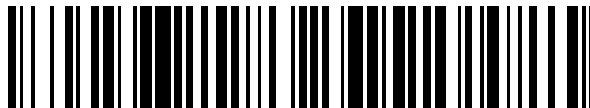


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 300**

51 Int. Cl.:

G01N 15/10 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2016 PCT/EP2016/062129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2016 E 16728867 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3304037**

54 Título: **Método para recoger una colonia de células**

30 Prioridad:

02.06.2015 US 201562169735 P

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOEHN, JADRANKA;
NEURATH, MARIANNE;
BOEHM, ERNST y
DOCKAL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 772 300 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 recoger una colonia de células

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para recoger una colonia de células y producir una línea celular a partir de esta colonia. La divulgación proporciona además la línea celular así establecida, y el uso de la línea celular en un método para producir una molécula biológica de interés.

10

Antecedentes

Las líneas celulares de producción derivadas de una única célula son deseables para la producción de proteínas recombinantes, ya que tales líneas celulares pueden contribuir a la homogeneidad y uniformidad del producto durante todo el periodo de cultivo dentro de una campaña de producción. La necesidad técnica y reguladora de líneas celulares derivadas de una única célula se ejemplifica en los siguientes documentos:

15

La directriz Q5D de la ICH Calidad de los productos biotecnológicos: derivación y caracterización de sustratos celulares usados para la producción de productos biotecnológicos/biológicos establece que, para productos recombinantes, el sustrato celular es la célula transfectada que contiene las secuencias deseadas, que se ha clonado de un único progenitor celular.

20

En el Suplemento de la FDA sobre los puntos a considerar en la producción y pruebas de nuevos fármacos y productos biológicos producidos mediante la tecnología de ADN recombinante: caracterización de ácidos nucleicos y estabilidad genética, se establece que se clona una única célula huésped que contiene el constructo de expresión para dar lugar al banco de células maestro (BCM).

25

La directriz Q5B de la ICH Calidad de los productos biotecnológicos: análisis del constructo de expresión en las células usadas para la producción de productos de proteína derivados de ADN-r transmite que el BCM deriva generalmente del clon celular seleccionado que contiene el constructo de expresión.

30

En *lai et al.*, 2013, *Pharmaceuticals* 6: 579-603, *Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production*, se señala que, además de ser un requisito regulador, la clonación de células únicas o la dilución limitante es técnicamente necesaria en el proceso porque la productividad de proteínas de células individuales en las células poblaciones de células transfectadas y amplificadas por genes son variadas.

35

Existen varios métodos y sistemas automatizados disponibles para lograr este objetivo en el desarrollo de líneas celulares, incluyendo la clonación por dilución limitante, la clonación por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y la recogida de colonias de un medio semisólido (por ejemplo, Aviso/ALS, Clonepix/Molecular Devices, ClonaCell EasyPick/Stem Cell/Hamilton).

40

Yoshimoto *et al.*, 2013, *Scientific Reports* 3:1191, describen un sistema automatizado para la reproducción basada en células únicas de alto rendimiento. Hou *et al.*, 2014, *New Biotechnology* 31 (3): 214-220, describen un análisis mediante ClonePix FL de alto rendimiento de clones que expresan anticuerpos monoclonales (Acm).

45

En la medida en que se refiere a la recogida de colonias de un medio semisólido, a lo que se refiere la invención, las tecnologías y los métodos mencionados anteriormente y otros conocidos comparten una limitación importante: usando métodos y tecnologías conocidos, no ha sido posible determinar si un La colonia dada (que va a ser) recogida de un medio semisólido deriva de una única célula o de más de una célula. Dicho de otro modo, no ha sido posible verificar si una colonia dada es monoclonal cuando se recoge la colonia del medio semisólido siguiendo protocolos conocidos.

50

En vista de los requisitos reguladores y técnicos para usar líneas celulares derivadas de una única célula en muchos procesos industriales, tales como la producción de proteínas recombinantes, y en vista de las limitaciones de las tecnologías conocidas para el desarrollo de tales líneas celulares, existe la necesidad constante de tecnologías mejoradas para desarrollar líneas celulares derivadas de una única célula.

55

Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un método para recoger una colonia de células, comprendiendo el método

(a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,

65

- (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- 5 (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 10 (e) determinar y registrar el área ocupada por la una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo, y
- (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e).
- 15 2. Un método para determinar el estado clonal de una colonia de células recogida, comprendiendo el método
- (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 20 (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 25 (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 30 (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e), y
- (g) deducir que una colonia de células seleccionada y recogida en (f) es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f).
- 35 3. Un método para recoger una colonia de células monoclonal, comprendiendo el método
- 40 (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- 45 (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 50 (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (f) deducir que una colonia de células es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células, y
- 55 (g) seleccionar y recoger al menos una colonia de células monoclonal.
- 60 4. Un método para producir una línea celular, comprendiendo el método
- (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 65 (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,

- (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 5 (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 10 (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e), y
- (g) producir una línea celular cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células seleccionada y recogida en (f).
- 15 5. Un método para determinar el estado clonal de una línea celular producida, comprendiendo el método
- (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 20 (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 25 (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 30 (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e),
- 35 (g) producir una línea celular cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células seleccionada y recogida en (f), y
- (h) deducir que la línea celular es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f) y cultivada para establecer la línea celular en (g).
- 40 6. Un método para producir una línea celular monoclonal, comprendiendo el método
- (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 45 (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- 50 (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 55 (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e),
- 60 (g) deducir que una colonia de células seleccionada y recogida en (f) es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f), y
- 65 (h) producir una línea celular monoclonal cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células seleccionada y recogida en (f) y que se deduce que es monoclonal en (g).

ES 2 772 300 T3

- 5 7. El método según el punto 4 o el punto 5, en el que en (g), la colonia de células se cultiva a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada en medio de crecimiento tamponado con carbonato durante de aproximadamente 3 días a 1 mes.
- 10 8. El método según el punto 6, en el que en (h), la colonia de células se cultiva a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada en medio de crecimiento tamponado con carbonato durante de aproximadamente 3 días a 1 mes.
- 15 9. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que las células son células animales, células humanas o células de insectos.
- 20 10. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que las células son células de mamífero.
- 25 11. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que las células son HEK293, CHO, BHK, células madre, líneas celulares continuas, células primarias, líneas celulares cancerosas, líneas celulares inmortalizadas por cualquier medio, hibridomas de cualquier especie, NSO, Sp2/0, HKB11, HuH7, HepG2, SkHep, Vero, Cos o PerC6, creciendo todas ellas de forma adherente, o adaptadas para crecer en suspensión y/o creciendo en suspensión.
- 30 12. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la pared del fondo sustancialmente plana del recipiente de muestra es transparente.
- 35 13. El método uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que en (c), se determina y registra la posición de la una o más células registrando una primera imagen de las células,
en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la primera imagen,
30 de tal manera que puedan reconocerse la una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo en la primera imagen,
y de tal manera que puedan asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más células en la primera imagen.
- 40 14. El método según el punto 13, en el que en (e), se determina y registra el área ocupada por la una o más colonias de células registrando una segunda imagen de las células,
en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la segunda imagen,
40 de tal manera que puedan reconocerse la una o más colonias de células en la segunda imagen,
y de tal manera que puedan asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más colonias de células en la primera imagen y puedan compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen .
- 45 15. El método según el punto 14, en el que se realizan el registro de la segunda imagen y la selección y recogida de una colonia de células usando un aparato de recogida de colonias.
- 50 16. El método según el punto 15, en el que el aparato de recogida de colonias es capaz de registrar imágenes de microscopio de fluorescencia y de campo claro.
- 55 17. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 16, en el que se realizan el registro de la segunda imagen y la selección y recogida de una colonia de células usando el sistema ClonePix FL.
- 60 18. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 16, en el que se realizan el registro de la segunda imagen y la selección y recogida de una colonia de células usando el sistema ClonePix 2.
- 65 19. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 18, en el que, si el método comprende una etapa de deducir que una colonia de células es monoclonal, un requisito adicional para deducir que la colonia de células es monoclonal es que la colonia de células tenga una forma que sea indicativa de monoclonalidad.
20. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 18, en el que, si el método comprende una etapa de deducir que una línea celular es monoclonal, un requisito adicional para deducir que la línea celular es monoclonal es que la colonia de células cultivada para producir la línea celular tenga una forma que sea indicativa de monoclonalidad.

- 5 21. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la selección y recogida de una colonia de células se basa en la presencia e intensidad de fluorescencia de la propia colonia y/o lo que rodea directamente a la colonia, y/o en una distancia suficiente a la siguiente colonia.
- 10 22. El método según uno cualquiera de los puntos 13 a 21, en el que durante el tiempo de incubación en (d), se registra(n) una o más imagen/imágenes adicional(es) de las células,
- 15 en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la(s) una o más imagen/imágenes adicional(es),
- en el que pueden reconocerse células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es),
- y en el que pueden asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a las células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es) de tal manera que puedan compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen.
- 20 23. El método según el punto 22, en el que se registra(n) la(s) imagen/imágenes adicional(es) una vez al día.
- 25 24. El método según uno cualquiera de los puntos 13 a 23, en el que la(s) imagen/imágenes se registra(n) usando microscopía óptica y una cámara.
26. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 24, en el que la primera imagen y cual(es)quier imagen/imágenes adicional(es), pero no la segunda imagen, se registra(n) usando un citómetro de formación de imágenes.
- 30 25. El método según el punto 25, en el que el citómetro de formación de imágenes es capaz de registrar imágenes de microscopio de campo claro del cultivo celular.
- 35 27. El método según uno cualquiera de los puntos 14 a 26, en el que la primera imagen y cual(es)quier imagen/imágenes adicional(es), pero no la segunda imagen, se registra(n) usando un citómetro Celigo.
28. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que después de (b) pero antes de (c), el método comprende además una etapa de elegir la al menos una región predeterminada en la pared de fondo basándose en una distribución de células en el recipiente de muestra.
- 40 29. El método según el punto 28, en el que la etapa de elegir la al menos una región predeterminada en la pared de fondo se lleva a cabo con la ayuda de un microscopio óptico o con la ayuda de un microscopio óptico y un ordenador.
- 45 30. El método según el punto 29, en el que el microscopio óptico es un citómetro de formación de imágenes, tal como un citómetro Celigo, o un aparato de recogida de colonias, tal como un sistema ClonePix FL o un sistema ClonePix 2.
- 50 31. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la al menos una región predeterminada en la pared de fondo corresponde a la totalidad del área de superficie de la pared de fondo que está en contacto con la suspensión.
32. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que en (c), se determina y registra la posición de cada célula ubicada dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo.
- 55 33. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que en (a), la concentración de las células en la suspensión es de 250 a 1000 células/ml si las células son líneas celulares libres de suero estables, de 50 a 500 células/ml si las células son líneas celulares que contienen suero estables, de 1000 a 5000 células/ml si las células se obtienen mediante transfección libre de suero, de 500 a 2000 células/ml si las células se obtienen mediante transfección que contiene suero, de 10^5 a 10^6 células/ml si las células se obtienen mediante fusión de hibridomas, o 1000 células/ml si las células son células HEK293.
- 60 34. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e) se tiñe con un agente de mejora de contraste para ayudar a seleccionar y/o recoger la colonia.
- 65 35. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que al menos una de las colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e) se tiñe con un colorante fluorescente para ayudar a seleccionar y/o recoger la colonia.

- 5 36. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que las células de al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e) comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan una molécula biológica de interés o una entidad biológica de interés.
37. El método según el punto 36, en el que la molécula biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, y una parte de los mismos.
- 10 38. El método según el punto 36, en el que la entidad biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una partícula viral, un vector viral, y una parte de los mismos.
39. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el medio semisólido se basa en metilcelulosa.
- 15 40. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el medio semisólido contiene uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de los mismos, marcados con un colorante fluorescente; proteínas, tales como receptores o ligandos, marcadas con un colorante fluorescente; colorantes fluorescentes específicos para un componente celular tal como para ácidos nucleicos; y sustratos enzimáticos fluorogénicos o inhibidores enzimáticos, tales como metotrexato (MTX) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- 20 41. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el recipiente de muestra es una placa de 1 pocillo o placa de Petri, placa de 6 pocillos, placa de 12 pocillos, placa de 24 pocillos, placa de 48 pocillos, placa de 96 pocillos, placa de 384 pocillos o una placa de 1536 pocillos.
- 25 42. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que en (b), la centrifugación se realiza a 1000 x g durante 10 minutos.
- 30 43. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que después de (b), las células son capaces de dividirse.
44. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que en (d), el recipiente de muestra se incuba a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada durante de aproximadamente 3 días a 1 mes.
- 35 El método de la invención permite determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas en la pared de fondo. Esta información puede usarse posteriormente (por ejemplo, antes o después de la recogida de colonias) para determinar el estado clonal de una colonia de células, es decir, para evaluar si una colonia dada ha crecido a partir de una única célula o de más de una célula, es decir, si una colonia dada es monoclonal. Además, esta información puede usarse para evaluar si una línea celular producida cultivando una colonia de células recogida es monoclonal, o para producir una línea celular cultivando una colonia recogida cuyo estado clonal se ha determinado que es monoclonal.
- 40 **Breve descripción de los dibujos**
- 45 Figura 1: Imagen de Celigo de un cultivo de células HEK293 en medio semisólido, registrado directamente después de la siembra pero antes de cualquier centrifugación.
- 50 Figura 2: Imagen de Celigo del mismo cultivo mostrado en la figura 1, registrada después de una primera etapa de centrifugación (véase el ejemplo 1).
- figura 3: Imagen de Celigo del mismo cultivo mostrado en la figura 1 y la figura 2, registrada después de una segunda etapa de centrifugación (véase el ejemplo 1).
- 55 Figura 4: Imagen de Celigo del mismo cultivo mostrado en las figuras 1-3, registrada después de una tercera etapa de centrifugación (véase el ejemplo 1).
- Figura 5: Imagen de Clonepix de una placa de 6 pocillos capturada 14 días después de la siembra. Las colonias seleccionadas para la recogida están numeradas.
- 60 Figura 6: Imágenes de Celigo de la misma placa de 6 pocillos que en la figura 5 capturadas el día 14 después de la siembra, registradas antes y después de la recogida de colonias.
- 65 Figura 7: Coordenadas de las colonias n.º 1, n.º 2, n.º 9, n.º 12 y n.º 15 numeradas en la figura 5 proporcionadas por Clonepix (panel superior) y Celigo (panel inferior).

Figura 8: Imágenes de Celigo de las colonias n.º 1, n.º 2, n.º 9, n.º 12 y n.º 15 capturadas el día de la siembra de células y 14 días después de la siembra justo antes de la recogida mediante Clonepix. Las numeraciones de colonias son como en la figura 5.

