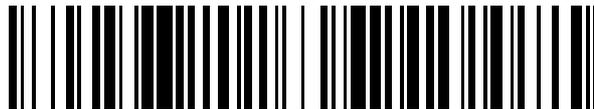


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 733**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10016179 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2471359**

54 Título: **Método de congelación de células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2016**

73 Titular/es:

**CELLULIS S.L. (100.0%)  
C/Eguilior 1, 4º C  
39740 Santoña, Cantabria, ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁN IZQUIERDO, ROBERTO;  
GALLOT ESCOBAL, NATALIA y  
CRUZ PACHECO, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 576 733 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 de congelación de células

5 **Campo de la invención**

La invención da a conocer un vial de congelación de células de múltiples capas y un método de obtención del mismo. La disponibilidad y durabilidad de las células congeladas se aumentan según el método de la invención. Resulta útil en ensayos basados en células para aplicaciones de investigación básica, diagnóstico y desarrollo de fármacos en el sector biotecnológico y farmacéutico.

**Técnica anterior**

15 Células cultivadas *in vitro*, incluyendo células de mamífero, se usan ampliamente en estudios de biología celular. Hasta mediados de la década de los 80, las técnicas de cultivo celular requerían mucho trabajo y no producían una escala de altos números de célula. Actualmente, existe una amplia aceptación y aplicación universal de selección de alto rendimiento (HTS) usando ensayos basados en células en la industria farmacéutica y biotecnológica así como en investigación básica.

20 La selección de tipo HTS se realiza en microplacas. La superficie de estas microplacas puede modificarse para aplicaciones de cultivo celular, normalmente usando una descarga de plasma para una adhesión celular más fácil. Estas microplacas de cultivo celular han facilitado el cultivo a mayor escala de células teniendo un impacto tanto sobre el desarrollo como sobre la fabricación de fármacos. Con respecto al descubrimiento de fármacos, están usándose cada vez más ensayos basados en células para la validación de dianas farmacológicas en estudios de eficacia usando análisis de alto contenido, y también ADMET (absorción de fármaco, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) *in vitro*. Estos estudios se realizan con células ya que proporcionan respuestas más representativas a los fármacos que simples ensayos moleculares, y son más fáciles de usar en un formato de alto rendimiento que animales.

30 La criopreservación es el método de referencia para el almacenamiento a largo plazo de células cultivadas. Dado que la criopreservación puede afectar adversamente a la disponibilidad y función de células, se han desarrollado procedimientos de congelación y descongelación metodológicos con el fin de conservar la estructura, función, comportamiento y biología correctos de células en cultivo. En los primeros años, la adición de agentes crioprotectores incluyendo glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) ya se usaba tanto para la conservación de células tumorales como también para células primarias hematopoyéticas sanas. En general, las normas actuales indican que las células congeladas a largo plazo se almacenan a  $-130^{\circ}\text{C}$  o menos en fase de vapor de nitrógeno líquido para garantizar el mayor nivel de viabilidad. Para periodos de tiempo más cortos comúnmente usados para fines de transporte (habitualmente desde 1 hasta 3 días), pueden almacenarse células congeladas a entre  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

40 Pueden contenerse células congeladas en pipetas tipo pajita o, más comúnmente, en ampollas de 1 ml a 5 ml también conocidas como crioviales o criotubos, con un 10% de criopreservante.

45 Ya se han establecido en la técnica condiciones de descongelación básicas como beneficiosas para la recuperación de las células. Estas condiciones de descongelación siguen siendo los protocolos convencionales actuales e incluyen optimización de la temperatura de descongelación, dilución de disolución criopreservada mediante adición de medio de cultivo celular con eliminación de suero o agente crioprotector completo mediante centrifugación. Estos protocolos de descongelación convencionales (por ejemplo protocolos de ATCC) indican que el criovial tiene que descongelarse rápidamente colocándolo en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se aplica agitación continua hasta que su contenido se ha descongelado completamente. Después se descontamina el vial y se transfiere inmediatamente el contenido a un vaso de cultivo que contiene normalmente hasta 10 volúmenes de medio de cultivo apropiado. Esta dilución se realiza gota a gota con el fin de minimizar lo más posible el choque osmótico. Esto reducirá la concentración del agente crioprotector (comúnmente DMSO) hasta un nivel que no necesita su eliminación completa inmediata para la mayoría de las células. Toda la operación de descongelación debe realizarse lo más rápido posible con el fin de minimizar los efectos tóxicos del agente crioprotector para las células. Tras la fijación de las células, comúnmente en el plazo de las 24 horas siguientes de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, se reemplaza el medio por uno fresco y eso acelera la eliminación del agente crioprotector. Para tipos de células más sensibles al agente crioprotector, debe realizarse centrifugación antes de la siembra con el fin de eliminar completamente el agente tóxico.

60 Los cultivos celulares se expanden normalmente *in vitro* y se recogen a una confluencia del 80% o más. Se usan varios métodos en la técnica para recoger cultivos celulares, incluyendo digestión enzimática usando tripsina y EDTA, levantamiento mecánico usando raspadores celulares, o superficies sensibles a la temperatura, es decir, UpCell™ de Nunc. Tras la recogida de las células, normalmente se centrifugan las células, se diluyen, se cuentan usando un hemocitómetro o un contador celular automático y o bien se siembran de nuevo o bien se suspenden a la concentración correcta de agente crioprotector.

Se siembran células en vasos de cultivo celular habituales también denominados frascos, se hacen crecer *in vitro* durante algunos días y después vuelven a sembrarse en microplacas cuando se requiere el uso de alto rendimiento. Este procedimiento de cultivo tisular todavía es la norma habitual para sembrar células en un formato de alto rendimiento, siendo un método laborioso y que requiere mucho tiempo que requiere técnicos cualificados e instalaciones de cultivo celular apropiadas. El resultado está expuesto a contaminación microbiana y contaminación cruzada de las células debido a los numerosos procedimientos de manipulación implicados.

El documento JP 2002253205 A ha intentado abordar este problema congelando directamente células que se adhieren a una placa. El documento US 2002012901 A1 enseña sobre métodos de descongelación también relacionados con células congeladas adherentes. Sin embargo, se sabe bien que las células congeladas en monocapas son más propensas a daño por congelación que aquellas en suspensión. Se ha notificado que esto puede deberse a la presencia de uniones comunicantes que facilitan la propagación de hielo entre células vecinas (Armitage *et al.* Cryobiology 2003; Liu *et al.* Cryo letters 2003, Acker JP *et al.*, 2001). Los documentos JP 2069200 A y CA 2689946 A1 enseñan sobre células congeladas adherentes en placas y se centran simplemente en pruebas de diagnóstico para revelar virus y parásitos intracelulares. Ninguno de estos métodos enseña sobre viales congelados de varias capas tal como en la presente invención.

