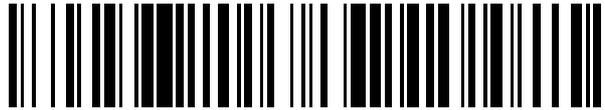


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 633**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 1/18 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08792087 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2184345**

54 Título: **Método para detectar células**

30 Prioridad:

02.08.2007 JP 2007201493

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

19.05.2016

73 Titular/es:

TOYAMA PREFECTURE (50.0%)
1-7, Shinsogawa
Toyama-shi, Toyama 930-8501, JP y
VALNEVA (50.0%)

72 Inventor/es:

JIN, AISHUN;
KISHI, HIROYUKI;
MURAGUCHI, ATSUSHI y
OBATA, TSUTOMU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 570 633 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para detectar células

La presente solicitud reivindica la prioridad en virtud de la solicitud de patente japonesa nº 2007-201493 presentada el 2 de agosto de 2007.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la detección de células y a una matriz de micropocillos empleada en este método. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la detección de células inmunes, tales como células productoras de inmunoglobulinas específicas y células específicas productoras de citoquinas y a una matriz de micropocillos empleada en este método.

10 Antecedentes de la invención

De manera convencional, se han preparados hibridomas productores de anticuerpos específicos de antígeno para producir anticuerpos monoclonales. En el método convencional de preparación de hibridomas, los hibridomas se preparan, después de lo cual los clones de hibridoma que producen anticuerpos específicos de antígeno son examinados. Sin embargo, la preparación de hibridomas no es eficiente. Es decir, no todos los linfocitos B se convierten en hibridomas; sólo algunos de los linfocitos B en los que se ha producido la fusión de células con un mieloma se convierten en hibridomas. Incluso cuando se produce un hibridoma con una célula de bazo que se ha estimulado con un antígeno, se producen no sólo anticuerpos productores de hibridomas específicos de antígeno; la mayor parte de los hibridomas que se producen o bien producen anticuerpos no relacionados o no producen anticuerpos en absoluto.

Por ejemplo, cuando se busca un hibridoma que produce un anticuerpo diana por el método convencional, las células de bazo procedentes de un ratón inmunizado se someten a fusión celular con mielomas y se siembran en aproximadamente diez placas de 96 pocillos. Más podían sembrarse si se utilizaran todas las células, pero hay límites de tiempo cuando una sola persona está haciendo la detección y las que quedan son almacenadas por congelación o similar. Normalmente, los hibridomas crecen en aproximadamente 500 pocillos cuando se utiliza este método.

No todos los hibridomas en los 500 pocillos proliferan a la misma velocidad; algunos crecen rápidamente y otros crecen lentamente. En consecuencia, es imposible comprobar el crecimiento de todos los 500 simultáneamente. En primer lugar, se debe hacer un control bajo un microscopio en cuanto a si los pocillos han producido el crecimiento celular y a si el número de células ha aumentado lo suficiente para comprobar los anticuerpos. Posteriormente, el sobrenadante de células se recoge de los pocillos adecuados y se realiza una comprobación de la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Es necesario realizar la comprobación de las células y la verificación del sobrenadante de células extremadamente rápidamente. Esto se debe a que los hibridomas crecen de manera constante y proliferan en exceso si se dejan solos, agotando los nutrientes en el medio y en las vías de desaparición. En consecuencia, la detección debe ser completada antes de que los hibridomas deseados mueran.

Además, una vez que se encuentra un pocillo en el que un hibridoma diana está creciendo, con frecuencia habrá hibridomas que produzcan otros anticuerpos que crezcan en el pocillo, además del hibridoma que produce el anticuerpo diana. También, puesto que los hibridomas bajan sus propios cromosomas durante su crecimiento, también hay casos en los que un hibridoma que ha estado produciendo un anticuerpo acaba perdiendo el cromosoma con el anticuerpo y se vuelve incapaz de producir el anticuerpo. El crecimiento de tales células es a menudo más rápido que el de los hibridomas que producen anticuerpos y la mayoría de las células que se cultivan, cuando se quedan solas, llegan a convertirse en células no productoras de anticuerpos. Por consiguiente, cuando se descubre un pocillo en el que un hibridoma deseado está creciendo, las células en tal pocillo se vuelven a sembrar inmediatamente a una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos (método de dilución crítica) y la detección se lleva a cabo de nuevo para los hibridomas productores de anticuerpos deseados (cribado secundario). Una vez que se ha detectado un hibridoma diana, es necesario proceder rápidamente a través de la detección secundaria antes de que el estado de la célula se deteriore.

Como se ha expuesto anteriormente, puesto que la detección se lleva a cabo a veces con sólo algunos de los hibridomas que se preparan, sin el cribado de todos ellos, se hace difícil obtener hibridomas productores de anticuerpos específicos de antígeno de baja frecuencia.

Más específicamente, en el caso de anticuerpos específicos de antígeno humanos, existe un método de detección de células productoras de anticuerpos específicos de antígeno en las cepas desarrolladas por la transformación de los linfocitos B periféricos con el virus de EB (documento no de patente 1). En este método, ya que la frecuencia de las cepas de células de linfocitos establecidos es baja, la probabilidad de obtener una cepa celular de linfocitos B productora de anticuerpos específica de antígeno es extremadamente baja. Además, se tarda aproximadamente un mes para establecer una cepa de células. Aún más, las cepas de linfocitos B que se establecen producen sólo pequeñas cantidades de anticuerpo. Aunque se pueden preparar hibridomas para ratones, no se ha desarrollado ningún sistema para la producción de hibridomas con una buena eficiencia para seres humanos.

Se pueden preparar hibridomas para ratones. Convencionalmente, para producir un hibridoma, se inmuniza un ratón con un antígeno, se retiran el bazo o los ganglios del ratón, se preparan los linfocitos, aproximadamente 10^8 de los linfocitos preparados y aproximadamente 10^7 de células de mieloma se fusionan utilizando polietilenglicol o glicol o sometiéndolos a un voltaje, que se cultivan en un medio de selección tal como HAT, los hibridomas que crecen se criban por ELISA, citometría de flujo o similares, para determinar si producen o no el anticuerpo específico de antígeno y los hibridomas productores de anticuerpos específicos de antígeno se seleccionan (documentos no de patente 2 y 3). Cuando se emplea este método, los hibridomas crecen en de 300 a 400 pocillos. De estos, los hibridomas que producen anticuerpos específicos de antígeno crecen sólo en varios porcentajes de los pocillos. Este número varía con el antígeno empleado, pero es difícil preparar hibridomas por este método cuando la frecuencia del linfocito B productor de anticuerpos específica de antígeno es baja.

Por consiguiente, los presentes inventores examinaron métodos para seleccionar convenientemente linfocitos que reaccionan específicamente con los antígenos prescritos en la forma de tanto linfocitos específicos de antígeno de frecuencia relativamente alta como los linfocitos específicos de antígeno de frecuencia baja y prepararon hibridomas productores de anticuerpos específicos de antígeno a partir de los linfocitos B específicos de antígeno que se seleccionaron. A continuación, idearon un método para preparar hibridomas productores de anticuerpos específicos de antígeno mediante el cultivo de linfocitos B específicos de antígeno seleccionados y fusionaron los linfocitos B específicos de antígeno cultivados mediante el cultivo con células de mieloma para preparar hibridomas, y solicitaron una patente (Documento de Patente 1).

También se han hecho intentos para especificar y seleccionar células individuales y el uso de las células que han sido seleccionadas. Por ejemplo, la detección por separado de la especificidad del antígeno individual, la recuperación de un único linfocito específico de antígeno detectado y el uso de los linfocitos específicos de antígeno solos recuperados para preparar un anticuerpo, por ejemplo, han sido examinados (documentos de patente 2 y 3).

[Documento de Patente 1] Documento WO2004/08791

[Documento de Patente 2] Publicación no examinada de patente japonesa 2004-173681

25 [Documento de Patente 3] Publicación no examinada de patente japonesa 2004-187676

[Documento no de patente 1] "Methods of Detecting Lymphocyte Functions (Version 5)", Junichi YANO, Michio FUJIWARA, eds., Chugai Igakusha (1994), "Use of EB virus transform B cells for preparation of human monoclonal antibody", Fumio MIZUNO, Toshiro OHSATO, pp381-391.

30 [Documento no de patente 2] "Methods of Detecting Lymphocyte Functions (Version 5)", Junichi YANO, Michio FUJIWARA, eds., Chugai Igakusha (1994), "Preparation of monoclonal antibody with B cell hibridomas", Hideo NARIUCHI, pp574-576.

[Documento no de patente 3] Los anticuerpos monoclonales en "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 139-244 de 1988.

35 [Documento no de patente 4] "In vitro antibody production". En Current Protocols in Immunology. Editado por J. E. Coligan et al., John Wiley & Sons (New York), p. 3.8.1-3.8.16, 1991.

[Documento no de patente 5] Babcook, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A., Schrader, J. W. "A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities". Proc Natl Acad Sci USA S A, 93: 7843-7848, 1996.

40 [Documento no patente 6] "Measurement of polyclonal immunoglobulin synthesis using the ELISPOT assay". En Current Protocols in Immunology. Editado por J. E. Coligan et al., John Wiley & Sons (New York), p.7.14.1-7.14.7, 1991.

[Documento no de patente 7] "Assays for antibody production. In Current Protocols in Immunology". En Current Protocols in Immunology. Editado por J. E. Coligan et al., John Wiley & Sons (New York), p.2.1.1-2.1.22, 1991.

45 [Documento no patente 8] J. C. Love, J. L. Ronan, G. M. Grotenbreg, A. G. van der Veen, H. L. Ploegh, "A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies". Nature Biotechnology, 24: 703-707, 2006.

Además, el documento WO 03/035824 describe matrices de micropocillos para detectar células diana.

En los métodos convencionales descritos anteriormente, la detección por separado de la especificidad de antígeno de los linfocitos individuales y la recuperación de los linfocitos específicos de antígeno que se detectan se llevan a cabo manualmente. En los documentos de patente 2 y 3, se indica que se ha confirmado la especificación de las células a nivel celular y que también es posible recuperar las células especificadas. Sin embargo, la detección real de los linfocitos que han reaccionado específicamente con un antígeno de entre numerosos linfocitos es difícil.

5 Como un ejemplo de un método de detección, se explota el hecho de que la concentración de iones de calcio aumente en los linfocitos que han reaccionado con un antígeno; este cambio en la concentración de iones de calcio se detecta por fluorescencia y los linfocitos específicos de antígeno se especifican. Sin embargo, dependiendo del tipo de célula (linfocitos), el método de generación de fluorescencia, la intensidad de la misma y similares pueden ser diferentes. Hay linfocitos en los que la concentración de iones de calcio se eleva inmediatamente después de la estimulación del antígeno, lo que resulta en un aumento en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, también son células en las que la concentración de iones de calcio se eleva sólo después de que haya transcurrido un cierto período después de la estimulación del antígeno, lo que resulta en un aumento en la intensidad de fluorescencia. Además, es necesario medir casi simultáneamente y de una sola vez la intensidad de la fluorescencia de aproximadamente 10.000 a 200.000 linfocitos que se mantiene en la superficie de un tubo de varios centímetros cuadrados. Aún más, ya que esta fluorescencia aumenta en las células individuales, la intensidad de la fluorescencia es baja, lo que requiere la detección con fluorescencia altamente sensible.

Hasta ahora, no existe ningún método ni ningún dispositivo capaz de medir simultáneamente la intensidad de numerosas fuentes de fluorescencia débiles reunidas en forma altamente concentrada en la superficie de un tubo.

15 Un dispositivo convencional es el citómetro de barrido láser. Con un citómetro de barrido láser es posible medir la concentración de calcio en varios cientos de miles de células individuales. Sin embargo, una sola exploración requiere un largo tiempo de 10 minutos o más, lo que impide la detección a tiempo real en los linfocitos de la intensidad de la fluorescencia, la cual cambia varios minutos después de la estimulación del antígeno.

20 Un microscopio de fluorescencia con el proyector se compone de un microscopio fluorescente normal combinado con un dispositivo de detección. Un microscopio de fluorescencia con proyector no presenta ningún problema en términos de velocidad. Sin embargo, como un microscopio ordinario, el alcance de detección es estrecho, por lo que es posible la detección de la fluorescencia en sólo aproximadamente 1.000 células a la vez. Es imposible detectar la fluorescencia en varias decenas de miles a cientos de miles de células a la vez.

25 Un detector de chip de la célula basado en un escáner de micromatrices de ADN es un dispositivo que ha sido desarrollado para detectar la fluorescencia en las células dispuestas en los chips de células y se puede detectar la fluorescencia dentro o fuera de las células. Sin embargo, es un sistema que excita un tinte fluorescente con un láser y detecta la luz de excitación. Por lo tanto, en los sistemas de detección que rastrean cambios en el tiempo, la velocidad de barrido de línea del láser es lenta, lo que impide la detección simultánea de numerosas regiones celulares.

30 En los métodos descritos en los documentos de patente citados anteriormente 2 y 3, se requiere que el sistema de detección de reacción para la detección de células que reaccionan específicamente frente a un antígeno que tiene la capacidad de captar en los cambios en tiempo real en el calcio con el tiempo dentro de las células individuales y la capacidad de detectar las células individuales que están presentes en sólo un pequeño número (reaccionar sólo ligeramente) entre un gran número de células, lo que requiere la capacidad de analizar por separado y al mismo tiempo un gran número de células en paralelo.

35 Por consiguiente, el objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita la medición simultánea de los estados de un gran número de células, superior a 10.000 y deseablemente superior a 100.000, que se realiza en un chip, tales como las propiedades reactivas de linfocitos estimulados con antígeno y la determinación por separado de los estados de las células individuales.

40 Los linfocitos B expresan un único anticuerpo en la superficie celular. Cuando un patógeno (antígeno) o similar invade el cuerpo, el antígeno se une al anticuerpo en la superficie celular, activando la célula y haciendo que proliferen y se diferencien. Por último, diferencia entre una célula secretora de anticuerpos. Ya existen numerosos métodos de especificación de las células secretoras de anticuerpos. Los métodos típicos de especificación de las células secretoras de anticuerpos individuales son el método de la placa y el método del inmunoensayo ligado a enzima (ELISPOT).

45 El método de placa es un método para especificar las células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno en las que se emplea como indicador la hemólisis inducida por anticuerpos de unión a eritrocitos, que han sido marcados con los antígenos que rodean las células que secretan los anticuerpos (documento no de patente 4). Un método que detecta células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno por el método de la placa y recupera el gen del anticuerpo que ya se ha desarrollado (documento no de patente 5).

50 El método ELISPOT es un método de inoculación de células en una placa que ha sido revestida con el antígeno, haciendo que el anticuerpo que es secretado por las células secretoras de anticuerpos se una al antígeno alrededor de las células y detectando a éste con anticuerpo anti-Ig marcado con enzima o similares (documento no de patente 6). Con el método de ELISPOT, en el curso de la detección de la unión del anticuerpo específico de antígeno alrededor de las células con anticuerpo anti-Ig marcado con enzima, las propias células se eliminan por lavado, lo que impide la recuperación de las células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno.

55 Los hibridomas son células secretoras de anticuerpos. Sin embargo, en el curso de la detección de hibridomas, se emplea comúnmente el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (documento no de patente 7).

Recientemente, este método se ha desarrollado aún más; un método ha sido publicado mediante el que se cultivan en pocillos pequeños hibridomas individuales y el anticuerpo que se secreta en cada pocillo se detecta por un antígeno o similar marcado con un marcador fluorescente para detectar células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno (documento no de patente 8).

- 5 Para conseguir el objeto anteriormente indicado de la presente invención, los presentes inventores llevaron a cabo una amplia investigación para proporcionar un método para detectar células del sistema inmune, tales como nuevas células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno, que fue completamente diferente de los métodos descritos en los documentos no de patente de 4 a 8. La presente invención se concibió sobre esa base.

Descripción de la invención

- 10 La presente invención, ideada para resolver los problemas arriba mencionados, se expone a continuación:

[1] Una matriz de micropocillos para detectar células diana que secretan una sustancia, que comprende múltiples pocillos en una de las superficies principales de un miembro de base, siendo los pocillos de un tamaño que permita la entrada de una única célula en cada pocillo, caracterizada por una capa de una sustancia de unión capaz de unirse a al menos parte de una sustancia secretada por una célula diana que reviste la superficie principal alrededor de los pocillos, y no dentro de los pocillos, en donde la porción de la superficie principal que no está revestida por dicha capa está revestida con un agente bloqueante.

- 15 [2] La matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células dianas son células productoras de inmunoglobulinas y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-inmunoglobulina o de antígeno.

- 20 [3] La matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células diana son células productoras de citoquinas, y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-citoquina o un receptor de citoquinas.

[4] La matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el miembro de base tiene forma de placa.

- 25 [5] Un método de cribado de una célula diana presente entre células de muestra, que comprende las etapas de:

- hacer que las células de muestra y un caldo de cultivo de células esté contenido en al menos una parte de los pocillos de una matriz de micropocillos que comprende múltiples pocillos en una de las superficies principales de un miembro de base, siendo los pocillos de un tamaño que permita la entrada de una única célula en cada pocillo, y que comprende una capa de una sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a por lo menos una porción de una sustancia secretada por dicha célula diana, que reviste la superficie principal alrededor de los pocillos, y no dentro de los pocillos, en donde la porción de la superficie principal de la matriz de micropocillos, que no está revestida por dicha capa, está revestida con un agente bloqueante.

- 30 - sumergir la capa de revestimiento y los pocillos en el caldo de cultivo y cultivar las células en un estado que permita la difusión de sustancias en el caldo de cultivo de los pocillos en la capa de revestimiento;

- después de retirar opcionalmente el caldo de cultivo, alimentar con una sustancia marcadora que se una específicamente a dicha sustancia secretada por dicha célula diana; e

- identificar la célula diana detectando la sustancia secretada por dicha célula diana que se ha unido a la sustancia en la capa de revestimiento por medio de dicha sustancia marcadora.