5 Figura 9: Imágenes de Celigo de una célula que crece para dar una colonia de células en medio semisólido en un plazo de 14 días (columna a la izquierda), o tres células que crecen para dar una colonia de células (columna a la derecha).

10 Figura 10: Distribución del origen mono o policlonal de 24 colonias cultivadas en medio semisólido, monitorizadas mediante Celigo, y determinadas adecuadas para la recogida mediante la tecnología Clonepix tal como se muestra a modo de ejemplo en las figuras 5 y 6.

Descripción detallada de la invención

15 La invención se refiere a un método para recoger una colonia de células de un medio semisólido. El método de la invención se caracteriza porque el uso de un medio semisólido se combina con la determinación y el registro de la posición de las células después de la siembra para permitir una evaluación de si una colonia dada que se hace crecer posteriormente en el medio semisólido deriva o no de una única célula, es decir, es monoclonal. En el método de la invención, esta evaluación se facilita mediante una etapa de centrifugación después de la siembra de células.

20 En los métodos conocidos, antes de recoger una colonia de células que luego puede usarse para establecer una línea celular, las células se siembran normalmente en medio líquido o semisólido. En estos métodos, la siembra de células constituye la denominada etapa de clonación, es decir, la etapa en el que las células individuales deben separarse entre sí de tal manera que puedan dar lugar a colonias de células monoclonales. Sin embargo, garantizar la monoclonalidad basándose solamente en la separación de las células durante su siembra no es trivial.

25 En los métodos de recogida de colonias conocidos que se basan en un medio semisólido, las colonias se evalúan normalmente tanto para propiedades celulares deseadas (tales como la productividad en la producción de una molécula biológica de interés) como para propiedades que se correlacionan con la monoclonalidad (tales como la forma de la colonia), y luego se recogen basándose en esto y se usan para establecer líneas celulares. Sin embargo, cuando se recogen colonias de un medio semisólido, por ejemplo, usando la tecnología Clonepix, actualmente no hay evidencia directa de que una colonia identificada para la recogida derive de una única célula (es decir, que la colonia sea monoclonal). Las probabilidades de monoclonalidad pueden estimarse basándose en cálculos estadísticos (y basándose en estudios empíricos), pero estos no proporcionan evidencia directa de monoclonalidad de una colonia. Estas probabilidades pueden aumentarse repitiendo la recogida de colonias en varias tandas, pero sólo a expensas de tiempo adicional e, incluso entonces, no puede evaluarse directamente si una colonia dada es monoclonal o no. Los datos presentados en el contexto de la presente invención muestran que la probabilidad de monoclonalidad puede ser menor del 60% en tales métodos de recogida de colonias basados en medio semisólido (véanse el ejemplo 3 y la figura 10).

30 Los métodos de recogida de colonias conocidos basados en un medio semisólido no han permitido determinar si una colonia celular dada deriva de una única célula (es decir, si la colonia es monoclonal). Sin embargo, el método de la invención permite esta verificación de la monoclonalidad, concretamente a través de una comparación de la posición de una o más células después de la siembra con el área ocupada por una colonia hecha crecer a partir de al menos una de estas células más tarde. Esto puede lograrse, por ejemplo, registrando al menos una primera imagen justo después de sembrar las células y una segunda imagen antes o en el contexto de seleccionar y recoger una colonia. La comparación de estas posiciones y área, por ejemplo, la comparación de al menos dos imágenes (particularmente en la región ocupada por una colonia dada en la segunda imagen) revela si la colonia ha surgido de una única célula o no. Es decir, puede evaluarse cuántas células estaban presentes (según sus posiciones determinadas y registradas, por ejemplo, en la primera imagen) después de la siembra de células en el área ocupada más tarde por una colonia dada, por ejemplo en la segunda imagen.

35 En el método de la invención, primero, las células se resuspenden en medio semisólido (tal como un medio semisólido basado en metilcelulosa), y la suspensión resultante se introduce en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana en contacto con la suspensión. De ese modo, se proporciona una suspensión que comprende células y medio semisólido en el recipiente de muestra para uso adicional en el método de la invención. Esta etapa de resuspender células en medio semisólido e introducir la suspensión en un recipiente de muestra también se denomina "siembra de células" o "siembra".

40 En realizaciones preferidas de la invención, el medio semisólido contiene uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de los mismos, marcados con un colorante fluorescente; proteínas, tales como receptores o ligandos, marcadas con un colorante fluorescente; colorantes fluorescentes específicos para un componente celular tal como para ácidos nucleicos; y sustratos enzimáticos fluorogénicos o inhibidores enzimáticos, tales como metotrexato (MTX) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En realizaciones preferidas de la invención, el recipiente de muestra es una placa de 1 pocillo o placa de Petri, placa de 6 pocillos, placa de 12 pocillos, placa de 24 pocillos, placa de 48 pocillos, placa de 96

pocillos, placa de 384 pocillos o una placa de 1536 pocillos.

El recipiente de muestra (por ejemplo, la placa o cápsula de cultivo celular) que contiene la suspensión de células y el medio semisólido se centrifuga de tal manera que, después de la centrifugación, se sitúan sustancialmente todas las células en la pared de fondo del recipiente de muestra. Preferiblemente, la capacidad de las células para dividirse se retiene a través de la etapa de centrifugación, es decir, después de la centrifugación, las células son capaces de dividirse. Preferiblemente, esta etapa de centrifugación se realiza el día de la siembra de células, lo más preferiblemente sin demora después de la siembra de células, es decir, normalmente en un plazo de aproximadamente 30 minutos o en un punto de tiempo mucho antes de que las células sembradas se dividan, dependiendo de las características de crecimiento del tipo de célula. En cambio, en los protocolos conocidos para la clonación basada en medio semisólido, las células se dejan inalteradas después de la siembra para permitir que se formen colonias (véanse, por ejemplo, Guía de aplicación para nuevos usuarios ClonePix FL de Molecular Devices, y también Dharshanan S, Hung CS, en *Methods Mol Biol.* 2014, 1131:105-12: Screening and subcloning of high producer transfectomas using semisolid media and automated colony picker). Después de centrifugación usando condiciones apropiadas, en el método de la invención, sustancialmente todas las células se sitúan en la pared de fondo del recipiente de muestra. Qué condiciones de centrifugación son apropiadas para su uso en el método de la invención depende, entre otras cosas, del tipo de célula particular y del medio semisólido usado, y pueden determinarse experimentalmente condiciones apropiadas (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 en el presente documento).

En realizaciones preferidas de la invención, después de la centrifugación pero antes de determinar la posición de una o más células, se elige al menos una región predeterminada en la pared de fondo, por ejemplo, basándose en una distribución de células en el recipiente de muestra. Esta etapa de elección puede llevarse a cabo con la ayuda de un microscopio óptico o con la ayuda de un microscopio óptico y un ordenador, en la que el microscopio óptico puede ser, por ejemplo, un citómetro de formación de imágenes, tal como un citómetro Celigo, o un aparato de recogida de colonias, tal como un sistema ClonePix FL o un sistema ClonePix 2. Sin embargo, la al menos una región predeterminada en la pared de fondo también puede elegirse insertando el recipiente de muestra en un dispositivo tal como un citómetro de formación de imágenes o un aparato de recogida de colonias en una orientación definida que el dispositivo requiere, definiéndose de ese modo automáticamente al menos una región predeterminada en la pared de fondo del recipiente de muestra que analizará el dispositivo.

En la siguiente etapa del método de la invención, se determina y registra la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo. Preferiblemente, esta etapa de determinación y registro se realiza el día de la siembra de las células, más preferiblemente sin demora después de la centrifugación, por ejemplo, en un plazo de 30 minutos o en un tiempo antes de que las células se dividan. La determinación y el registro de la posición de la una o más células pueden realizarse, por ejemplo, mediante inspección manual del recipiente de muestra usando un microscopio óptico o, por ejemplo, usando un dispositivo parcial o totalmente automatizado, tal como un citómetro de formación de imágenes (por ejemplo, un citómetro Celigo (Brooks Life Science Systems, Nexcelom)). En realizaciones preferidas de la invención, la posición de cada célula ubicada dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo se determina y registra en esta etapa. Determinar y registrar la posición de una o más células (por ejemplo, cada célula) ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo permite luego deducir si una colonia de células que ha crecido dentro de la al menos una región predeterminada es monoclonal o no: la colonia es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en la etapa descrita en este párrafo, está ubicada dentro del área ocupada por la colonia; en ese caso, la colonia deriva de una única célula, es decir, es monoclonal.

En realizaciones preferidas de la invención, se determina y registra la posición de la una o más células registrando una primera imagen de las células, en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la primera imagen, de tal manera que puedan reconocerse la una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo en la primera imagen, y de tal manera que puedan asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más células en la primera imagen. Más preferiblemente, la primera imagen se registra usando un citómetro de formación de imágenes, lo más preferiblemente un citómetro de formación de imágenes capaz de registrar imágenes de microscopio de campo claro, por ejemplo un citómetro Celigo (Brooks Life Science Systems, Nexcelom).

Después de determinar y registrar la posición de una o más células tal como se describió anteriormente (el día de la siembra), el recipiente de muestra se incuba en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias. Las condiciones adecuadas dependen, entre otras cosas, del tipo de células usadas y, si es necesario, las condiciones adecuadas pueden determinarse experimentalmente. En realizaciones preferidas, durante esta etapa de incubación, se registra(n) una o más imagen/imágenes adicional(es) de las células en las que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la(s) una o más imagen/imágenes adicional(es), en la que pueden reconocerse células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es), y en la que pueden asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a las células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es) de tal manera que puedan compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen. Preferiblemente, se registra(n) la(s) imagen/imágenes adicional(es) usando microscopía óptica y

una cámara, por ejemplo, un citómetro de formación de imágenes, más preferiblemente un citómetro de formación de imágenes capaz de registrar imágenes de microscopio de campo claro, por ejemplo un citómetro Celigo (Brooks Life Science Systems, Nexcelom).

5 Luego, una vez que han crecido una o más colonias de células, se determina y registra el área ocupada por una o más colonias de células ubicadas dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo. De nuevo, esto puede realizarse, por ejemplo, mediante inspección manual del recipiente de muestra usando un microscopio óptico o, por ejemplo, usando un dispositivo parcial o totalmente automatizado, tal como un aparato de recogida de colonias (por ejemplo, un sistema Clonepix tal como ClonePix FL o ClonePix 2 (Molecular Devices o Genetix)).

10 En realizaciones preferidas de la invención, se determina y registra el área ocupada por una o más colonias de células ubicadas dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo registrando una segunda imagen de las células, en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo es el plano focal de la segunda imagen, de tal manera que pueden reconocerse la una o más colonias de células en la segunda imagen, y pueden asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más colonias de células en la segunda imagen y pueden compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen. Más preferiblemente, la segunda imagen se registra usando un aparato de recogida de colonias, lo más preferiblemente un aparato de recogida de colonias capaz de registrar imágenes de microscopio de fluorescencia y de campo claro, tal como un sistema ClonePix FL o ClonePix 2.

20 En realizaciones preferidas de la invención, al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas tal como se describió anteriormente se tiñe con un agente de mejora de contraste, tal como un colorante fluorescente, para ayudar a seleccionar y/o recoger la colonia. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante un aditivo que puede estar presente en el medio semisólido y que se une a y/o reacciona con una molécula o entidad biológica de interés que las células de la colonia comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan: tal aditivo comprende el agente de mejora de contraste, por ejemplo colorante fluorescente, que tiñe la colonia. La molécula biológica de interés puede seleccionarse del grupo que consiste en: una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, y una parte de los mismos; la entidad biológica de interés puede seleccionarse del grupo que consiste en: una partícula viral, un vector viral, y una parte de los mismos.

25 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método para recoger una colonia de células; en estas realizaciones, se selecciona y se recoge al menos una de la una o más colonias de células cuya área se determinó y registró tal como se expuso anteriormente. Preferiblemente, la selección y recogida de la al menos una colonia de células se realizan el mismo día que se determina y registra el área ocupada por la al menos una colonia de células. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante la inspección manual del recipiente de muestra usando un microscopio óptico y recogiendo manualmente una colonia usando, por ejemplo, una pipeta manual o, por ejemplo, esto puede realizarse usando un dispositivo parcial o totalmente automatizado, tal como un aparato de recogida de colonias (por ejemplo, un sistema Clonepix tal como ClonePix FL o ClonePix 2 (Molecular Devices o Genetix)). En estas realizaciones, el hecho de que se hayan determinado y registrado la posición de una o más células y el área ocupada por una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo, tal como se describió anteriormente, permite comparar la(s) posición/posiciones y área(s) registrada(s) en cualquier tiempo antes o después de seleccionar y recoger una colonia para determinar si la colonia es monoclonal: la colonia es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra después de la siembra y centrifugación de células, está ubicada dentro del área ocupada por la colonia aproximadamente en el momento de su selección y recogida; en ese caso, la colonia deriva de una única célula, es decir, es monoclonal. En realizaciones preferidas de la invención, la selección y recogida de una colonia de células se basan en la presencia e intensidad de fluorescencia de la colonia, y/o en una distancia suficiente a la siguiente colonia para evitar la recogida simultánea de una colonia no deseada. En realizaciones preferidas de la invención, el éxito de la recogida de colonias se verifica visualmente, por ejemplo inspeccionando manualmente las células restantes en el medio semisólido o, por ejemplo, registrando una última imagen de las células restantes en el medio semisólido (realizándose el registro de la misma manera que se describe en el presente documento para una primera imagen o una segunda), después de que se haya recogido al menos una colonia; verificando visualmente el éxito de la recogida de colonias, en este caso, significa evaluar a simple vista (inspección manual) o en la última imagen si la al menos una colonia seleccionada para la recogida se recogió con éxito.

30 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método para determinar el estado clonal de una colonia de células recogida, en el que las etapas hasta e incluyendo la selección y recogida de al menos una colonia de células se llevan a cabo tal como se describió anteriormente. De manera posterior, en estas realizaciones, se deduce que una colonia de células seleccionada y recogida tal como se describió anteriormente es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra después de la siembra y centrifugación de células (véase anteriormente), está ubicada dentro del área determinada y registrada (tal como se describió anteriormente) como el área ocupada por la colonia de células que se ha seleccionado y recogido (etapa de deducción). Opcionalmente, en una etapa de deducir que una colonia de células es monoclonal, un requisito adicional para deducir que la colonia de células es monoclonal puede ser que la colonia de células tenga una forma

que sea indicativa de monoclonalidad (por ejemplo, tamaño de la colonia, redondez de la colonia, rugosidad de la colonia y distancia a otras colonias).

5 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método para recoger una colonia de células monoclonal; en estas realizaciones, se lleva a cabo una etapa de deducir que una colonia de células es monoclonal (tal como se describió anteriormente) después de determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células pero antes de la etapa de seleccionar y recoger al menos una colonia de células. En estas realizaciones, en lugar de seleccionar y recoger al menos una colonia de células (tal como anteriormente), se recoge al menos una colonia de células monoclonal, es decir, se recoge al menos una colonia que se ha deducido que es monoclonal en la etapa de deducción descrita anteriormente.

