enzimática (Altman, Prog. Histochem. Cytochem., 9:1-56 (1976)). Se pueden encontrar compuestos colorimétricos adicionales en, por ejemplo, la patente U.S. nº 7.026.111, en la columna 11.

20 Las moléculas luminiscentes, tales como luminol e isoluminol, se pueden conjugar a sustratos enzimáticos y se pueden usar directamente en los métodos de la invención (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 4.748.116). Como alternativa, los sustratos conjugados a luciferina se pueden emplear en un sistema en el que se exprese luciferasa (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 7.148.030).

25 Los métodos de la invención pueden emplear grupos salientes fluorescentes, por ejemplo colorantes de xanteno, fluoresceínas, rodaminas, moléculas a base de cumarina, y sus derivados. Las moléculas fluorescentes disponibles son bien conocidas en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 4.557.862; 4.640.893; 4.694.070; 4.801.534; 5.352.803; 6.130.101; 6.248.904; 6.342.611; 6.458.966; 6.750.357; 6.759.207; RE38.723, particularmente Tabla II, allí y las Solicitudes de Patente U.S. nºs 10/138.375, presentada el 6 de mayo de 2006 (publicada como Publicación de Patente U.S. nº 2003/0208037) y 10/621.311, presentada el 18 de julio de 2003 (publicada como Publicación de Patente U.S. nº 2005/0014160) para ejemplos de grupos salientes fluorescentes.

30 La señal producida por el grupo saliente se puede detectar por cualquier medio apropiado, por ejemplo inspección visual, un espectrofotómetro, luminómetro, o fluorómetro. En aplicaciones en las que están presentes en una muestra dos o más grupos salientes distinguibles, se pueden detectar simultánea o secuencialmente.

35 Los conjugados de sustrato-grupo saliente útiles en los métodos de la invención tendrán un grupo saliente conjugado a un sustrato de una enzima estable a la muerte celular que es, por ejemplo, un resto de hidrato de carbono, lípido, proteína, péptido, ácido nucleico, hormona o vitamina; o una combinación de uno o más de tales sustratos. Estos restos pueden ser de origen natural (por ejemplo, purificados bioquímicamente) o sintéticos (por ejemplo, sintetizados químicamente o producidos recombinantemente). Adicionalmente, estos sustratos pueden contener nada, algo, o todos los componentes no nativos (por ejemplo aminoácidos no naturales, grupos bloqueantes o protectores, etc.). En la técnica se conocen catálogos amplios de pares de enzima/sustrato (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 4.167.449 (particularmente la Tabla II), 5.871.946 (particularmente la Tabla I), y 7.026.111 (particularmente las columnas 13-18) para ejemplos de tales pares de enzima/sustrato. Adicionalmente, se pueden generar librerías de sustratos, como se describe en la patente U.S. nº 6.680.178, y se pueden cribar para identificar sustratos peptídicos útiles para uso en los métodos de la invención. En algunas realizaciones, se puede trazar el perfil de la preferencia por el sustrato de la actividad enzimática usando tecnología de presentación de fagos, como se describe en, por ejemplo, Felber et al., Biol. Chem. 386:291-98 (2005).

40 Otras moléculas útiles en los métodos de la invención incluyen conjugados del colorante fluorescente rodamina con restos peptídicos (Leytus et al., Biochem. J., 209:299-307 (1983)), que son útiles en ensayos para determinar la actividad de proteasa, por ejemplo Grant et al., J. of Biomol. Screen, 7:531-540 (2002) y Hug et al., Biochemistry, 38:13906-11 (1999). Estos reactivos se pueden integrar en ensayos múltiples, como se describe en, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. nº 10/762.836, presentada el 22 de enero de 2004 (publicada como Publicación de Patente U.S. 2005/0164321 el 28 de julio de 2005).

45 El papel central de las proteasas en el mantenimiento de la homeostasis celular y del organismo a lo largo de los filamentos es una razón para la prevalencia de sustratos peptídicos marcados como marcadores de la actividad de proteasas (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 6.037.137 y 6.984.718, que proporcionan reactivos y métodos para detectar *in situ* y en células completas la actividad de proteasas).

La actividad enzimática intrínseca varía ampliamente entre diferentes enzimas y para diferentes sustratos de una enzima particular. Los factores extrínsecos que afectan a la actividad enzimática incluyen las condiciones del medio (por ejemplo, pH, temperatura, osmolaridad, etc.), el nivel de expresión o la regulación post-traducciona

5 operario de forma apropiada. Para una enzima dada, y condiciones del medio, las concentraciones adecuadas del sustrato pueden estar en el intervalo de, por ejemplo, 0,01 ng/ml a 100 mg/ml, o 10 µg/ml a 10 mg/ml. En algunas situaciones, puede ser apropiada una concentración del sustrato de entre 0,001 mM y 10 mM. Como alternativa, la concentración del sustrato puede estar entre 0,01 mM y 0,5 mM. De forma similar, los tiempos de incubación que permiten el desarrollo de señales detectables variarán ampliamente dependiendo de estos mismos parámetros. En consecuencia, los tiempos de incubación pueden oscilar desde 30 segundos o menos, hasta 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, ó 90 minutos; o incluso 2, 4, 6, 10, ó 12 horas o más.

Un sustrato útil para la detección de la actividad proteolítica en los métodos de la invención es bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 (Promega, nº de Cat. G9260). Un sustrato adicional útil en los métodos de la invención es Ala-Ala-Phe-AMC (nº de Cat. Bachem 1-1415.0050). Se teoriza, pero no se basa en, que el tripéptido Ala-Ala-Phe es un sustrato para la enzima extralisosómica tripeptidil peptidasa II (TPP II; Balow et al., J. Biol. Chem., 261:2409-2417 (1986)) y la enzima lisosómica tripeptidil peptidasa I (TPP I; Vines y Warburton, Biochim. Biophys. Acta., 1384:233-242 (1998) y Steinfeld et al., J. Histochem. Cytochem., 54:991-996 (2006)). De forma notable, Ala-Ala-Phe es un sustrato común y específico para las subtilisinas bacterianas (Stambolieva et al., Arch. Biochem. Biophys., 294:703-6 (1992)), que son funcionalmente similares a las tripeptidil peptidasas. Sustratos adicionales de TPP I se pueden encontrar en, por ejemplo, Tian et al., J. Biol. Chem., 281:6559-72 (2006), que cribaron grandes librerías de sustratos, y en la patente U.S. nº 6.824.998, que describe sustratos (con grupos salientes precipitantes) útiles para aplicaciones histológicas.

También se sabe que Ala-Ala-Phe es un sustrato para la enzima quimi tripsina. Otros sustratos para quimi tripsina y enzimas relacionadas, tales como calpaína, son conocidos en la técnica - como lo son las correlaciones de estructura/función de tales enzimas. Éstas se discuten además en, por ejemplo, Sharma et al., Biol. Chem. (2008; agosto 8 publicación electrónica; PubMed Id (PMID) nº 18690777), Croall y Ersfeld Genome Biol. 8:218 (2007); Czapinska y Otlewski Euro. J. Biochem 260:571-95 (1999); Perona y Craik J. Biol. Chem. 272:29987-90 (1997).