- 35 [6] El método de detección de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células presentes entre las células de muestra incluyen las células que han sido estimuladas con un antígeno deseado con antelación y están en un estado capaz de secretar una sustancia.

[7] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde al menos una parte de las células contenidas en los pocillos son células productoras de inmunoglobulinas.

- 45 [8] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7, en donde al menos una parte de las células contenidas en los pocillos son células productoras de citoquinas.

[9] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de inmunoglobulina y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-inmunoglobulina o un antígeno, y la célula diana es una célula productora de inmunoglobulina específica de antígeno.

50

[10] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de inmunoglobulina, y en donde dicha sustancia de unión es un receptor de citoquinas o receptor, y la célula diana es una célula productora de inmunoglobulina específica de antígeno.

5 [11] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de citoquinas y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-citoquina o un receptor de citoquinas, y la célula diana es una célula productora de citoquinas específicas de antígeno.

10 [12] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde las células productoras de inmunoglobulinas y las células productoras de citoquinas son células naturales, hibridomas o cepas de células.

[13] El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde dicha célula diana es un linfocito B y en donde dichos pocillos tienen forma cilíndrica y un diámetro de 4 a 15 micrómetros.

15 15. Un método para aislar una célula diana, que comprende recuperar de un pocillo una célula diana identificada por el método de detección de acuerdo con una cualquiera de 5 a 14.

15 La presente invención proporciona un método y un medio que permite la medición simultánea de los estados de un gran número de células, superior a 10.000, por ejemplo, y de manera deseable superior a 100 000, que se realiza en un chip, tales como las propiedades reactivas de linfocitos estimulados por antígenos y la determinación por separado de los estados de las células individuales.

Los mejores modos de realizar la invención

20 [La matriz de micropocillos]

La matriz de micropocillos empleada es una matriz de micropocillos que tiene múltiples pocillos en una de las superficies principales de un miembro de base; los pocillos son de un tamaño que permita la entrada de una única célula. Una matriz de micropocillos que tiene una estructura tal puede emplearse en la forma descrita en los documentos de patente 1 a 3, por ejemplo.

25 Micropocillos múltiples se disponen en filas y columnas espaciadas por igual en un chip de matriz de micropocillos.

30 Ni la forma ni el tamaño de los micropocillos está limitada específicamente. Sin embargo, por ejemplo, la forma del micropocillo puede ser cilíndrica. También puede ser no cilíndrica, tal como un poliedro compuesto de múltiples caras (por ejemplo, un paralelepípedo, columna hexagonal o una columna octogonal), un cono invertido, una pirámide invertida (pirámide triangular invertida, pirámide cuadrada invertida, pirámide pentagonal invertida, pirámide hexagonal invertida, o una pirámide invertida poligonal con siete o más ángulos), o tienen una forma combinando dos o más de estas formas. Por ejemplo, puede ser parcialmente cilíndrica, teniendo el resto la forma de un cono invertido. En el caso de una forma cónica invertida o una piramidal invertida, la boca del micropocillo está en la parte inferior. Sin embargo, la forma puede ser una en la que una porción de la parte superior del cono invertido o de la pirámide invertida se corta (en cuyo caso el fondo de los pocillos es plano). Para cónicos y paralelepípedos, el fondo de los pocillos es normalmente plano, pero también son posibles superficies curvas (cóncavas o convexas). La razón de que el fondo de los pocillos se haga curvo es la misma que para las formas que consisten en un cono invertido o una pirámide invertida con una porción de la parte superior cortada.

40 Para un micropocillo de forma cilíndrica, las dimensiones pueden ser, por ejemplo, de un diámetro de 3 a 100 micrómetros. Cuando la célula orgánica es un linfocito B, el diámetro tiene convenientemente de 4 a 15 micrómetros. Además, la profundidad puede ser de 3 a 100 micrómetros, y en el caso en que la célula orgánica sea un linfocito B, la profundidad es deseablemente de 4 a 40 micrómetros. Sin embargo, las dimensiones de los pocillos, como se expuso anteriormente, pueden ser adecuadamente determinadas en consideración de una relación deseable entre el diámetro de la célula orgánica que está contenida en el pocillo respecto a las dimensiones de la microplaca.

45 La forma y el tamaño de los pocillos se determinan adecuadamente en consideración al tipo de célula orgánica (forma, tamaño y similares de la célula orgánica) que se almacena en el micropocillo de modo que una sola célula orgánica estará contenida por micropocillo.

50 Para asegurar que una sola célula orgánica esté contenida por pocillo, por ejemplo, el diámetro del círculo más grande que puede ser inscrito en la forma plana de los pocillos cae adecuadamente dentro de un intervalo de 0,5 a 2 veces, deseablemente de 0,8 a 1,9 veces, y preferiblemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que está contenida en el pocillo.

Además, la profundidad de los pocillos cae adecuadamente dentro de un intervalo de 0,5 a 4 veces, deseablemente de 0,8 a 1,9 veces, y preferiblemente, de 0,8 a 1,8 veces el diámetro de la célula orgánica que está contenida en el pocillo.

El número de micropocillos presentes en un único chip de matriz de micropocillos no está limitado específicamente. Sin embargo, cuando la célula orgánica es un linfocito y la frecuencia de un linfocito específico de antígeno dado por cada 10^5 células es de 1 a aproximadamente 500 en el extremo superior, el número de micropocillos puede variar de aproximadamente 2.000 a 1.000.000 por cm^2 , por ejemplo.

5 La matriz de micropocillos de la presente invención comprende además, en al menos una porción de la superficie principal de los mismos alrededor de los pocillos, una capa de revestimiento de una sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a por lo menos una porción de una sustancia secretada por, al menos, una parte de las células contenidas en los pocillos. Esta es una característica de la matriz de micropocillos de la presente invención.

10 En la matriz de micropocillos de la presente invención, el miembro de base puede ser una placa (pero no hay intención de limitarse a una placa), y se proporciona una capa de revestimiento sobre al menos una porción de la superficie principal aproximadamente de los múltiples pocillos provistos en una superficie principal del miembro de base. La matriz de micropocillos de la presente invención se emplea para detectar la presencia o ausencia de la unión entre una sustancia producida por al menos una parte de las células contenidas en los pocillos y una sustancia en la capa de revestimiento.

15 Las células contenidas en los pocillos (células de la muestra) pueden ser, por ejemplo, un grupo de células que contiene células productoras de inmunoglobulinas o células productoras de citoquinas. Además, las células productoras de inmunoglobulinas y las células productoras de citoquinas pueden ser células naturales, hibridomas, o cepas de células. Las células naturales pueden ser células de mamífero, tales como las células recogidas de seres humanos, ratones o similares. Los hibridomas se pueden crear mediante los métodos habituales descritos en la
 20 técnica anterior. Las cepas de células pueden ser cepas en las que una biblioteca de cADN de tipo de expresión, o similar, se ha introducido genéticamente.

25 Cuando las células contenidas en los pocillos son muestras, las células que incluyen las células productoras de inmunoglobulina, un antígeno o un anticuerpo anti-inmunoglobulina capaz de reaccionar frente a la inmunoglobulina en forma de una sustancia producida por las células productoras de inmunoglobulinas se pueden emplear como la sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a al menos una parte de la sustancia producida por las células. La presencia o ausencia de la unión se detecta usando un antígeno o un anticuerpo para la inmunoglobulina producida.

30 Cuando las células contenidas en los pocillos son muestras, las células que incluyen las células productoras de citoquinas, un anticuerpo anti-citoquina capaz de reaccionar a la citoquina que es la sustancia producida por las células productoras de citoquinas, o receptores, se pueden emplear como la sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a al menos una parte de la sustancia producida por las células. La presencia o ausencia de la unión se detecta usando un anticuerpo frente a la citoquina o a un receptor de citoquinas.

35 O, cuando las células contenidas en los pocillos son muestras, las células que incluyen las células productoras de inmunoglobulina, la sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a al menos una parte de la sustancia producida por las células puede ser un receptor o receptor de citoquinas que es capaz de reaccionar con la inmunoglobulina que se produce por las células productoras de inmunoglobulina. En ese caso, se detecta la presencia o ausencia de enlaces usando un ligando o citoquina capaz de reaccionar con el receptor o el receptor de citoquinas. Cuando la inmunoglobulina producida se une al receptor o receptor de citoquinas, la unión al ligando o
 40 las citoquinas utilizado para detectar la presencia o ausencia de unión está bloqueado, lo que permite la detección de la presencia o ausencia de la unión.

Los ejemplos de:

(1) sustancias que tienen la capacidad de unirse a al menos una parte de la sustancia producida por las células (aglutinante);

(2) células almacenadas en los pocillos (células de la muestra);

45 (3) Las sustancias producidas por las células (sustancias producidas); y

(4) marcar las sustancias (sustancias marcadoras) para identificar las sustancias producidas se dan en la Tabla 1 a continuación.

50 La sustancia utilizada para las sustancias marcadoras para la identificación de la sustancia producida puede ser una sustancia fluorescente, por ejemplo. Sin embargo, no se limita a sustancias fluorescentes, y otras sustancias marcadoras son posibles. El marcado con una sustancia fluorescente tal como un antígeno o anticuerpo que sirve como sustancia marcadora puede llevarse a cabo por los métodos habituales. Hay casos en los que la sustancia marcadora se une específicamente a la sustancia producida, y los casos en los que se une específicamente a la sustancia de unión.

[Tabla 1]

Sustancia de unión	Célula	Sustancia producida	Sustancia marcadora
Anti-inmunoglobulina	Linfocitos B	Inmunoglobulina (anticuerpo)	Antígeno
Anticuerpo		Todos los anticuerpos tales como IgG, IgM, IgA, IgE	
Anti-inmunoglobulina	Linfocitos B	Inmunoglobulina (anticuerpo) de anticuerpos	Anticuerpo de anti-inmunoglobulina
Anticuerpo		Todos los anticuerpos tales como IgG, IgM, IgA, IgE	
Anticuerpo anti-IgG	Linfocitos B	IgG	Antígeno
Anticuerpo anti-IgG	Linfocitos B	IgG	Anticuerpo anti-IgG
Anticuerpo anti-IgM	Linfocitos B	IgM	Antígeno
Anticuerpo anti-IgM	Linfocitos B	IgM	Anticuerpos anti-IgM
Anticuerpo anti-IgA	Linfocitos B	IgA	Antígeno
Anticuerpo anti-IgA	Linfocitos B	IgA	Anticuerpo anti-IgA
Anticuerpo anti-IgE	Linfocitos B	IgE	Antígeno
Anticuerpo anti-IgE	Linfocitos B	Citoquina	Anticuerpo anti-IgE
Anticuerpo anti-citoquina	Linfocitos T, otros	Citoquina	Anticuerpo anti-citoquina
Anticuerpo anti-citoquina	Linfocitos T, otros	Citoquina	Receptor de citoquinas (soluble)
Receptor de citoquinas (soluble)	Linfocitos T, otros	Citoquina	Anticuerpos anti-citoquina
Antígeno	Linfocitos B	IgG	Anticuerpo anti-IgG
Antígeno	Linfocitos B	IgM	Anticuerpo anti-IgM
Antígeno	Linfocitos B	IgA	Anticuerpo anti-IgA
Antígeno	Linfocitos B	IgE	Anticuerpos anti-IgE
Receptor de citoquinas (soluble)	Linfocitos B	Anticuerpo	Citoquina*
Receptor (soluble)	Linfocitos B	Anticuerpo	Ligando**

* La detección de anticuerpos que bloquean la unión de la citoquina

**La detección de anticuerpos que bloquean la unión del ligando

5 En la formación de la capa de revestimiento de una sustancia de unión, la superficie principal de la placa base en la que la capa de revestimiento se va a formar se trata con un agente de acoplamiento de silano, por ejemplo, para asegurar la unión de la sustancia de unión y la superficie principal. A continuación, una solución que contiene la sustancia de unión puede ser aplicada a la superficie que ha sido tratada con el agente de acoplamiento de silano para formar la capa de revestimiento. La cantidad de la capa de aglutinante en la capa de revestimiento puede ser adecuadamente determinada con base al tipo de sustancia, el tipo de célula y la sustancia producida, y el tipo de sustancia marcadora. El tratamiento de la superficie para asegurar la unión de la sustancia que se une a la superficie principal no se limita al tratamiento con un agente de acoplamiento de silano; cualquier sustancia que promueva la unión de una sustancia de unión que comprenda la proteína o similar a la superficie de una placa de base compuesta de un material inorgánico (tal como un material de silicona) o un material orgánico (tal como un material polímero) se puede seleccionar adecuadamente para su uso.

15 En la superficie que está revestida con la sustancia de unión, puede haber casos en los que la sustancia de unión puede no estar revestida densamente, con porciones de la superficie no revestida restantes dependiendo de la

cantidad del revestimiento. En tales casos, particularmente cuando la superficie ha sido tratada con un agente de acoplamiento de silano como se ha expuesto anteriormente, hay casos en los que la sustancia producida por las células se unirá de manera no específica a la superficie de la placa base. Tal unión no específica causa una disminución en la precisión de la sensibilidad de la detección. En consecuencia, en la presente invención, al menos una porción de la superficie principal no tiene una capa de revestimiento de una sustancia que tiene la capacidad de unirse a al menos una parte de la sustancia producida por las células que están contenidas en los pocillos se reveste deseablemente con un agente de bloqueo. Un ejemplo de un agente de bloqueo es el polímero soluble en agua Lipidure (marca registrada) que tiene una unidad estructural en forma de 2-metacrililoixietilfosforilcolina (MPC) con la misma estructura que la base polar de la fosfatidilcolina que constituye la membrana celular.

10 [El método de cribado]

El método de cribado de la presente invención emplea la matriz de micropocillos de la presente invención para detectar una célula diana de un grupo de células que contienen células de muestras; que comprende las siguientes etapas:

15 (1) hacer que las células de muestra y el caldo de cultivo de células estar contenidos en al menos una parte de los pocillos de la matriz de micropocillos;

(2) sumergir la capa de revestimiento y los pocillos en caldo de cultivo y cultivar las células durante un cierto período en un estado que permita la difusión de sustancias contenidas en el caldo de cultivo de las células en la capa de revestimiento;

20 (3) después de retirar el caldo de cultivo, alimentar con una sustancia marcadora que se una específicamente a la sustancia producida por las células diana presentes entre las células de muestra en la capa de revestimiento; y

(4) detectar una sustancia que se ha producido o secretado por las células diana y que se ha unido a la sustancia en la capa de revestimiento con la sustancia marcadora para identificar la célula diana.

25 La (1) sustancia que tiene la capacidad de unirse a al menos una porción de una sustancia producida por una célula (aglutinante); (2) las células contenidas en los pocillos (células de la muestra); (3) la sustancia producida por las células (sustancia producida); y (4) la sustancia que identifica la sustancia producida que se ha marcado (sustancia de identificación marcadora) empleada en el método de cribado de la presente invención son idénticos a los descritos para la matriz de micropocillos de la presente invención, y los elementos dados en la Tabla 1 son ejemplos de esto.

Etapas 1)

30 Las células (un grupo de células), que incluyen las células de muestras se introducen con un caldo de cultivo de células en al menos una parte de los pocillos de una matriz de micropocillos. Antes de introducir las células, los pocillos de la matriz de micropocillos y el área alrededor de ellos se limpian con el medio; la eliminación adecuada de impurezas que se han adherido a la superficie en el curso de la formación de la capa de revestimiento de una sustancia de unión es deseable para una detección precisa. Las células se introducen con el caldo de cultivo en los pocillos. Las células de muestra que están contenidas en los pocillos pueden estar compuestas de un grupo de células que contiene células productoras de inmunoglobulinas o células productoras de citoquinas. Además, las células productoras de inmunoglobulinas y células productoras de citoquinas pueden ser células naturales o híbridomas. Estos grupos de células se pueden obtener por métodos conocidos.

40 Las células que están contenidas en los pocillos pueden ser células que han sido estimuladas con un antígeno deseado con antelación para inducir una producción de sustancia que permita el estado. Por ejemplo, en el caso de células productoras de inmunoglobulinas, que son células deseablemente que han sido estimuladas con un antígeno deseado con antelación para inducir un estado que permita la producción de inmunoglobulina. Del mismo modo, en el caso de células productoras de citoquinas, que son células deseablemente que han sido estimuladas con un antígeno deseado con antelación para inducir un estado que permita la producción de citoquinas. El antígeno deseado no está específicamente limitado; varios miembros deseados del grupo que consisten en proteínas, azúcares, lípidos, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, y combinaciones de los mismos (incluyendo las células) se pueden seleccionar adecuadamente. El caldo de cultivo se puede determinar adecuadamente sobre la base de los tipos de células que se están introduciendo y detectando.

Etapas 2)

50 La capa de revestimiento y los pocillos se sumergen en el caldo de cultivo y las células se cultivan en un estado que permita la difusión de sustancias contenidas en el caldo de cultivo de los pocillos en la capa de revestimiento. Las células cultivadas producen sustancias y de las sustancias que se producen se liberan en el caldo de cultivo, difundiéndose de los pocillos en la capa de revestimiento alrededor de los pocillos. Las sustancias que se difunden y llegan a la capa de revestimiento se unen a las sustancias de unión que constituyen la capa de revestimiento producida. Las condiciones de cultivo se pueden determinar adecuadamente en función del tipo de célula. El período de cultivo puede ser adecuadamente determinado para producir una cantidad detectable de la sustancia producida

unida a la sustancia de unión que constituye la capa de revestimiento. En la capa de revestimiento alrededor de los pocillos que contenían células que no producían la sustancia, no tiene lugar la unión entre una sustancia producida y la sustancia de unión. Un período de cultivo excesivamente largo de resulta en una excesiva amplia difusión de la sustancia producida en ocasiones, por lo que es difícil especificar a aquellos pocillos que contienen las células que producen la sustancia producida. El período de cultivo es deseable determinarlo adecuadamente dentro de un intervalo que permita la especificación lista de esos pocillos que contienen las células que producen la sustancia producida.