15 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método de producción de una línea celular. En este método, se selecciona y recoge al menos una o más colonias de células según el método de la invención para recoger una colonia de células, tal como se describió anteriormente, y luego se produce una línea celular cultivando en condiciones adecuadas tal colonia de células seleccionada y recogida. Este método de producción de una línea celular permite más adelante deducir si una línea celular producida es monoclonal o no: la línea celular es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula (determinada y registrada tal como se describió anteriormente) está ubicada dentro del área ocupada por la colonia (determinada y registrada tal como se describió anteriormente) de la que deriva la línea celular mediante cultivo; en ese caso, la línea celular deriva de una única célula, es decir, es monoclonal.

20 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método para determinar el estado clonal de una línea celular producida, en el que las etapas hasta e incluyendo la producción de una línea celular se llevan a cabo tal como se describió anteriormente. De manera posterior, en estas realizaciones, se deduce que una línea celular producida es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en una etapa previa (véase anteriormente), está ubicada dentro del área determinada y registrada (tal como se describió anteriormente) como el área ocupada por la colonia de células que se ha seleccionado, recogido y cultivado en condiciones adecuadas para producir la línea celular.

30 Algunas realizaciones de la invención se refieren a un método para producir una línea celular monoclonal. En estas realizaciones, se lleva a cabo una etapa de deducir que una colonia de células es monoclonal después de la etapa de seleccionar y recoger al menos una colonia de células, tal como se describió anteriormente. Luego, en estas realizaciones, se produce una línea celular monoclonal cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células monoclonal.

35 Alternativamente, según la invención, un método para producir una línea celular monoclonal comprende las etapas del método descrito anteriormente para recoger una colonia de células monoclonal y, además, una etapa adicional de producción de la línea celular monoclonal cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células monoclonal seleccionada y recogida tal como se describió anteriormente.

40 Además, la presente divulgación proporciona una línea celular producida mediante los métodos descritos anteriormente. En realizaciones preferidas de la divulgación, las células de la línea celular comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan una molécula biológica de interés o una entidad biológica de interés; en la que la molécula biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, y una parte de los mismos; y/o en el que la entidad biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una partícula viral, un vector viral, y una parte de los mismos. Realizaciones preferidas de la divulgación proporcionan una línea celular monoclonal producida mediante el método descrito anteriormente de producción de una línea celular monoclonal. Además, la presente divulgación proporciona un uso de la línea celular definida en este párrafo, por ejemplo, la línea celular monoclonal, en un método para producir la molécula biológica y/o la entidad biológica de interés.

55 En los métodos de la presente invención, tal como se describió anteriormente, la etapa de centrifugación facilita garantizar o verificar la monoclonalidad de una colonia (o de una línea celular producida mediante el cultivo de la colonia) al permitir una comparación de la posición de una o más células (en un plano) en la pared de fondo después de la siembra y centrifugación con el área ocupada por la colonia en un tiempo posterior (antes o en el contexto de la selección y recogida de una colonia). Esta comparación puede realizarse, por ejemplo, comparando las imágenes primera y segunda descritas anteriormente que muestran células después de la siembra y centrifugación, y colonias crecidas de manera posterior, respectivamente, en el área ocupada por la colonia en la segunda imagen.

60 En el caso de una comparación basada en una primera imagen y una segunda tal como se describió anteriormente, la comparación puede realizarse comparando las coordenadas o cualquier otro identificador único asignado a las células y colonias en las imágenes. En el caso de que se registren una primera imagen y una segunda de tal manera que las coordenadas o cualquier otro identificador único asignado a las células y colonias no puedan compararse directamente entre la primera imagen y la segunda, los dos sistemas de coordenadas u otro identificador único usados en las dos imágenes pueden armonizarse de tal manera que pueda establecerse la comparación. Por ejemplo, si el punto de origen de un sistema de coordenadas (bidimensional) usado en la primera imagen se

encuentra a cierta distancia en una cierta dirección lejos del punto de origen de un sistema de coordenadas (bidimensional) usado en la segunda imagen, las coordenadas asignadas a las células en la primera imagen pueden ajustarse en esta distancia en la dirección apropiada para corresponder a las coordenadas asignadas a las colonias en la segunda imagen, o viceversa.

5 Realizaciones preferidas de la invención se refieren al desarrollo de líneas celulares usando la plataforma Clonepix FL que proporciona la denominada técnica de recogida de halo de fluorescencia. El sistema Clonepix consiste en un aparato de recogida de colonias semiautomático que puede identificar colonias derivadas de líneas celulares de mamífero secretoras de proteínas recombinantes basándose en sus propiedades ópticas en medio semisólido en
10 placas de múltiples pocillos. Las colonias que producen una proteína recombinante pueden identificarse añadiendo un anticuerpo marcado con fluorocromo contra la proteína recombinante secretada en el medio semisólido que forma un inmunoprecipitado alrededor de la colonia. Por tanto, puede detectarse un halo fluorescente que rodea la colonia mediante excitación y detección de fluorescencia a una longitud de onda específica. Mediante el uso de software de formación de imágenes, el tamaño del halo fluorescente puede medirse y relacionarse con el tamaño de
15 la colonia. Esto permite la selección de colonias según su productividad de proteínas recombinantes y recogerlas usando un pasador de acero, en placas de múltiples pocillos. Sin embargo, la resolución del sistema óptico del sistema Clonepix no es lo suficientemente alta como para identificar células únicas en el medio semisólido el día de la siembra.

20 En realizaciones preferidas de la invención, los inventores usaron en su lugar el citómetro de formación de imágenes Celigo para evaluar si una colonia dada deriva de una única célula, y para monitorizar el crecimiento de colonias en las placas de múltiples pocillos en medio semisólido de forma regular desde la siembra hasta la recogida. La resolución de las imágenes de Celigo permitió a los inventores identificar células únicas, y el software permite el seguimiento de las células a lo largo del tiempo al guardar las coordenadas.

25 En estas realizaciones preferidas, para facilitar la formación de imágenes de células que crecen en medio semisólido, se requirió centrifugar las placas de cultivo en una centrífuga de laboratorio en ajustes de baja velocidad y aceleración lenta y alta rotura. Las células deben recogerse en el fondo de la placa, porque el Celigo puede explorar una placa de cultivo celular sólo en un plano óptico. Al combinar ambos sistemas (Clonepix y Celigo), así como la centrifugación, los inventores pudieron determinar si una colonia de alta producción dada recogida mediante
30 la tecnología Clonepix deriva de una única célula.

Por tanto y por ejemplo, según estas realizaciones preferidas, el método de la invención hace que sea posible hacer crecer y recoger colonias en y a partir de medio semisólido, por ejemplo, medio que contiene metilcelulosa, que
35 derivan de una única célula. Los datos relacionados con la invención también muestran que las colonias que derivan de más de una célula no pueden distinguirse de manera fiable por el tamaño o la redondez solos de las colonias monoclonales. El método de la invención permite el seguimiento y la recogida de colonias derivadas de células únicas para el desarrollo de líneas celulares más estables y uniformes, por ejemplo, para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico humano. El método es aplicable para muchas líneas celulares, incluidas
40 HEK293, CHO, BHK, células madre, líneas celulares continuas, células primarias, líneas celulares cancerosas, líneas celulares inmortalizadas por cualquier medio, hibridomas de cualquier especie, NSO, Sp2/0, HKB11, HuH7, HepG2, SkHep, Vero, Cos o PerC6, creciendo todas ellas de manera adherente, o adaptadas para crecer en suspensión y/o creciendo en suspensión. Realizaciones preferidas de la invención también ofrecen la ventaja de que los análisis de imágenes, registradas para determinar y registrar la posición de una o más células o el área ocupada
45 por una colonia, pueden realizarse en cualquier momento, porque todas las imágenes y posiciones y áreas de células y colonias (por ejemplo, en forma de coordenadas), se almacenan en un ordenador o en un medio de almacenamiento adecuado usando el software respectivo. Esto también puede facilitar la decisión de si es necesario o no volver a clonar una línea celular de alta producción.

50 En el contexto de la invención, el término "células" incluye cualquier tipo de célula que pueda hacerse crecer en medio semisólido. En particular, se incluyen células animales, células humanas y células de insectos. En realizaciones preferidas de la invención, las células son células de mamífero, tales como HEK293, CHO, BHK, células madre, líneas celulares continuas, células primarias, líneas celulares cancerosas, líneas celulares inmortalizadas por cualquier medio, hibridomas de cualquier especie, NSO, Sp2/0, HKB11, HuH7, HepG2, SkHep,
55 Vero, Cos o PerC6, creciendo todas ellas de manera adherente, o adaptadas para crecer en suspensión y/o creciendo en suspensión.

En realizaciones preferidas de la invención, algunas o todas las células comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan una molécula biológica de
60 interés o una entidad biológica de interés. En realizaciones preferidas de la invención, la molécula biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, y una parte de los mismos. En realizaciones preferidas de la invención, la entidad biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una partícula viral, un vector viral, y una parte de los mismos.

65 La densidad apropiada a la cual las células se resuspenden, es decir, se siembran en un medio semisólido para proporcionar una "suspensión que comprende células y medio semisólido" depende del tipo de célula usado y puede

optimizarse caso por caso. Una densidad celular típica es de 250 a 1000 células/ml si las células son líneas celulares libres de suero estables, de 50 a 500 células/ml si las células son líneas celulares que contienen suero estables, de 1000 a 5000 células/ml si se obtienen las células mediante transfección libre de suero, de 500 a 2000 células/ml si las células se obtienen mediante transfección que contiene suero, de 10^5 a 10^6 células/ml si las células se obtienen mediante fusión de hibridomas, o 1000 células/ml si las células son células HEK293.

En el contexto de la invención, el término “medio semisólido” incluye cualquier medio de cultivo celular que tenga una viscosidad apropiada para facilitar la separación espacial de células individuales y de colonias que crecen a partir de las mismas, debido a la difusión limitada dentro del medio. En realizaciones preferidas de la invención, el medio semisólido se basa en metilcelulosa, tal como el número CAS 9004-67-5. En realizaciones preferidas de la invención, la concentración de metilcelulosa en el medio semisólido es de entre el 1,3 y el 2,5% (véase METHODS LN CELL BIOLOGY, volumen 14, David M. Prescott, Academic Press, 13 de enero de 1977, páginas 240f y 258f), tal como del 2% p/v (disolución acuosa), y la viscosidad es de entre 1200 cP y 5600 cP, tal como 1500 cP o 4000 cP. En realizaciones preferidas de la invención, el medio semisólido es CloneMedia (Molecular Devices), por ejemplo, CloneMedia-HEK, CloneMedia-CHO, Clone Media-CHO-G, CloneMedia-G o CloneMedia. En realizaciones preferidas de la invención, el medio semisólido comprende además otros aditivos. En otras realizaciones, el medio semisólido se basa en agarosa.

Los “aditivos” presentes en el medio semisólido según realizaciones preferidas de la invención incluyen agentes de mejora de contraste, tales como agentes fluorescentes, que pueden teñir colonias de células que presentan una propiedad particular, tal como la producción de una molécula biológica de interés o un entidad biológica de interés. Esta tinción de colonias puede ayudar a seleccionar colonias adecuadas para la recogida, y a recoger estas colonias. En realizaciones preferidas de la invención, un aditivo presente en el medio semisólido se selecciona del grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de los mismos, marcados con un colorante fluorescente; proteínas, tales como receptores o ligandos, marcadas con un colorante fluorescente; colorantes fluorescentes específicos para un componente celular tal como para ácidos nucleicos; y sustratos enzimáticos fluorogénicos o inhibidores enzimáticos, tales como metotrexato (MTX) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En el contexto de la invención, el término “recipiente de muestra que tiene una pared de fondo sustancialmente plana” incluye cualquier recipiente de muestra que, en primer lugar, sea adecuado para el cultivo celular, y en segundo lugar, tenga una pared de fondo que sea sustancialmente plana, preferiblemente tal que una fuerza centrífuga perpendicular a la pared de fondo (siendo la fuerza centrífuga apropiada para la etapa de centrifugación tal como se define en el método descrito anteriormente de la invención) no mueva las células lateralmente (es decir, en direcciones perpendiculares a la fuerza centrífuga) cuando estas células se sitúan en la pared de fondo. En realizaciones preferidas de la invención, el recipiente de muestra es una placa de fondo plano de 1 pocillo o placa de Petri, placa de 6 pocillos, placa de 12 pocillos, placa de 24 pocillos, placa de 48 pocillos, placa de 96 pocillos, placa de 384 pocillos o placa de 1536 pocillos, preferiblemente una placa de fondo plano de seis pocillos fabricada por Greiner, Corning, CytoOne, Nunc, BD Biosciences, Perkin Elmer y otros fabricantes, según lo que recomiendan, por ejemplo, los fabricantes de citómetros de formación de imágenes (tales como Celigo) y de aparatos de recogida de colonias (tales como ClonePix), por ejemplo, la placa 657160 Greiner™ de 6 pocillos. Las placas configuradas para usarse con Clonepix FL también son la placa negra de 6 pocillos de Genetix, PetriWell-1 de Genetix, la placa PetriWell-6 de Genetix y la bandeja Omni de Nunc. Para Clonepix, los usuarios también pueden solicitar que se les informe sobre si cierta placa es adecuada o ya está programada, a través de un formulario en línea “certificación de placa”, <http://mdc.custhelp.com/app/ask>. En realizaciones preferidas de la invención, la pared de fondo sustancialmente plana del recipiente de muestra es transparente.

En el contexto de la invención, la centrifugación del recipiente de muestra se realiza usando una centrifuga de laboratorio adecuada, tal como una centrífuga Eppendorf 5810R. Las condiciones apropiadas para centrifugar el recipiente de muestra se caracterizan porque, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células en la suspensión contenida en el recipiente de muestra se sitúan en la pared de fondo del recipiente de muestra. Las condiciones particulares dependen, entre otras cosas, de la composición particular del medio semisólido y en el tipo de célula particular empleado. Pueden determinarse condiciones apropiadas, por ejemplo, aplicando una gama de condiciones en centrifugaciones de prueba paralelas o posteriores, determinando mediante microscopía óptica si sustancialmente todas las células se sitúan en la pared de fondo del recipiente de muestra, y eligiendo la fuerza de centrifugación y el tiempo mínimos requeridos para que sustancialmente todas las células se sitúen de esta manera. En realizaciones preferidas de la invención, la centrifugación se realiza a $1000 \times g$ durante 10 minutos, usando un tiempo de aceleración de nivel 2 en una escala de 0 a 9, donde 9 es el más rápido y 2 es igual a 170 segundos (o una aceleración angular de 37 rad/s^2) y un tiempo de desaceleración de nivel 9 en una escala de 0 a 9, donde 9 es el más rápido que equivale a aproximadamente 30 segundos (o una desaceleración angular de 209 rad/s^2), cuando se usa una centrífuga Eppendorf 5810R con un rotor A-4-81 y cestillos MTP/flex. Alternativamente, pueden usarse 100 s de tiempo de aceleración (o 63 rad/s^2 de aceleración angular).