Medio de cultivo celular, y matriz

La invención proporciona métodos que se pueden usar para medir la viabilidad de células cultivadas derivadas de una amplia variedad de organismos hospedantes, por ejemplo mamíferos, incluyendo seres humanos, y de una amplia variedad de tejidos fuente. Las células evaluadas pueden derivar de tejidos en diversas etapas de desarrollo. Las células pueden derivar de una fuente adulta, fetal, o embrionica. Las células pueden ser células madre totipotentes o pluripotentes, derivadas de un órgano que se origina de cualquiera de las tres capas germinales primordiales (es decir, ectodermo, mesodermo o endodermo). Por ejemplo, las células pueden derivar de la piel, corazón, músculo esquelético, músculo liso, riñón, hígado, pulmones, hueso, páncreas, tejido nervioso central, tejido nervioso periférico, tejido circulatorio, tejido linfoide, intestino, bazo, tiroide, tejido conjuntivo (por ejemplo, condrocitos), o gónada. Las células pueden ser células primarias no expandidas, células primarias expandidas en cultivo, o estirpes celulares consolidadas. Adicionalmente, las células se pueden hacer crecer en una variedad de medios, por ejemplo con o sin suero (por ejemplo, medios químicamente definidos), y con o sin rojito de fenol.

La invención proporciona métodos para medir la viabilidad de células a lo largo de un amplio intervalo de densidades celulares. Por ejemplo, las células pueden estar presentes a una densidad de entre $2,2 \times 10^4$ y $2,8 \times 10^6$ células/cm², entre $3,5 \times 10^4$ y $2,8 \times 10^6$, o entre 5×10^4 y 1×10^6 células/cm². Las células también pueden estar presentes a una densidad elevada de al menos $2,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$, 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 células/cm², o más. Los métodos proporcionados por la invención se han puesto en práctica con densidades celulares de hasta alrededor de 3×10^6 células/cm². Se contempla que los métodos podrían funcionar con densidades celulares de hasta 10^6 células/cm², o más. Se debería entender que todas las densidades celulares citadas a lo largo de esta descripción son calificadas mediante el término "media". El experto apreciará indudablemente que se producirán fluctuaciones locales en la densidad celular, y se contemplan en los métodos proporcionados por la invención.

Las células se incuban en medio para permitir la acumulación de proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular en el medio, es decir, para producir medio acondicionado. Los métodos proporcionados por la invención miden la viabilidad con respecto a la cantidad de tiempo que las células están en contacto con el medio, es decir, el medio acondicionado generalmente no se puede sustituir por medio reciente justo antes del ensayo. Las células se pueden incubar durante una cantidad variable de tiempo, dependiendo de la aplicación particular, por ejemplo tipo celular, densidad celular, tipo de medio, o semivida de la proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular. Las células se pueden incubar antes del ensayo durante alrededor de 1, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, ó 240 minutos; o alrededor de 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, ó 24 horas; o hasta alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 días, o más.

Los métodos de la invención son útiles para medir la fracción de células viables que se hacen crecer en una variedad de sustratos o matrices. Las células se pueden hacer crecer sobre sustratos de cultivo celular bidimensionales tradicionales, por ejemplo vidrio o plástico tratado en la superficie. Como alternativa, las células se

5 pueden soportar mediante un armazón o matriz, por ejemplo, en el que las células son parte de un producto de ingeniería tisular. Los armazones adecuados pueden incluir estructuras compuestas de metales, plásticos, vidrio, silicio, cerámica, y/o fosfatos de calcio. Otros materiales de armazón adecuados incluyen poliésteres absorbibles (por ejemplo, polímeros de glicolida o lactida, y sus derivados o copolímeros); hidrato de carbono (por ejemplo hialuronina, quitina, almidón, o alginato); y proteína (por ejemplo, colágeno (por ejemplo, una matriz derivada de colágeno porcino) o gelatina), o combinaciones de cualesquiera de estas matrices. Una discusión adicional de matrices usadas en ingeniería de tejidos se puede encontrar, por ejemplo, en Langer y Vacanti (1993); Ikada, J. R. Soc. Interface, 3:589-601 (2006); y en las patentes U.S. n^{os} 6.689.608 y 6.800.296.

Variaciones del ensayo

10 Se ha descubierto que el rojo de fenol puede ampliar adicionalmente el intervalo de densidades celulares ensayables mediante el método de la invención. Esto se logra atenuando la señal del grupo saliente. Esto es, el rojo de fenol reduce la señal de, por ejemplo, rodamina-110 (R110), y el ensayo se satura a una densidad celular mayor. Se teoriza, aunque no se descansa en ello, que el rojo de fenol desprotonado ejerce su efecto debido a que su espectro de absorción tiene un solapamiento significativo tanto con los espectros de excitación como de emisión de la rodamina 110.

15 Además del rojo de fenol para R110, también se contempla el uso de otros agentes atenuantes adaptados para uso con otros grupos salientes. Los agentes atenuantes apropiados para los espectros de excitación y o de emisión de grupos salientes particulares tendrán el grado deseado de solapamiento en su espectro de absorción. Los espectros de absorción, de excitación y de emisión son conocidos en la técnica, o se pueden determinar fácilmente de forma empírica, por ejemplo mediante fluorometría.

20 Adicionalmente, los métodos proporcionados por la invención son modulares y susceptibles a la multiplexación. Esto es, procedimientos, etapas y/o agentes adicionales pueden ampliar adicionalmente la utilidad del ensayo. Por ejemplo, los métodos proporcionados por la invención pueden incluir además la detección de más de una proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular. Esto se logra aplicando múltiples sustratos específicos de la enzima para dos o más actividades enzimáticas estables a la muerte celular en una porción de muestra usando, por ejemplo, sustratos y/o grupos salientes ortogonales. Tal "mezcla de detección" contiene una o más especies de sustrato para actividades enzimáticas estables a la muerte celular, acopladas a uno o más grupos salientes. Estos métodos de multiplexación se pueden dividir en dos clases amplias: una única especie de grupo saliente, y múltiples especies de grupos salientes.

30 Una mezcla de detección en la que una única especie de grupo saliente se acopla con múltiples especies de sustratos enzimáticos producirá una señal integrada. Esto es, la señal resultante es una suma de las actividades enzimáticas detectadas. Por ejemplo, cada sustrato se podría procesar mediante una actividad enzimática distinta. Evaluando y sumando las múltiples actividades enzimáticas, la señal integrada es una visión más exacta del estado metabólico global de la muestra. Las señales integradas también pueden ser útiles cuando se desean tiempos de incubación más cortos.

35 El uso de múltiples especies de grupos salientes en los métodos de la invención proporciona medidas independientes de la viabilidad. Una mezcla de detección que contiene una única especie de sustrato para una actividad enzimática acoplado a múltiples especies de grupos salientes proporciona medidas paralelas de la viabilidad. Las diferentes señales ofrecen flexibilidad adicional a los investigadores usando un equipo de detección que puede tener sensibilidades dependientes de la máquina o del detector, por ejemplo, a diferentes longitudes de onda y o intensidades.

40 El uso de múltiples especies de sustratos, cada una acoplada a una especie diferente de grupo saliente, ofrece medidas completamente independientes de viabilidad. Los sustratos pueden pertenecer, por ejemplo, a enzimas con actividades relativas bajas, medias, o elevadas. Las actividades relativas podrían variar de baja a elevada en al menos 10, 20, 40 u 80%, o en al menos 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, ó 1000 veces, o más. Realizando múltiples medidas independientes de la viabilidad, es más probable que un investigador permanezca en el intervalo de detección lineal con al menos una especie de sustrato.

45 Una aplicación adicional que usa múltiples grupos salientes es un ensayo de control de calidad. En particular, los métodos de la invención pueden incluir además la etapa de añadir uno o más sustratos específicos del contaminante, cada uno acoplado a la misma especie de grupo saliente, y detectar una o más actividades enzimáticas específicas del contaminante. La especie de sustrato específica del contaminante son sustratos para enzimas específicas de contaminantes habituales de cultivos celulares, tales como: hongos, bacterias, arqueas, y protistas - y sin proteomas de las células cultivadas. En consecuencia, la detección del grupo saliente específico del contaminante indica contaminación de la población de células cultivadas. Naturalmente, el grupo saliente para las actividades enzimáticas específicas del contaminante será distinguible del grupo o grupos salientes usados para medir la viabilidad de las células cultivadas.