Etapa 3)

Una vez que el cultivo ha finalizado, después de retirar opcionalmente el caldo de cultivo, una sustancia marcadora que se une específicamente a la sustancia producida por las células diana presentes entre las células de muestra se introduce en la capa de revestimiento. La sustancia producida por las células diana se dispersa durante el cultivo, uniéndose a la sustancia de unión que constituye la capa de revestimiento. Mediante la alimentación de una sustancia marcadora en esta etapa, la sustancia marcadora se une a la sustancia producida que se ha unido a la capa de revestimiento, o se une a la capa de revestimiento que no ha sido bloqueada por la sustancia producida unida a la capa de revestimiento. En el primer caso, la sustancia marcadora a veces se une a la sustancia producida. En este último caso, la sustancia marcadora no se une a la sustancia producida, sino a la sustancia de unión que constituye la capa de revestimiento. Este punto se describe con detalle más adelante.

Antes de alimentar la sustancia marcadora, es deseable eliminar el caldo de cultivo. Cuando las células contenidas en los pocillos son células productoras de inmunoglobulina, por ejemplo, grandes cantidades de anticuerpos se secretan en el caldo de cultivo. Cuando se añade el anticuerpo anti-inmunoglobulina, por ejemplo, termina la unión al anticuerpo en el caldo de cultivo antes de que se una al anticuerpo en la superficie del chip, y puede impedir la detección del anticuerpo unido a la superficie del chip. Sin embargo, hay casos en los que la detección puede llevarse a cabo sin problema mediante la combinación de células y sustancias de unión, incluso cuando la sustancia marcadora se introduce en la capa de revestimiento sin necesidad de retirar el caldo de cultivo.

Etapa 4)

La sustancia producida por la célula diana que se ha unido a la sustancia en la capa de revestimiento se detecta por medio de la sustancia marcadora y se especifica la célula diana. La sustancia marcadora se une a la sustancia producida que se ha unido a la capa de revestimiento. En consecuencia, es posible especificar la célula (célula diana) que produce la sustancia producida que se une a la capa de revestimiento mediante la detección de la sustancia marcadora.

Cuando la sustancia marcadora es una sustancia que se une específicamente a la sustancia producida, la sustancia marcadora se une a la sustancia producida que se ha difundido de los pocillos en la capa de revestimiento alrededor de los pocillos, alcanzada la capa de revestimiento, y unida a la sustancia que se une que constituye la capa de revestimiento. Se detecta esta sustancia marcadora unida. Además, no hay unión de la sustancia producida y la sustancia de unión en la capa de revestimiento alrededor de los pocillos en los que no se produce ninguna sustancia. Por lo tanto, no hay unión de la sustancia marcadora y no se detecta sustancia marcadora.

Cuando la sustancia marcadora es una sustancia que se une específicamente a la sustancia de unión, la sustancia producida que se ha difundido de los pocillos en la capa de revestimiento alrededor de los pocillos, que alcanza la capa de revestimiento y se une a la sustancia de unión que constituye la capa de revestimiento, bloquea la unión de la sustancia marcadora y la sustancia de unión. Además, no hay unión de la sustancia producida y la sustancia de unión en la capa de revestimiento alrededor de los pocillos en los que no se ha producido la sustancia producida. Por lo tanto, la unión de la sustancia marcadora y la sustancia de unión no está bloqueada y la sustancia marcadora se une. En este caso, no se detecta ninguna sustancia marcadora en los pocillos en los que la sustancia producida se ha producido, distinguiéndolos de los pocillos en los que se detecta la sustancia marcadora.

Cuando la sustancia marcador es un marcador fluorescente, por ejemplo, las células diana se pueden especificar con un microscopio de fluorescencia, escáner de imágenes fluorescentes, lector de imágenes o similar.

En las realizaciones descritas más adelante, se emplean principalmente chips con pocillos regulares de forma hexagonal (abajo a la izquierda en la Fig. 1). En este caso, la señal se propaga en casi formas de círculo concéntrico (parte superior izquierda de la Fig. 1). Sin embargo, como se indica en la parte inferior derecha de la figura 1, cuando se forma en un pocillo hexagonal regular una incisión diagonal, el anticuerpo o similar que se produce también se extiende en la dirección de la hendidura, produciendo una forma tal como el sistema de la Vía Láctea que se muestra en la parte superior derecha de la figura. 1. De esta manera, la señal de la sustancia mrcadora obtenida a través del producto varía en la forma basada en la forma del pocillo.

Cuando la sustancia marcadora es una sustancia que se une específicamente a la sustancia producida (1)

Cuando las células de muestra contenidas en los pocillos incluyen células productoras de inmunoglobulina, el cultivo de las células da como resultado la producción de inmunoglobulina. Mediante el uso de una capa de revestimiento con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o antígeno como la sustancia de unión, la inmunoglobulina que se produce

se une a la capa de revestimiento y la inmunoglobulina, que se ha producido y se ha unido a la capa de revestimiento, se puede detectar utilizando un anticuerpo para la inmunoglobulina o un antígeno. Alrededor de los pocillos que contenían células que no producían inmunoglobulina, es decir, en torno a los pocillos que contenían células que no producen inmunoglobulina cuando son estimulados con el antígeno que se ha proporcionado, no hay inmunoglobulina que se haya difundido de los pocillos. Estos pocillos se pueden distinguir de los pocillos que contienen células que producen inmunoglobulina. De esta manera, es posible especificar las células diana en forma de células productoras de inmunoglobulinas específicas de antígeno.

Una descripción más específica se le dará usando la figura. 2.

(A) Se vierten células que secretan anticuerpo en los pocillos individuales de un chip de matriz de micropocillos de silicio a la superficie de la cual se ha unido el anticuerpo anti-inmunoglobulina (Ig).

(B) Las células se cultivan, haciéndolas que secreten el anticuerpo. El anticuerpo que es secretado por las células se une al anticuerpo anti-Ig alrededor de los pocillos.

(C) Cuando se añade el antígeno marcado con fluorescencia, el antígeno se une al anticuerpo específico de antígeno que ha sido atrapado alrededor de los pocillos.

(D) La observación por microscopia de fluorescencia, escaneado, o similar revela que el anticuerpo específico de antígeno se ha extendido con forma de rosquilla alrededor de los pocillos.

Cuando la sustancia marcadora es una sustancia que se une específicamente a la sustancia producida (2)

Cuando las células de muestra contenidas en los pocillos incluyen células productoras de citoquinas, el cultivo de las células da como resultado la producción de citoquinas. Mediante el uso de una capa de revestimiento con un anticuerpo anti-citoquina o un receptor de citoquinas como sustancia de unión, la citoquina que se produce se une a la capa de revestimiento y la citoquina, que ha sido producida y unida a la capa de revestimiento, se puede detectar utilizando un anticuerpo para la citoquina o un receptor de citoquinas. Alrededor de los pocillos que contenían células que no producen citoquinas, es decir, los pocillos que contenían células que no producen citoquinas cuando son estimuladas con el antígeno que se ha proporcionado, no se difunden citoquinas desde los pocillos. Estos pocillos se pueden distinguir de los pocillos que contienen células que producen citoquinas. De esta manera, es posible especificar las células diana en forma de células productoras de citoquinas.

Cuando la sustancia marcadora es una sustancia que se une específicamente a la sustancia de unión

Cuando las células de muestra contenidas en los pocillos incluyen células productoras de inmunoglobulina, el cultivo de las células da como resultado la producción de inmunoglobulina. Mediante el uso de una capa de revestimiento con un receptor de citoquina o un receptor como la sustancia de unión, una parte de la inmunoglobulina que se produce se une a la capa de revestimiento, y la porción de inmunoglobulina que se ha producido y se ha unido a los bloques de la capa de revestimiento de unión del receptor de citoquina o receptor frente a la sustancia marcadora en forma de una citoquina o un ligando. La sustancia marcadora no se une alrededor de los pocillos que contienen células productoras de inmunoglobulina. Alrededor de los pocillos que contenían células que no producen inmunoglobulina, es decir, los pocillos que contenían células que no producen inmunoglobulina cuando está excitado con el antígeno que se ha proporcionado, ninguna inmunoglobulina se dispersa de los pocillos y no se bloquea la unión del receptor de citoquina o receptor a la citoquina o ligando. Alrededor de los pocillos que contienen células que producen inmunoglobulina que no se une a un receptor de citoquinas o receptor, y alrededor de los pocillos que contienen células productoras de inmunoglobulina que se unen a un receptor de citoquinas o a un receptor, pero no se bloquea la unión entre el receptor de citoquina o el receptor y la citoquina o ligando, la inmunoglobulina de difusión de los pocillos se une, pero no se bloquea la unión del receptor de citoquina o del receptor de citoquina o el ligando. Tales pocillos se pueden distinguir de los pocillos que contienen células productoras de inmunoglobulina. Las células diana en forma de células productoras de inmunoglobulinas específicas de antígeno de este modo se pueden especificar.

Se describirá el método anterior basado en la fig. 3.

(A) Un receptor se reviste sobre la superficie del chip.

(B) Se añaden las células que secretan anticuerpos a los pocillos y se cultivan. El anticuerpo que es secretado se difunde. El anticuerpo específico de receptor se une al receptor alrededor de los pocillos.

(C) Cuando el anticuerpo que se ha unido al receptor se une a un sitio de unión al ligando, el ligando marcado con fluorescencia no puede unirse al receptor.

(D) Cuando el anticuerpo que se ha unido al receptor se une a algo más que un sitio de unión al ligando, el ligando marcado con fluorescencia es capaz de unirse al receptor.

[Método para aislar células diana]

La presente invención incluye un método para aislar células diana de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende la recuperación de los pocillos de las células diana que se han identificado por el método de selección descritos anteriormente de la presente invención. Las células diana pueden ser células productoras de inmunoglobulinas específicas o células específicas productoras de citoquinas.

- 5 La presente descripción permite la preparación de una proteína de anticuerpo específico de antígeno mediante la recuperación de un gen de inmunoglobulina específica de antígeno de una célula diana recuperada, que expresa cADN de anticuerpo y la preparación de una proteína anticuerpo específico de antígeno. Además, el ARNm de un gen receptor de células T expresadas por una célula que ha producido una citoquina se puede recuperar y el cADN del receptor de células T se puede recuperar y se introduce en otra célula para expresar una proteína del receptor de células T.

Realizaciones

La presente invención se describe con mayor detalle a continuación sobre la base de realizaciones. Se describirá un ejemplo de la preparación de un chip de matriz de micropocillos.

Ejemplo de preparación 1

- 15 Se describirá un ejemplo de preparación que emplea una placa base de silicio. La figura 4-1 es un ejemplo de un chip de matriz de micropocillos basado en el ejemplo de preparación 1. Ejemplos de las etapas de preparación se muestran en la Fig. 4-2.

(1) Se forma una película de óxido 1-a sobre una placa base de silicio 1-b.

- 20 (2) Una resina fotosensible 1-c, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón.

(3) La película de óxido 1-a que se expone a través de la resina fotosensible 1-c se graba con ácido fluorhídrico tamponado.

(4) Los pocillos 1-d, que tienen de 10 a 20 micras de profundidad se forman por ataque químico en seco o por grabado húmedo. La fotorresistencia 1-c se elimina adecuadamente basada en el método de grabado.

- 25 (5) La superficie se trata con el cebador de modo que los anticuerpos se unen de manera uniforme. Por ejemplo, se utiliza un tratamiento de sililación para formar grupos sililo 1-e en la superficie y las paredes interiores de los pocillos. Hay varios materiales y métodos que se pueden emplear en este tratamiento; que no están limitados por el tratamiento empleado en el presente ejemplo de preparación.

(6) La detección de células que secretan anticuerpo se lleva a cabo basado en la presente invención.

30 Ejemplo de preparación 2

Para controlar más claramente los anticuerpos que son secretados por las células, es posible proporcionar particiones alrededor de los pocillos. La figura 5-1 muestra la apariencia externa de una partición tal y la Fig. 5-2 muestra un ejemplo de preparación.

(1) Se forma una capa de óxido 2-a sobre una placa base de silicio 2-b.

- 35 (2) Una resina fotosensible 2-c, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón.

(3) La película de óxido 2-a que se expone a través de la resina fotosensible 2-c se graba con ácido fluorhídrico tamponado.

- 40 (4) Las resinas fotosensibles 2-c se retiran y se fabrican muescas 2-D que son de 1 a 5 micras de profundidad por ataque químico.

(5) Una resina fotosensible 2-e, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica de nuevo en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón. Cuando las muescas son profundas, se puede emplear una resina negativa, tal como OMR-85 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd.

(6) Los pocillos 2-f que tienen de 10 a 20 micras de profundidad se forman con un grabador seco.

- 45 (7) La superficie se trata con el cebador de modo que los anticuerpos se unen de manera uniforme. Por ejemplo, se utiliza un tratamiento de sililación para formar grupos sililo 2-g en la superficie y las paredes interiores de los pocillos. Hay varios materiales y métodos que se pueden emplear en este tratamiento; que no están limitados por el tratamiento empleado en el presente ejemplo de preparación.

(8) La detección de células que secretan anticuerpo se lleva a cabo basado en la presente invención. En el presente ejemplo, dado que las paredes se forman alrededor de los pocillos para inhibir la difusión de los anticuerpos, la confusión debida a la difusión de los anticuerpos se inhibe, lo que facilita la identificación de la imagen.

5 La figura 5-3 muestra el resultado de una prueba del presente ejemplo de preparación.

Ejemplo de preparación 3

Al aumentar el área de superficie alrededor de los pocillos, es posible observar con mayor precisión los anticuerpos que se secretan. El área de superficie se puede aumentar mediante la formación de una estructura de silicio porosa o una estructura desigual, por ejemplo. La publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. Heisei 6-21509, por ejemplo, describe un método para la preparación de silicio poroso. Una estructura desigual se puede preparar por ataque químico, deposición de vapor o similares. La figura 6-1 muestra la apariencia externa de la misma, y la fig. 6-2 muestra un ejemplo de obtención de la misma.

(1) Una película de óxido 3-a se forma en la placa base de silicio 3-b.

15 (2) Una resina fotosensible 3-c, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón.

(3) La película de óxido 3-a que se expone a través de la resina fotosensible 3-c se graba con ácido fluorhídrico tamponado.

20 (4) Para aumentar el área superficial de las aberturas en las partes expuestas, puede ser fabricada una estructura porosa 3-d, por ejemplo. La estructura porosa se forma por el tratamiento de conversión química del ánodo o similares. También se puede fabricar una nanoestructura en la superficie con una mezcla de ácido fluorhídrico y ácido nítrico.

(5) Una resina fotosensible 3-e, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica de nuevo en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón. Se utiliza grabado en seco para formar pocillos 3-f que tienen de 10 a 20 micras de profundidad.

25 (6) La superficie es tratada con el cebador de modo que los anticuerpos se unen de manera uniforme. Por ejemplo, se utiliza un tratamiento de sililación para formar grupos sililo 3-g en la superficie y las paredes interiores de los pocillos. Hay varios materiales y métodos que se pueden emplear en este tratamiento; que no están limitados por el tratamiento empleado en el presente ejemplo de preparación.

30 (7) La detección de células que secretan anticuerpos se lleva a cabo basado en la presente invención. En el presente ejemplo, puesto que el área de superficie aumenta alrededor de los pocillos y ya que se aumenta la densidad de los enlaces marcados con fluorescencia, se facilita la identificación de la imagen de fluorescencia.

Ejemplo de preparación 4

Al causar que el anticuerpo se una de manera localizada solamente alrededor de los pocillos, es posible observar la secreción de anticuerpos con más claridad. En el presente método, una sustancia que sirve como medio para provocar que el anticuerpo se una solamente alrededor de los pocillos puede ser lograda por la terminación usando un patrón o similar. La apariencia externa de la misma se muestra en la Fig. 7-1, y un ejemplo de preparación se muestra en la Fig. 7-2. Una película de óxido 4-a se forma sobre un sustrato de silicio 4-b.

(1) Una resina fotosensible 4-c, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd. se aplica en la placa base y se utiliza un dispositivo de exposición para transferir un patrón.

40 (2) La película de óxido 4-a que se expone a través de la resina fotosensible 4-c se graba con ácido fluorhídrico tamponado.

45 (3) La superficie es tratada con el cebador de modo que los anticuerpos se unen de manera uniforme. Por ejemplo, la superficie se termina con un agente de acoplamiento de silano en forma de hexametildisilazano o similares. Hay varios materiales y métodos que se pueden emplear en este tratamiento; que no están limitados por el tratamiento empleado en el presente ejemplo de preparación.

(4) Una resina fotosensible 4-e, tal como OFPR-800 de Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd., se aplica sobre la misma.

50 (5) Un patrón de unión de anticuerpo se forma en la fotorresina 4-e con un dispositivo de exposición. La dimensión del patrón de unión del anticuerpo, que es mayor que los pocillos, es de 1 micrómetro a 1/2 entre los pocillos adyacentes.

(6) Las fotorresinas 4-e se procesan en un patrón de pocillo con un dispositivo de exposición.

(7) Se utiliza grabado en seco para formar pocillos 4-f que tienen de 10 a 20 micras de profundidad en el patrón del pocillo. En el curso de los pocillos que forman, la sustancia 4-d que se une al anticuerpo que no está protegida por la sustancia fotorresistente 4-e se elimina simultáneamente. También se puede quitar con plasma de oxígeno o similares.