En el contexto de la invención, la expresión “sustancialmente todas las células se sitúan en la pared de fondo” se refiere a una situación en la que, cuando se registra una imagen de microscopio de células en la pared de fondo (en la que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es

el plano focal de la imagen), todas las células que son visibles en la imagen también están en el foco de la imagen, es decir, no aparecen células desenfocadas. En tal situación, las células visibles en el foco de la imagen pueden ubicarse directamente en la pared de fondo (es decir, tocar la pared de fondo) y/o directamente por encima de la pared de fondo (por ejemplo, sin tocar la pared de fondo pero tan cerca de ella que las células todavía están en el foco de la imagen), a lo que se hace referencia en el presente documento usando la expresión general de que las células están “situadas en la pared de fondo”.

En el contexto de la invención, el término “determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo” se refiere a un procedimiento para determinar la posición de una o más de tales células en relación con un punto de referencia dado y registrar esta posición o estas posiciones como información de tal manera que pueda accederse de nuevo a esta información en un tiempo posterior. Preferiblemente, se determina y registra la posición de una o más células de una manera en la que esta posición o estas posiciones se define(n) en dos dimensiones, por ejemplo, en un plano paralelo a la pared de fondo del recipiente de muestra. Como un ejemplo particularmente simple, la posición de una o más de tales células puede determinarse mediante la inspección del recipiente de muestra usando un microscopio óptico; la posición de una o más de tales células puede determinarse manualmente ajustando el foco del microscopio a un plano paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, de tal manera que las células situadas en la pared de fondo puedan verse enfocadas; la posición de una o más (por ejemplo: todas) de tales células puede registrarse entonces, por ejemplo, aplicando manualmente marcas al recipiente de muestra (por ejemplo, con un rotulador permanente, en la superficie exterior de la pared de fondo del recipiente de muestra). En realizaciones preferidas de la invención, la posición de una o más de tales células se determina y registra analizando el recipiente de muestra usando un citómetro de formación de imágenes, tal como un citómetro Celigo, que registra una primera imagen de las células y asigna coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más células en la primera imagen.

El término “citómetro de formación de imágenes”, tal como se usa en el presente documento para describir realizaciones preferidas de la invención, se refiere a un dispositivo capaz de analizar propiedades de células que se sitúan en un plano, tales como células que se sitúan en la pared de fondo del recipiente de muestra según la presente invención, o tales como células adherentes que se adhieren a la pared de fondo de un recipiente de muestra de fondo plano. Normalmente, un citómetro de formación de imágenes de este tipo analiza las células registrando una o más imágenes de microscopio de las células y luego realizando análisis con estas imágenes. Por ejemplo, pueden asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a una o más células visibles en la(s) imagen(es) registrada(s) y guardarse en un ordenador o medio de almacenamiento adecuado, determinando y registrando de ese modo sus posiciones. Un ejemplo de un citómetro de formación de imágenes es un citómetro Celigo (Brooks Life Science Systems, Nexcelom).

Cuando se describe el registro de imágenes en realizaciones preferidas de la invención anterior, el término “plano” se usa para referirse a un plano óptico, es decir, un plano bidimensional en un espacio tridimensional. El plano en el que se enfoca una imagen se denomina el “plano focal” de la imagen.

En el contexto de la invención, el término “región predeterminada en la pared de fondo” se refiere a la totalidad o parte del área de superficie de la pared de fondo que está en contacto con la suspensión que comprende células y medio semisólido. En realizaciones de la invención, una región predeterminada corresponde a la totalidad del área de superficie que está en contacto con la suspensión. En otras realizaciones de la invención, se elige al menos una región predeterminada en la pared de fondo que corresponde a parte o la totalidad del área de superficie en contacto con la suspensión después de centrifugar el recipiente de muestra pero antes de determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de la al menos una región predeterminada; preferiblemente, la elección de al menos una región predeterminada se basa en una distribución de células en el recipiente de muestra; por ejemplo, puede elegirse al menos una región predeterminada basándose en una distancia mínima entre células ubicadas dentro de la al menos una región predeterminada.

En realizaciones preferidas de la invención, se registran imágenes usando microscopía óptica y una cámara. Registrar una primera imagen no significa necesariamente que sólo se registre una imagen, sino que se registran una o más imágenes y se elige una imagen como primera imagen. Esto también se aplica a otras imágenes registradas según realizaciones de la presente invención. La imagen elegida como la primera imagen es una en la que pueden reconocerse células individuales y en la que pueden asignarse coordenadas a células individuales, preferiblemente para que coincidan con las coordenadas de las colonias mostradas en otras imágenes registradas más tarde, tales como una segunda imagen (véase a continuación). En realizaciones preferidas de la invención, la primera imagen se registra usando un citómetro de formación de imágenes, tal como un citómetro de formación de imágenes capaz de capturar imágenes de microscopio de campo claro del cultivo celular, tal como un citómetro Celigo (Brooks Life Science Systems, Nexcelom). La primera imagen registrada en realizaciones preferidas de la invención se registra por encima o por debajo del recipiente de muestra, y la imagen se enfoca en un plano óptico horizontal (es decir, un plano óptico que es paralelo a la pared de fondo sustancialmente plana del recipiente de muestra) que corta las células por encima de la pared de fondo del recipiente de muestra.

En realizaciones preferidas de la invención, se registra una primera imagen sin demora después de la etapa de

centrifugación, es decir, normalmente en un plazo de 30 minutos o en un punto de tiempo mucho antes de que las células sembradas se dividan, dependiendo de las características de crecimiento del tipo de célula.

5 En realizaciones preferidas de la invención, durante la fase de crecimiento de colonias entre la determinación y el registro de la posición de una o más células y la determinación y el registro del área ocupada por una o más colonias, respectivamente, el recipiente de muestra que contiene la suspensión se incuba a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada durante de aproximadamente 3 días a 1 mes. Estas condiciones son ejemplos de “condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células”.

10 Durante la fase de crecimiento de colonias, las colonias de células pueden crecer mientras las células se adhieren a la pared de fondo y/o mientras las células están en suspensión en el medio semisólido directamente por encima de la pared de fondo. Estas formas de crecimiento pueden distinguirse microscópicamente, ya que las células presentan diferentes morfologías dependiendo de si se adhieren o no a la pared de fondo.

15 En el contexto de la invención, el término “colonia” se refiere a un grupo o una agregación de células en medio semisólido (es decir, al menos dos células que se tocan entre sí). Tal colonia crece normalmente durante el periodo de incubación tras las etapas de siembra de las células en medio semisólido, centrifugación y determinación y registro de la posición de una o más células. En principio, o bien puede crecer una colonia a partir de una única célula suficientemente alejada de todas las demás células en el medio semisólido para que estas otras células no formen parte de la colonia hecha crecer a partir de una única célula, o bien puede crecer una colonia a partir de varias células lo suficientemente cerca unas de otras en el medio semisólido como para que más de una de ellas forme parte de la colonia hecha crecer a partir de las mismas.

20 En el contexto de la invención, el término “determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células” se refiere a un procedimiento para determinar el área ocupada por una o más colonias de células en relación con un punto de referencia dado y registrar esta área o estas áreas como información de tal manera que pueda accederse a esta información de nuevo en un tiempo posterior. Como un ejemplo particularmente simple, las áreas de una o más colonias pueden determinarse mediante la inspección del recipiente de muestra usando un microscopio óptico; el área de una o más de tales células puede determinarse manualmente ajustando el foco del microscopio a un plano paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, de tal manera que puedan verse enfocadas las colonias de células ubicadas en la pared de fondo; las áreas ocupadas por una o más de tales colonias pueden registrarse, por ejemplo, aplicando manualmente marcas al recipiente de muestra (por ejemplo, con un rotulador permanente, en la superficie exterior de la pared de fondo del recipiente de muestra) o memorizando estas áreas. En realizaciones preferidas de la invención, la posición de una o más de tales colonias de células se determina y registra analizando el recipiente de muestra usando un aparato de recogida de colonias, tal como un sistema ClonePix (por ejemplo, un sistema ClonePix FL o ClonePix 2), que registra una segunda imagen de las células y asigna coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más colonias de células en la primera imagen. Por tanto, el área ocupada por una o más colonias de células en la pared de fondo puede determinarse y registrarse como un área o áreas en un sistema de coordenadas bidimensional, por ejemplo. El área o áreas así determinadas y registradas, en realizaciones preferidas de la invención, son susceptibles de comparación con la posición de una o más células determinadas y registradas previamente; en particular, puede analizarse si se situó no menos y no más de una célula (después de la centrifugación) en el área ocupada por una colonia dada, lo que permite deducir si la colonia dada es monoclonal, es decir, deriva de una única célula.

45 El término “aparato de recogida de colonias”, tal como se usa en el presente documento al describir realizaciones preferidas de la invención, se refiere a un dispositivo capaz de seleccionar y recoger al menos una colonia de células del medio semisólido en un recipiente de muestra. Preferiblemente, la selección y recogida de colonias está parcial o totalmente automatizada en dicho dispositivo. Preferiblemente, un aparato de recogida de colonias es capaz de registrar imágenes de microscopio de campo claro y de fluorescencia de células y colonias de células. En realizaciones preferidas de la invención, basándose en propiedades de las colonias visibles en tales imágenes, el dispositivo puede (por ejemplo, con la entrada del usuario o según reglas predeterminadas) seleccionar y recoger colonias de células. Un ejemplo de un aparato de recogida de colonias es un sistema ClonePix, tal como un sistema ClonePix FL o ClonePix 2 (Molecular Devices, Genetix).

50 En el contexto de la invención, “seleccionar una colonia de células” significa identificar una colonia como adecuada para la recogida basándose en uno o más criterios tales como el tamaño de la colonia, la redondez de la colonia, la rugosidad de la colonia y la distancia a otras colonias (por ejemplo, una distancia mínima entre colonias, tal como 0,9 mm, puede elegirse como uno o más criterios que es/son necesario cumplir para que una colonia se identifique como adecuada para la recogida, es decir, para que se seleccione una colonia). En realizaciones preferidas de la invención, tales como realizaciones en las que se usa un aparato de recogida de colonias (tal como un sistema Clonepix) para seleccionar una colonia de células, el uno o más criterios en función del/de los que se selecciona una colonia como adecuada para la recogida pueden incluir la intensidad de fluorescencia (o la intensidad de otro tipo de tinción) de la propia colonia y/o de lo que rodea directamente a la colonia como un “halo” fluorescente, por ejemplo, como inmunoprecipitado. Esta intensidad de fluorescencia puede resultar de la detección de una molécula biológica o entidad de interés secretada por las células de la colonia o presentada en su superficie, por ejemplo, lográndose la

detección mediante un aditivo marcado con fluorescencia en el medio semisólido.

En el contexto de la invención, el término “recoger una colonia de células” se refiere al proceso de transferir una o más células de una colonia, pero no ninguna célula que no forme parte de la colonia, desde el recipiente de muestra que en que ha crecido la colonia a otro recipiente de muestra. Alternativamente, en lugar de transferir a otro recipiente de muestra, la una o más células de una colonia pueden usarse en otro método (por ejemplo, un método de análisis o un método de producción) tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o cultivo celular. En realizaciones preferidas de la invención, durante la recogida de una colonia, una o más células de la colonia se transfieren a un pocillo de una placa de múltiples pocillos (tal como una placa de 96 ó 384 pocillos) que contiene medio de cultivo celular adecuado para el cultivo del tipo de células que componen la colonia. En realizaciones preferidas de la invención, durante la recogida de una colonia, la una o más células de la colonia se aspiran del medio semisólido usando una punta de pipeta o cualquier dispositivo similar (por ejemplo, una aguja de acero inoxidable como la que forma parte de un aparato de recogida de colonias (tal como un sistema ClonePix FL o ClonePix 2)) y se introducen en un medio de crecimiento líquido expulsando la colonia de la punta de la pipeta o dispositivo similar usando aire comprimido y enjuagando la punta de la pipeta o dispositivo similar.

En realizaciones preferidas de la invención, la colonia se recoge basándose en la presencia e intensidad de su fluorescencia, una técnica también conocida como “técnica de recogida de halo fluorescente”. En tales realizaciones, un aditivo apropiado está presente en el medio semisólido para teñir de manera fluorescente colonias que comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan una molécula biológica de interés o entidad biológica de interés capaz de unirse a o reaccionar con el aditivo.

En realizaciones preferidas de la invención, las imágenes primera y segunda se comparan en el área ocupada por una colonia dada en la segunda imagen, en la que la colonia de células deriva de una única célula si la misma área en la primera imagen contiene sólo una célula. Esta comparación permite evaluar si una colonia dada ha surgido o no a partir de una única célula.

En el contexto de la invención, el término “estado clonal” se refiere a una propiedad de una colonia de células o de una línea celular, concretamente a la propiedad de ser monoclonal o no.

En el contexto de la invención, el término “monoclonal”, usado por ejemplo para caracterizar una colonia de células o una línea celular, significa “derivado de una única célula”. Dicho de otro modo, una colonia monoclonal es una colonia que ha crecido a partir de una única célula, y una línea celular monoclonal es una línea celular que ha crecido a partir de una única célula.

En realizaciones preferidas de la invención, se identifican colonias de interés comparando una primera imagen registrada usando un citómetro Celigo (que muestra una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo) con una segunda imagen registrada por el sistema ClonePix FL (mostrando colonias recogidas, o colonias que van a recogerse), en la que a una o más células y una o más colonias se le han asignado coordenadas para identificar su posición y áreas ocupadas, respectivamente. Por tanto, se identifican células individuales y/o colonias por sus coordenadas proporcionadas por los sistemas Celigo o ClonePix, aunque se usan diferentes sistemas de coordenadas (bidimensionales). El sistema ClonePix FL tiene su punto de origen en la esquina superior izquierda de la placa, mientras que el sistema Celigo tiene su punto de origen en el centro de cada pocillo, pero ambos sistemas miden en μm o mm y, por tanto, son comparables. En realizaciones preferidas de la invención, las coordenadas de Celigo se leen usando el modo de software “detección de tumoresferas” (“tumosphere detection”). En el submenú “puerta” (“gate”) en la pestaña “clases” (“classes”), pueden presentarse los detalles de la población, incluidas las coordenadas de una colonia seleccionada.