Se considera que los documentos WO 2006072335 A1 y EP 1869976 son las publicaciones de técnica anterior más próximas, que enseñan sobre células suspendidas congeladas en placas de múltiples pocillos a una presión parcial de oxígeno inferior a la presión atmosférica en el momento de congelación de las células con el fin de prolongar su vida útil de almacenamiento. Ninguna de estas dos publicaciones enseña sobre viales congelados de varias capas de alta eficacia, y de hecho estos métodos necesitan dilución mediante la adición de medio de cultivo a las células descongeladas antes de realizar cualquier ensayo basado en células, con el fin de evitar el efecto tóxico del agente crioprotector, al contrario que la presente invención. Sin embargo, buscando un efecto similar sobre la vida útil de almacenamiento, una realización preferida de la invención describe una última capa de medio hipóxico.

Por tanto, el problema de la técnica es proporcionar un método de congelación que pueda dar como resultado una mejor viabilidad de las células tras la descongelación, ahorro de tiempo en la realización de pruebas y reducción de los riesgos de contaminación. La solución proporcionada por la presente invención es un método de congelación secuencial que da como resultado un recipiente de cuerpo de doble o triple capa, que incluye al menos una capa de diluyente fresco. Este método facilita el procedimiento de descongelación en una única etapa, aumenta la eficacia de descongelación como mínimo en un 15% y evita el intercambio de células viables a otro recipiente, reduciendo por tanto los riesgos de contaminación.

### Descripción de la invención

La invención es un método de congelación y descongelación de células que evita la necesidad de incorporar nuevo medio fresco a las células descongeladas para la dilución del agente crioprotector. Esto se logra mediante la congelación previa de una capa adicional de medio o diluyente además de la disolución de células congelada que contiene dicho agente crioprotector. En el momento de la descongelación, el diluyente y la disolución de células se mezclan entre sí llevando la concentración del agente crioprotector hasta una dilución no patógena, logrando la separación eficaz de dicho agente crioprotector de las células vivas tanto si se deja fluir hasta el fondo o hasta la superficie de la disolución resultante dependiendo del peso molecular de dicho agente, y minimizando el choque osmótico de las células con los solutos debido a su mezclado progresivo. Esto es el concepto inventivo común de la presente invención.

Dentro de este concepto inventivo están comprendidas al menos dos posibilidades: 1) disponer la disolución de células congelada sobre el diluyente congelado. La capa de células vivas que comprende el agente crioprotector frío se congelará inmediatamente a una velocidad de temperatura de 1°C por minuto o más rápida. En este caso, el agente crioprotector debe tener un peso molecular mayor que el del diluyente; por ejemplo, DMSO o glicerol. Y 2) disponer la disolución de células congelada por debajo del diluyente congelado, teniendo el agente crioprotector elegido un peso molecular menor que el del diluyente; por ejemplo metanol. Cuando se descongela, el agente crioprotector fluirá hacia arriba por la mezcla separándose de las células vivas, que sobrevivirán en un gran porcentaje. El concepto inventivo sigue siendo el mismo: cuando se descongela, la mezcla de diluyente fresco y disolución de células diluye al agente crioprotector. Esto permite evitar la fase de expansión celular que sigue a la descongelación de las células según los procedimientos generales de la técnica, llevando la invención a un ahorro considerable de tiempo en la realización de cualquier ensayo.

Por tanto, una primera realización de la invención es un método de congelación de células o materiales de tipo células, concretamente orgánulos celulares, membranas celulares o liposomas, o embriones no humanos, comprendiendo dicho método las etapas de: congelar una capa de medio de cultivo celular completo en un recipiente; añadir sobre dicho medio de cultivo celular completo congelado una capa de dichas células o materiales de tipo células o embriones no humanos en forma de una disolución, comprendiendo el medio de dicha disolución al menos un agente crioprotector en concentración adecuada; y congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de doble capa con la disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos congelados en la parte superior; o: congelar una capa de células o materiales de tipo células o embriones

5 no humanos en forma de una disolución, comprendiendo el medio de dicha disolución al menos un agente crioprotector en concentración adecuada, en un recipiente; añadir sobre dicha disolución congelada una capa medio de cultivo celular completo; y congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de doble capa con el medio congelado en la parte superior; en el que el volumen de dicha capa de disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos es igual o inferior al volumen de dicha capa de medio de cultivo celular completo.

10 En el alcance de la presente solicitud, la expresión “congelar” significa reducir la temperatura del diluyente líquido o la disolución de células por debajo de su respectiva temperatura de transición vítrea para formar un cuerpo congelado.

En el alcance de la presente invención, el término “materiales de tipo células” se refiere a orgánulos celulares, membranas celulares o liposomas.

15 En el alcance de la presente invención, el término “diluyente líquido biológicamente aceptable” se refiere a cualquier diluyente líquido compatible con células que viven en condiciones *in vitro* saludables.

20 Otra realización de la invención es repetir cualquiera de estas series de congelación para obtener un cuerpo congelado de múltiples capas. El recipiente de múltiples cuerpos también es una realización preferida de la invención siempre que dicho recipiente incluya la secuencia de capas dada a conocer.

25 La estructura en capas de la invención puede reducir el efecto tóxico del agente crioprotector y reducir el choque osmótico para las células durante el procedimiento de descongelación. Resulta clave que la capa que contiene dichas células no debe ser mayor que la mitad del volumen de la capa de diluyente, para garantizar una dilución apropiada. Por tanto, una realización particular del método de congelación de células o materiales de tipo células o embriones no humanos de la invención es que el volumen de dicha capa de disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos es igual o inferior a la capa de diluyente, más preferiblemente igual o inferior a la mitad del volumen de dicha capa de diluyente líquido.

30 Otra realización preferida es el método de congelación de células o materiales de tipo células o embriones no humanos de la invención, que comprende las etapas adicionales de añadir, sobre la disolución de células congeladas o materiales de tipo células o embriones no humanos en la parte superior del cuerpo congelado de doble capa, una capa de diluyente líquido biológicamente aceptable hipóxico, y congelar el resultado para obtener un cuerpo congelado de triple capa. Preferiblemente, dicho diluyente líquido biológicamente aceptable hipóxico es un diluyente líquido biológicamente aceptable anóxico. Esta capa hipóxica adicional también debe dispensarse uniformemente a una temperatura próxima a 0°C en la parte superior de la capa congelada de disolución de células y congelarse rápidamente a una temperatura de -70°C o menos. La cantidad de líquido debe ser suficiente para sellar completamente el recipiente de modo que las células congeladas quedan confinadas y rodeadas por el diluyente. Se logra una vida útil de almacenamiento mejorada de las células congeladas mediante la adición de esta capa hipóxica, de una manera similar al efecto enseñado por la técnica de usar una atmósfera hipóxica en el momento de la congelación. La realización de método de triple capa aumenta el tiempo de conservación del recipiente a -80°C hasta 6 meses.