Los métodos de la invención también se pueden adaptar para medir la citotoxicidad de un tratamiento. Un tratamiento puede ser un tratamiento medioambiental o fisiológico, por ejemplo estímulo térmico, barométrico,

mecánico, o fótico. El tratamiento también puede ser un tratamiento químico, por ejemplo osmolaridad, pH, un agente farmacológico o biológico, o cualquier combinación de los anteriores. Los métodos de la invención pueden incluir además las etapas de aplicar un tratamiento a una población de células de ensayo, medir la viabilidad de la población de células de ensayo mediante los métodos de la invención, y comparar la viabilidad con un cultivo de control de las mismas células no expuestas al tratamiento. En ciertas realizaciones, la citotoxicidad se puede calcular como 1 menos la viabilidad fraccional de una población. En estas realizaciones, no es necesaria una población de control.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medida de la viabilidad celular de un producto de ingeniería tisular

En la Figura 1 se muestra un breve esquema de un ensayo de viabilidad celular. Allí, "Lectura #1" es la cantidad de proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular presente en la porción de la población que contiene las células y medio acondicionado, mientras que "Lectura #2" es la cantidad de proteína o actividad enzimática estable a la muerte celular presente en la porción del medio acondicionado que no contiene células de la población de cultivo.

Se expandieron condrocitos articulares humanos hasta la segunda o tercera pasada en cultivos monocapa. A fin de copiar las condiciones de cultivo usadas en implantes MACI®, los condrocitos se sembraron por triplicado sobre placas de 96 pocillos opacas blancas en el lado rugoso de perforaciones de la matriz de membrana ACI-MAIX® (6 mm de diámetro), a densidades de aproximadamente 25.000 a 600.000 células por perforación. La matriz de membrana Matricel ACI-MAIX® es una matriz de membrana a base de colágeno porcino con un lado liso y un lado rugoso. Esta densidad de siembra es equivalente a $8,75 \times 10^4$ a $2,1 \times 10^6$ células/cm², que corresponde a $1,75 \times 10^6$ a 42×10^6 células por matriz de membrana ACI-MAIX® (20 cm²). Cuando el ensayo se aplica a muestras de implantes MACI® de tamaño completo, se toman para cada muestra dos pequeñas perforaciones (típicamente 6 mm de diámetro) y una cantidad proporcional de medio acondicionado. Para dos perforaciones de 6 mm de diámetro, que representan juntas aproximadamente 2,8% de una membrana de 20 cm², una cantidad proporcional del medio acondicionado es aproximadamente 2,8% del volumen total del medio acondicionado que se encuentra sobre la membrana de 20 cm². Tanto en el caso de escala completa como de escala reducida, se procesaron como controles perforaciones de la matriz de membrana y medio como blancos.

Tres horas después de la siembra celular, la mitad del medio acondicionado, que contendría la mitad de la cantidad total de cualesquiera proteasas liberadas por células muertas (no viables), se transfirió a pocillos vacíos.

A continuación, se añadieron a las muestras una mezcla maestra que contiene el sustrato bis-(Ala-Ala-Phe)-Rodamina-110 (bis-alanil-alanil-fenilalanilrodamina 110; n° de Cat. de Promega G9260) con saponina (disolución acuosa al 10%, Sigma, St. Louis, MO, n° de Cat. S4521) y rojo de fenol (opcional; disolución al 0,1% preparada diluyendo rojo de fenol al 0,5%, n° de Cat. de Sigma P0290, en disolución salina tamponada con fosfato (PBS)). La saponina se usó para permear las células vivas en la porción que contiene células y medio acondicionado, para hacer a las proteasas intracelulares accesibles al sustrato. La concentración final de los diversos componentes en la mezcla maestra es típicamente:

- bis-(Ala-Ala-Phe)-Rodamina-110, 0,83 mM
- saponina 1,67%
- rojo de fenol 0,167 mg/ml (opcional)

Tras la incubación (45-90 min.), la placa se leyó usando un lector de microplacas de Molecular Devices SpectraMax M5 con el software SoftMax Pro a una excitación de 485 nm - emisión de 520 nm. Los datos se procesaron entonces en Microsoft EXCEL.

En la Figura 2 se muestran los resultados de los experimentos representativos. Se muestran diagramas de puntos de la intensidad de la señal del informador fluorescente (Lectura #1, células vivas con sobrenadante, Figura 2A; y Lectura #2, sobrenadante solamente, Figura 2B), como función de la densidad de siembra celular. Los puntos de los datos son la media de tres réplicas. El tiempo de incubación con el sustrato bis-(Ala-Ala-Phe)-Rodamina-110 fue 45, 60 ó 90 minutos. La relación entre la señal y la densidad celular fue lineal, y varió poco para todos los tiempos de incubación ensayados. En medidas posteriores se usó una etapa de incubación de 60 minutos.

Ejemplo 2: Exactitud y precisión del ensayo

La exactitud del ensayo se evaluó comparando la viabilidad medida de un cultivo con un porcentaje conocido de células viables. El cultivo estaba compuesto de una mezcla de cantidades conocidas de células vivas y muertas, premezcladas y sembradas a las densidades indicadas, y procesadas después como en el Ejemplo 1. La viabilidad medida se representó gráficamente como una función del porcentaje de células viables en la mezcla de ensayo (Figura 3). Los puntos de datos representados gráficamente son la media de dos réplicas. Típicamente, la diferencia entre la viabilidad medida y la viabilidad real es menor que 15%. Para densidades de siembra celular menores que $0,175 \times 10^6$ células/cm², un tiempo de incubación más largo (al menos 90 min.) ayuda a asegurar la exactitud del

ensayo.

5 Para medir la exactitud del ensayo entre cepas, se sembraron proporciones 1:1 de células vivas y muertas de 3 cepas diferentes a una densidad de $7,0 \times 10^5$ células/cm². Aunque puede existir variabilidad intrínseca significativa en los niveles de señal absolutos de diferentes cepas celulares (Tabla 1, primera columna de datos; %CV=41,49), la variabilidad en la viabilidad medida es sustancialmente menor (Tabla 1, segunda columna de datos; %CV=7,62).

Tabla 1

	Señal Lectura #1	Viabilidad medida
Cepa #1	20724,01	58,27
Cepa #2	10029,55	51,04
Cepa #3	24999,32	51,37
Media	18584,29	53,56
Desviación estándar (SD)	7710,85	4,08
%CV=(100xSD/Media)	41,49	7,62

Ejemplo 3: Contribución de la variabilidad de la matriz, del reactivo y del analista a la precisión del ensayo

10 A fin de evaluar el efecto de diferentes analistas y diferentes lotes de matrices o reactivos sobre la precisión de la viabilidad medida, se sembraron células procedentes de un único cultivo progenitor a una densidad de $7,0 \times 10^5$ células/cm² sobre perforaciones de membrana, y se procesaron como se describe en el Ejemplo 1. Se analizaron tres variables: lote de la matriz, lote de ensayo, y analista. Cada variable se ensayó en dos grupos - teniendo cada grupo de tratamiento tres réplicas estadísticas. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Estos resultados sugieren que el ensayo es relativamente insensible a cambios en estas variables técnicas.