En realizaciones preferidas de la invención, la comparación entre las imágenes registradas usando un citómetro Celigo y las imágenes registradas usando el sistema ClonePix FL se logra a través de un método para armonizar las coordenadas de células y colonias de ambos sistemas, permitiendo el seguimiento de células y colonias, tal como se describe a continuación:

El sistema de coordenadas de Clonepix tiene su origen ($x = 0$, $y = 0$) en la esquina superior izquierda de la placa.

El sistema de coordenadas de Celigo tiene su origen en el centro de cada pocillo. Por tanto, las coordenadas de Clonepix de cada centro de pocillo deben determinarse o bien experimentalmente usando placas cuyos centros de pocillo están marcados, o bien usando coordenadas proporcionadas por el proveedor de placas; por ejemplo Greiner suministra coordenadas de centro de placa.

Las coordenadas (valores de x e y) de cada célula o colonia de células recogida o fotografiada se proporcionan como información mediante el software de Clonepix o Celigo respectivo.

Las coordenadas de Celigo y Clonepix pueden relacionarse entre sí mediante las siguientes ecuaciones:

X_{Celigo}coordenada x medida por Celigo [μm]
 X_{Clonepix} coordenada x medida por Clonepix [mm]
 $x0_{\text{Clonepix}}$ coordenada central de un pocillo almacenada en el software de Clonepix [mm]
 y_{Celigo}coordenada y medida por Celigo [μm]
 y_{Clonepix} coordenada y medida por Clonepix [mm]
 $y0_{\text{Clonepix}}$ coordenada central de un pocillo almacenada en el software de Clonepix [mm]

$X_{\text{Celigo}} = (X_{\text{Clonepix}} - x0_{\text{Clonepix}}) * 1000$
 $y_{\text{Celigo}} = (y_{\text{Clonepix}} - y0_{\text{Clonepix}}) * 1000$

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de las condiciones de centrifugación apropiadas

Las condiciones de centrifugación apropiadas para su uso en el método de la invención, a saber, en la etapa de centrifugación después de la siembra de células en medio semisólido (para que sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo del recipiente de muestra después de la centrifugación) dependen, entre otras cosas, del tipo de célula particular y el tipo de medio semisólido usado. Pueden determinarse condiciones apropiadas experimentalmente caso por caso, tal como se ejemplifica a continuación para las células HEK293.

Se resuspendieron células HEK293 a una densidad de 1000 células/ml en medio semisólido (el 90% v/v de CloneMedia-HEK (Molecular Devices, pedido K8685); el 10% v/v de medio CD293 (Life Technologies) complementado con L-glutamina 4 mM (Life Technologies), HEPES 10 mM (Life Technologies) y rojo de fenol 15 μM), según las instrucciones del fabricante (Molecular Devices). Se añadieron 2 ml de esta suspensión celular a un pocillo de una placa de 6 pocillos (Greiner). Se registró una imagen del pocillo que contenía la suspensión celular (figura 1), pero no pudo encontrarse un foco adecuado debido a la distribución de las células en tres dimensiones. Luego, se sometió la placa a varias etapas de centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5810R con un rotor A-4-81 y cestillos MTP/flex a 1000 x g usando una aceleración muy baja (2 de 9) y una alta fuerza de frenado (9 de 9), y se registró una imagen después de cada etapa de centrifugación, para determinar cómo de larga debía ser la centrifugación para que sustancialmente todas las células llegaran a la pared de fondo de la placa, es decir, en un plano óptico.

Después de una primera etapa de centrifugación de un minuto a aproximadamente 400 x g (ajustes de 1000 x g, aceleración 2 [195 segundos según las especificaciones de la centrífuga, pero en la presente experiencia sólo 100 s; puede variar considerablemente], frenado 9 [30 s]); se detuvo la campaña después de un minuto, por tanto, se alcanzó 400 x g), sin embargo, se registró una imagen (figura 2) que muestra la misma sección que la figura 1, pero no se encontró un foco adecuado para capturar todas las células en un plano óptico, sin embargo, algunas células ya se encontraban en el fondo del pocillo. Después de una etapa de centrifugación adicional durante 1 min y 50 s (10 s a 1000 g de manera efectiva, aceleración 2, frenado 9) se registró otra imagen (figura 3), en la que todavía algunas células no estaban enfocadas. Sin embargo, después de una etapa de centrifugación final de cinco minutos (3 min 20 se a 1000 g, aceleración 2, frenado 9), pudo registrarse una imagen final que muestra sólo las células enfocadas (figura 4).

En cambio, simplemente incubar una placa de 6 pocillos que contiene la suspensión de células y medio semisólido durante 5,5 horas a 37°C y el 5 - 7% de CO₂ en una atmósfera humidificada, sin ninguna centrifugación, no permitía que las células sedimentaran en un plano. Este resultado ilustra que, siguiendo protocolos conocidos para el desarrollo de líneas celulares usando un medio semisólido, tales como los protocolos para plataformas ClonePix (Molecular Devices), es decir, sin centrifugación (dejando las células "inalteradas" después de la siembra), no es posible registrar una imagen significativa de las células el día de la siembra. Por tanto, siguiendo tales protocolos conocidos, no puede verificarse la monoclonalidad de una colonia dada como puede ser usando el método de la invención, es decir, basándose en una imagen de las células (en un plano) registrada el día de la siembra.

Ejemplo 2: Comparación de coordenadas de colonias en imágenes registradas usando Celigo y ClonePix FL, respectivamente

Se formaron imágenes de una placa de 6 pocillos que contenía colonias derivadas de células HEK293 hechas crecer en medio semisólido mediante Celigo usando la aplicación "tumorsphere 1" para proporcionar imágenes para la comparación de las coordenadas de los sistemas Celigo y ClonePix FL. Las opciones de formación de imágenes usadas con Celigo fueron las siguientes: Nombre de la aplicación: Tumorsphere1 o Target 1; Placa: placa 657160 de Greiner; Exposición: aproximadamente 1800 μs de campo claro; porcentaje de tamaño de máscara de pocillo: 99 algoritmo: 0; umbral de intensidad: 10-50; precisión: 2; tamaño del filtro: 12-50; posición de foco A: 3,3; posición de foco B: 3,3; información adicional véase archivos "Datos de nivel de pocillo xxx" ("Well level Data xxx").

Después de haberse insertado la placa de 6 pocillos en el sistema Clonepix FL, se inició la formación de imágenes en el software del sistema respectivo. Se tomó una "Imagen de vista previa" ("Preview Picture") y se fijó el diámetro de colonia promedio (por ejemplo, 0,46 mm), así como las opciones de formación de imágenes de luz blanca de

100 ms, brillo de 2 LED/FITC: 1000 ms, brillo de 128 LED y umbral local del algoritmo. A continuación, se seleccionaron los pocillos de interés y se tomaron imágenes tal como se preestableció. En la pestaña “Gráfico” (“Graph”) en el submenú “Grupos” (“Groups”) se realizaron definiciones para clones de interés. (por ejemplo, “demasiado grande” más de > 0,7 mm; “demasiado pequeño” igual a o menor de 0,06 mm, proximidad no menor de 0,9 mm; compacidad (definida como 0 = no compacta, 1 = círculo perfecto) no menor de 0,6; razón axial (definida como la razón entre los radios mínimo y máximo de la característica) no menor de 0,6; FITC de intensidad media exterior de más de 23,55 y no más de 500). Los clones aceptados se resaltaron en verde automáticamente y se recogieron en la siguiente etapa en placas de 96 pocillos.

Usando la opción “revisar resultados” (“review results”), se exportaron los parámetros estadísticos de todos los clones como archivo *.csv y se pasaron a un MS Excel que contiene las coordenadas x e y de los clones dadas en mm. Usando el software de Celigo en la pestaña “Resultados” (“Results”), se acercó la colonia de interés lo más posible en la imagen tomada antes de la recogida. Sin cambiar la sección de imagen en la pantalla, se cargó la exploración desde el día 0 cambiando la fecha en el menú de exploración de manera apropiada para volver a evaluar la presencia de una única célula en el área definida de la colonia.

Las coordenadas de la colonia seleccionada pueden obtenerse usando el menú “Puerta” (“Gate”). Primero, ha de hacerse clic en el pocillo de interés de la placa. La colonia de interés se encontró comparando el “patrón de clonación”. Se acercó lo más posible y se aseguró de que se activara la opción “superposición gráfica” (“graphic overlay”) y se cambió al submenú “Clases” (“Classes”). La colonia estaba rebordeada por un color de elección. La colonia se seleccionó haciendo clic con el botón izquierdo y se leyeron sus coordenadas en el campo “datos a nivel de objeto” (“object level data”).

Se compararon las coordenadas de 5 colonias en el pocillo A2 de una placa de 6 pocillos medida mediante Celigo o sus coordenadas de Celigo teóricas calculadas a partir de los datos de Clonepix (usando el método descrito anteriormente para armonizar las coordenadas de células y colonias de los sistemas Celigo y Clonepix, es decir, relacionando las coordenadas de ambos sistemas entre sí usando la ecuación descrita anteriormente), y los resultados de esta comparación se presentan en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Número de colonia	Coordenadas de Clonepix		Coordenadas de Celigo		Coordenadas centrales para el pocillo A2 medido mediante Clonepix		Coordenadas de Celigo teóricas calculadas a partir de coordenadas de Clonepix		Coordenadas de Celigo medidas menos calculadas	
	x [mm]	y [mm]	x [µm]	y [µm]	x0 [mm]	y0 [mm]	x [µm]	y [µm]	x [µm]	y [µm]
n.º 1	68,53	31,76	4498	8250	63,88	23,24	4649	8518	-151	-268
n.º 2	72,54	23,03	8513	-468	63,88	23,24	8655	-206	-142	-262
n.º 9	71,29	16,03	7252	-7441	63,88	23,24	7412	-7215	-160	-226
n.º 12	53,30	28,01	-10765	4579	63,88	23,24	-10583	4771	-182	-192
n.º 15	50,11	18,89	-13983	-4632	63,88	23,24	-13766	-4346	-217	-286
Desviación media de coordenadas de Celigo calculadas frente a medidas									-170	-247

A partir de los datos de la tabla 1, puede concluirse que puede identificarse una única célula o una colonia en una imagen de Celigo de manera única basándose en los datos de Clonepix, porque la proximidad máxima de 900 µm de una colonia a otra, que está predefinida como un requisito para seleccionar una colonia adecuada para la recogida mediante Clonepix, es mucho mayor que las desviaciones observadas en las direcciones x e y (170 y 247 µm, respectivamente).

Ejemplo 3: Recogida de colonias y verificación de monoclonalidad usando el método de la invención

Introducción

Este ejemplo se refiere al desarrollo de líneas celulares usando la plataforma Clonepix FL, que proporciona la denominada técnica de recogida de halo de fluorescencia, en combinación con el citómetro Celigo y una etapa de centrifugación, según el método de la invención.

Materiales y métodos

Cultivo de células

Se generaron células HEK293H (Life Technologies) que secretaban una proteína recombinante mediante transfección de un vector de plásmido de expresión de mamífero basado en pBudCE4.1 (n.º de catálogo de Life Technologies V532-20) mediante la tecnología Nucleofector que codifica para el gen de interés (que codifica para una proteína de fusión de IgG humana), y se seleccionaron células transfectadas de manera estable por su resistencia a zeocina añadida a 10 µg/ml al medio de cultivo (medio CD293 (Life Technologies) complementado con L-glutamina 4 mM (Life Technologies), HEPES 10 mM (Life Technologies), insulina 5 µg/ml (Lonza) y peptona de soja 2 g/l (preparación de Baxter) producido por la coexpresión de un gen de resistencia también codificado en el mismo plásmido. Los grupos de células después de la selección de antibióticos se sembraron en medio semisólido (Clone Media HEK, Molecular Devices, n.º de catálogo K8685) en placas de 6 pocillos, y se añadió un anticuerpo policlonal anti-IgG humana marcado con FITC a una concentración de 5 µg/ml. Del medio semisólido, se recogieron las colonias en el mismo medio de cultivo que antes, opcionalmente complementado con 1 parte de 3 sobrenadantes condicionados en el medio para facilitar el crecimiento a baja densidad celular y después de clonación y estrés de recogida. El sobrenadante condicionado puede obtenerse mediante centrifugación a alta velocidad de una alícuota del sobrenadante de cultivo del grupo de células seleccionado después de dos o tres días de cultivo. Los clones se expandieron adicionalmente para la caracterización.

Formación de imágenes de Celigo

Se centrifugaron las placas de 6 pocillos que contenían colonias de células en medio semisólido en una centrífuga Eppendorf 5810R a 1000 x g durante 10 minutos a una aceleración muy baja (2 de 9) y alto frenado (9 de 9) para permitir que las células o colonias se moviesen a la pared de fondo de la placa para la formación de imágenes. Se capturaron imágenes usando un citómetro Celigo de manera regular hasta la recogida de colonias. Se requirió recoger sustancialmente todas las células al mismo nivel en el fondo de la placa, porque el citómetro Celigo sólo puede explorar una placa de cultivo de célula completa dentro del mismo plano óptico o valor de coordenada z. Se ajustaron los parámetros de imagen para tomar 276 imágenes por placa de 6 pocillos en un plazo de aproximadamente 5 minutos. En detalle, se logró el rastreo de células (crecimiento) mediante la creación de una nueva ID de placa en el software de Celigo. Por tanto, todas las fotografías tomadas de la placa se archivaron como un experimento que contenía todas las exploraciones realizadas de una placa en momentos determinados (en esencia, directamente después de la siembra en placa y directamente antes de la recogida, opcionalmente varias veces entremedias). Las imágenes se vincularon entre sí, lo que permitió cambiar de la colonia de interés el día de la recogida a la misma posición directamente después de la siembra en placa para verificar la monoclonalidad de la colonia.

Recogida de colonias mediante Clonepix

Se recogieron clones usando ClonePix FL 14 días después de dividirse las células en medio semisólido. Para la recogida, se preparó el sistema ClonePix FL usando el programa “preparar para la campaña de recogida” (“prepare for pickrun”). (alineación de los pasadores; desinfección con PERA Safe y UV durante 10 minutos, limpieza con agua destilada). Para la recogida, se usó el programa “PICKRUN”. Según el menú, se eligieron los parámetros (por ejemplo, placa tipo Greiner de 6 pocillos, Opciones de adquisición Trans WL y FITC; Configuración principal Trans WL; Pocillos de destino).