5 (8) Las fotorresinas 4-e se eliminan con un disolvente orgánico tal como acetona. Dado que la sustancia que se une a los anticuerpos sólo está presente alrededor de los pocillos, el rango de la unión del anticuerpo puede ser localizado.

10 (9) Las etapas anteriores pueden simplificarse mediante el empleo de un agente de acoplamiento de silano fotosensible. En concreto, después de realizar el procesamiento de acuerdo con el Ejemplo de Preparación 1, el agente de acoplamiento de silano fotosensible se aplica y se forma en un patrón deseado por la exposición a la luz para lograr los mismos resultados que en el presente ejemplo de preparación.

15 Se sembró anticuerpo marcado con fluorescencia en un chip de matriz de micropocillos producido de acuerdo con el presente ejemplo de preparación. El estado de unión observado se muestra en la Fig. 7-3. La unión de anticuerpos se observó solamente en porciones alrededor de los pocillos. Además, el presente ejemplo de preparación se caracteriza por que la superficie de unión del anticuerpo se formó solamente alrededor de los pocillos; hay varios métodos para lograr esto. También es posible emplear la serie Dix o similar hecho por Kishimoto Sangyo Co., Ltd. Forma grupos amino en la superficie de resina poliparaxilileno. La misma superficie de unión se puede realizar como en el presente ejemplo de preparación. El mismo efecto se puede conseguir también mediante la formación de una película que tiene un efecto que es inverso de él de la imprimación para la unión del anticuerpo en porciones
20 distintas de la superficie de unión del anticuerpo, cuando sea necesario. Un ejemplo es Biosurfine, fabricado por Toyo Gosei Co., Ltd.

Método de tratamiento de la superficie (Fig. 8)

Un tratamiento de superficie se lleva a cabo por el método siguiente para causar que el anticuerpo anti-Ig se una de manera uniforme.

25 1. La suciedad, tal como el aceite, en la superficie de la placa base 5-a se retira. La suciedad se elimina, por ejemplo, mediante la limpieza con un disolvente orgánico, ácido y alcalino, o mediante la limpieza en seco con plasma de oxígeno o similares. El material de la placa base se puede seleccionar adecuadamente sobre la base de la suciedad.

30 2. Para aumentar la densidad de la unión de la superficie del cebador que se une a la placa base y un anticuerpo, por ejemplo, también es posible formar grupos hidroxilo 5-b que sustituyen a la imprimación en la superficie de la placa base. Para formar grupos hidroxilo en la superficie de la placa base y eliminar las micropartículas de la superficie, se lleva a cabo un lavado con aproximadamente 1 por ciento de agua de amoniaco. A continuación, se realiza un enjuague a fondo con agua. En el caso del silicio, basta con sustituir a éste con SC-1 que limpia en la limpieza de RCA. Sin embargo, el punto 2 se puede omitir si la formación de una superficie adecuada para la unión del cebador imprimación adecuado se puede lograr en 1.

35 3. El cebador 5-c se une a la superficie. Se sumerge en un agente de acoplamiento de silano o similar, y adecuadamente se sustituye con grupos hidroxilo en la superficie. El cebador es, por ejemplo, hexametildisilazano, que hace que la superficie sea hidrófoba. Hay varios materiales de cebadores y métodos que pueden emplearse en este tratamiento; que no se limitan al agente de tratamiento superficial empleado en el presente ejemplo de preparación.

40 El cebador se caracteriza principalmente por ser un agente de acoplamiento de silano o un agente de sililación, y por la unión del material orgánico al material inorgánico. Se emplea como agente modificador de la superficie y produce una superficie hidrófoba. En los semiconductores, son principalmente empleados materiales tipificados por hexametildisilazano. Es necesario que la imprimación se pueda seleccionar adecuadamente sobre la base del material de la placa base. Ejemplos de ello son los agentes de acoplamiento de silano y los agentes de sililación vendidos por Shin-Etsu Silicone.

45 El cebador puede ser revestido por una variedad de métodos. La inmersión, el revestimiento por rotación, la difusión con gas, burbujeo con N₂ y similares, son todos posibles. Es necesario seleccionar el método más adecuado para el material. Por ejemplo, en el caso de difusión con gas, la implementación es posible por la exposición a una atmósfera de imprimación vaporizada en un recipiente herméticamente sellado durante 5 a 10 minutos.

50 La matriz de chips de micropocillos del presente ejemplo de preparación no está limitada al silicio y se puede formar a partir de resina, metal, vidrio o similares. No tiene que tener la forma de un solo material, sino que puede tener forma de una película formada en una placa base.

55 Ejemplos de resinas son acrílico, polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo, ABS, poliuretano, resina epoxi, resinas termoendurecibles, resinas de fotocurado y resinas foto-solubles. Estas resinas pueden ser moldeadas por inyección, compresión, termoendurecimiento, fotocurado, grabado en seco y similares. También puede llevarse a

cabo el moldeo mediante la formación de una película de resina sobre un vidrio, silicio o la placa base de metal. La superficie de una resina que ha sido moldeada en forma de micropocillos puede ser tratada con la imprimación de la misma manera que el silicio se une a los anticuerpos. Por ejemplo, esto puede ser realizado por el método de tratamiento de la superficie que se describe en la presente invención. Mediante el uso de un cebador fotosensible, es posible formar un patrón de unión del anticuerpo de la misma manera que en el silicio. En este ejemplo, el cebador empleado se selecciona adecuadamente mientras que se tenga en cuenta también sus propiedades de unión a los materiales de resina. Si la resina en sí funciona para acoplar el anticuerpo a la superficie de la misma y es capaz de la unión de anticuerpos, se puede lograr una reducción aún mayor en el costo.

Los ejemplos de metales son el aluminio, las aleaciones de aluminio, aleaciones de cobre, oro y acero inoxidable. Estos metales pueden ser moldeados por moldeo en moldes de metal, grabado y similares. También puede llevarse a cabo el moldeo mediante la formación de una película metálica sobre un vidrio, silicio o placa base de metal. Una superficie de metal que ha sido moldeada con forma de micropocillos puede ser tratada con la imprimación de la misma manera que el silicio se une a los anticuerpos. Por ejemplo, esto puede ser realizado por el método de tratamiento de la superficie que se describe en la presente invención. En este ejemplo, el cebador empleado se selecciona adecuadamente mientras que se tengan en cuenta también sus propiedades de unión a los materiales metálicos.

Los micropocillos se pueden formar de vidrio por ataque químico. Además, se puede formar una película de resina, silicio o de metal en la superficie para formar micropocillos. La superficie de un metal que ha sido moldeado en forma de micropocillos puede ser tratada con la imprimación de la misma manera que el silicio se une a los anticuerpos. Por ejemplo, esto puede ser realizado por el método de tratamiento de la superficie que se describe en la presente invención. En este ejemplo, la imprimación empleada se selecciona adecuadamente mientras que se tenga en cuenta también su propiedad de unión al vidrio y los materiales de superficie de película que forma.

En las realizaciones siguientes, se emplearon chips de silicio de la matriz de pocillos fabricada de acuerdo con el Ejemplo de Preparación 1. Sin embargo, la forma de la superficie de los pocillos de los chips empleados en las realizaciones era hexagonal (redonda en el ejemplo de preparación 1).

Forma de realización 1

Método experimental (Protocolo I)

1. [Aplicación de un revestimiento sobre un chip de IgG anti-humana] Una cantidad de 80 μ l de IgG anti-humana que se había diluido con PBS a 10 μ g/ml se añadió a una matriz de chips de micropocillos de silicio que había sido tratada con un agente de acoplamiento de silano; el chip se colocó en una caja de conservación de la humedad (Fig. 9) para mantener la humedad del chip de modo que la solución en el chip no se secase y el chip se dejó en reposo durante una hora a temperatura ambiente (de 15 a 25°C) para hacer que el anticuerpo anti-IgG se uniera a la superficie del chip de silicio. En este caso, en contraste con la etapa 2 siguiente, se llevó a cabo sin desgasificación por reducción de la presión. El anticuerpo no entró en los pocillos, pero se distribuyó alrededor de los pocillos. (Posteriormente, mientras se incubó, el chip se mantiene constantemente en la caja de conservación de la humedad para evitar que se reseque.)

2. [Bloqueo] La solución de anticuerpo fue retirada del chip; se añadieron 100 μ l de PBS para el chip y luego se retiraron en una operación de limpieza que se repitió tres veces. Posteriormente, 100 μ l de PBS que contenían 0,2 por ciento (v/v) Lipidure (NOF Corporation, BL-B03 Lipidure (5 por ciento en peso)) se añadieron al chip y se utilizó una bomba de vacío para generar un vacío para eliminar completamente las burbujas en los micropocillos, cubriendo de este modo la superficie del chip y rellenando el interior de los pocillos con solución Lipidure. El chip se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) para llevar a cabo el bloqueo.

3. [Adición de células] El chip se lavó tres veces con 100 μ l de RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS. Se añadieron al chip células X63/116 (secretoras de IgG humana en respuesta al antígeno de la hepatitis B de superficie del virus (antígeno HBs)) o células HyHEL10 110TC (secretoras de anticuerpo quimérico de ratón / humano en respuesta a la lisozima de huevo de gallina (HEL)), que habían sido lavadas dos veces con medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS y el chip se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos para que las células entraran en los pocillos.

4. [Cultivo de las células] Las células que no habían entrado en los pocillos se eliminaron lavando varias veces con RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS (hasta que todas las células excedentes habían sido eliminadas). Una cantidad de 80 μ l de medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS se añadió en el chip, el chip se colocó en una incubadora de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂) y las células se cultivaron en el chip entre 2 y 3 horas.

5. [Unión a antígeno marcado con biotina] Mientras se tenía cuidado de evitar que las células salieran de los pocillos, el tampón fue retirado de la superficie del chip, se añadieron aproximadamente 100 μ l de PBS a la superficie del chip y luego se retiraron y se repitió esta operación varias veces para limpiar el chip. Posteriormente,

se añadió una cantidad 80 ml de 1 mg/ml de HEL marcado con biotina o antígeno de HBs marcado con biotina para el chip y el chip se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5 6. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 5, se añadieron al chip 80 μ l de estreptavidina marcada con Cy3 (Sigma, S-6402) compuesta de una dilución 1000 veces de la solución original y el chip del mismo modo se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 5, se añadió PBS al chip, la fluorescencia de la Cy3 se observó por microscopía de fluorescencia, y las posiciones de los pocillos que contenían células secretoras de anticuerpo específico de antígeno se determinaron en base a la difusión de fluorescencia Cy3 en forma de anillos de espuma alrededor de los pocillos (Fig. 10).

10 8. Se añadió una cantidad de 80 μ l de 1 mg / ml de Oregon verde al chip y el chip se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente para marcar las células con Oregon verde. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 5, se añadió al chip PBS fresco. Mientras se observaban las células por medio de la fluorescencia del verde Oregon como indicador, las células diana que fueron secretoras de anticuerpos específicos de antígeno se recuperaron con un micromanipulador.

15 Identificación de células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno en un chip de matriz de micropocillos por el método de la presente invención (método FLISPOT)

20 Se cultivaron células HyHEL10 110TC, células X63/116, y células 110TC (control negativo, no secretan anticuerpo) en los chips de matriz de los micropocillos de silicio revestidos con anticuerpo anti-IgG. Se detectó la secreción de anticuerpo específico de antígeno con HEL marcado con biotina o antígeno HBs marcado con biotina y estreptavidina marcada con Cy3 (Fig. 11A). Como se indica en la figura 11A, el anticuerpo que se había secretado se detectó en forma de anillos de espuma alrededor de los pocillos. En el chip el cual 110TC, que no secretaba anticuerpo, se había añadido, no se detectó señal. A continuación se utilizó Oregon verde para teñir las células y se confirmaron las células (Fig. 11 B).

25 La tinción fue específica para el antígeno. En el chip al cual se habían añadido células HyHEL10 110TC, se detectó una señal con HEL marcado con biotina, pero no se detectó señal con el antígeno HBs marcado con biotina. Por el contrario, en el chip al cual se habían añadido células X63/116, no se detectó ninguna señal con HEL marcado con biotina, pero se detectó una señal con el antígeno HBs marcado con biotina (los datos no se dan).

Identificación de hibridomas que secretan anticuerpos específicos de antígeno por el método FLISPOT (aplicando el protocolo I)

30 Se prepararon células de bazo de ratones BALB/c que habían sido inmunizados con la proteína HEL. Estas células se fusionan por el método usual empleando polietilenglicol con células de mieloma X63.Ag8.653 para crear hibridomas. Los hibridomas se seleccionaron con medio de selección HAT y después se añadieron a un chip de matriz de micropocillos que se había revestido con un anticuerpo anti-IgG de ratón. Las células que no entraron en los pocillos se eliminaron por lavado, después de lo cual se cultivaron las células en el chip durante 1 hora y 30 minutos. Los hibridomas que secretan anticuerpos a frente HEL fueron detectados utilizando HEL marcado con biotina y estreptavidina marcada con PE (Fig. 11A). Después, se añadió Oregon verde para determinar la posición de las células (Fig. 11 B). (Figura 11 c). Una combinación de A y B.

Realización 2

Método experimental (Protocolo II)

40 Preparación de células CD138 positivas de ratón (células que secretan anticuerpo)

1. Se prepararon células de bazo de ratón.

2. El anticuerpo CD138 anti-ratón se añadió a una suspensión de células de 100 μ l en una cantidad de $<1 \mu$ g por 10^6 células y las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C.

45 3. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS y después se suspendieron en 100 μ l de PBS. A la suspensión celular se añadió entonces microperlas unidas al anticuerpo de cadenas κ (kappa) anti-rata en una cantidad de $<1 \mu$ g por 10^6 células y las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C.

4. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS y después se suspendieron en 1000 μ l de PBS. Las células CD138 positivas fueron recuperadas con un AutoMACS.

Preparación de células positivas CD138 humanas

50 1. Fueron separados linfocitos de sangre periférica humana por un método establecido (el método de centrifugación por gravedad específica empleando Ficoll).

2. Se añadió reactivo de bloqueo del receptor de Fc (Miltenyi Biotec Co., Ltd.) en una cantidad de 20 μ l por cada 10^7 células, seguido de microperlas unidas al anticuerpo anti-CD138 en una cantidad de <1 μ g por 10^6 células y las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C.

3. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS y se suspendieron en 1000 μ l de PBS. Las células CD138 positivas fueron entonces recuperadas con un AutoMACS.

Método experimental (protocolo II, continuación)

1. En las pruebas siguientes, las mismas medidas fueron adoptadas para la prevención de secado como en el protocolo I en el curso de la incubación.

2. A una matriz de chip de silicio de micropocillos que habían sido tratados con un agente de acoplamiento de silano se añadieron 80 μ l de anticuerpo IgG diluido en PBS 10 mg derivado de burro/ml anti-cabra. El chip se colocó en una caja de conservación de la humedad (Fig. 1) de modo que la solución en el chip no se secase y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente (15-25°C) para hacer que el anticuerpo de IgG anti-cabra derivado de burro se una a la superficie del chip de silicio.

3. La solución de anticuerpo se eliminó del chip, el chip se lavó tres veces con 100 μ l de PBS, 100 μ l de PBS que contenía 0,2 por ciento (v/v) de Lipidure (NOF Corporation, BL-B03 Lipidure (5 por ciento en peso)) se añadieron al chip y un vacío fue generado para eliminar las burbujas en los pocillos, cubriendo de este modo la superficie del chip y rellenando el interior de los pocillos con solución Lipidure. El chip se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo el bloqueo.

4. El chip se lavó tres veces con 100 μ l de RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS. Se añadieron al chip células secretoras de anticuerpos positivos CD138 (de 1 a 2 x 10^6 células suspendidas en 30 μ l de PBS) que se habían lavado una vez con 10 ml de PBS y el chip se dejó en reposo durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que las células entren en los pocillos.

5. Las células que no habían entrado en los pocillos se eliminaron por lavado con RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS. Una cantidad de 80 μ l de 10 mg/ml de IgG derivado de cabra anti-humano (o de ratón) se añadió a continuación al chip y el chip se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente para producir el anticuerpo que se une al anticuerpo de IgG de cabra derivado de burro en la superficie del chip.

6. El chip se lavó con medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento FCS, teniendo cuidado de evitar que las células salieran de los pocillos. A continuación, se añadió una cantidad de 80 μ l de medio RPMI 1040 que contenía 10 por ciento de FCS al chip y las células se cultivaron durante 3 horas en un incubador de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂).

7. Las etapas subsiguientes en la forma de la etapa 5 y más allá en el Protocolo I, se llevaron a cabo a continuación.

Detección de células que secretan anticuerpo-HEL específica entre las células de bazo de ratón inmunizados con HEL por el método de la presente invención (método FLISPOT)

Se prepararon células CD138 positivas de las células de bazo de ratones BALB/c que habían sido inmunizados con la lisozima de huevo de gallina (HEL). Se añadieron las células a un chip de matriz de micropocillos de silicio al que el anticuerpo IgG anti-cabra derivado de burro se habían unido según el protocolo II. Posteriormente, el anticuerpo IgG anti-ratón derivado de cabra se une al chip de acuerdo con el protocolo y las células se cultivaron durante aproximadamente 3 horas. Posteriormente, se añadieron HEL marcado con biotina y estreptavidina marcada con Cy3 y las células que secretaban los anticuerpos IgG-HEL específicos se detectaron mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 12). Posteriormente, las células se recuperaron con un micromanipulador y se amplificó el gen del anticuerpo. De los siete IgG preparados, seis se unieron a HEL (los datos no se dan).