45 En el alcance de la presente invención, el término “hipóxico” se refiere a una condición en la que la presión parcial del oxígeno en el diluyente está por debajo del nivel óptimo para el metabolismo celular, normalmente entre 120 y 150 mm de Hg. Un ejemplo válido para una disolución hipóxica dentro del alcance de la invención es una presión parcial de oxígeno de 20 mm de Hg o menos.

50 En el alcance de la presente invención, el término “anóxico” significa una condición en la que la presión parcial del oxígeno en el diluyente es equivalente a cero.

55 En una realización muy preferida del método de la invención dicho diluyente líquido biológicamente aceptable es medio de cultivo celular completo, incluso más preferiblemente complementado con al menos un antibiótico y/o suero. En otra realización preferida de la invención dicho agente criogénico se selecciona del grupo de DMSO, glicerol, polivinilpirrolidona, etilenglicol, metanol, metil-acetamida y azúcares; más preferiblemente DMSO.

60 En otra realización de la invención, las células que se congelan son microorganismos, y en otra, las células que se congelan son células vegetales. En una realización preferida, las células que se congelan son células animales, más preferiblemente células animales seleccionadas del grupo de líneas de células tumorales, líneas de células inmortalizadas, líneas celulares continuas, líneas celulares genéticamente modificadas, células de división detenida, células madre, células madre pluripotentes inducidas y células aisladas primarias. Incluso más preferiblemente, dichas células aisladas primarias se seleccionan del grupo de células epiteliales, células endoteliales, células mesenquimatosas, células hematopoyéticas. En una realización preferida de la invención dichas células animales son células de mamífero, más preferiblemente ovocitos o espermatozoides.

65 En el alcance de la presente invención, el término “líneas de células tumorales” se refiere a líneas de cultivo celular

establecidas de manera permanente originadas a partir de tumores *in vivo*.

En el alcance de la presente invención, el término "líneas de células inmortalizadas" se refiere a aquellas líneas de células modificadas por ingeniería genética para reproducirse de manera indefinida.

En el alcance de la presente invención, el término "líneas celulares continuas" se refiere a aquellas líneas de células que pueden reproducirse *in vitro* de manera indefinida.

En el alcance de la presente invención, el término "líneas celulares genéticamente modificadas" se refiere a aquellas líneas celulares cuyo material genético se ha modificado alterado, normalmente mediante técnicas de ingeniería genética.

En el alcance de la presente invención, el término "células de división detenida" se refiere a aquellas células cuyo ciclo celular se ha detenido artificialmente; es decir, en las que su capacidad de división se ha vuelto inoperable. Se usan principalmente con fines de selección de alto rendimiento.

En el alcance de la presente invención, el término "células madre" se refiere a aquellas células que tienen la capacidad para experimentar numerosos ciclos de división celular mientras que mantienen un estado no diferenciado, y al mismo tiempo son pluripotentes pudiendo diferenciarse para dar tipos de células especializadas, con la excepción de células madre de embriones humanos.

En el alcance de la presente invención, el término "células madre pluripotentes inducidas" se refiere a aquellas células que se derivan de células no pluripotentes somáticas de adulto, y se han reprogramado genéticamente para perder sus cualidades específicas de tejido y volverse pluripotentes.

En el alcance de la presente invención, el término "células aisladas primarias" se refiere a aquellas células que se obtienen directamente del tejido de un sujeto.

En otra realización de la invención, el método de congelación de células o materiales de tipo células o embriones no humanos se realiza en una placa de múltiples pocillos, un vial, una pipeta tipo pajita, un vaso, un frasco o una caja.

Otra realización preferida es cualquiera de los cuerpos congelados de doble capa de la invención en los que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano, y el recipiente que comprende dicho cuerpo congelado de doble capa. Y todavía otra realización es el cuerpo congelado de triple capa de la invención en el que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano y el recipiente que contiene el mismo. Una realización muy preferida de la invención es que dicho recipiente es un pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Una de las realizaciones más preferidas es una placa de múltiples pocillos lista para usar en formato HTS que comprende al menos uno de los cuerpos congelados de doble capa y/o triple capa de la invención en la que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.

Cuando se descongela el recipiente de la invención en una atmósfera de temperatura caliente, normalmente incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C, las capas congeladas se funden de una manera progresiva de modo que se minimiza el choque osmótico y las células se mezclan uniformemente con el diluyente. Este método de "auto-sembrado" evita recogida de células adicional y permite que las células adherentes bajen y se adhieran al fondo del recipiente o pocillo en el caso de una microplaca, por gravedad. Al mismo tiempo, el agente crioprotector diluido hace que el entorno se vuelva apropiado para la rápida recuperación de las células. Normalmente, en el plazo de las siguientes 2 horas de incubación, el medio de cada pocillo puede sustituirse por medio de cultivo celular completo fresco a 37°C y puede colocarse la microplaca de vuelta en un incubador de cultivo celular, listo para su uso experimental.

La invención comprende congelar células directamente en microplacas de tipo HTS, evitando de esta manera las etapas que requieren mucho tiempo de descongelar células, sembrar células, expandir células en frascos, levantar células y sembrar células de nuevo en una nueva microplaca. La principal ventaja del método de congelación de la invención es el ahorro considerable de tiempo de procedimiento. Según procedimientos de prueba tradicionales de la técnica, las células deben descongelarse, hacerse crecer en frascos hasta que tienen un número de células apropiado, sembrarse en placas de 96 pocillos, después esperar 24 horas para que la incubación esté lista para el ensayo, lo que todavía tardará entre 4 y 5 días. Con el método de la invención, se descongelan directamente las células en las placas de 96 pocillos necesitando sólo un periodo tras la descongelación de una noche. A la luz de esta ventaja con respecto al tiempo, la realización del método de congelación/descongelación de células de múltiples capas con placas de 96 pocillos es un método rápido, económico, robusto y viable para estudiar la citotoxicidad o para cualquier otro ensayo basado en células.

Aparte del ahorro en cuanto al tiempo, la presente invención evita la posible contaminación de los cultivos debido al uso directo de las células y la minimización de manipulación de líquido. El uso del método de congelación de la invención no se basa en la adición de ningún nuevo reactivo, por tanto no se espera ningún nuevo efecto desconocido del agente sobre las células. La invención también permite la normalización ya que pueden producirse microplacas en lotes, comprendiendo cada lote varias microplacas congeladas idénticas. Además, se proporciona

una solución práctica a ensayos que requieren o bien el uso de células adherentes en diversas fases de confluencia o bien células sincronizadas en diversas fases del ciclo celular. El método de la invención también proporciona una ventaja comercial ya que pueden multiplexarse varios tipos de células en la misma microplaca, ahorrando costes asociados con adquirir los diferentes tipos de células individuales necesarios para un único ensayo. Esta capacidad de multiplexado es funcionalmente atractiva para una amplia gama de enfoques experimentales así como para contribuir a una reducción considerable del presupuesto.