Después de haberse insertado la placa de 6 pocillos en el sistema Clonepix FL, se inició la formación de imágenes en el software del sistema respectivo. Se seleccionaron colonias basándose en características morfológicas medidas en el canal de luz blanca, y el tamaño y la intensidad del halo fluorescente medido en el canal de fluorescencia. Se tomó una “Imagen de vista previa” y se fijó el diámetro de colonia promedio (por ejemplo, 0,46 mm), así como las opciones de formación de imágenes de luz blanca de 100 ms, brillo de 2 LED/FITC: 1000 ms, brillo de 128 LED y umbral local del algoritmo. A continuación, se seleccionaron los pocillos de interés y se tomaron imágenes tal como se preestableció. En la pestaña “Gráfico” (“Graph”) en el submenú “Grupos” (“Groups”) se realizaron definiciones para clones de interés. (por ejemplo, “demasiado grande” más de > 0,7 mm; “demasiado pequeño” igual a o menor de 0,06 mm, proximidad no menor de 0,9 mm; compacidad (definida como 0 = no compacta, 1 = círculo perfecto) no menor de 0,6; razón axial (definida como la razón entre los radios mínimo y máximo de la característica) no menor de 0,6; FITC de intensidad media exterior de más de 23,55 y no más de 500). Los clones aceptados se resaltaron en verde automáticamente y se recogieron en la siguiente etapa en placas de 96 pocillos.

Usando la opción “revisar resultados” (“review results”), se exportaron los parámetros estadísticos de todos los clones como archivo .csv y se pasaron a un MS Excel que contiene las coordenadas x e y de los clones dadas en mm. Usando el software de Celigo en la pestaña “Resultados” (“Results”), se acercó la colonia de interés lo más posible en la imagen tomada antes de la recogida. Sin cambiar la sección de imagen en la pantalla, se cargó la exploración desde el día 0 cambiando la fecha en el menú de exploración de manera apropiada para volver a evaluar la presencia de una única célula en el área definida de la colonia.

Las coordenadas de la colonia seleccionada pueden obtenerse usando el menú “Puerta” (“Gate”). Primero, ha de

hacerse clic en el pocillo de interés de la placa. La colonia de interés se encontró comparando el “patrón de clonación”. Se acercó lo más posible y se aseguró de que se activara la opción “superposición gráfica” (“graphic overlay”) y se cambió al submenú “Clases” (“Classes”). La colonia estaba rebordeada por un color de elección. La colonia se seleccionó haciendo clic con el botón izquierdo y se leyeron sus coordenadas en el campo “datos a nivel de objeto” (“object level data”).

Identificación de colonias y células basada en coordenadas de Celigo y Clonepix

Las colonias de interés se identificaron comparando las imágenes de Celigo con una imagen tomada por el sistema ClonePix FL que muestra las colonias recogidas marcadas. Las colonias también se identificaron por sus coordenadas dadas por los sistemas Celigo o Clonepix, aunque se usan diferentes sistemas de coordenadas (véase la descripción anterior de cómo armonizar, es decir, relacionar entre sí, las coordenadas de los dos sistemas diferentes). El sistema ClonePix FL tiene su punto de origen en la esquina superior izquierda de la placa, mientras que el sistema Celigo tiene su punto de origen en el centro de cada pocillo, pero ambos sistemas miden en [µm] o [mm]. Las coordenadas de Celigo se leen usando el modo de software “detección de tumoresferas” (“tumor sphere detection”). En el submenú “puerta” (“gate”) en la pestaña “clases” (“classes”), pueden mostrarse los detalles de la población, incluidas las coordenadas de una colonia o célula seleccionada. Se usaron todas las imágenes de Celigo tomadas durante el periodo de tiempo desde la siembra en medio semisólido hasta la recogida de colonias y una imagen después de la recogida para evaluar la monoclonalidad y el crecimiento de las colonias recogidas.

Resultados y conclusiones

En un experimento de recogida representativo, se sembraron 250 células por ml en una placa de seis pocillos, y el citómetro Celigo capturó imágenes periódicamente. Después de 14 días, se exploraron las placas en el sistema Clonepix, se seleccionaron colonias para su recogida y se recogieron en placas de 96 pocillos. En la figura 5, puede observarse la imagen de Clonepix de un pocillo representativo que muestra 15 colonias numeradas y seleccionadas para su recogida. La figura 6 muestra las imágenes de Celigo correspondientes capturadas antes y después de la recogida mediante Clonepix con las 15 colonias marcadas con círculos. La figura 7 muestra las coordenadas de colonia de 5 colonias seleccionadas tal como facilitan las tecnologías Clonepix y Celigo, lo que demuestra que pueden usarse las coordenadas de un sistema para ubicar las colonias en el otro sistema. En la figura 8, se muestran imágenes de Celigo de estas 5 colonias con un mayor aumento capturadas en el día cero y el día 14, lo que demuestra el seguimiento del crecimiento de colonias desde el principio. Las colonias derivadas de 1, 2 y más células pueden identificarse claramente. En la figura 9, se comparan el historial de una colonia derivada de una única célula, es decir, una colonia monoclonal, y de una colonia derivada de 3 células mostrando imágenes de Celigo capturadas los días 0, 2, 7 y 14 después de la siembra de células. Puede observarse que después de 2 días, son visibles 2 ó 6 células, respectivamente, según un tiempo de duplicación de aproximadamente 24-36 horas de las células HEK293. En la figura 10, se muestra para este experimento la distribución del origen mono o policlonal de 24 colonias hechas crecer en medio semisólido, monitorizadas mediante Celigo, y seleccionadas para la recogida mediante la tecnología Clonepix. Puede concluirse que la probabilidad de que una colonia recogida mediante la tecnología Clonepix no derive de una única célula puede ser de hasta aproximadamente el 45%, pero también que, a diferencia de los métodos conocidos, el método de la invención permite determinar si una colonia dada deriva o no de una única célula.

En resumen, en el presente documento se muestra por primera vez que es posible hacer crecer y recoger colonias en y a partir de medio semisólido que contiene metilcelulosa, que derivan de una célula, es decir, que son monoclonales.

También se muestra en el presente documento que las colonias que derivan de más de una célula no pueden distinguirse de manera fiable de las colonias monoclonales por su tamaño o redondez, por ejemplo. El método usado en el presente documento, por el contrario, permite el seguimiento y la recogida de colonias derivadas de células únicas para el desarrollo de líneas celulares monoclonales más estables y uniformes, por ejemplo, para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico humano. El método es aplicable para muchas líneas celulares, porque las células HEK293 (usadas en el presente documento) son más sensibles y “más difíciles de clonar” que muchas otras líneas celulares de mamíferos, incluyendo CHO y BHK. El método de la invención, tal como se ejemplifica en el presente documento, también ofrece la ventaja de que los análisis de imágenes pueden realizarse en cualquier momento, porque todas las imágenes y coordenadas de célula/colonia se almacenan en un ordenador o medio de almacenamiento adecuado mediante el software respectivo. Esto también puede facilitar la decisión si es necesario volver a clonar una línea celular de alta producción.

REIVINDICACIONES

1. Método para recoger una colonia de células, comprendiendo el método cualquiera de las etapas de
- 5 (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- 10 (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 15 (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo, y
- (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e), y
- 20 (g) opcionalmente, deducir que una colonia de células seleccionada y recogida en (f) es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f);
- 25 o las etapas de
- (a') proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 30 (b') centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, se sitúen sustancialmente todas las células en la pared de fondo,
- 35 (c') determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d') incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 40 (e') determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (f') deducir que una colonia de células es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c'), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e') como
- 45 área ocupada por la colonia de células, y
- (g') seleccionar y recoger al menos una colonia de células monoclonal.
2. Método para producir una línea celular, comprendiendo el método cualquiera de las etapas de
- 50 (a) proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- (b) centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, sustancialmente todas las células se sitúen en la pared de fondo,
- 55 (c) determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- (d) incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- 60 (e) determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 65 (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e), y

- (g) producir una línea celular cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células seleccionada y recogida en (f), y
- 5 (h) opcionalmente, deducir que la línea celular es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e) como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f) y cultivada para establecer la línea celular en (g);
- 10 o las etapas de
- (a') proporcionar una suspensión que comprende células y medio semisólido en un recipiente de muestra, teniendo el recipiente de muestra una pared de fondo sustancialmente plana,
- 15 (b') centrifugar el recipiente de muestra de tal manera que, después de la centrifugación, se sitúen sustancialmente todas las células en la pared de fondo,
- (c') determinar y registrar la posición de una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 20 (d') incubar el recipiente de muestra en condiciones adecuadas para el crecimiento de colonias de células,
- (e') determinar y registrar el área ocupada por una o más colonias de células, ubicándose la una o más colonias de células dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo,
- 25 (f) seleccionar y recoger al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e'),
- (g') deducir que una colonia de células seleccionada y recogida en (f) es monoclonal si la posición de no menos y no más de una célula, tal como se determina y registra en (c'), está ubicada dentro del área determinada y registrada en (e') como el área ocupada por la colonia de células seleccionada y recogida en (f'), y
- 30 (h') producir una línea celular monoclonal cultivando en condiciones adecuadas una colonia de células seleccionada y recogida en (f') y que se deduce que es monoclonal en (g').
- 35 3. Método según la reivindicación 2, en el que en (g) o (h'), la colonia de células se cultiva a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada en medio de crecimiento tamponado con carbonato durante de aproximadamente 3 días a 1 mes.
- 40 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son células animales, células humanas o células de insectos, preferiblemente en el que las células son células de mamífero, más preferiblemente en el que las células son HEK293, CHO, BHK, células madre, líneas celulares continuas, células primarias, líneas celulares cancerosas, líneas celulares inmortalizadas por cualquier medio, hibridomas de cualquier especie, NSO, Sp2/0, HKB11, HuH7, HepG2, SkHep, Vero, Cos o PerC6, creciendo todas ellas de manera adherente, o adaptadas para crecer en suspensión y/o creciendo en suspensión.
- 45 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en (c) o (c'), se determina y registra la posición de la una o más células registrando una primera imagen de las células,
- 50 en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la primera imagen,
- 55 de tal manera que puedan reconocerse la una o más células ubicadas dentro de al menos una región predeterminada en la pared de fondo en la primera imagen,
- y de tal manera que puedan asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más células en la primera imagen.
- 60 6. Método según la reivindicación 5, en el que, en (e) o (e'), el área ocupada por la una o más colonias de células se determina y registra registrando una segunda imagen de las células,
- 65 en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la segunda imagen,

de tal manera que puedan reconocerse la una o más colonias de células en la segunda imagen,

5 y de tal manera que puedan asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a la una o más colonias de células en la segunda imagen y puedan compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen .

7. Método según la reivindicación 6, en el que se realizan el registro de la segunda imagen y la selección y recogida de una colonia de células usando un aparato de recogida de colonias, preferiblemente en el que el aparato de recogida de colonias es capaz de registrar imágenes de microscopio de fluorescencia y de campo claro, más preferiblemente en el que se realizan el registro de la segunda imagen y la selección y recogida de una colonia de células usando el sistema ClonePix FL o el sistema ClonePix 2.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la selección y recogida de una colonia de células se basan en la presencia e intensidad de fluorescencia de la propia colonia y/o lo que rodea directamente a la colonia, y/o en una distancia suficiente a la siguiente colonia.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que durante el tiempo de incubación en (d) o (d'), se registra(n) una o más imagen/imágenes adicional(es) de las células,

20 en el que un plano horizontal, paralelo a la pared de fondo y que corta las células por encima de la pared de fondo, es el plano focal de la(s) una o más imagen/imágenes adicional(es),

25 en el que pueden reconocerse células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es),

y en el que pueden asignarse coordenadas o cualquier otro identificador único a las células y/o colonias de células en la(s) imagen/imágenes adicional(es) de tal manera que puedan compararse estas coordenadas o identificador único con cualquier coordenada o identificador único asignado a la una o más células en la primera imagen

30 preferiblemente en el que se registra(n) la(s) imagen/imágenes adicional(es) una vez al día.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la(s) imagen/imágenes se registra(n) usando microscopía óptica y una cámara.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la primera imagen y cual(es)quier imagen/imágenes adicional(es), pero no la segunda imagen, se registran usando un citómetro de formación de imágenes, preferiblemente en el que el citómetro de formación de imágenes es capaz de registrar imágenes de microscopio de campo claro del cultivo celular, más preferiblemente en el que el citómetro de formación de imágenes es un citómetro Celigo.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que después de (b) o (b') pero antes de (c) o (c'), el método comprende además una etapa de elegir la al menos una región predeterminada en la pared de fondo basándose en una distribución de células en el recipiente de muestra, preferiblemente en el que la etapa de elegir la al menos una región predeterminada en la pared de fondo se lleva a cabo con la ayuda de un microscopio óptico o con la ayuda de un microscopio óptico y un ordenador, más preferiblemente en el que el microscopio óptico es un citómetro de formación de imágenes, tal como un citómetro Celigo, o un aparato de recogida de colonias, tal como un sistema ClonePix FL o un sistema ClonePix 2.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la al menos una región predeterminada en la pared de fondo corresponde a la totalidad del área de superficie de la pared de fondo que está en contacto con la suspensión;

55 y/o en el que, en (c) o (c'), se determina y registra la posición de cada célula ubicada dentro de la al menos una región predeterminada en la pared de fondo;

60 y/o en el que en (a) o (a'), la concentración de las células en la suspensión es de 250 a 1000 células/ml si las células son líneas celulares libres de suero estables, de 50 a 500 células/ml si las células son líneas celulares que contienen suero estables, de 1000 a 5000 células/ml si las células se obtienen mediante transfección libre de suero, de 500 a 2000 células/ml si las células se obtienen mediante transfección que contiene suero, de 10^5 a 10^6 células/ml si las células se obtienen mediante fusión de hibridomas, o 1000 células/ml si las células son células HEK293;

65 y/o en el que al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y

registradas en (e) o (e') se tiñe con un agente de mejora de contraste para ayudar a seleccionar y/o recoger la colonia;

5 y/o en el que al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e) o (e') se tiñe con un colorante fluorescente para ayudar a seleccionar y/o recoger la colonia .

10 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células de al menos una de la una o más colonias de células que ocupan el área o áreas determinadas y registradas en (e) o (e') comprenden, transcriben, traducen, replican, expresan, presentan en su superficie, expresan de manera intracelular y/o secretan una molécula biológica de interés o una entidad biológica de interés;

15 preferiblemente en el que la molécula biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, y una parte de los mismos, o en el que la entidad biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en: una partícula viral, un vector viral, y una parte de los mismos.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

20 (i) el medio semisólido se basa en metilcelulosa,

25 (ii) el medio semisólido contiene uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de los mismos, marcados con un colorante fluorescente; proteínas, tales como receptores o ligandos, marcadas con un colorante fluorescente; colorantes fluorescentes específicos para un componente celular tal como para ácidos nucleicos; y sustratos enzimáticos fluorogénicos o inhibidores enzimáticos, como el metotrexato (MTX) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC),

30 (iii) el recipiente de muestra es una placa de 1 pocillo o placa de Petri, placa de 6 pocillos, placa de 12 pocillos, placa de 24 pocillos, placa de 48 pocillos, placa de 96 pocillos, placa de 384 pocillos o una placa de 1536 pocillos,

(iv) en (b) o (b'), la centrifugación se realiza a 1000 x g durante 10 minutos,

35 (v) después de (b) o (b'), las células son capaces de dividirse y/o

40 (vi) en (d) o (d'), el recipiente de muestra se incuba a 32 - 37°C y el 3 - 12% de CO₂, preferiblemente 32 - 37°C y el 5 - 10% de CO₂, más preferiblemente 37°C y el 5 - 7% de CO₂, en una atmósfera humidificada durante de aproximadamente 3 días a 1 mes.