Detección de células secretoras de anticuerpos específicos de HBs entre los linfocitos de sangre periférica humana por el método de la presente invención (método FLISPOT)

Fueron preparadas células CD138 positivas por el protocolo II de sangre periférica humana sana que había sido reforzada con vacuna de antígeno HBs. Se añadieron las células CD138 positivas a un chip de microplaca de silicio al que el anticuerpo IgG anti-cabra derivado de burro había sido unido por el Protocolo II. Posteriormente, el anticuerpo IgG anti-humano derivado de cabra se une al chip de acuerdo con el protocolo y se cultivaron las células durante aproximadamente 3 horas. A continuación se añadieron el antígeno HBs marcado con biotina y la estreptavidina marcada con Cy3 y las células que secretaban anticuerpo de IgG específico del antígeno HBs se detectaron mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 13).

Los voluntarios, de los que se obtuvo el consentimiento informado, fueron inoculados con la vacuna contra HBs, se extrajeron 100 ml de sangre el día 7, se seleccionaron las células CD138 positivas a partir de linfocitos de sangre periférica obtenida de esta sangre y estas células se sembraron en una placa que se había sido revestido con IgG

anti-humana. Las células se cultivaron, después de lo cual se detectaron células HBs específicas secretoras de anticuerpos utilizando antígeno HBs marcado con biotina y estreptavidina marcada con Cy3. Las células se recuperaron de un total de 24 pocillos. Se detectaron de manera similar células HBs específicas secretoras de anticuerpos a partir de linfocitos de sangre periférica obtenidos mediante la extracción de 100 ml de sangre el día 8 después de la vacunación con HBs y las células se recuperaron de 57 pocillos. A partir de estas células, se prepararon 53 pares de cadena H de anticuerpo y ADNc de cadena L. El ADNc se combina en un vector de expresión, los pares de la cadena H y de la cadena L se introdujeron en el genoma de las células 293T (una cepa celular derivada de riñón humano fetal) y se recuperó el sobrenadante del cultivo. Tanto si el anticuerpo que se había secretado o no en el sobrenadante unido al antígeno HBs se analizó por ELISA. Como resultado, se produjeron 41 proteínas de anticuerpos, de las cuales 36 eran específicas del antígeno HBs.

Realización 3

Método experimental (Protocolo III)

1. Una cantidad de 80 μ l de antígeno (proteína HEL) que había sido diluida con PBS a 10 μ g/ml se añadió a una matriz de chips de silicio de micropocillos que había sido tratada con un agente de acoplamiento de silano. El chip se coloca en una caja de conservación de la humedad (Fig. 9) de modo que la solución en el chip no se secase. El chip se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente (15-25°C) para hacer que la proteína HEL se una a la superficie del chip de silicio. (Cada vez que el chip se incubaba posteriormente, se colocaba en esta caja para evitar que se secase.)

2. La solución de antígeno se retiró del chip y el chip se lavó tres veces con 100 μ l de PBS. Se añadió al chip una cantidad de 100 μ l de PBS que contenía 0,2 por ciento (v/v) de Lipidure (NOF Corporation, BL-B03 Lipidure (5 por ciento en peso)) y un vacío fue generado para eliminar las burbujas en los pocillos, cubriendo de este modo la superficie del chip y rellenando el interior de los pocillos con solución Lipidure. El chip se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo el bloqueo.

3. Se prepararon células CD138 positivas de acuerdo con el protocolo II a partir de células de bazo de ratón inoculados con HEL.

4. El chip se lavó con medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS, después de lo cual las células CD138 positivas (de 1 a 2 x 10⁶ células suspendidas en 30 μ l de PBS) que se habían lavado una vez con 10 ml de PBS se añadieron al chip. A continuación, el chip se dejó en reposo durante unos 10 minutos para permitir que las células entraran en los pocillos.

5. Se separaron las células que no habían entrado en los pocillos por lavado con RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS, después de lo cual se añadieron 80 μ l de RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS al chip. A continuación, el chip se colocó en una incubadora de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂) y las células se cultivaron durante 3 horas en el chip.

6. Teniendo cuidado de no causar que las células salieran de los pocillos, se eliminó el tampón en la superficie del chip, se añadió 100 μ l de PBS a la superficie del chip y esta operación se repitió varias veces para limpiar el chip. Posteriormente, 80 μ l de 1 mg marcados con Cy3/ml de anti-IgG de ratón se añadieron al chip y el chip se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7. Un chip idéntico al de 6 se lavó con PBS, se añadió PBS al chip y la fluorescencia de la Cy3 se observó por microscopía de fluorescencia para determinar las posiciones de los pocillos que contenían las células que fueron secretoras de anticuerpos específicos de antígeno usando la difusión de fluorescencia de Cy3 en la forma de anillos de espuma alrededor de los pocillos como indicador (Fig. 14).

8. Se añadió una cantidad de 80 μ l de Oregon verde al chip y el chip se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos para marcar las células con verde Oregon. Un chip idéntico al de 6 anterior se lavó con PBS, se añadió PBS fresco al chip y mientras se observaron las células con la fluorescencia del verde Oregon, como indicador, las células diana que fueron secretoras de anticuerpos específicos de antígeno se recuperaron con una micromanipulador.

Realización 4

Método experimental (aplicación del Protocolo IV)

El uso de antígeno marcado con enzima o anticuerpo marcado con enzima en lugar de antígeno marcado con fluorescencia o anticuerpo marcado con fluorescencia

Diferencias

1. Después de emplear la acción de un antígeno marcado con enzima o un anticuerpo marcado con enzima, se añadió un tampón al cual el sustrato de la enzima se había añadido al chip y la incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente.

5 2. El producto resultante de la conversión del sustrato por la enzima se precipita en forma de anillo alrededor del pocillo. Esto se observó por microscopía óptica, permitiendo la detección de células secretoras de anticuerpos.

Enzima: fosfatasa alcalina; Sustrato: BCIP/NBT

La detección también es posible usando un antígeno o un anticuerpo al cual se ha unido un punto cuántico en lugar de un pigmento fluorescente.

10 Detección de células productoras de citoquinas

1. En lugar de causar que el anticuerpo anti-IgG se uniera al chip, el anticuerpo anti-citoquina se hace unirse al chip, las células T o similares que secretan citoquina se siembran en el chip y se induce la producción de citoquinas.

2. La citoquina que es secretada se une al anticuerpo anti-citoquina alrededor de los pocillos.

15 3. A continuación, cuando se añade el anticuerpo de citoquinas marcado con la fluorescencia o la enzima, los anillos de citoquina que se unen alrededor de los pocillos pueden ser detectados y las células T secretoras de citoquinas o similares pueden ser detectadas.

Ensayo del inmuno ensayo de punto en Chip (ISAAC)

Detección de células secretoras de citoquinas

20 Método

1. Se prepararon linfocitos a partir de sangre periférica humana y se estimularon durante la noche en una incubadora de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂) en presencia de 10 ng/ml de forbol miristato acetato (PMA) y 1 μM de ionomicina.

25 2. Los linfocitos se recuperaron y se lavaron, después de lo cual se añadieron las células a un chip de matriz de micropocillos que había sido revestido con anticuerpo IFN γ (gamma) anti-humano. El chip se coloca en una caja de conservación de la humedad (Fig. 9) para evitar que se seque, después de lo cual las células se cultivaron durante 5 horas en un incubador de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂).

30 3. El chip se lavó con PBS-Tween 20, se añadieron al chip anticuerpos de γ IFN anti-humanos marcados con biotina (gamma) y el chip se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una caja de mantenimiento de la humedad.

4. El chip se lavó con PBS-Tween 20, se añadió estreptavidina marcada con Cy3 y el chip se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en el cuadro de mantenimiento de la humedad.

5. El chip se lavó con PBS-Tween 20 y la señal de la citoquina secretada se observó por microscopía de fluorescencia (2 segundos de exposición).

35 Los resultados se dan en la Fig. 15.

Realización 5 (obtención de anticuerpo de bloqueo)

1. Fueron adoptadas las mismas medidas para evitar que se sequen como en el protocolo I en el curso de la incubación de las fichas en las siguientes pruebas.

40 2. Una cantidad 80 μl de 10 μg/ml de TRAIL-R1/Fc se diluyó con PBS, se añadió a una matriz de chips de silicio de micropocillos que había sido tratada con un agente de acoplamiento de silano y el chip se colocó en una caja de conservación de la humedad (Fig. 9) de modo que la solución en el chip no se secase. El chip se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente (15-25°C) y el TRAIL-R1/Fc se une a la superficie del chip de silicio.

45 3. La solución de anticuerpo se eliminó del chip y el chip se lavó tres veces con 100 μl de PBS. Se añadió al chip una cantidad de 100 μl de PBS que contenía 0,2 por ciento (v/v) de Lipidure (NOF Corporation, BL-B03 Lipidure (5 por ciento en peso)) y un vacío fue generado para eliminar las burbujas en los pocillos, cubriendo de este modo la superficie del chip y rellenando el interior de los pocillos con solución de Lipidure. El chip se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo el bloqueo.

4. El chip se lavó tres veces con 100 μ l de RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS. Se añadieron al chip células secretoras de anticuerpos de CD138 positiva que habían sido lavadas una vez con 10 ml y se lavaron dos veces con 1000 μ l del medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS (de 1 a 2×10^6 células suspendidas en 30 μ l del medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS) después de lo cual se dejó el chip de pie durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que las células entraran en los pocillos.

5. Teniendo cuidado de no causar que las células salieran de los pocillos, el chip se lavó con medio RPMI 1640 que contenía 10 por ciento de FCS, después de lo cual se añadieron otros 80 μ l de RPMI 1640 que contenía 10 por ciento FCS al chip. Las células se cultivaron a continuación durante 3 horas en un incubador de CO₂ (37°C, 5 por ciento de CO₂).

6. Teniendo cuidado de no causar que las células salieran de los pocillos, el tampón se retira de la superficie del chip, la operación de adición de alrededor de 100 μ l de PBS a la superficie del chip y la eliminación se repitió varias veces para limpiar el chip, se añadieron al chip 80 μ l de 1 μ g/ml de TRAIL marcado con biotina y el chip se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 6, se añadieron 80 μ l de estreptavidina marcada con Cy3 (Sigma, S-6402) que comprende una solución original diluida 1000 veces al chip, que después se dejó de manera similar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

8. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 6, se añadió PBS al chip y la fluorescencia de Cy3 se observó por microscopía de fluorescencia. Las posiciones de los pocillos que contienen las células que fueron secretoras de anticuerpos que se estaba bloqueadas entre el TRAIL-R1/Fc y su ligando, TRAIL, se determinaron utilizando un indicador en forma de rosquilla negra donde la fluorescencia de Cy3 no se había unido alrededor de los pocillos en la superficie del chip que era de color rojo brillante con fluorescencia Cy3.

9. Se añadió una cantidad de 80 PBS μ l de 1 mg/ml de Oregon verde al chip y el chip se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos para marcar las células con verde Oregon. Después de lavar el chip con PBS de la misma manera que en el 6, se añadió al chip PBS fresco. Mientras se observaban las células con fluorescencia de Oregon verde como indicador, las células diana que fueron secretoras de anticuerpos específicos de antígeno se recuperaron con un micromanipulador.

Realización 6 (aplicación de anticuerpo funcional a la detección)

La proteína del receptor se revistió sobre la superficie de un chip y las células CD138 preparadas a partir de las células de bazo de ratones que habían sido inmunizadas con la proteína del receptor se sembraron en el chip. Las células se cultivaron, después de lo cual se añadieron el ligando marcado con biotina y el ligando marcado con marcado con estreptavidina se unieron sobre casi toda la superficie del chip. Sin embargo, la unión del ligando marcado con biotina y Cy3 marcado con estreptavidina se bloqueó alrededor de los pocillos de células productoras de un anticuerpo funcional que bloqueó la unión de ligando de receptor, por lo que estas zonas eran oscuras. Los resultados se muestran en la Fig. 16. A la izquierda: los resultados de detección de ligando marcado con biotina/estreptavidina marcada con Cy3. Medio: Las células se marcaron con Oregon verde y se observaron. Izquierda: Las figuras de la izquierda y del medio superpuestas.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención es útil en los campos técnicos relacionados con procedimientos de cribado de células inmunes, tales como células productoras de inmunoglobulinas específicas y las células específicas productoras de citoquinas. Ejemplos de ello son los campos de diagnóstico y los productos farmacéuticos relacionados con la inmunología, incluyendo productos farmacéuticos de anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo que muestra la relación entre la forma de la señal de una sustancia marcadora y la forma del pocillo.

La figura 2 es un dibujo descriptivo del método de la presente invención en un ejemplo que emplea células que secretan anticuerpo.

La figura 3 es un dibujo descriptivo del método de la presente invención en el caso (1), en el que la sustancia marcadora se une específicamente a una sustancia producida.

La figura 4-1 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 1.

La figura 4-2 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 1.

La figura 5-1 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 2.

- La figura 5-2 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 2.
- La figura 5-3 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 2.
- La figura 6-1 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 3.
- La figura 6-2 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 3.
- 5 La figura 7-1 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 4.
- La figura 7-2 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 4.
- La figura 7-3 es un dibujo descriptivo del Ejemplo de Preparación 4.
- La figura 8 es un dibujo descriptivo de un método de tratamiento de la superficie.
- La figura 9 es un dibujo descriptivo de una caja de conservación de la humedad que mantiene la humedad del chip.
- 10 La figura 10 muestra los resultados de la determinación de las posiciones de los pocillos que contenían células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno en la Realización 1.
- La figura 11 muestra los resultados de identificación en un micropocillo de matriz de chips de las células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno empleados en el método (FLISPOT) de la presente invención en la Realización 1.
- 15 La figura 12 muestra los resultados de la detección de células que secretan anticuerpo específico de HEL entre las células de bazo de ratón inmunizados con HEL por el método (FLISPOT) de la presente invención en la Realización 2.
- La figura 13 muestra los resultados de la detección de células secretoras de anticuerpos específicas del antígeno HBs entre linfocitos de sangre periférica humana por el método (FLISPOT) de la presente invención en la Realización 2.
- 20 La figura 14 muestra los resultados de la realización 3.
- La figura 15 muestra los resultados de la realización 4 (detección de células productoras de citoquinas).
- La figura 16 muestra los resultados de la Realización 6 (aplicación del anticuerpo funcional a la detección)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una matriz de micropocillos para detectar células diana que secretan una sustancia, que comprende múltiples pocillos en una de las superficies principales de un miembro de base, siendo los pocillos de un tamaño que permita la entrada de una única célula en cada pocillo, caracterizada por que una capa de una sustancia de unión capaz de unirse a al menos parte de una sustancia secretada por una célula diana que reviste la superficie principal alrededor de los pocillos, y no dentro de los pocillos, en donde la porción de la superficie principal que no está revestida por dicha capa está revestida con un agente bloqueante.
- 10 2. La matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células dianas son células productoras de inmunoglobulinas y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-inmunoglobulina o de antígeno.
3. La matriz de micropocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células diana son células productoras de citoquinas y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-citoquina o un receptor de citoquinas.
- 15 4. La matriz de micropocillos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el miembro de base tiene forma de placa.
- 20 5. Un método de cribado de una célula diana presente entre células de muestra, que comprende las etapas de:
 - hacer que las células de muestra y un caldo de cultivo de células esté contenido en al menos una parte de los pocillos de una matriz de micropocillos que comprende múltiples pocillos en una de las superficies principales de un miembro de base, siendo los pocillos de un tamaño que permita la entrada de una única célula en cada pocillo y que comprende una capa de una sustancia de unión que tiene la capacidad de unirse a por lo menos una porción de una sustancia secretada por dicha célula diana, que reviste la superficie principal alrededor de los pocillos, y no dentro de los pocillos, en donde la porción de la superficie principal de la matriz de micropocillos, que no está revestida por dicha capa, está revestida con un agente bloqueante.
 - 25 - sumergir la capa de revestimiento y los pocillos en el caldo de cultivo y cultivar las células en un estado que permita la difusión de sustancias en el caldo de cultivo de los pocillos en la capa de revestimiento;
 - después de retirar opcionalmente el caldo de cultivo, alimentar con una sustancia marcadora que se une específicamente a dicha sustancia secretada por dicha célula diana; y
 - 30 - identificar la célula diana detectando la sustancia secretada por dicha célula diana que se ha unido a la sustancia en la capa de revestimiento por medio de dicha sustancia marcadora.
6. El método de detección de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células presentes entre las células de muestra incluyen las células que han sido estimuladas con un antígeno deseado con antelación y están en un estado capaz de secretar una sustancia.
- 35 7. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde al menos una parte de las células contenidas en los pocillos son células productoras de inmunoglobulinas.
8. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7, en donde al menos una parte de las células contenidas en los pocillos son células productoras de citoquinas.
- 40 9. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de inmunoglobulina y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-inmunoglobulina o un antígeno y la célula diana es una célula productora de inmunoglobulina específica de antígeno.
10. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de inmunoglobulina, y en donde dicha sustancia de unión es un receptor de citoquinas o receptor y la célula diana es una célula productora de inmunoglobulina específica de antígeno.
- 45 11. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las células de muestra incluyen las células productoras de citoquinas y en donde dicha sustancia de unión es un anticuerpo de anti-citoquina o un receptor de citoquinas y la célula diana es una célula productora de citoquinas específicas de antígeno.
- 50 12. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde las células productoras de inmunoglobulinas y las células productoras de citoquinas son células naturales, hibridomas o cepas de células.
13. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde dicha célula diana es un linfocito B y en donde dichos pocillos tienen forma cilíndrica y un diámetro de 4 a 15 micrómetros.

14. El método de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde los pocillos tienen un diámetro entre 0,5 y 2 veces el diámetro de las células de muestra.

15. Un método para aislar una célula diana, que comprende recuperar de un pocillo una célula diana identificada por el método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.