15

Tabla 2

	Matriz de membrana		Reactivo de ensayo		Analista	
	Lote #1	Lote #2	Lote #1	Lote #2	Analista #1	Analista #2
Experimento #1	78,6	80,7	75,8	79,3	75,9	77,0
Experimento #2	78,3	82,5	80,5	78,6	82,8	78,6
Experimento #3	77,6	81,6	76,1	80,7	78,4	73,7
Media	78,2	81,6	77,5	79,5	79,0	76,4
Desviación estándar	0,5	0,9	2,6	1,1	3,5	2,5
%CV	0,7	1,1	3,4	1,3	4,4	3,3

Ejemplo 4: Efecto de rojo de fenol

20 Durante el desarrollo de este ensayo, se encontró que la adición de rojo de fenol a la mezcla de ensayo podría atenuar la intensidad de la señal de una manera dependiente de la dosis, y extender el intervalo lineal del ensayo hasta mayores densidades celulares. Se sembraron células a densidades variables y se procesaron como en el Ejemplo 1, con o sin rojo de fenol, y la viabilidad media de tres réplicas se muestra en la Figura 4. La adición de rojo de fenol no afecta a la exactitud del ensayo; simplemente sirve para prevenir que los niveles de las señales se aproximen a la saturación al suprimir los resultados de las señales de una manera dependiente de la dosis. La cantidad de rojo de fenol se puede ajustar según sea necesario. El rojo de fenol no es necesario típicamente para
 25 densidades de siembra menores que $0,5 \times 10^6$ células/cm² de matriz de membrana.

Ejemplo 5: Cadencia de la adición de rojo de fenol

30 Se encontró que la cadencia de la adición de rojo de fenol a la mezcla de ensayo era flexible. Para demostrar esto, células procedentes de una única cepa se sometieron a ultrasonidos para liberar todas las proteasas intracelulares y se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^4$ células/cm² en una placa de 96 pocillos, en un volumen de 100 µl/pocillo. Se añadieron los sustratos y el rojo de fenol en la cantidad y en el momento según la Tabla 3. Los resultados se muestran como la intensidad de señal media de tres réplicas por tratamiento, en la Tabla 4. Estos resultados demuestran que el rojo de fenol de concentraciones variables añadido a puntos de tiempo variables durante el ensayo es igualmente eficaz atenuando las señales.

El uso de rojo de fenol amplió significativamente el intervalo dinámico del nuevo ensayo para medir la viabilidad cuando se usa: una densidad de siembra celular elevada (típicamente alrededor de $1,4 \times 10^6$ células/cm²), o en una variedad de medios, incluyendo los que contienen suero o los que están libres de suero, y los que contienen rojo de fenol o los que están libres de rojo de fenol.

5

Tabla 3

Grupo	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo = 0 min. (cuando empezó), añádase rojo de fenol adicional para la 1ª ronda:		2 ul de 0,05% de rojo de fenol por pocillo	2 ul de 0,1% de rojo de fenol por pocillo				
Tiempo = 30 min.: añádase sustrato							
Tiempo = 90 min.: añádase rojo de fenol adicional para la 2ª ronda: (60 min después de añadir sustrato)				2ul de 0,05% de rojo de fenol por pocillo	2ul de 0,1% de rojo de fenol por pocillo		
Tiempo = 210 min.: añádase rojo de fenol adicional para la 3ª ronda: (180 min después de añadir sustrato)						2ul de 0,05% de rojo de fenol por pocillo	2ul de 0,1% de rojo de fenol por pocillo

Tabla 4

Grupo n Señales (RFU) a	1 (sin rojo de fenol adicional)	2	3	4	5	6	7
Tiempo = 60 min. (60 min. después de la ronda 1 rojo de fenol adicional y 30 min después de la adición de sustrato)	336,51	155,07	104,64	264,06	288,91	310,23	326,48
Tiempo = 90 min. (Justo antes de la ronda 2 rojo de fenol adicional)	868,22	408,44	258,21	721,74	774,08	829,01	866,34
Tiempo = 90 min. (Justo después de la ronda 2 rojo de fenol adicional)	871,22	403,59	251,84	426,17	275,25	841,60	886,71
Tiempo = 210 min. (Justo antes de la ronda 3 rojo de fenol adicional)	3921,60	1861,36	1170,77	1917,11	1131,79	4039,14	4282,18
Tiempo = 210 min. (Justo después de la ronda 2 rojo de fenol adicional)	3550,22	1736,73	1084,51	1777,20	1038,75	1981,21	1313,56
Tiempo = 270 minutos	5513,00	2522,19	1611,28	2583,72	1561,83	2642,22	1715,75
Tiempo = 12 horas	17777,36	9809,42	6125,19	10058,85	5868,30	9722,61	5782,98

Ejemplo 6: Células que se hacen crecer sobre una matriz alternativa

5 Para demostrar el efecto de un material de matriz diferente sobre el método, se sembraron células sobre Gelfoam (Upjohn Pharmacia, Kalamazoo, MI), una esponja de gelatina muy porosa, a densidades que oscilan de $7,1 \times 10^4$ a $2,3 \times 10^6$ células/cm². Las células se procesaron como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 5 como la viabilidad media de tres réplicas. La viabilidad de las células, según se determina mediante exclusión de azul de tripán justo antes de la siembra, fue 91%. Estos datos indican que el ensayo es susceptible de analizar células sembradas sobre una variedad de diferentes matrices.

Ejemplo 7: Células que se hacen crecer sobre cultivos bidimensionales (plástico de cultivo tisular).

10 Para demostrar la eficacia del ensayo en un entorno de cultivo tisular más tradicional (es decir, crecimiento sobre un sustrato plano, inorgánico), las células se sembraron directamente en una placa de tejido tisular de seis pocillos plástica, sin matriz, a densidades que oscilan de $2,2 \times 10^4$ a $2,8 \times 10^6$ células/cm². Las células se procesaron como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 6 como la viabilidad media de dos réplicas. La viabilidad de las células, según se determina mediante exclusión de azul de tripán justo antes de la siembra, fue 96%. Estos resultados demuestran que el ensayo se comporta bien con células que se hacen crecer sobre un sustrato de cultivo celular tradicional, además de células que se hacen crecer sobre una variedad de matrices.

15 Ejemplo 8: Células no humanas

20 Para demostrar la eficacia del ensayo sobre células no humanas, se sembraron condrocitos de conejo, procedentes de dos donantes, sobre perforaciones de matriz de membrana ACI-MAIX® (6 mm de diámetro) a densidades que oscilan de $0,175$ a $1,4 \times 10^6$ células/cm². Las células se procesaron como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 7 como la viabilidad media de dos réplicas. La viabilidad de las cepas 1 y 2, según se determina mediante exclusión de azul de tripán justo antes de la siembra, fueron 88,0% y 84,9%, respectivamente. Estos resultados demuestran que el ensayo se comporta bien con células procedentes de una fuente no humana.

Ejemplo 9: Sustrato alternativo

25 Para demostrar la eficacia del método usando sustratos distintos de bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110, se ensayó un sustrato alternativo, (Ala-Ala-Phe)-AMC (nº de Catálogo Bachem 1-1415.0050, Torrance, CA), usando tres cepas de condrocito humano sembradas a densidades en el intervalo de $8,75 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^6$ células/cm². Las células se procesaron como en el Ejemplo 1, excepto que bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 se sustituyó por (Ala-Ala-Phe)-AMC, y la placa de las muestras se leyó a una excitación de 360 nm - emisión de 440 nm. Las viabilidades para la cepa A, B y C, determinadas mediante exclusión de azul de tripán antes de la siembra, fueron 98,6%, 98,6%, y 99,2%, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 8 como la viabilidad media de dos réplicas. El resultado demostró que el sustrato alternativo (Ala-Ala-Phe)-AMC fue eficaz (Figura 8).