Fig. 1

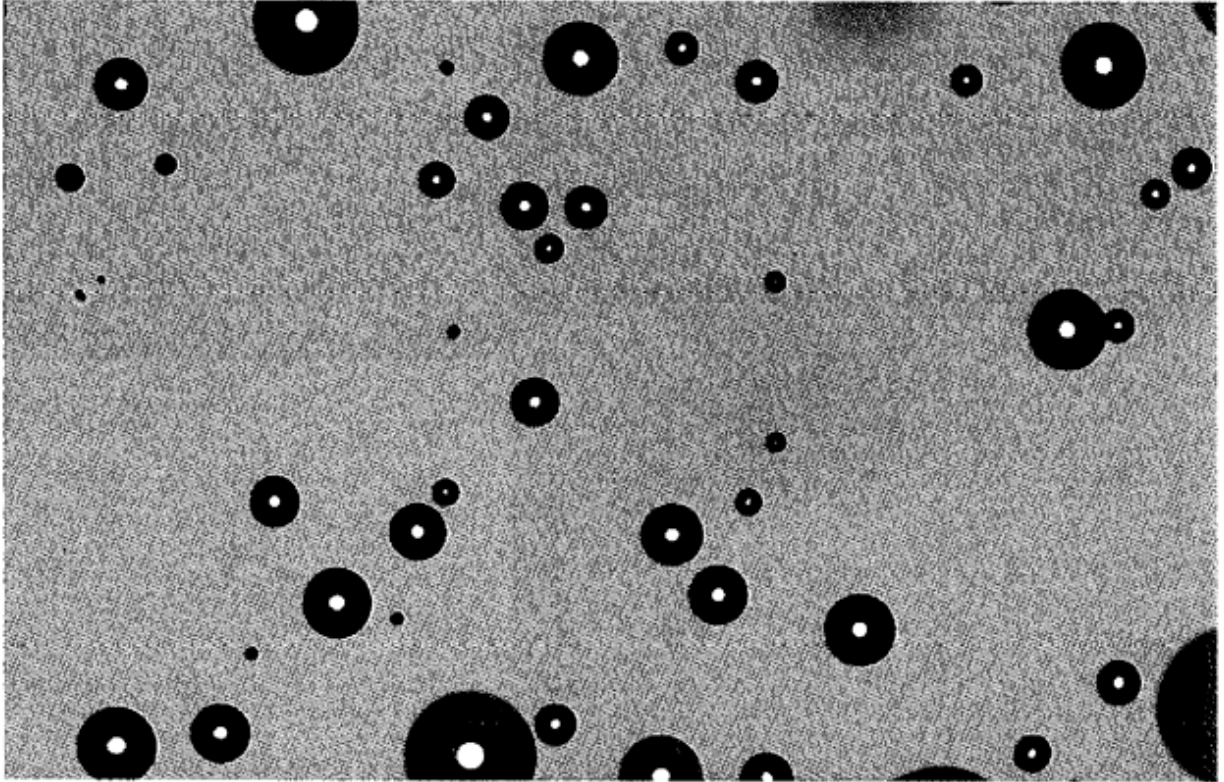


Fig. 2

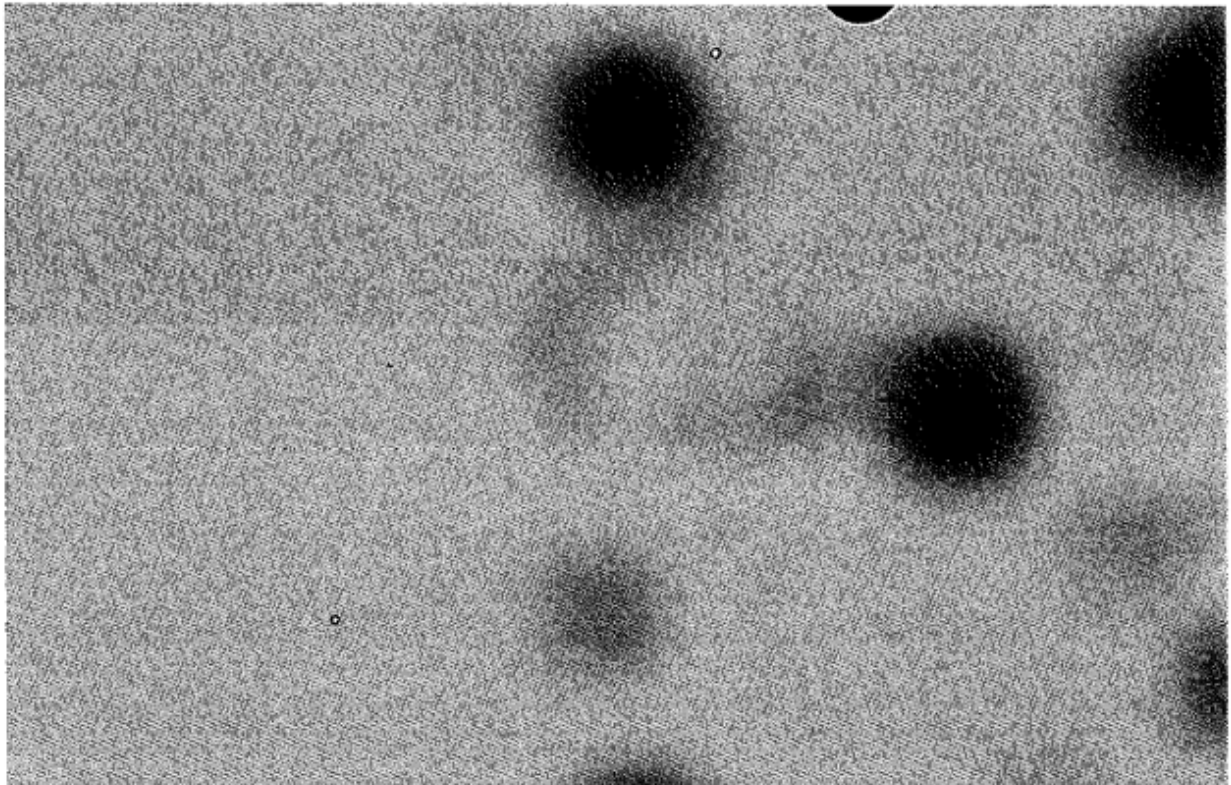


Fig. 3

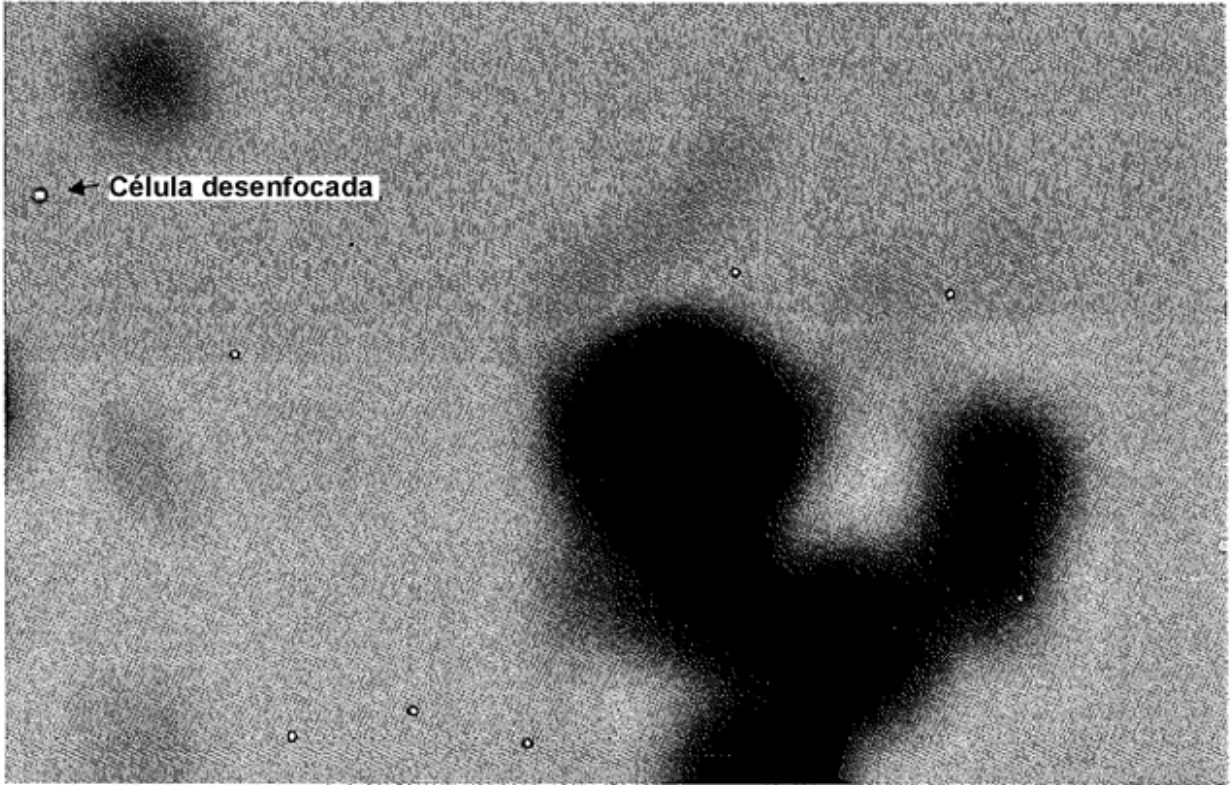


Fig. 4

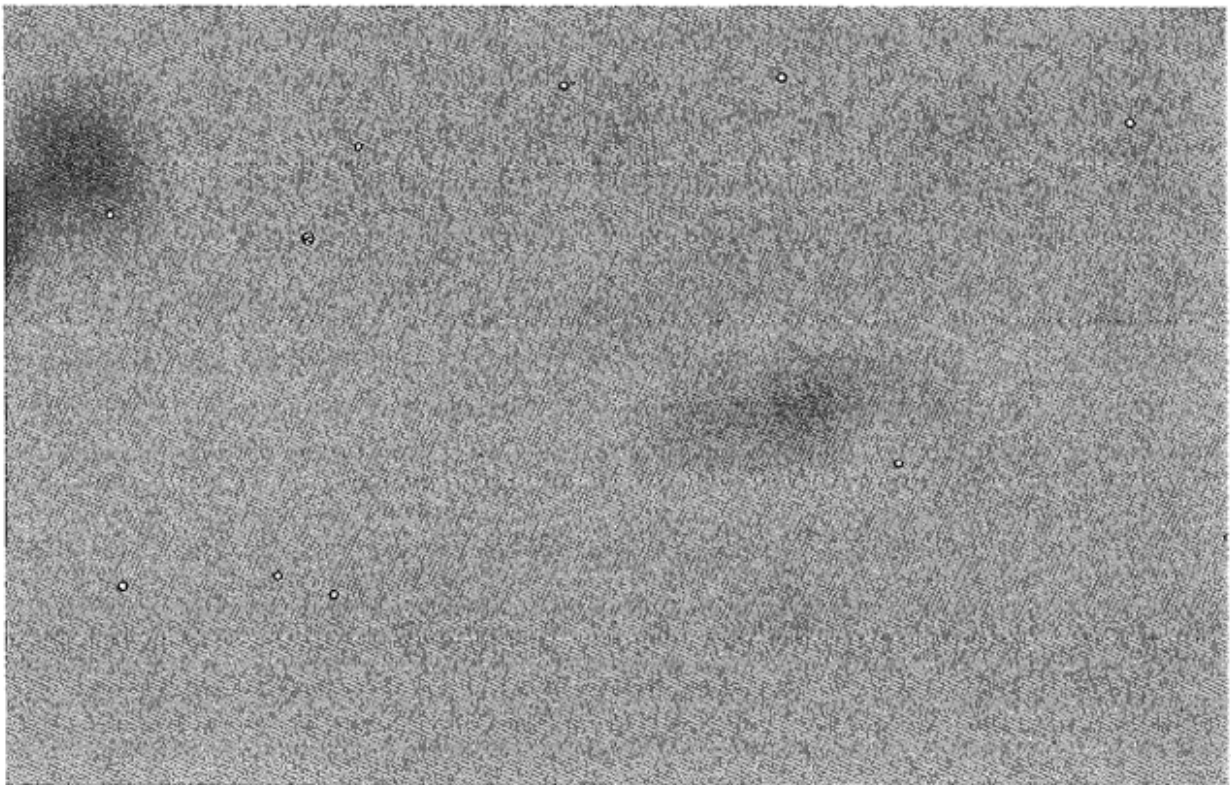


Fig. 5

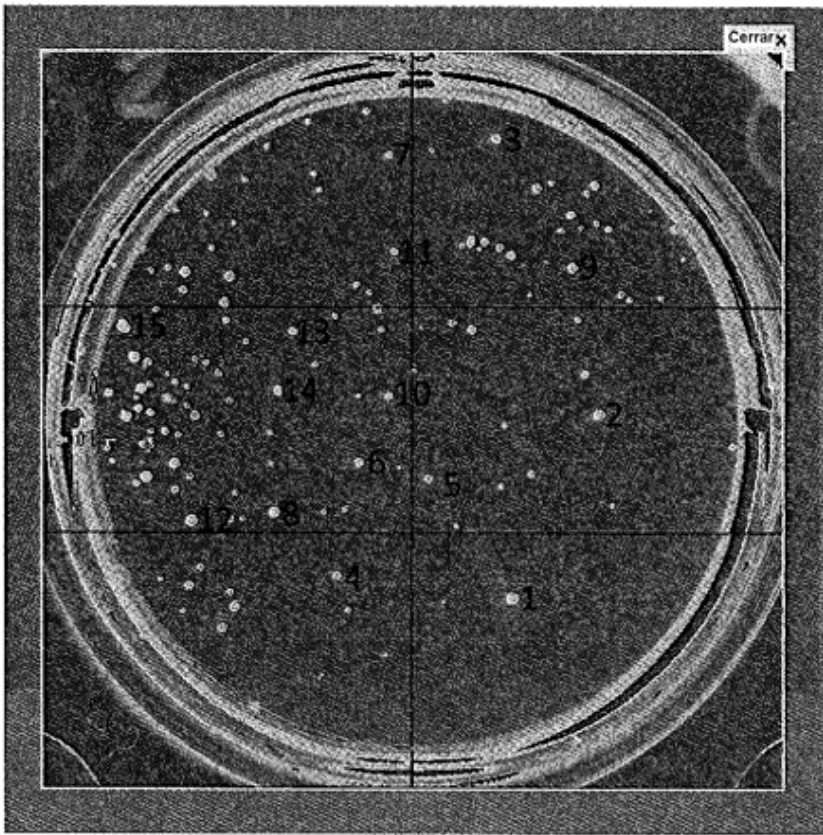


Fig. 6

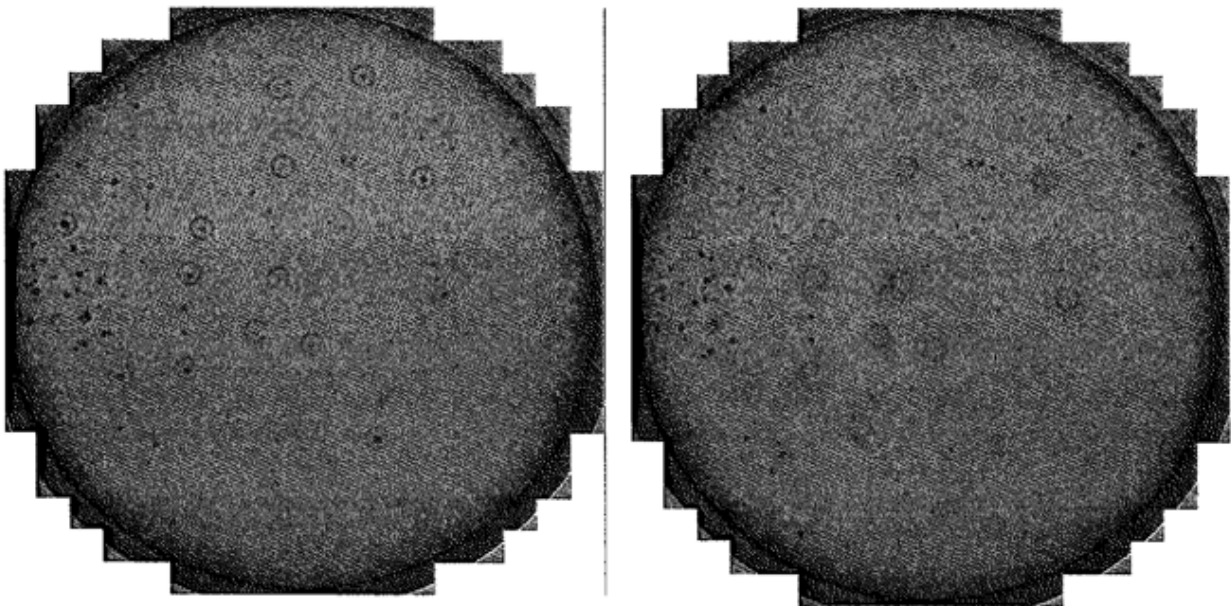


Fig. 7

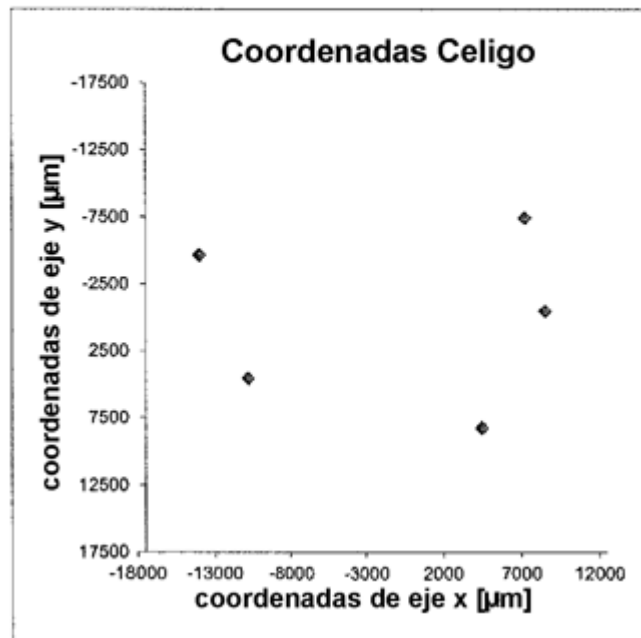
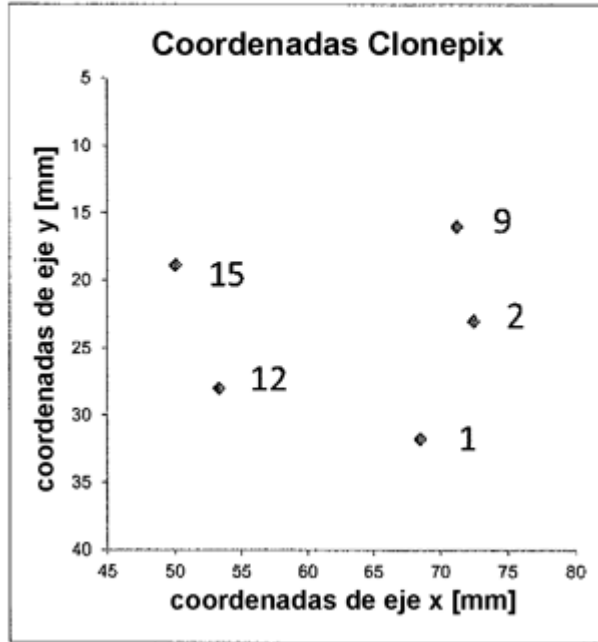
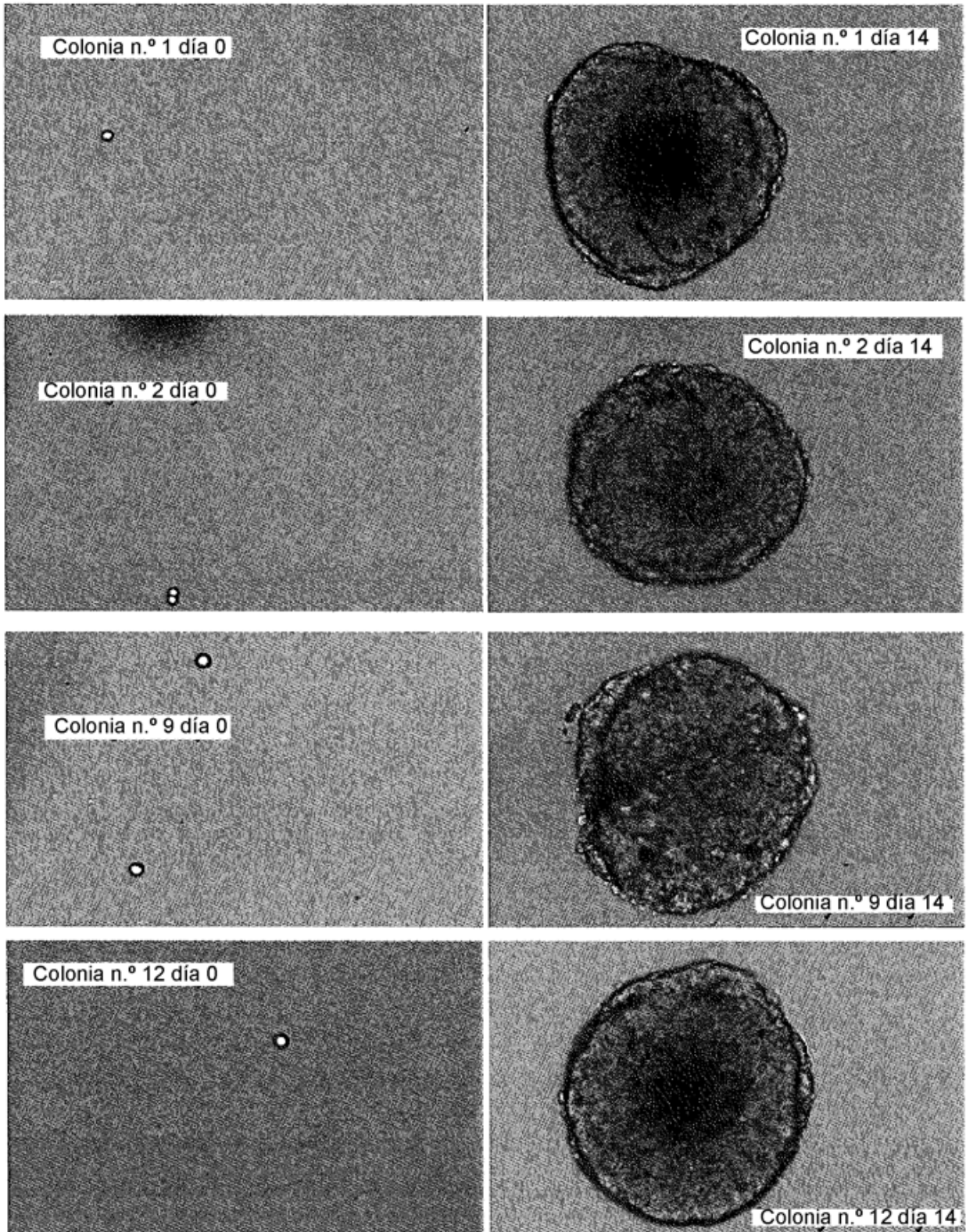


Fig. 8