5

Fig. 1

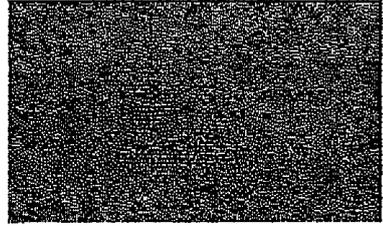
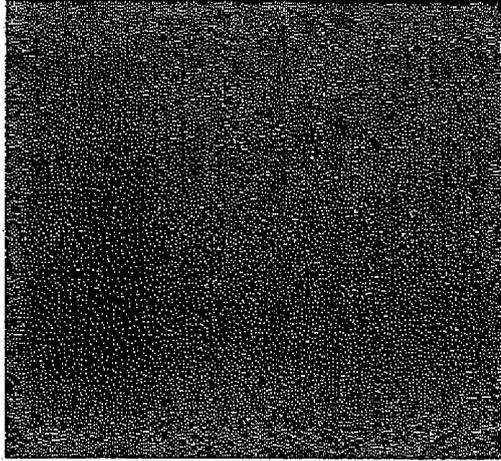


Fig. 2

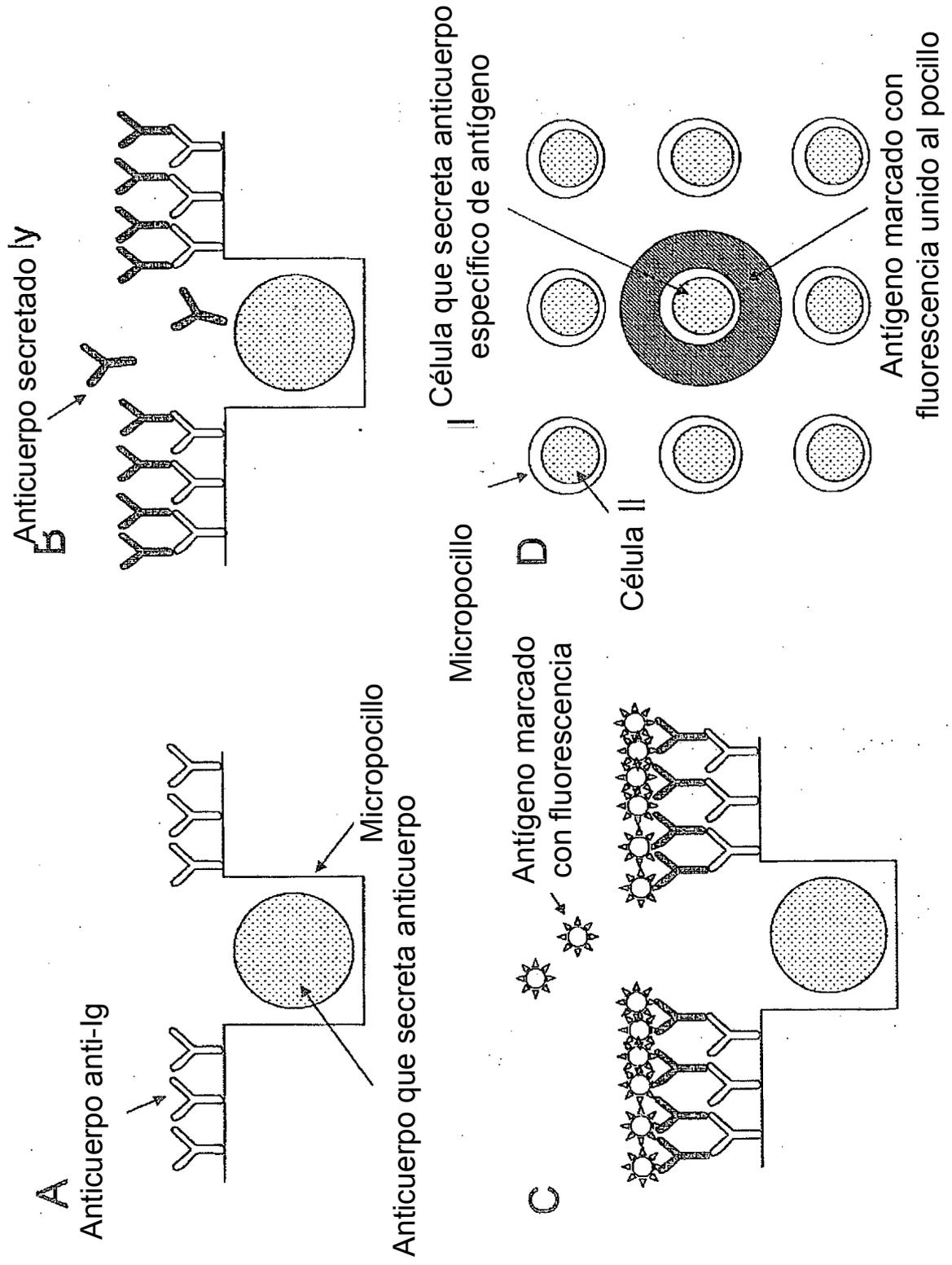


Fig. 3

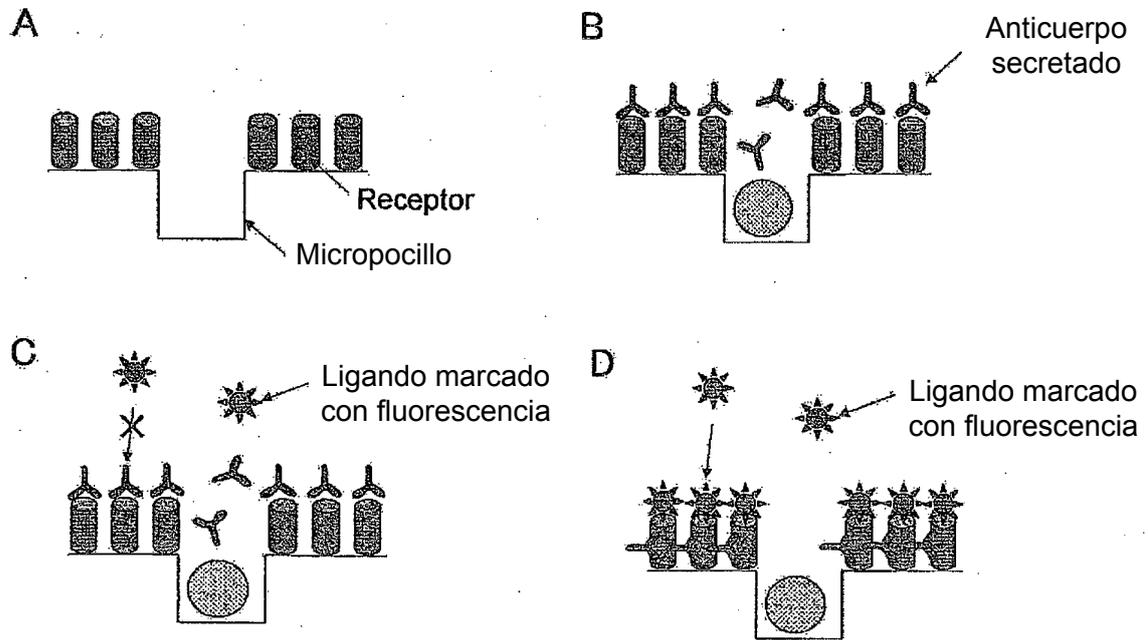


Fig. 4-1

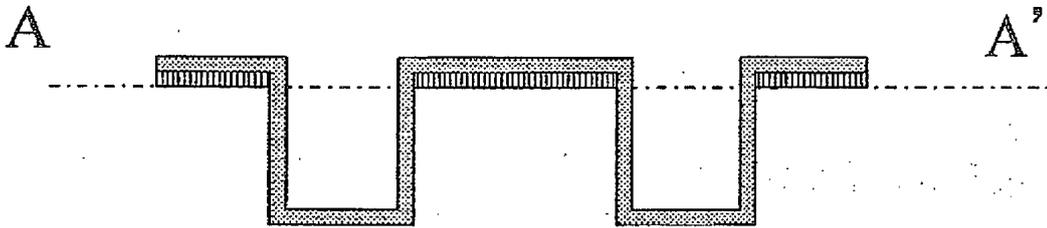
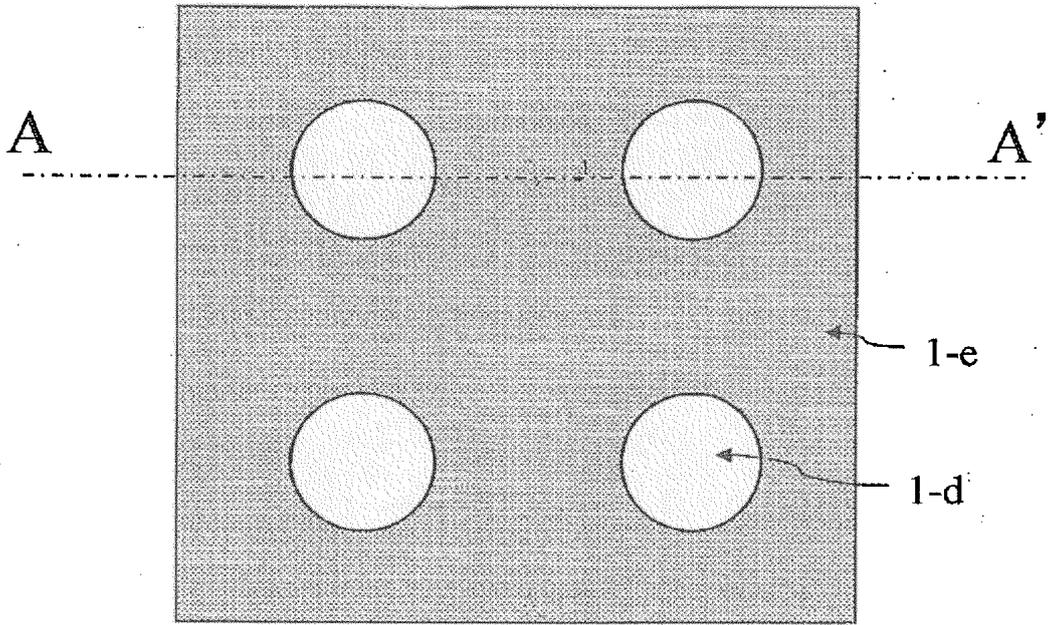


Fig. 4-2

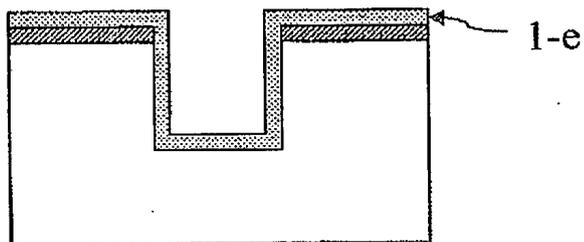
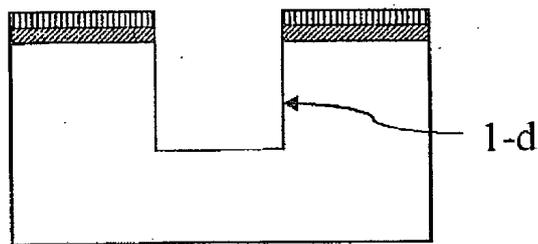
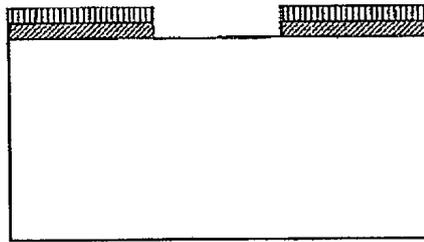
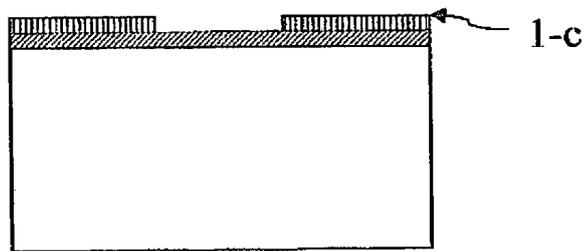
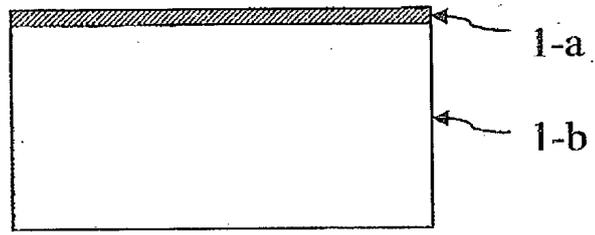


Fig. 5-1

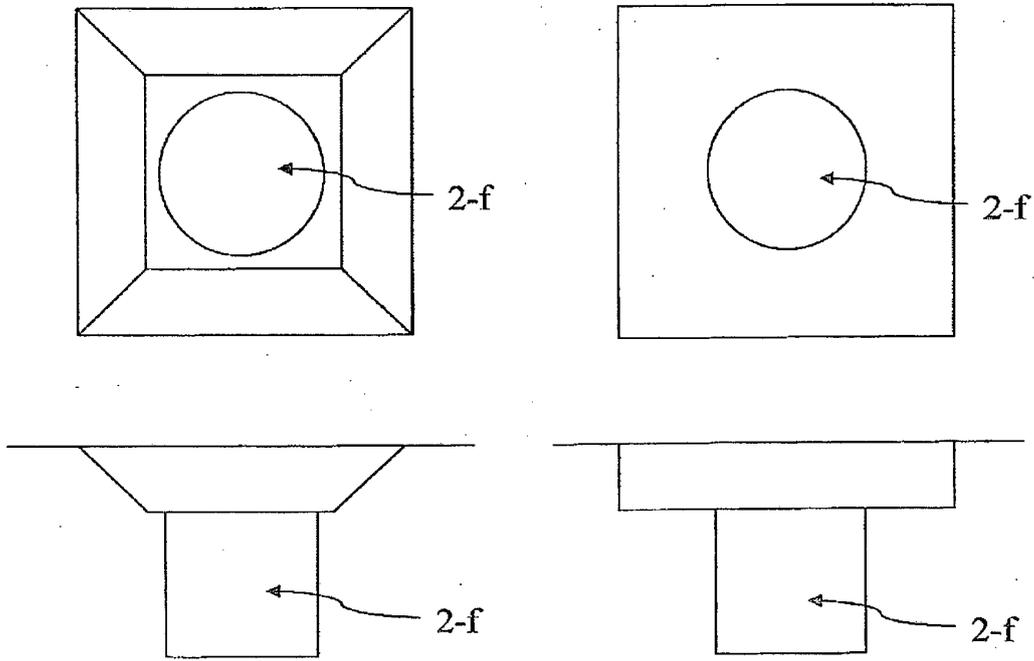


Fig. 5-2

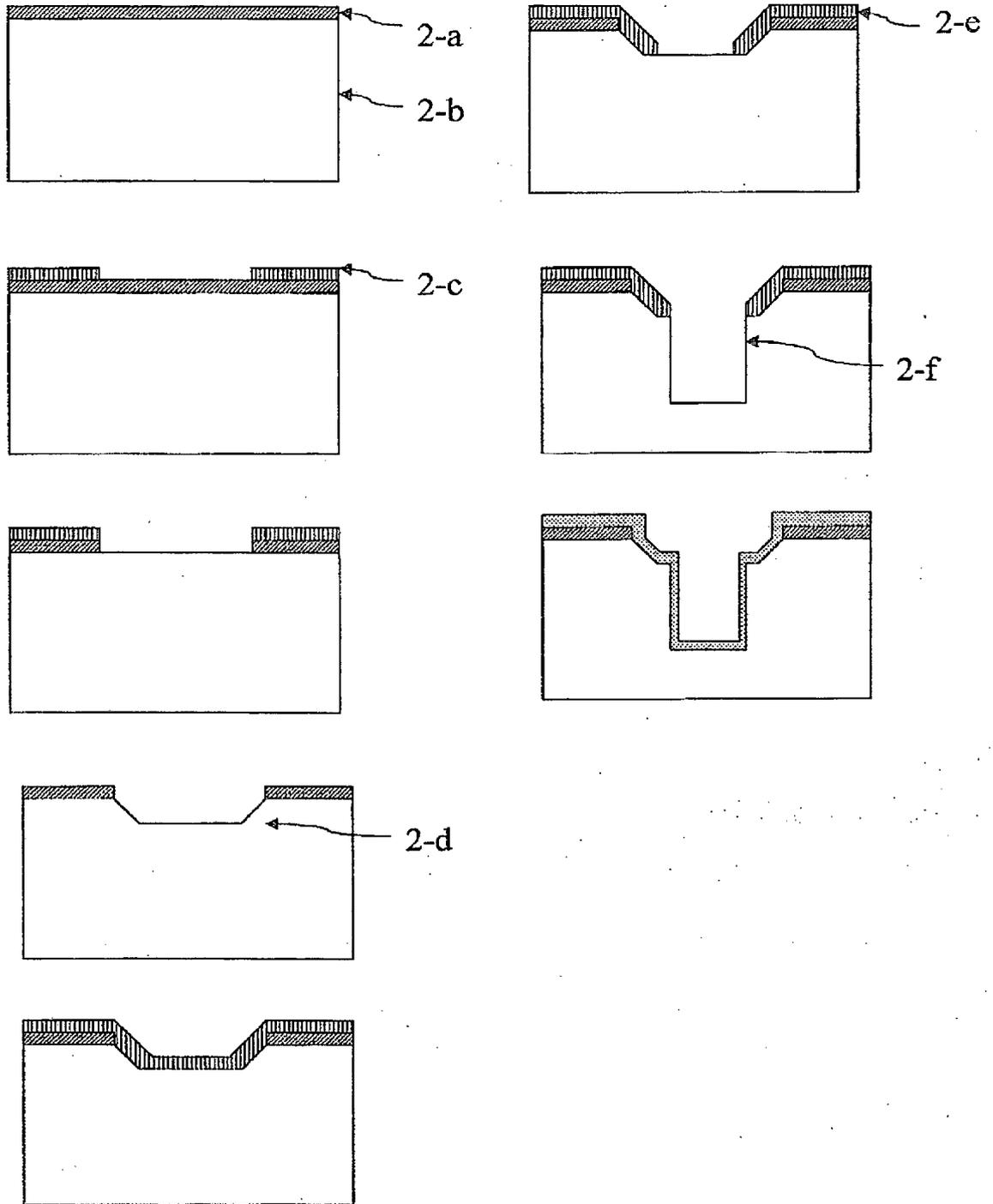
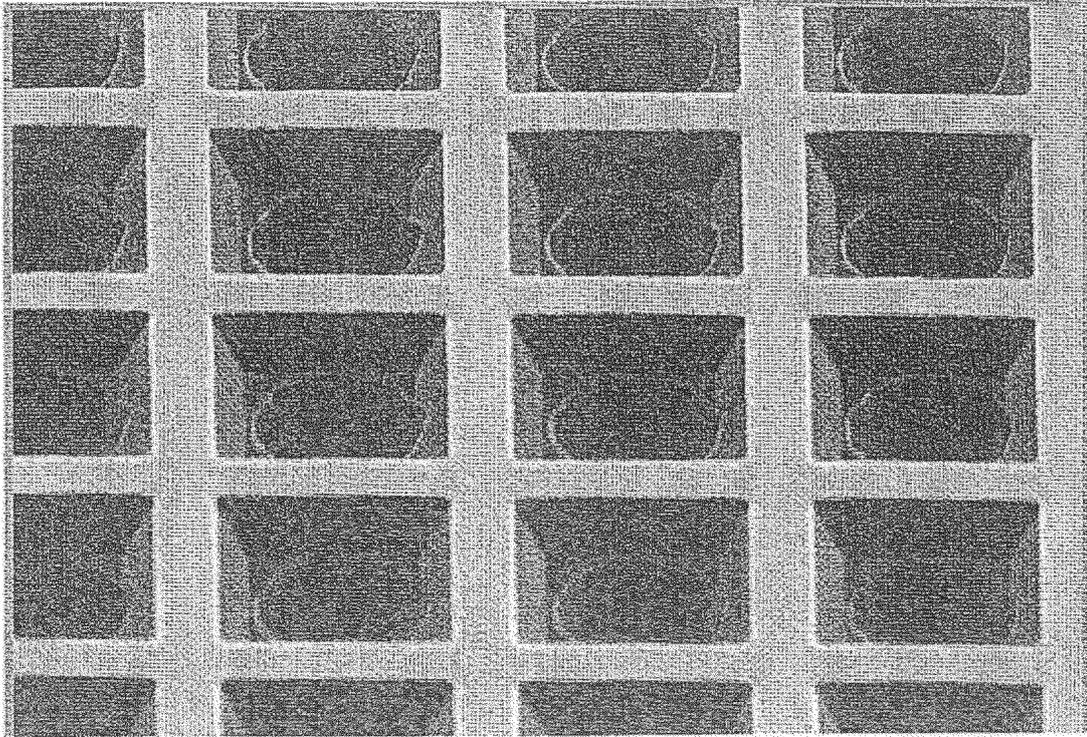