30

Otras realizaciones de la invención serán manifiestas para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y práctica de la invención descrita aquí. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos sean considerados solamente como ejemplares.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la fracción de células viables en una población celular mantenida en un medio de cultivo celular, comprendiendo el método:

- 5 (a) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en una porción de un medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células de la población celular;
- (b) destruir la integridad de la membrana de las células en una porción del medio de cultivo celular que contiene células de la población;
- (c) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en las células y medio acondicionado de dicha porción del medio de cultivo celular que contiene células de la población celular; y
- 10 (d) comparar el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en las células y medio acondicionado de la porción del medio de cultivo celular que contiene células con el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en la porción del medio acondicionado del cultivo celular que no contiene células;

en el que la fracción de células viables en la población celular se puede calcular según la fórmula:

15
$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

en la que $c = \frac{1-f}{f}$. y f es la fracción del medio acondicionado total presente en la porción del medio acondicionado del cultivo celular que no contiene células de la población celular.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el método es un método para medir la fracción de células viables en un producto de ingeniería tisular mantenido en un medio de cultivo celular, y en el que el método comprende:

- 20 (a) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en una porción de un medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células del producto de ingeniería tisular;
- (b) destruir la integridad de la membrana de las células en una porción del medio de cultivo celular que contiene células del producto de ingeniería tisular;
- 25 (c) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en las células y medio acondicionado de dicha porción del medio de cultivo celular que contiene células del producto de ingeniería tisular; y
- (d) comparar el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en la porción del medio de cultivo celular que contiene células y medio acondicionado del producto de ingeniería tisular con el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células del producto de ingeniería tisular,

30 en el que la fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular se puede calcular según la fórmula:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

en la que $c = \frac{1-f}{f}$. y f es la fracción del medio acondicionado total presente en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células de la población celular.

35 3. El método de la reivindicación 1, en el que el método es un método para medir la fracción de células viables en un producto de ingeniería tisular mantenido en un medio de cultivo celular, y en el que el método comprende:

- (a) proporcionar una porción de muestra del producto de ingeniería tisular que contiene células y una cantidad proporcional de un medio acondicionado de cultivo celular;
- 40 (b) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en una porción de un medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células del producto de ingeniería tisular procedente de la porción de muestra proporcionada en la etapa (a);
- (c) destruir la integridad de la membrana de las células en la porción de muestra del producto de ingeniería tisular proporcionada en la etapa (a);
- (d) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en las células y medio acondicionado de

la porción de muestra del producto de ingeniería tisular proporcionada en la etapa (a); y

(e) comparar el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular detectada en las etapas (b) y (d), en el que, cuando la relación del porcentaje de células totales al porcentaje de medio acondicionado de cultivo celular total en la porción de muestra es 1:1, la fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular se puede calcular según la fórmula:

5

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

en la que $c = \frac{1-f}{f}$. y f es la fracción del medio acondicionado de muestra total presente en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células de la población celular;

10

y en el que cuando la relación del porcentaje de células al porcentaje de medio acondicionado de cultivo celular en la porción de muestra se desvía de 1:1, la fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular se puede calcular según la fórmula:

$$\frac{X - cY}{X + Y + 2Y(\alpha - 1)}$$

en la que $c = \frac{1-f}{f}$. y f es la fracción del medio acondicionado de muestra total presente en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células de la población celular;

15

y en el que α es la relación del porcentaje de células totales al porcentaje del medio acondicionado total presente en la muestra.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la integridad de la membrana de las células en la porción de muestra del producto de ingeniería tisular se destruye mediante cizallamiento, ultrasonidos, baja presión barométrica, temperatura elevada, baja temperatura, lisis química o enzimática, o agentes de desacoplamiento de la membrana.

20

5. El método de la reivindicación 4, en el que la integridad de la membrana de las células en la porción de muestra del producto de ingeniería tisular se destruye mediante adición de un anfífilo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el anfífilo es saponina.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el método es un método para medir la fracción de células viables en un producto de ingeniería tisular mantenido en un medio de cultivo celular, y en el que el método comprende:

25

(a) proporcionar una porción del producto de ingeniería tisular que contiene células y una cantidad proporcional del medio acondicionado de cultivo celular;

(b) proporcionar una porción del medio acondicionado de cultivo celular, proporcionada en la etapa a), que no contiene células del producto de ingeniería tisular;

(c) añadir saponina y bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 a las muestras proporcionadas en las etapas a) y b); y

30

(d) detectar las fluorescencias correspondientes a bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110 escindido en las muestras proporcionadas en las etapas a) y b), en el que las células son condrocitos humanos, mantenidos en una matriz a una densidad de entre $1,5 \times 10^4$ y 6×10^6 células/cm².

8. Un método para medir la citotoxicidad de un tratamiento para células en un producto de ingeniería tisular mantenido en un medio de cultivo celular, que comprende:

35

(a) aplicar el tratamiento al producto de ingeniería tisular;

(b) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (Y) en una porción de un medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células del producto de ingeniería tisular;

(c) destruir la integridad de la membrana de las células en una porción del medio de cultivo celular que contiene células del producto de ingeniería tisular;

40

(d) detectar una actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en las células y medio acondicionado de dicha porción del medio de cultivo celular que contiene células del producto de ingeniería tisular; y

(e) comparar el nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular (X) en la porción del medio de cultivo celular que contiene células del producto de ingeniería tisular con el nivel de actividad enzimática estable a la

muerte celular (Y) en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células del producto de ingeniería tisular,

en el que la citotoxicidad del tratamiento es proporcional a la diferencia en la fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular tratado a un producto de ingeniería tisular no tratado, y en el que la fracción de células viables en el producto de ingeniería tisular se puede calcular según la fórmula:

5

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

en la que $c = \frac{1-f}{f}$. y f es la fracción del medio acondicionado total presente en la porción del medio acondicionado de cultivo celular que no contiene células de la población celular.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 u 8, en el que las células son de mamífero.

- 10 10. El método de la reivindicación 9, en el que las células son humanas.
11. El método de la reivindicación 10, en el que las células son condrocitos.
12. El método de la reivindicación 9, en el que las células se hacen crecer sobre una matriz.
13. El método de la reivindicación 9, en el que las células están presentes a una densidad entre $1,5 \times 10^4$ y 6×10^6 células/cm².
- 15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8, en el que las células están presentes a una densidad elevada de al menos $2,0 \times 10^5$ células/cm².
15. El método de la reivindicación 14, en el que las células están presentes entre 2×10^5 y 6×10^6 células/cm².
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular se mide mediante las etapas que comprenden:
- 20 (a) poner en contacto una muestra con un sustrato de la actividad enzimática estable a la muerte celular, en el que el sustrato está conjugado a un grupo saliente detectable; y
- (b) detectar el grupo saliente,
- en el que la cantidad de grupo saliente detectada es proporcional al nivel de actividad enzimática estable a la muerte celular.
- 25 17. El método de la reivindicación 16, en el que el grupo saliente es cromogénico, luminogénico, o fluorescente.
18. El método de la reivindicación 17, en el que el grupo saliente es fluorescente.
19. El método de la reivindicación 18, en el que el grupo saliente es rodamina-110.
20. El método de la reivindicación 16, en el que el sustrato es bis-(Ala-Ala-Phe)-rodamina-110.
21. El método de la reivindicación 18, en el que el grupo saliente es un derivado de cumarina.
- 30 22. El método de la reivindicación 21, en el que el grupo saliente es AMC.
23. El método de la reivindicación 22, en el que el sustrato es Ala-Ala-Phe-AMC.
24. El método de la reivindicación 16, que comprende además la etapa de añadir un agente que modula la señal del grupo saliente detectable.
- 35 25. El método de la reivindicación 24, en el que el agente que modula la señal del grupo saliente atenúa la señal del grupo saliente.
26. El método de la reivindicación 25, en el que el agente que atenúa la señal del grupo saliente es rojo de fenol.
27. El método de la reivindicación 26, en el que el rojo de fenol está presente a una concentración de hasta 500 mg/l.
- 40 28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular es proteolítica.
29. El método de la reivindicación 28, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular comprende una o

más tripeptidil peptidasas.