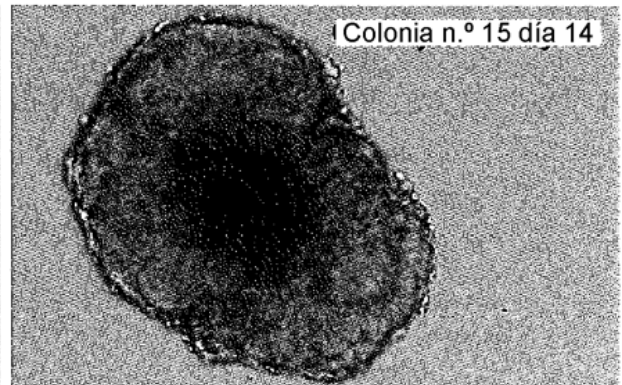
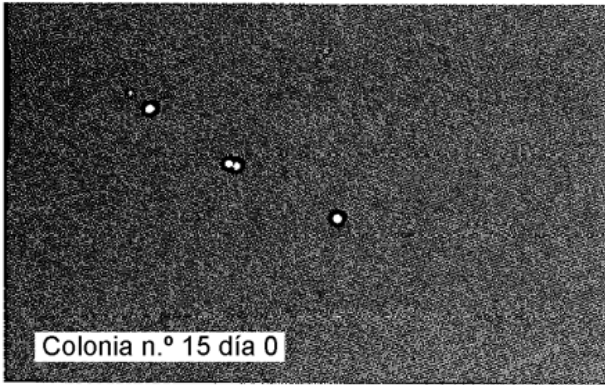
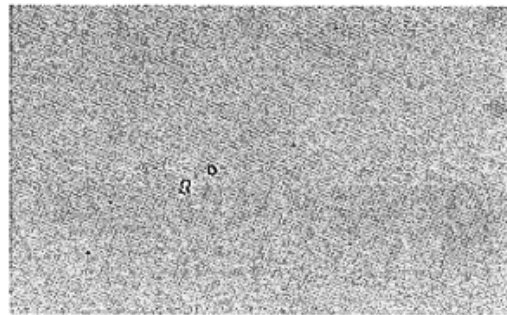
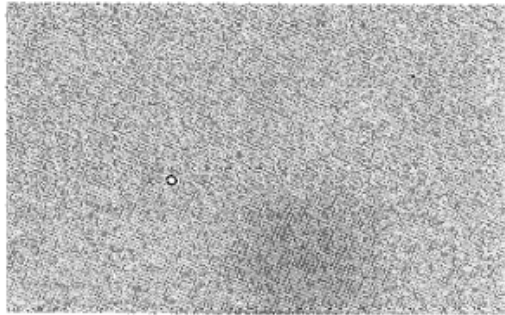
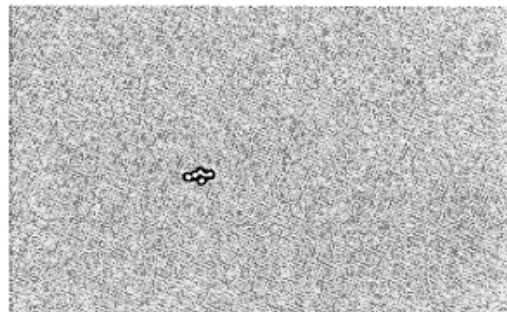
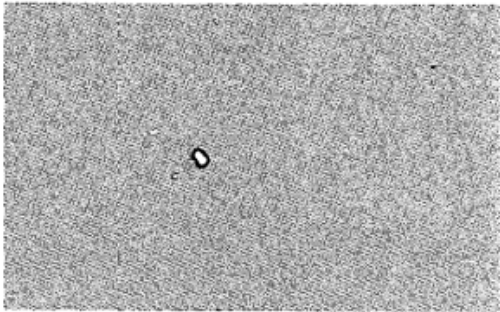


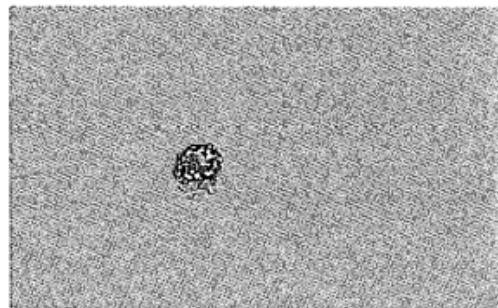
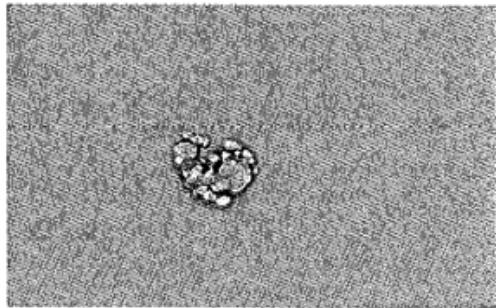
Fig. 9



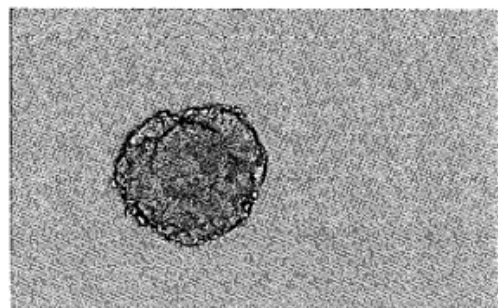
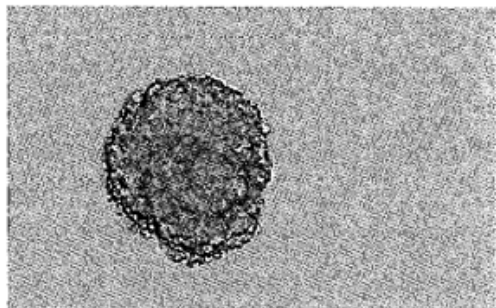
Día 0



Día 2



Día 7



Día 14

Fig. 10