Fig. 5-3



$1,700 \times 5.88 \mu\text{m}$

10kV

Fig. 6-1

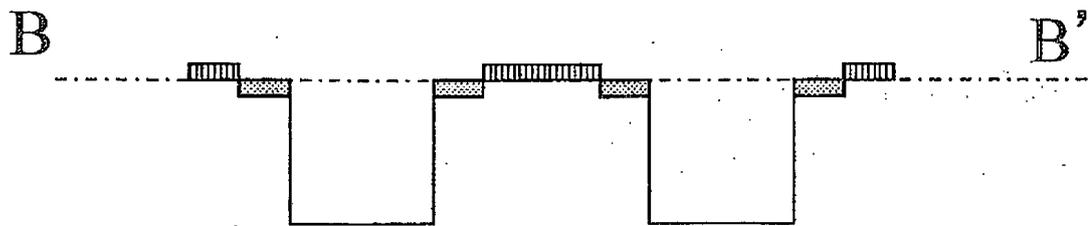
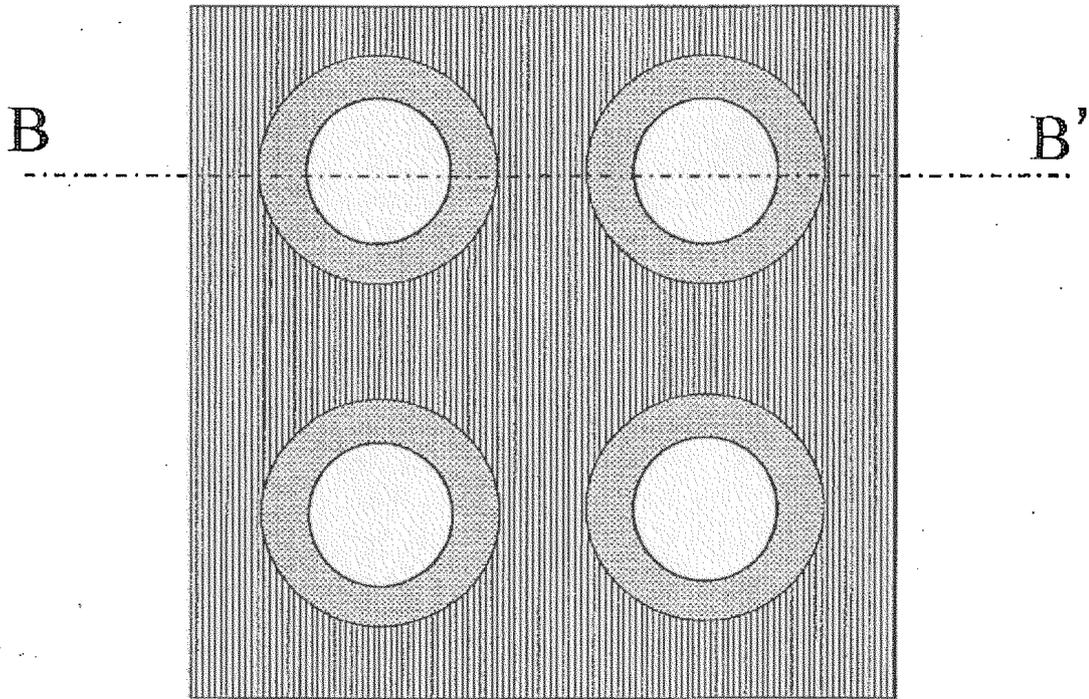