Según los resultados dados a conocer en el presente documento, el método de congelación de múltiples capas de la invención es válido en placas de 96 pocillos para células tumorales humanas HT29 y células de fibroblastos NIH3T3. La viabilidad de las células descongeladas en los ejemplos era considerablemente mayor que en la congelación y descongelación de las células según el método en vial convencional de la técnica.

La realización más preferida de la invención es una placa de múltiples pocillos lista para usar en formato HTS que contiene al menos un cuerpo congelado de células de triple capa en la que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano, obteniéndose dicho cuerpo congelado de triple capa mediante un método que comprende las etapas de: congelar una capa de medio de cultivo completo complementado con al menos un antibiótico y suero en dicho pocillo; añadir sobre dicho diluyente congelado una capa de células en forma de una disolución, comprendiendo el medio de dicha disolución DMSO en concentración adecuada; congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de doble capa; añadir, sobre dichas células congeladas en la parte superior del cuerpo congelado de doble capa, una capa de medio de cultivo completo anóxico y congelar el resultado para obtener dicho cuerpo congelado de triple capa.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Procedimiento de congelación en dos etapas en un pocillo de una placa de 96 pocillos (imágenes A y B) seguido por descongelación (imágenes C y D), proporcionando un mecanismo de auto-sembrado de células una vez que la placa se descongela en un incubador de células habitual.

A: Se dispensa una primera capa de medio de cultivo celular completo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después se congela la placa a  $-70^{\circ}\text{C}$  o menos.

B: Se añade una segunda capa de células o materiales de tipo células que contiene un agente crioprotector a  $4^{\circ}\text{C}$  o menos en la parte superior de la capa congelada de medio de cultivo completo. Después se congela la placa a  $-70^{\circ}\text{C}$  o menos.

C: Mezclar las dos capas como resultado de la descongelación de la microplaca a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los puntos representan células suspendidas en el agente crioprotector diluido.

D: Las células adherentes bajan por gravedad y se unen de manera uniforme al fondo de los pocillos tras un breve tiempo de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Figura 2: Curva de calibración de HT29.  $f(x) = 357415x - 30210$ ;  $R^2 = 0,98$ .

Figura 3.- Viabilidad celular en células HT29. Muestra un claro incremento en la viabilidad del número de células del método de congelación/descongelación de múltiples capas frente a las células del vial de control. El número de células por debajo y por encima de 80.000 células/pocillo representa respectivamente la mortalidad celular y la proliferación celular tras una incubación de 24 horas.

Figura 4.- Curva de calibración de NIH3T3.  $f(x) = 422129x - 24554$ .  $R^2 = 0,96$

Figura 5.- Viabilidad celular en células NIH3T3. Muestra un ligero incremento en la viabilidad del número de células tras una incubación de 24 horas en comparación con el método de congelación/descongelación de múltiples capas frente a las células del vial de control.

Figura 6.- Respuesta citotóxica dependiente de la concentración de células BALB3T3 tras tratamientos con 5-fluoracilo.

Figura 7.- Respuesta citotóxica dependiente de la concentración de células BALB3T3 tras tratamientos con tamoxifeno.

Figura 8.- Respuesta citotóxica dependiente de la concentración de células Smac tras tratamientos con 5-fluorouracilo.

Figura 9.- Respuesta citotóxica dependiente de la concentración de células Smac tras tratamientos con tamoxifeno.

#### Descripción detallada de realizaciones particulares

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención, sin embargo no deben interpretarse como limitativos del alcance de las mismas.

5 Ejemplo 1. Método de congelación/descongelación de células de dos capas con células de carcinoma de colon HT29

Se hicieron crecer células HT29 (ATCC, LGC Standards) cultivadas en medio de cultivo completo 5A de Mc Coy libre de endotoxina complementado con FCS al 10% (Gibco), penicilina 100 µg/ml y estreptomina 100 UI/ml (Sigma-Aldrich) en frascos hasta que presentaron una confluencia del 80%, y después se recogieron. La recogida tuvo lugar mediante incubación de células con 5 ml de PBS que contenía EDTA al 0,05% durante 2 min, y se logró un desprendimiento final mediante incubación en 5 ml de PBS con tripsina al 0,1% y EDTA al 0,05% durante otros 5 min. Se centrifugaron las células a 400xG durante 5 min. Después, se preparó un total de 4,8 ml de una disolución a 4°C que contenía 80.000 células HT29/50 µl de medio de congelación de Mc Coy al 80%, FCS al 10%, DMSO al 10% (AppliChem) (densidad celular determinada mediante hemocitómetro), formando la denominada disolución de congelación. Además, se dispusieron 100 µl de medio de cultivo completo en cada célula de una placa de 96 pocillos y se congeló hasta -80°C. Una vez congelada, se recuperó la placa y se añadieron 50 µl/pocillo de dicha disolución de congelación encima de cada pocillo que contenía 100 µl de medio de cultivo completo ya congelado. Se mantuvo la placa durante 10 min en una atmósfera de nieve carbónica y a continuación se pasó a un congelador a -80°C durante 5 días. Como control negativo, se congeló otra disolución de 80.000 células HT29/50 µl en un criovial junto con la placa de 96 pocillos y después también se pasó a un congelador a -80°C para usarse como control de vial.

Cinco días después, se pasó la placa de 96 pocillos congelada a un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Al mismo tiempo, se descongeló rápidamente el control de vial en un baño de agua limpia a 37°C con agitación suave. Se sembraron 50 µl/pocillo del control de vial sobre otra placa de 96 pocillos que contenía 100 µl/pocillo de medio de cultivo completo caliente. Una hora después de la descongelación, se cambió el medio de todas las placas por medio de cultivo completo previamente calentado fresco. Se realizó un ensayo de MTT (Sigma-Aldrich) con todas las células tras 24 horas de incubación. El ensayo de MTT es una prueba de laboratorio y un ensayo colorimétrico convencional para medir la actividad de enzimas que reducen MTT para dar formazán, dando un color púrpura. MTT amarillo (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) se reduce para dar formazán púrpura en células vivas. Se preparó una disolución madre de MTT con 5 mg/ml de PBS 1x. Se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de trabajo de MTT (1:100 en medio de cultivo) a las células previamente descongeladas, y se incubaron en el incubador de CO<sub>2</sub>. Tras 3 horas, se retiró el MTT de los pocillos de la placa mediante aspiración y se añadieron 200 µl/pocillo de DMSO para convertir el producto de formazán púrpura insoluble en una disolución coloreada. Se cuantificó la absorbancia de esta disolución en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems) a 540 nm.