30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular es actividad enzimática estable tanto a la muerte celular de forma necrótica como a la muerte celular programada.

5 31. El método de la reivindicación 30, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular es una actividad enzimática estable a la muerte celular programada.

32. El método de la reivindicación 30, en el que la actividad enzimática estable a la muerte celular es una actividad enzimática estable de forma necrótica.

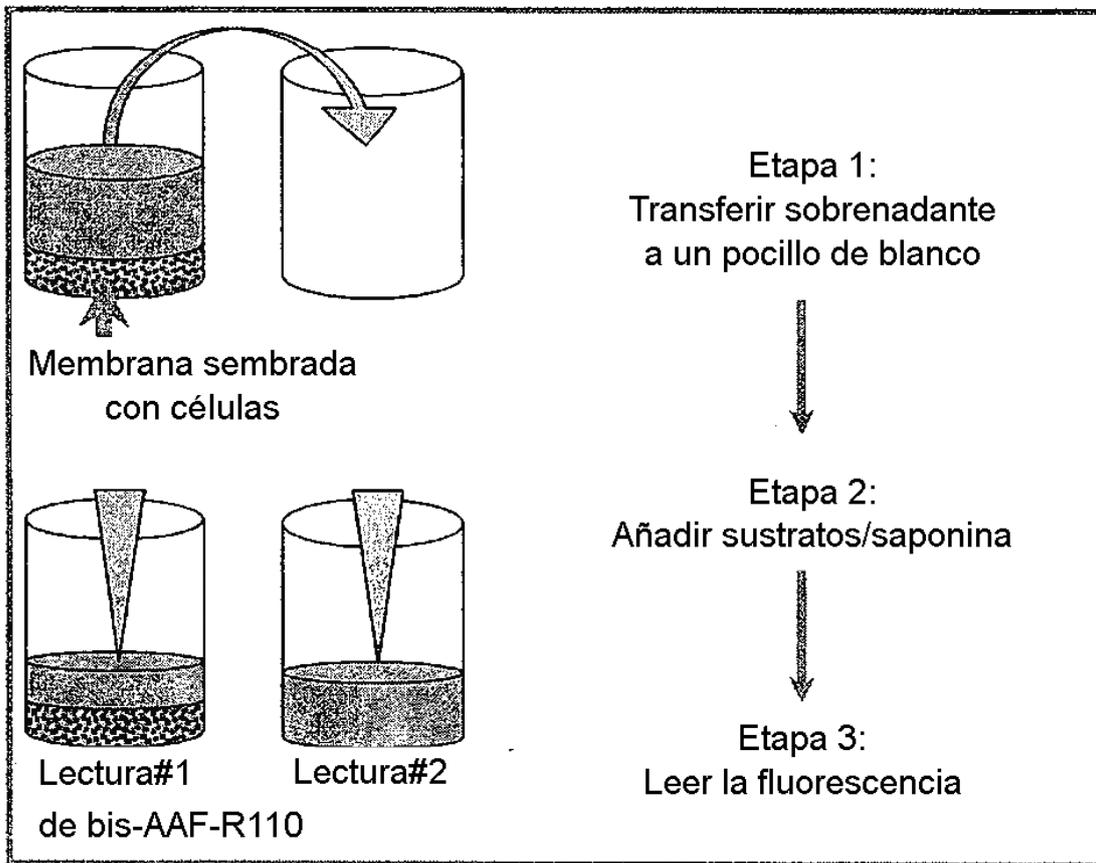


Fig. 1

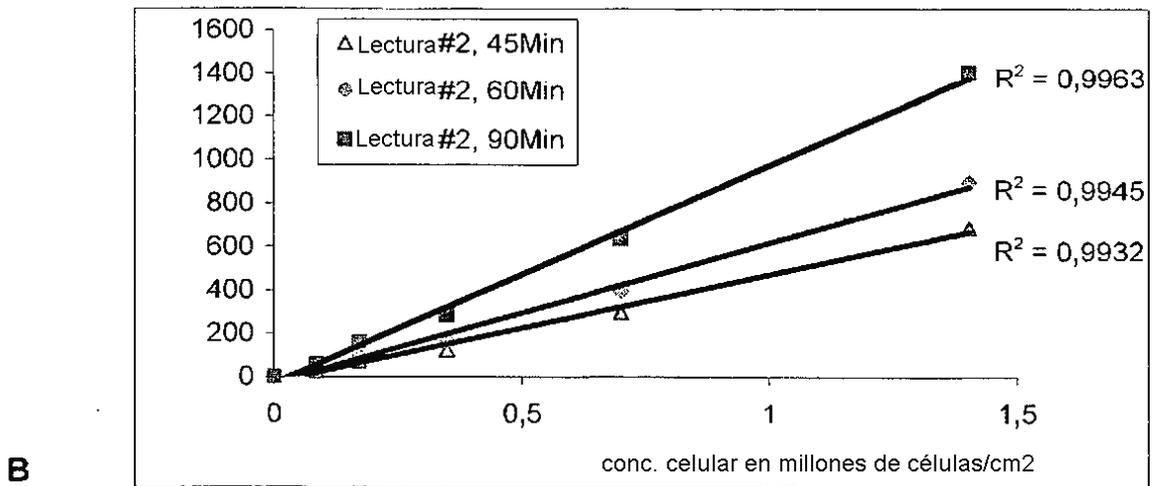
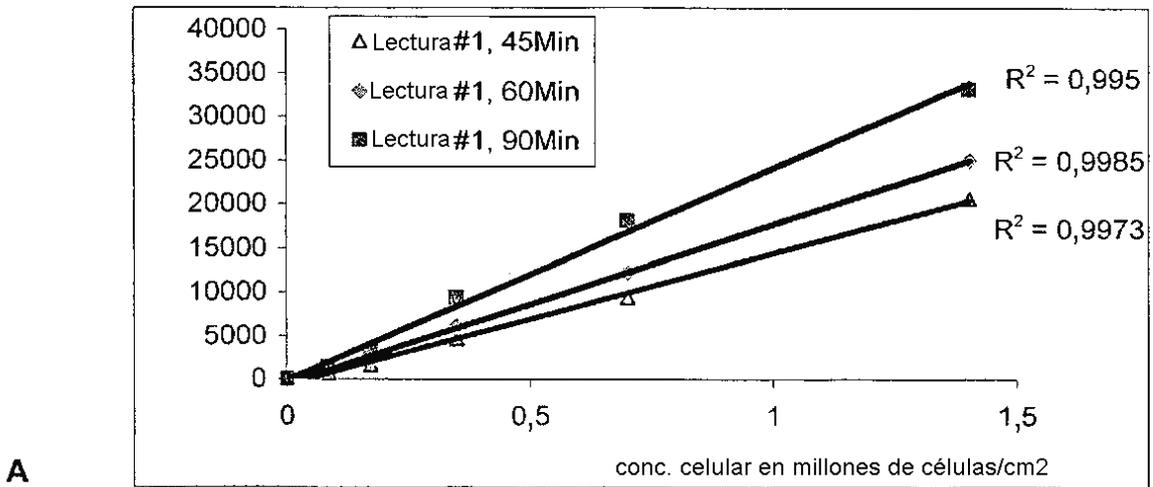