Fig. 6-2

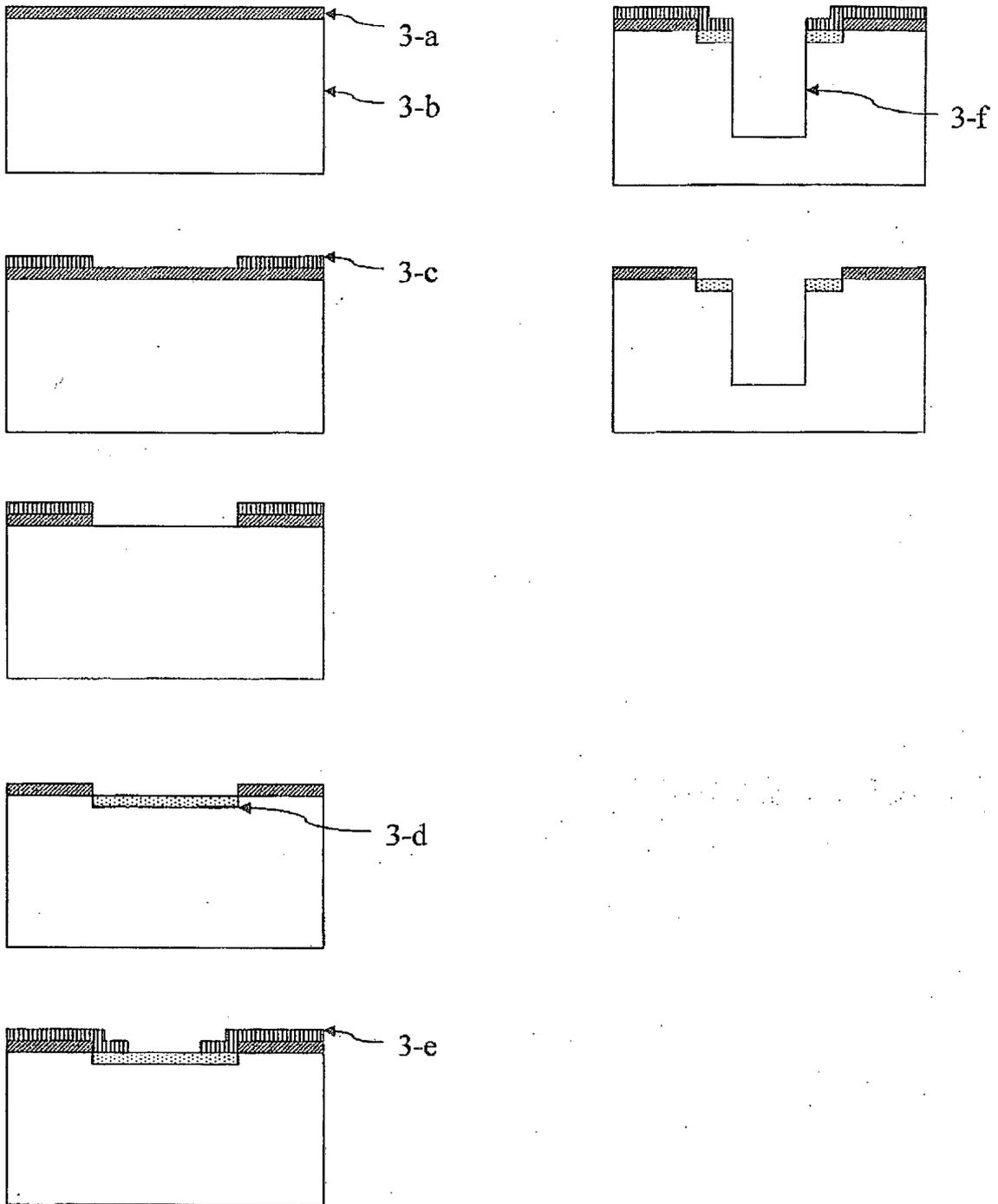


Fig. 7-1

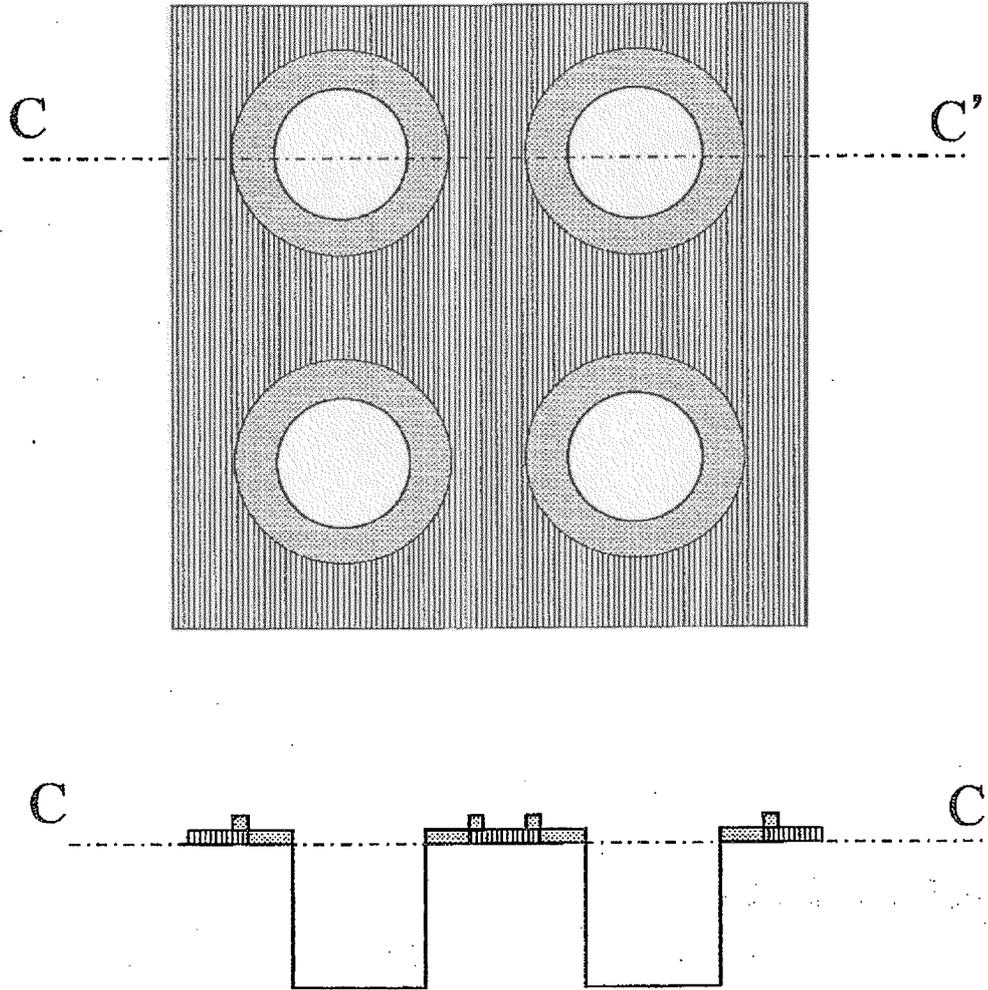


Fig. 7-2

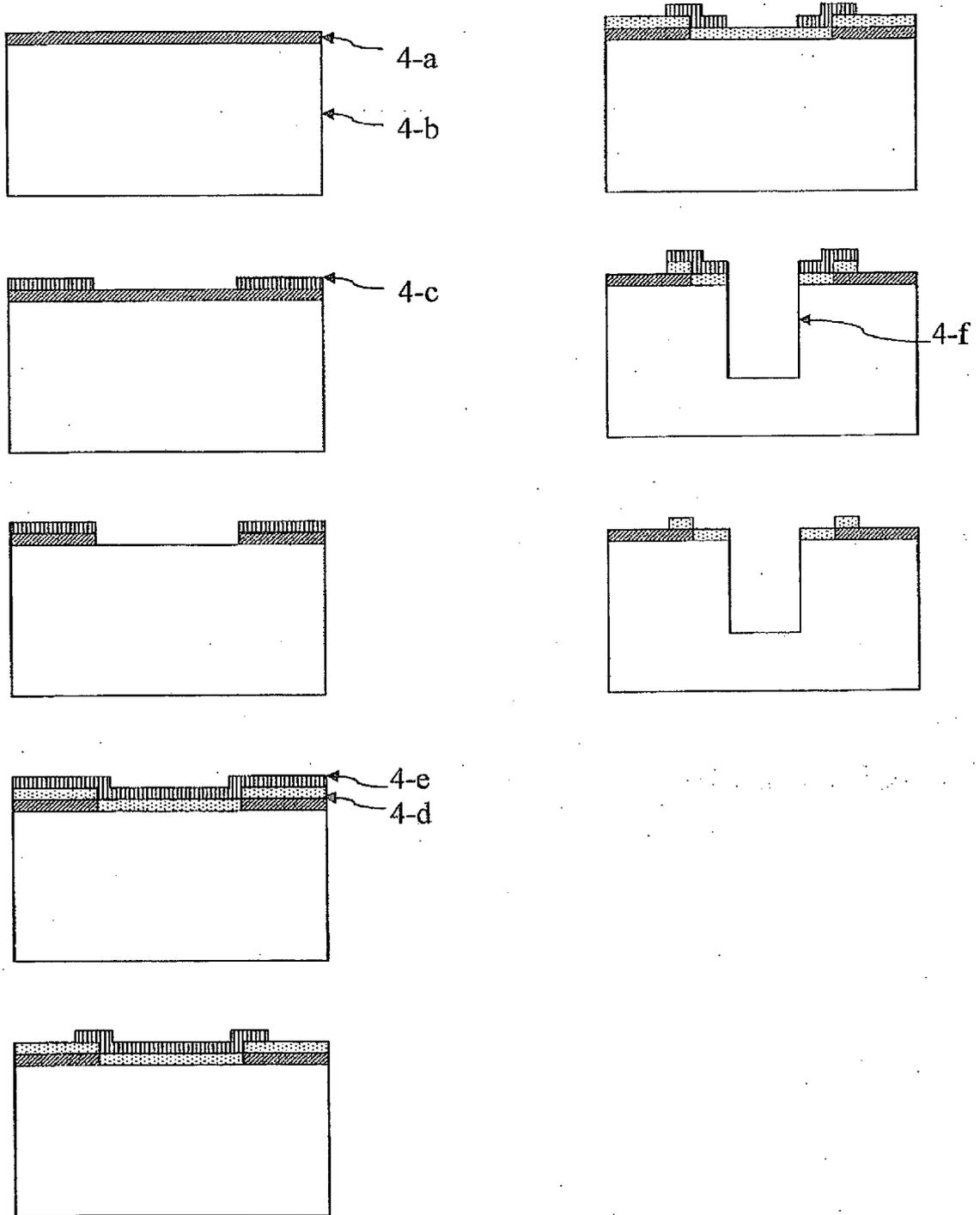


Fig. 7-3

50 μ m

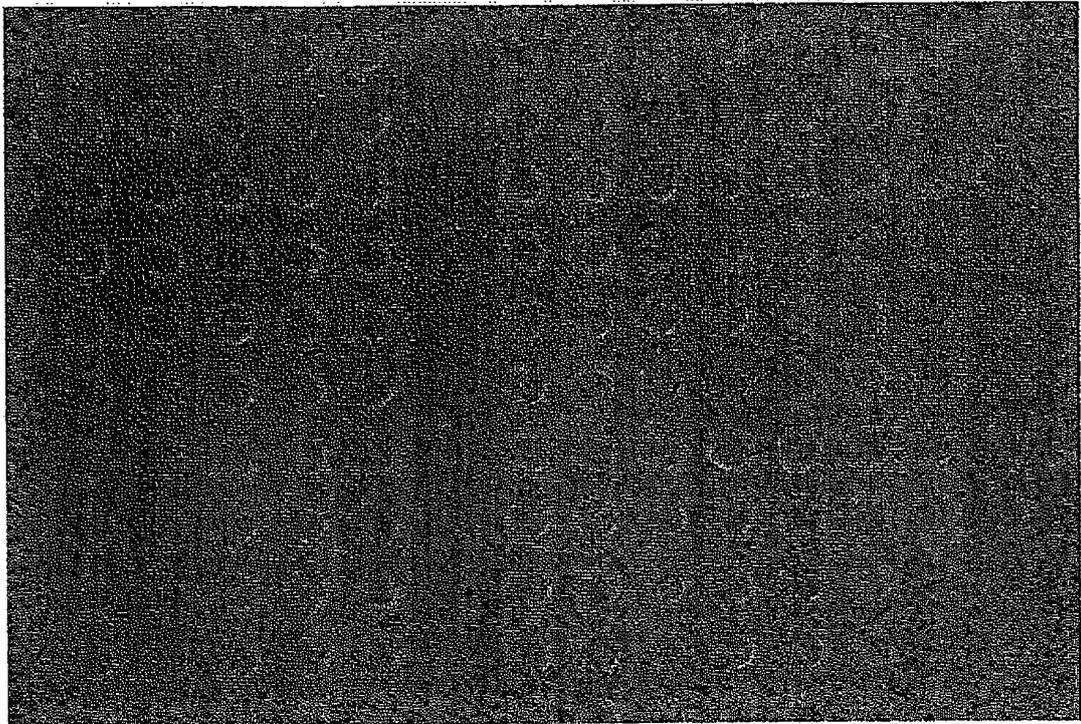


Fig. 8

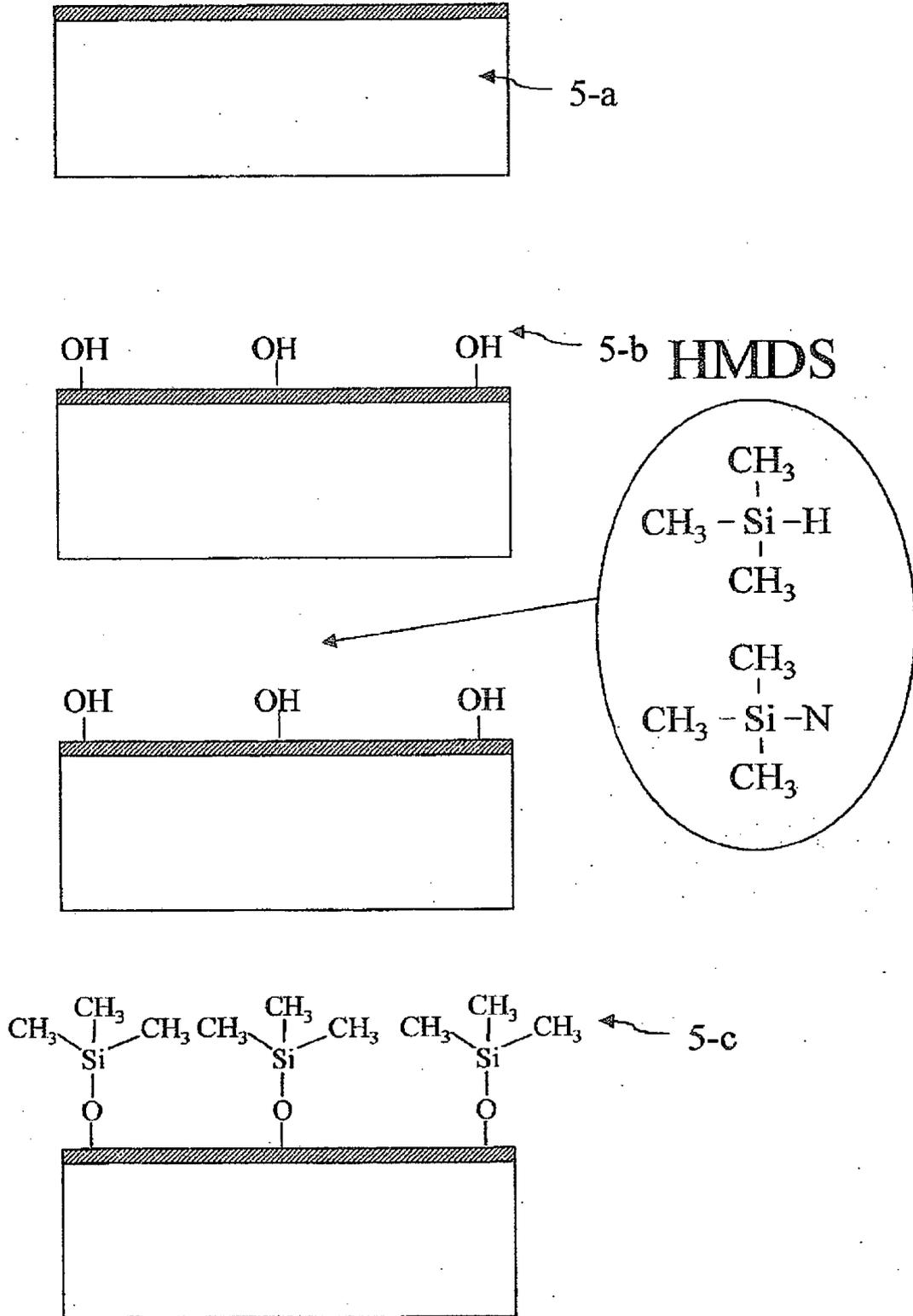


Fig. 9

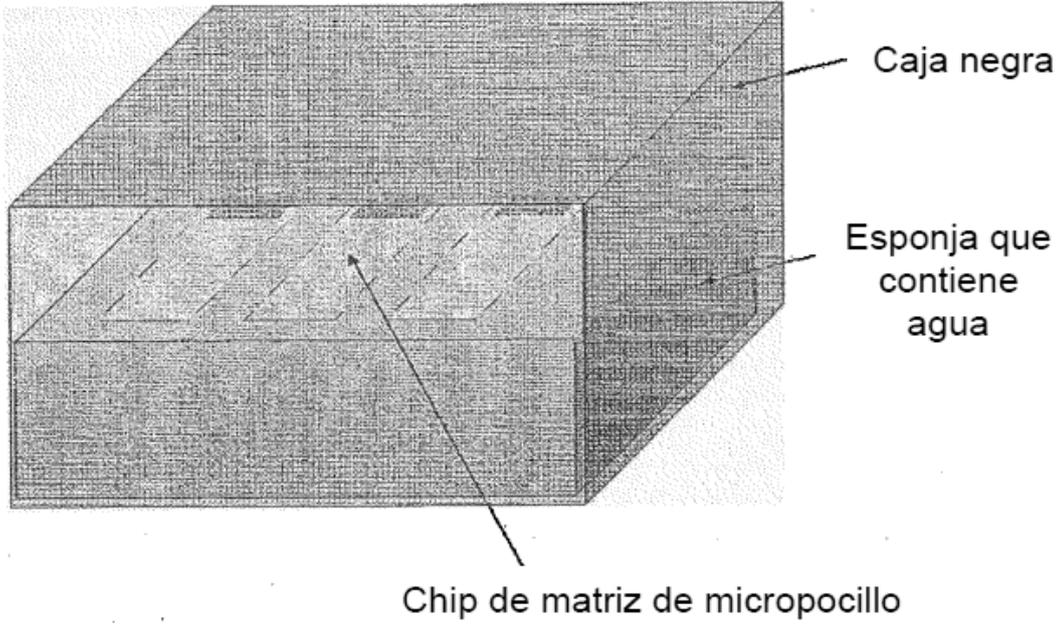


Fig. 10

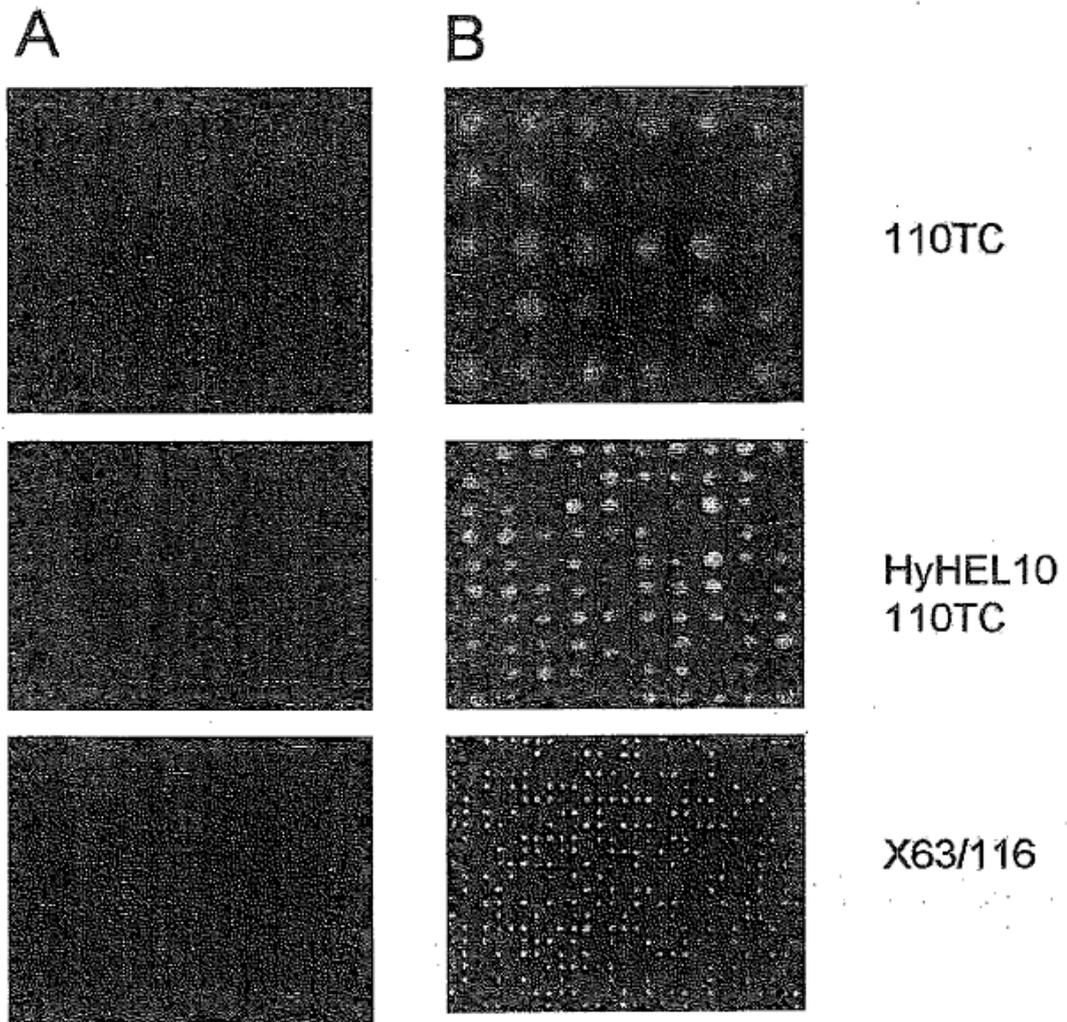


Fig. 11



Fig. 12



Fig. 13

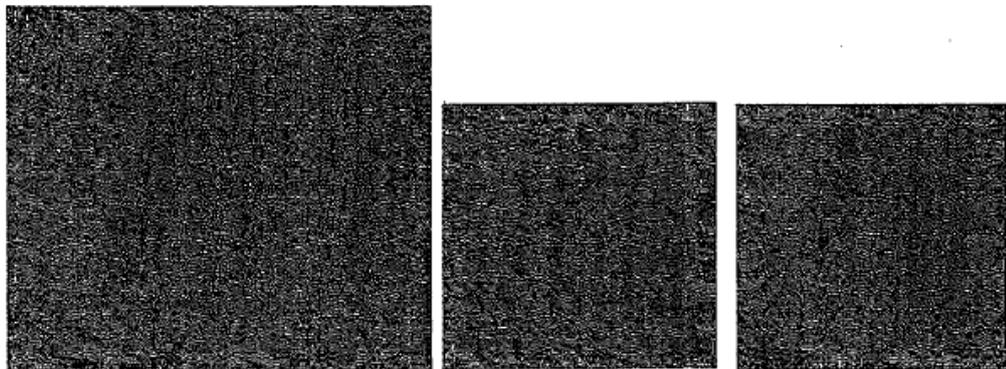
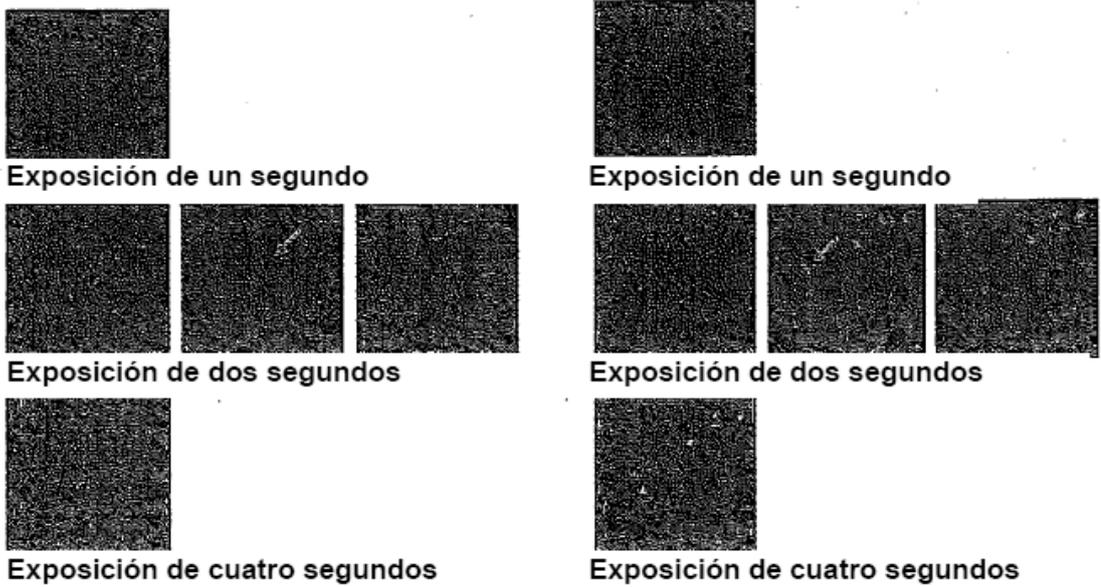


Fig. 14

HEL-Ag → Ig de mHEL → IgG-cy3 antiratón → Detección



Bazo de ratón inmunizado con células derivadas de CD138+HEL de ratón

Fig. 15

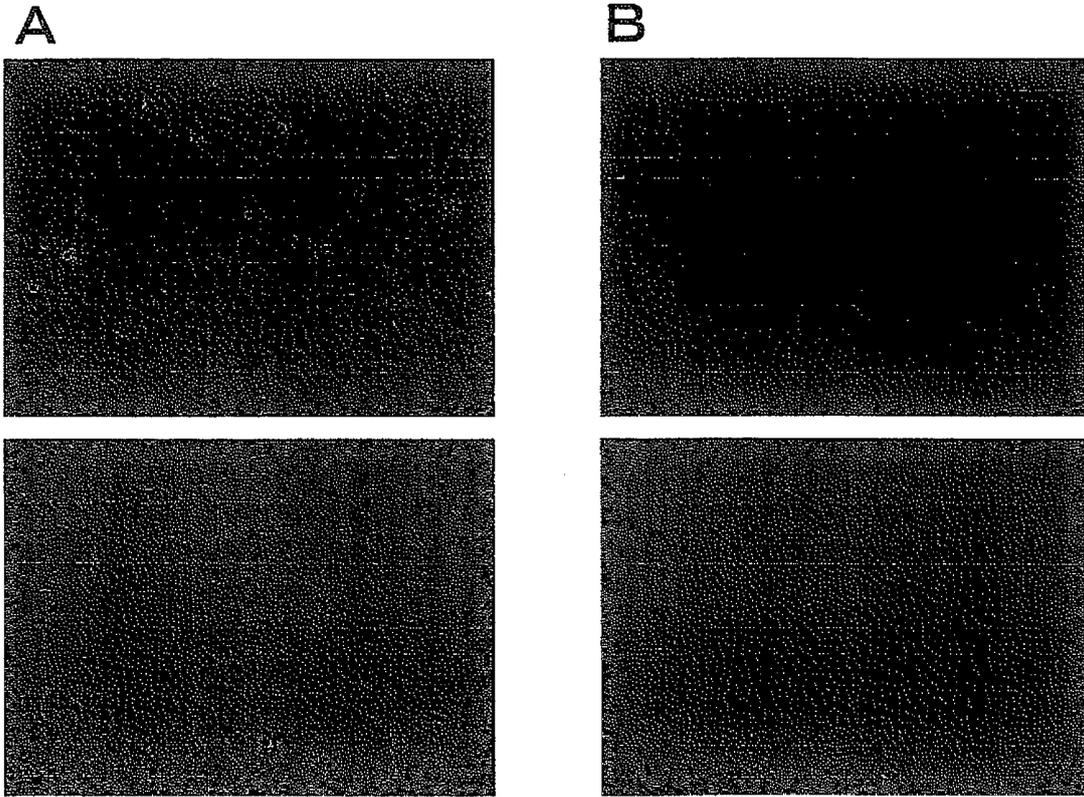


Fig. 16