Se creó una curva de calibración de referencia (figura 2). En primer lugar se incubaron células HT29 en EDTA al 0,05% durante 2 min. Se logró un desprendimiento final mediante incubación en tripsina al 0,1% y EDTA al 0,05% durante otros 5 min. Se centrifugaron las células a 400xG durante 5 min. Se determinó la densidad celular contando las células usando un hemocitómetro. Se generaron las series de dilución en los pocillos de una placa de 96 pocillos. El número de células osciló entre 1250 y 160000 células en volúmenes de 200 µl. En cuanto las células estuvieron apropiadamente unidas, se realizó el ensayo de MTT tal como se mencionó anteriormente.

45 Ejemplo 2. Método de congelación/descongelación de células de dos capas con fibroblastos murinos NIH3T3

Se hicieron crecer células NIH3T3 (ATCC, LGC Standards) cultivadas en medio DMEM libre de endotoxina (Sigma-Aldrich) complementado con FCS al 10%, penicilina 100 µg/ml y estreptomina 100 UI/ml (Sigma-Aldrich) en frascos hasta que presentaron una confluencia del 80%, y después se recogieron. La recogida tuvo lugar mediante incubación de células en 5 ml de PBS con EDTA al 0,05% durante 2 minutos, y se logró un desprendimiento final mediante incubación en tripsina al 0,1% y EDTA al 0,05% durante otros 5 minutos. Se centrifugaron las células a 400 xG durante 5 minutos. Después se preparó un total de 4,8 ml de una disolución a 4°C que contenía 80.000 células NIH3T3/50 µl de medio de congelación de DMEM al 80%, FCS al 10%, DMSO al 10% (AppliChem) (densidad celular determinada mediante hemocitómetro), formando la denominada disolución de congelación. Además, se dispusieron 100 µl de medio de cultivo completo en cada célula de una placa de 96 pocillos y se congeló hasta -80°C. Una vez congelada, se recuperó la placa y se añadieron 50 µl/pocillo de dicha disolución de congelación encima de cada pocillo que contenía 100 µl de medio de cultivo completo ya congelado. Se mantuvo la palca durante 10 min en una atmósfera de nieve carbónica y a continuación se pasó a un congelador a -80°C durante 5 días. Como control negativo, se congeló otra disolución de 80.000 células HT29/50 µl en un criovial junto con la placa de 96 pocillos y después también se pasó a un congelador a -80°C para usarse como control de vial.

Cinco días después, se pasó la placa de 96 pocillos congelada a un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Al mismo tiempo se descongeló rápidamente el control de vial en un baño de agua limpia a 37°C con agitación suave. Se sembraron 50 µl/pocillo del control de vial sobre otra placa de 96 pocillos que contenía 100 µl/pocillo de medio de cultivo completo caliente. Una hora después de la descongelación, se cambió el medio de todas las placas por medio de

5 cultivo completo previamente calentado fresco. Se realizó un ensayo de MTT (Sigma-Aldrich) con todas las células tras 24 horas de incubación. Se preparó una disolución madre de MTT con 5 mg/ml de PBS 1 x. Se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de trabajo de MTT (1:100 en medio de cultivo) a las células previamente descongeladas, y se incubaron en el incubador de CO<sub>2</sub>. Tras 3 horas, se retiró el MTT de los pocillos de la placa mediante aspiración y se añadieron 200 µl/pocillo de DMSO para convertir el producto de formazán púrpura insoluble en una disolución coloreada. Se cuantificó la absorbancia de esta disolución en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems) a 540 nm.

10 Se creó una curva de calibración de referencia (figura 4). En primer lugar se incubaron células NIH3T3 en EDTA al 0,05% durante 2 min. Se logró un desprendimiento final mediante incubación en tripsina al 0,1% y EDTA al 0,05% durante otros 5 min. Se centrifugaron las células a 400xG durante 5 min. Se determinó la densidad celular contando las células usando un hemocitómetro. Se generaron las series de dilución en los pocillos de una placa de 96 pocillos. El número de células osciló entre 1.250 y 160.000 células en volúmenes de 200 µl. En cuanto las células estuvieron apropiadamente unidas, se realizó el ensayo de MTT tal como se mencionó anteriormente.

### 15 Ejemplo 3. Prueba citotóxica

20 Se cultivaron fibroblastos Balb3T3 (ATCC, LGC Standards) y células aórticas de músculo liso (SMAC, recién aisladas de ratas Sprague Dawley, Harlan Laboratories), células primarias, en medio de cultivo completo que consistía en DMEM libre de endotoxina (Sigma-Aldrich) complementado con FCS al 10%, penicilina 100 µg/ml y estreptomycin 100 UI/ml (Sigma-Aldrich). Se aislaron células SMAC de una única aorta de rata macho: se disecó cuidadosamente la aorta de su origen en el ventrículo izquierdo hacia la bifurcación ilíaca y se aislaron células mediante digestión enzimática del tejido con colagenasa tipo II (Worthington). Se dejaron crecer las células resultantes durante doce días antes de la crioconservación. Se hicieron crecer ambos tipos de células en frascos hasta que presentaron una confluencia del 80% y después se recogieron. La recogida tuvo lugar mediante incubación de células en 5 ml de PBS con EDTA al 0,05% durante 2 minutos, y se logró un desprendimiento final mediante incubación en tripsina al 0,1% y EDTA al 0,05% durante otros 5 minutos. Se centrifugaron las células a 400 xG durante 5 minutos. Después, se preparó un total de 4,8 ml de una disolución a 4°C que contenía 50.000 células/50 µl de medio de congelación de DMEM al 80%, FCS al 10%, DMSO al 10% (AppliChem) (densidad celular determinada mediante hemocitómetro), formando la denominada disolución de congelación. Además, se dispusieron 100 µl de medio de cultivo completo en cada célula de una placa de 96 pocillos y se congeló hasta -80°C. Una vez congelada, se recuperó la placa y se añadieron 50 µl/pocillo de dicha disolución de congelación encima de cada pocillo que contenía 100 µl de medio de cultivo completo ya congelado. Se mantuvo la placa durante 10 min en una atmósfera de nieve carbónica y a continuación se pasó a un congelador a -80°C durante 35 5 días. Cinco días después, se pasó la placa de 96 pocillos congelada a un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Una hora después de la descongelación, se cambió el medio de todas las placas por medio de cultivo completo previamente calentado fresco. Veinticuatro horas tras la descongelación, se incubaron ambos tipos de células, células Balb3T3 y SMAC, con 20, 40, 80 y 100 µg/ml de 5-fluorouracilo y 0,62, 1,25, 2,5 y 5 mM de tamoxifeno respectivamente. Las células de control recibieron medio basal y las células de FBS de control recibieron medio completo. Los experimentos se realizaron por triplicado. Veinticuatro horas después se realizó un ensayo de MTT y se calculó la citotoxicidad según los valores de absorbancia.