Fig. 2

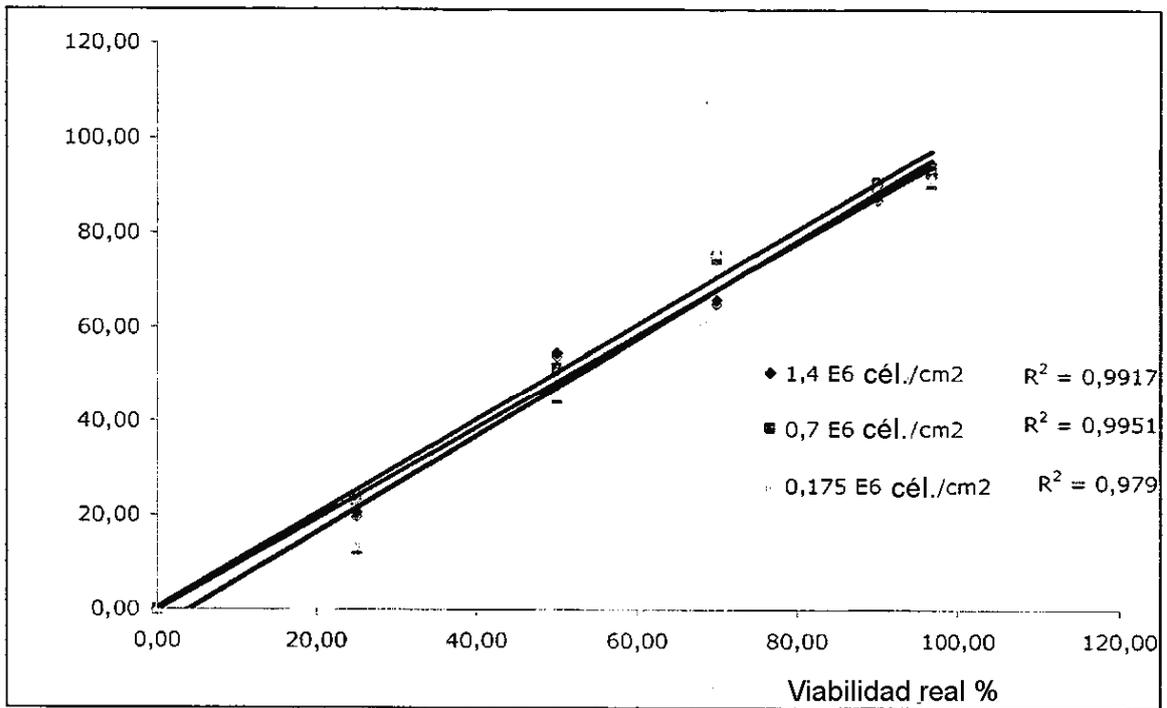


Fig. 3

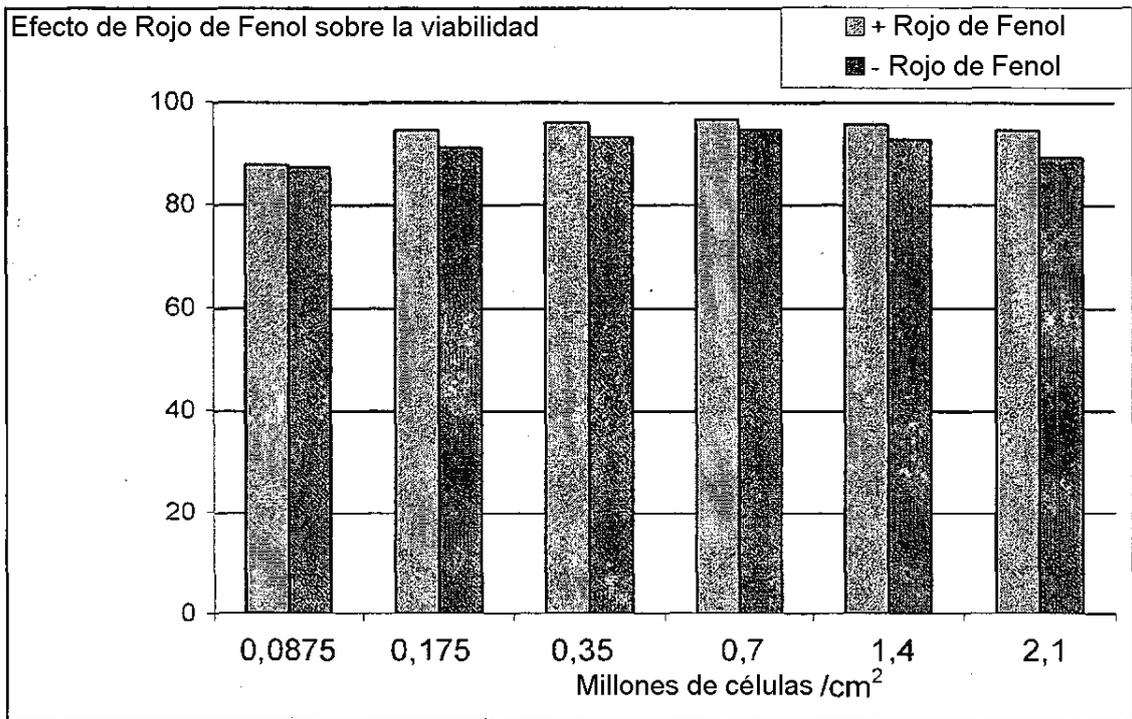


Fig. 4

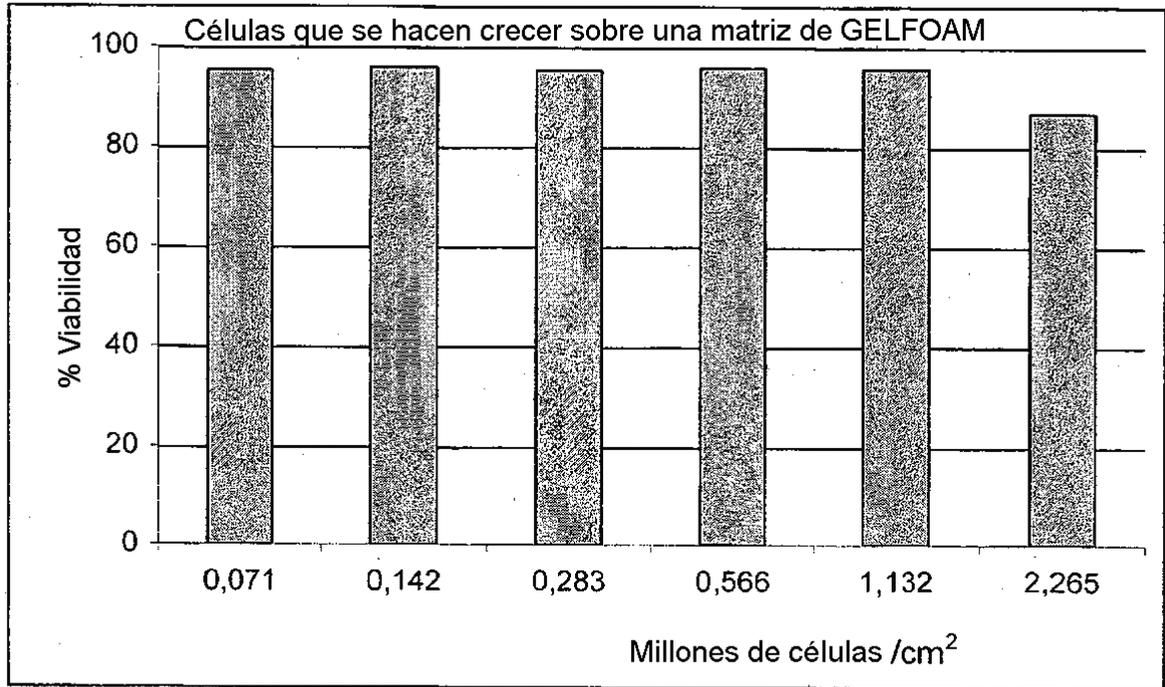