45 Se preparó una disolución madre de MTT con 5 mg/ml de PBS 1x. Después, se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de trabajo de MTT (1:100 en medio de cultivo) a las placas previamente congeladas y se incubaron durante 3 horas en el incubador de CO<sub>2</sub>. Se retiró el MTT de los pocillos de la placa y se añadieron 200 µl/pocillo de DMSO para disolver el producto de formazán púrpura insoluble para dar una disolución coloreada. Se cuantificó la absorbancia de esta disolución midiendo a 540 nm mediante un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems).

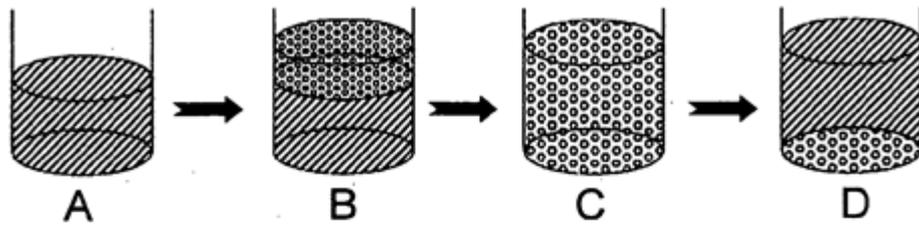
**REIVINDICACIONES**

1. Método de congelación de células o materiales de tipo células, concretamente orgánulos celulares, membranas celulares o liposomas, o embriones no humanos, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5
- a) congelar una capa de medio de cultivo celular completo en un recipiente;
- b) añadir sobre dicho medio de cultivo celular completo congelado una capa de dichas células o materiales de tipo células o embriones no humanos en forma de una disolución, comprendiendo el medio de dicha disolución al menos un agente crioprotector en concentración adecuada; y
- 10
- c) congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de doble capa con la disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos congelados en la parte superior;
- 15
- o
- a) congelar una capa de células o materiales de tipo células o embriones no humanos en forma de una disolución, comprendiendo el medio de dicha disolución al menos un agente crioprotector en concentración adecuada, en un recipiente;
- 20
- b) añadir sobre dicha disolución congelada una capa de medio de cultivo celular completo; y
- c) congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de doble capa con el medio congelado en la parte superior;
- 25
- en el que el volumen de dicha capa de disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos es igual o inferior al volumen de dicha capa de medio de cultivo celular completo.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el volumen de dicha capa de disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos es igual o inferior a la mitad del volumen de dicha capa de medio de cultivo celular completo.
- 30
3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las etapas de:
- c) añadir, sobre la disolución de células o materiales de tipo células o embriones no humanos congelados en la parte superior del cuerpo congelado de doble capa, una capa de medio de cultivo celular completo hipóxico; y
- 35
- d) congelar el resultado de la etapa anterior para obtener un cuerpo congelado de triple capa.
- 40
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho medio de cultivo celular completo hipóxico es un medio de cultivo celular completo anóxico.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho medio de cultivo celular completo se complementa con al menos un antibiótico y/o suero.
- 45
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho agente criogénico se selecciona del grupo de DMSO, glicerol, polivinilpirrolidona, etilenglicol, metanol, metil-acetamida y azúcares.
- 50
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichas células son microorganismos.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichas células son células vegetales.
- 55
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichas células son células animales.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque dichas células animales se seleccionan del grupo de líneas de células tumorales, líneas de células inmortalizadas, líneas celulares continuas, líneas celulares genéticamente modificadas, células de división detenida, células madre, células madre pluripotentes inducidas y células aisladas primarias.
- 60
11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dichas células aisladas primarias se seleccionan del grupo de células epiteliales, células endoteliales, células mesenquimatosas, células hematopoyéticas.
- 65

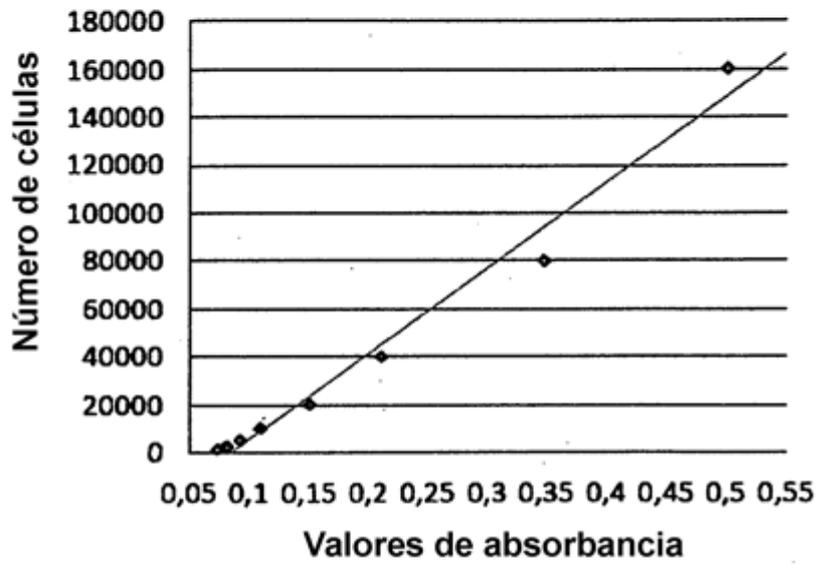
## ES 2 576 733 T3

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque dichas células animales son células de mamífero.
- 5 13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque dichas células animales son ovocitos o espermatozoides.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho recipiente es un pocillo de una placa de múltiples pocillos, un vial, una pipeta tipo pajita, un vaso, un frasco o una caja.
- 10 15. Cualquiera de los cuerpos congelados de doble capa según la reivindicación 1, en el que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.
16. Cuerpo congelado de triple capa según la reivindicación 3, en el que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.
- 15 17. Recipiente que comprende cualquiera de los cuerpos congelados de doble capa según la reivindicación 1, en el que el recipiente no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.
- 20 18. Recipiente que comprende el cuerpo congelado de triple capa según la reivindicación 3, en el que el recipiente no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.
19. Recipiente según las reivindicaciones 17 ó 18, siendo dicho recipiente un pocillo de una microplaca de 96 pocillos.
- 25 20. Placa de múltiples pocillos lista para usar en formato HTS que comprende al menos uno de los cuerpos congelados de doble capa y/o triple capa según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el cuerpo no contiene un embrión, ovocito o espermatozoide de origen humano.