Fig. 5

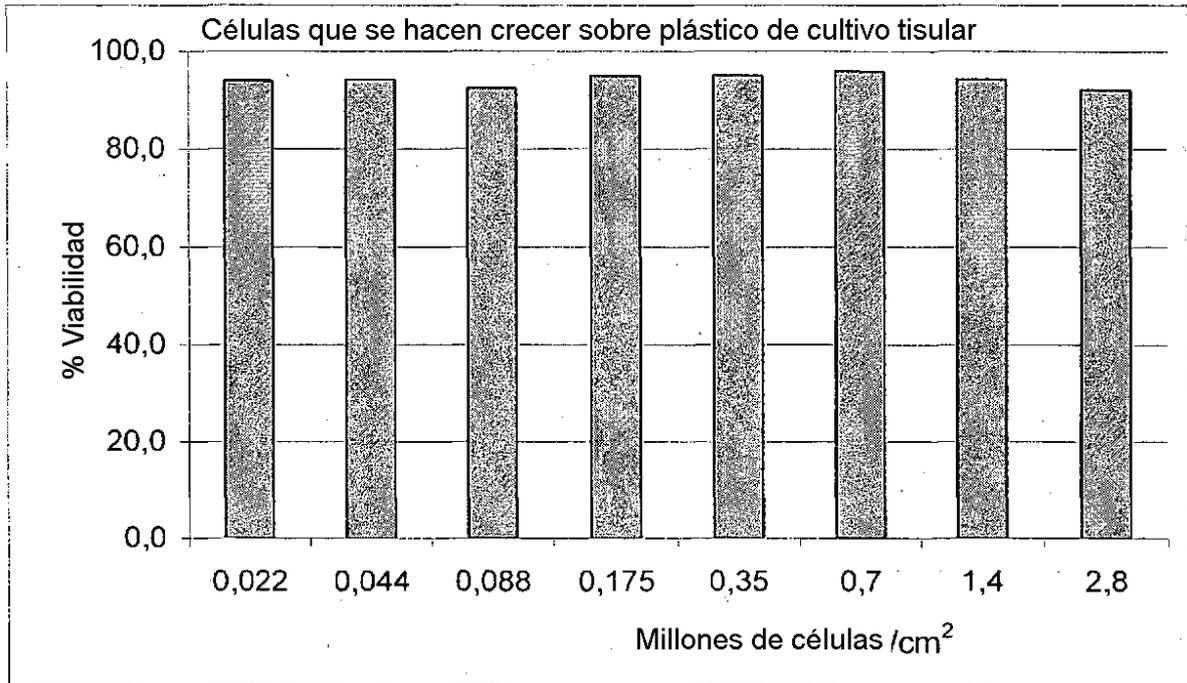


Fig. 6

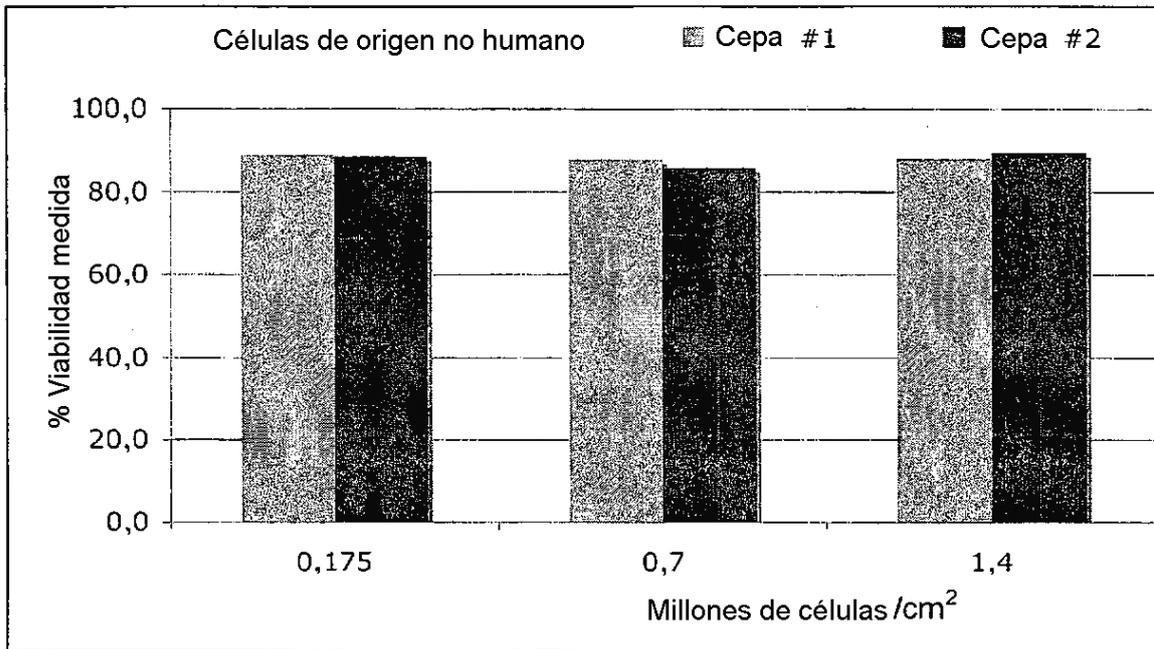


Fig. 7

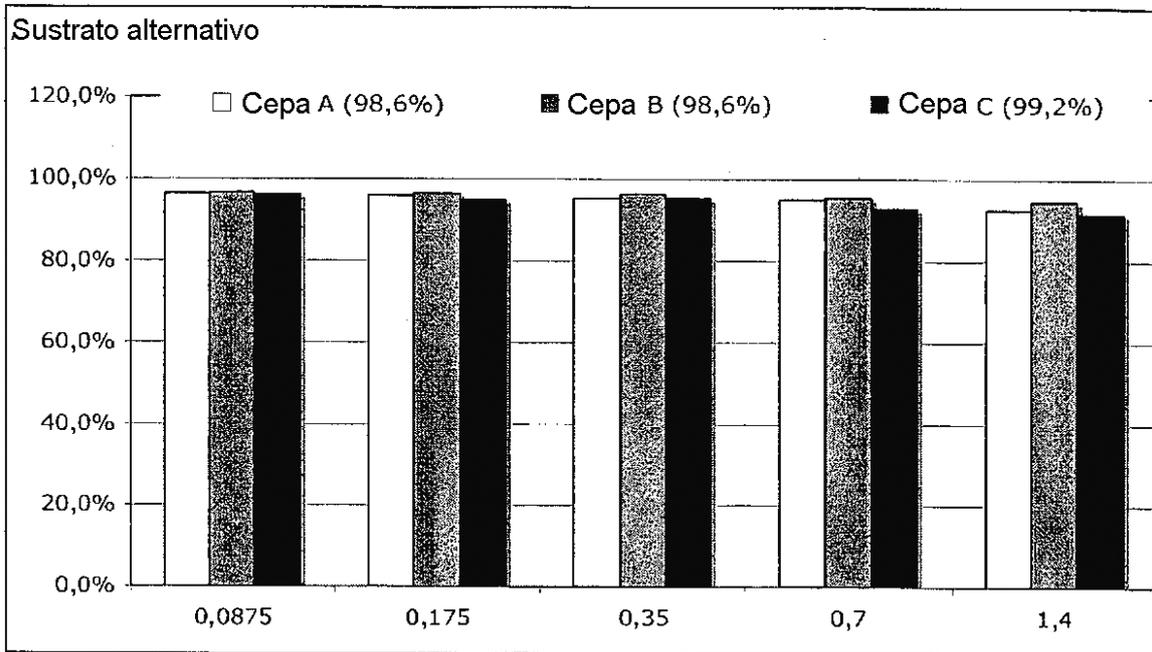


Fig. 8