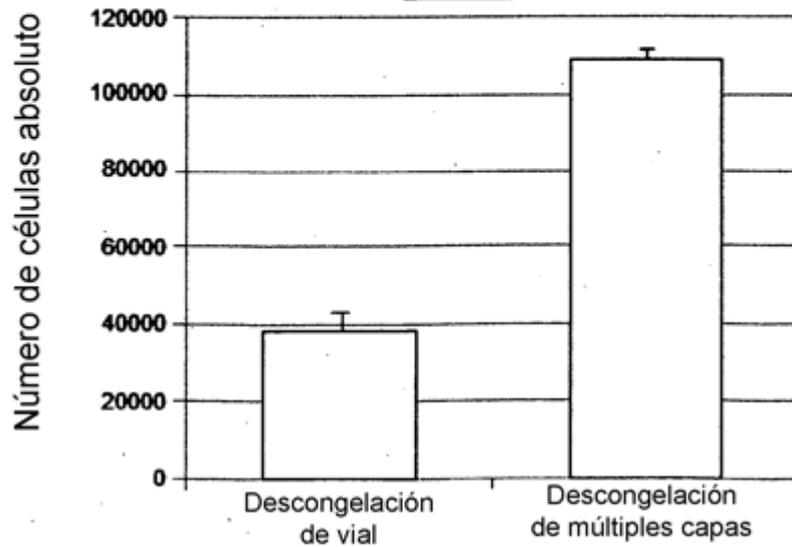
**FIG. 1**



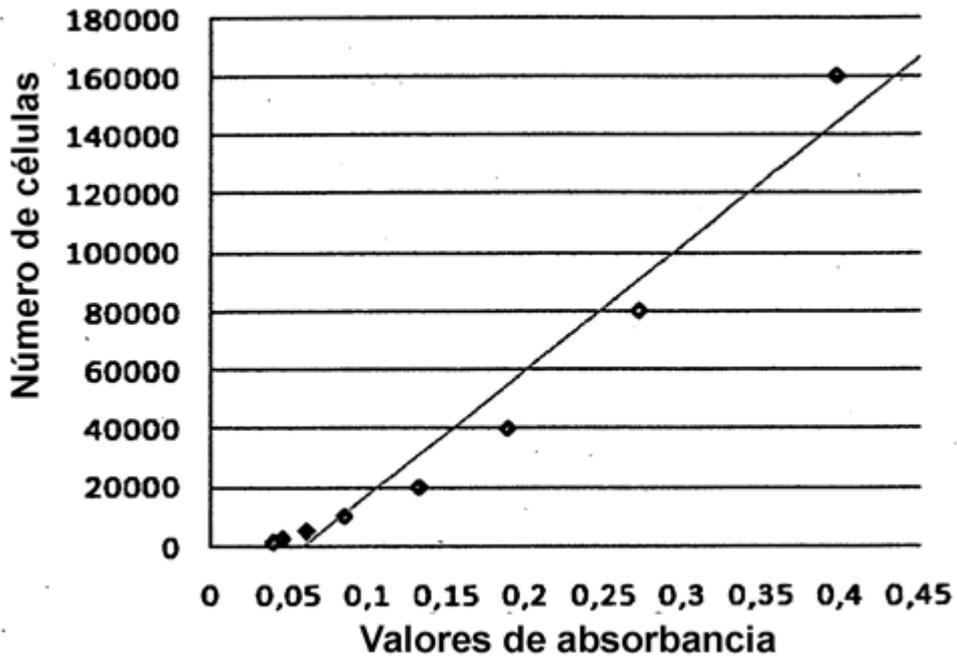
**FIG. 2**



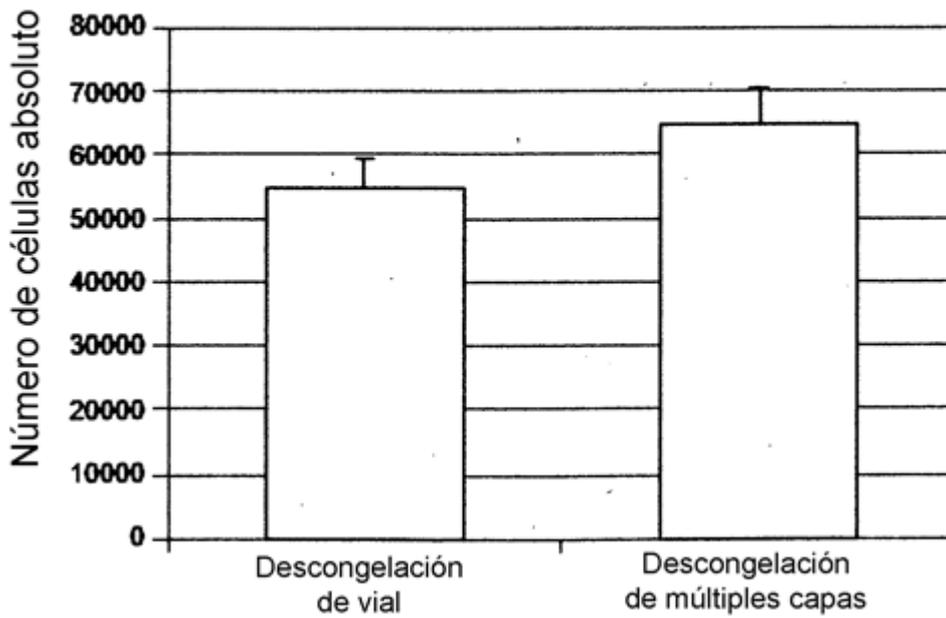
**FIG. 3**



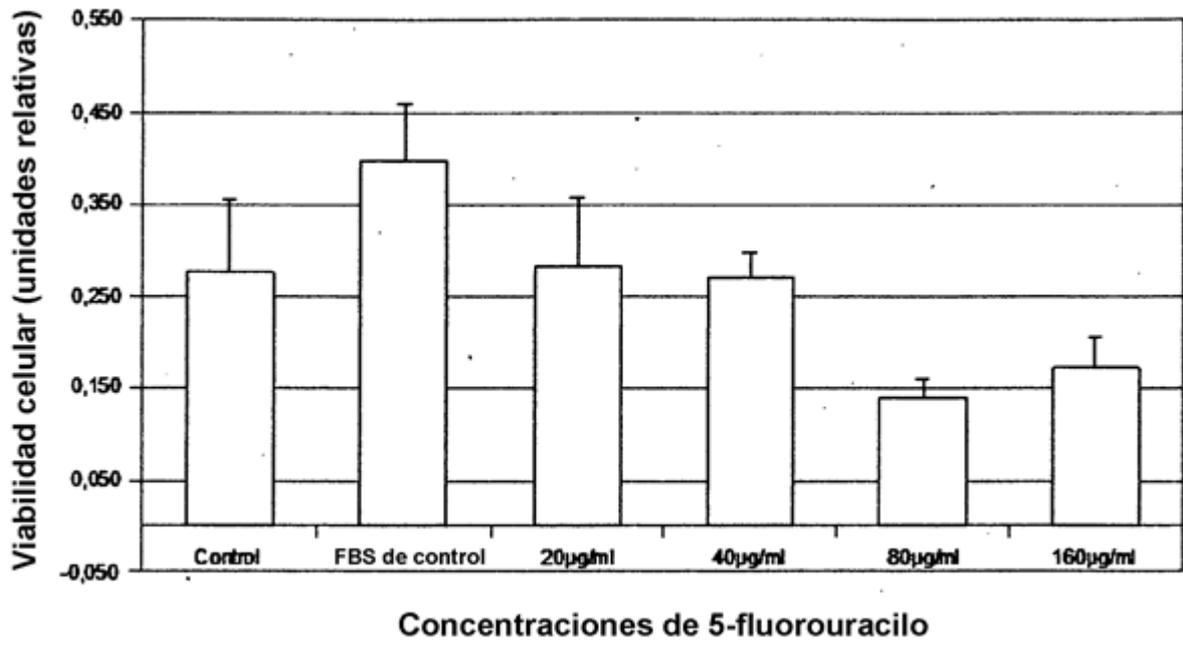
**FIG. 4**



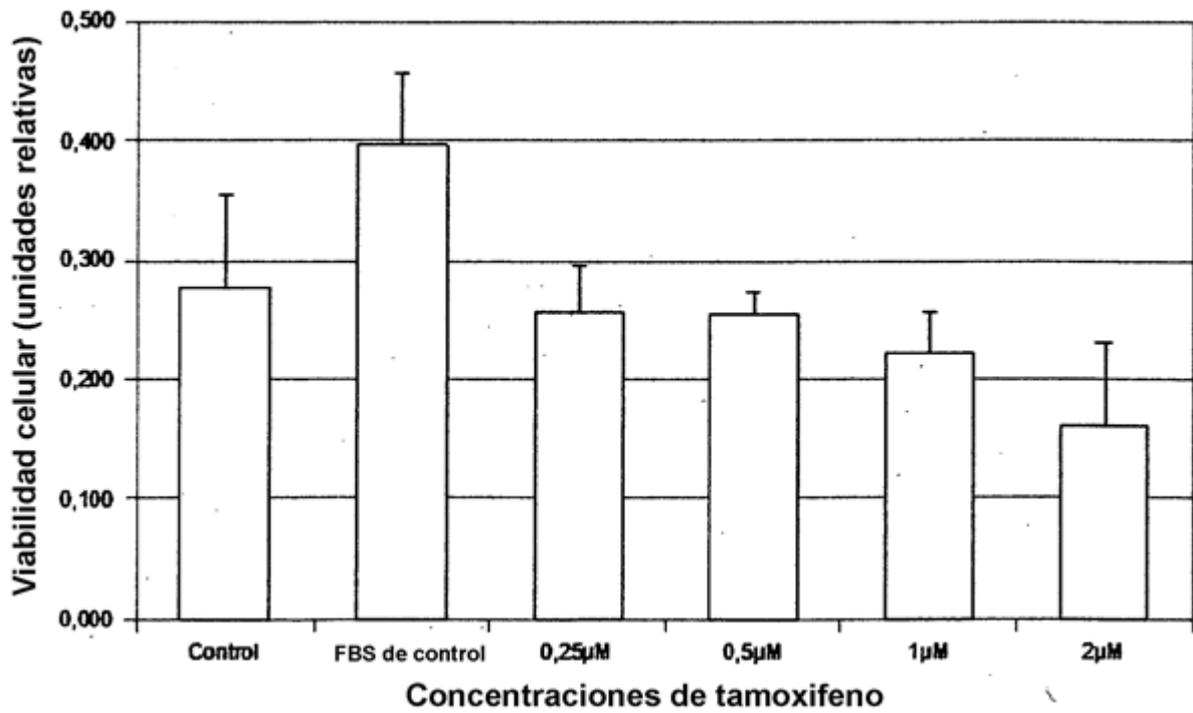
**FIG. 5**



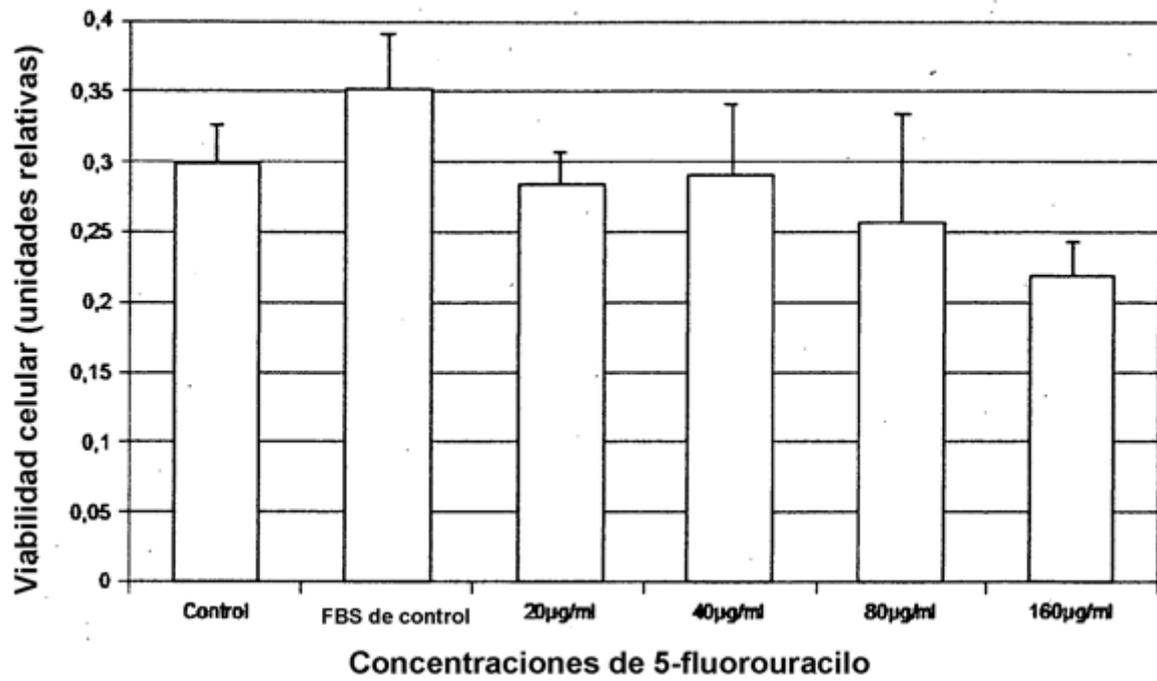
**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**

