

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 488 847**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
C11D 3/37 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2005 E 05757674 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1763673**

(54) Título: **Usos de formulaciones de gel**

(30) Prioridad:

02.07.2004 GB 0414825

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2014

(73) Titular/es:

BIOSTATUS LIMITED (100.0%)
56 Charnwood Road
Shepshed, Leicestershire LE12 9NP, GB

(72) Inventor/es:

SMITH, PAUL;
PATTERSON, LAURENCE y
ERRINGTON, RACHEL JANE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 488 847 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

Usos de formulaciones de gel

5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones de gel termorreversible y sus aplicaciones generalmente en investigación, ensayos de diagnóstico y exploración y metodología en el uso de aplicaciones basadas en matriz de soporte de células o partículas o reactivos.

10 Antecedentes a la invención

Existe la necesidad de hacer ensayos biológicos más rápidos y más simples a realizar con urgencia primordial para hacer los procesos más baratos manteniendo aún la precisión y reproducibilidad. Esto se debe a un rápido aumento en la cantidad de sondas moleculares de investigación y diagnóstico disponibles (por ejemplo, nuevas moléculas indicadoras fluorescentes) y las ventajas en términos de contenido de información de combinar dichos ensayos a través de una gama de instrumentos. Existe la necesidad creciente de ensayos basados en células, partículas y perlas (y una combinación de estas unidades) en que la presencia, por ejemplo, de células con ciertas características indica procesos patológicos. Asimismo, la demanda y evolución de enfoques racionales en la búsqueda de moléculas bioactivas para nuevas medicinas ha provocado la necesidad de exploración de alto rendimiento (HTS) a bajo coste y el desarrollo de ensayos basados en células y moléculas, herramientas y series dentro del campo de análisis funcional.

Dichos ensayos requieren de o se potencian mediante la disponibilidad de metodologías para:

- 25 i) la manipulación de células/partículas, analitos y reactivos en fases líquida y de gel para propósitos de procesamiento,
- 30 ii) el suministro controlado de moléculas fluorescentes/bioluminiscentes a células/partículas o la retención de las propiedades fluorescentes/bioluminiscentes asociadas de dichas partículas/células.
- 35 iii) la inmovilización controlable de dichas células/partículas para el propósito de análisis que implica recogida de luz
- iv) la retención de viabilidad celular y función celular durante periodos de tiempo suficientes para los propósitos de un análisis.

La presente invención busca proporcionar medios para su uso en dichas metodologías.

40 Se conocen diversos hidrogeles basados en polímeros termorreversibles (en forma líquida a temperaturas elevadas pero en forma de gel a temperaturas inferiores), incluyendo materiales que forman gel natural tales como agarosa, goma de agar, furcelarano, beta-carragenina, beta-1,3-glucanos tales como curdlano, gelatina, o compuestos que contienen polioxialquileno.

45 La presente invención explota las distintas ventajas y propiedades de geles basados en copolímero de bloque de polioxipropileno y polioxietileno, es decir geles de copolímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP), que habitualmente experimentan transición a forma líquida tras reducción de temperatura. Esta propiedad puede describir como 'termoestabilidad invertida'.

50 Las propiedades seleccionadas de las preparaciones PBP, tales como propiedades detergentes y las propiedades mecánicas y termorreversibles de los hidrogeles en general, se han documentado y explotado en la técnica.

Por ejemplo, los usos y propiedades informados de preparaciones PBP incluyen los siguientes:

55 Propiedades tensioactivas

El polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) se ha usado como tensioactivo no iónico para detergentes, dispersantes, aglutinantes, estabilizantes, agentes antiespumantes, agentes emulsionantes por nombrar unos pocos. A elevadas concentraciones de PBP acuoso, más allá de una temperatura de transición, puede formarse un gel que comprende micelas de copolímero de bloque anfílico. Una preparación comercial Pluronic® F-127 (PEO₉₉-PPO₆₉-PEO₉₉, siendo E y P polioxietileno y polioxipropileno, respectivamente) se ha usado en forma de gel para preparaciones farmacéuticas.

Agar inverso y biopelículas

Las formulaciones que forman gel de PBP se han descrito como 'agar inverso' en su uso. La formulación gelificante a baja temperatura se ha usado para dar soporte al crecimiento limitado de microorganismos en aplicaciones de microbiología convencional. Dichos hidrogeles basados en Pluronic® se han usado extensivamente para ensayar tratamientos biocidas. Las poblaciones de microorganismos atrapadas en gel imitan las elevadas densidades celulares localizadas observadas en biopelículas y están sometidas a gradientes similares de nutrientes y agentes químicos encontrados dentro de biopelículas naturales. Dichos usos de la técnica previa con respecto a microorganismos han revelado que PBP debe tener baja toxicidad en la forma estable de gel.

Propiedades de tamiz molecular

La forma de gel PBP tiene el potencial de formar estructuras micelares ordenadas y se ha usado como medio de separación para ácidos nucleicos, que indica el movimiento coherente de moléculas a través del gel tras el paso de una corriente eléctrica continua o pulsada. También se han diseñado microdispositivos con geles de tamiz dentro del mismo dispositivo para realizar separaciones que implican ADN tanto monocatenario como bicatenario sobre distancias del orden de 1 cm. Se han hecho comparaciones extensivas para comparar diferentes matrices de gel sobre la base de la facilidad de moldeo del gel, la capacidad de reutilización, y el rendimiento de separación global usando por ejemplo un marcador en escalera de ADN bicatenario de 100 pares de bases como muestra patrón.

Hidroalmohadillas

Se buscan tamaños de miniatura y alta sensibilidad de biochips en diagnóstico, ensayo, e investigación en medicina, ciencia y aplicaciones veterinarias, agricultura, toxicología, control ambiental, ciencia forense etc. Se han desarrollado biochips tridimensionales que comprenden geles no termorreversibles (hidroalmohadillas) que consisten en una serie de elementos de gel tridimensionales sobre la superficie hidrófoba de un portaobjetos de microscopio. Por ejemplo, se inició un proyecto de biochip basado en gel en Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Science (EIMB) en 1989 provocando el desarrollo de la 'microserie inmovilizada de elementos de gel' en chip (o chip IMAGE), que puede dar soporte a oligonucleótidos, ADN, proteínas, compuestos pequeños o células fijados dentro de almohadillas de hidrogel semiesféricas. Se ha desarrollado un procedimiento simple de dos etapas para la fabricación a gran escala de dichos chips. Las almohadillas de gel pueden servir tanto como soporte para inmovilización y también como tubos de ensayo individuales de nanolitro para realizar diversas interacciones específicas, reacciones químicas o enzimáticas. Se han producido chips que contienen anticuerpos, antígenos, enzimas, receptores, y diferentes ligandos inmovilizados.

Encapsulación celular

También se han explorado los geles poliméricos como materiales de encapsulación celular para ingeniería tisular. Las células y tejidos aislados de mamífero tienen incontables aplicaciones en medicina y biotecnología, pero la protección y nutrición de células *in vitro* o *in vivo* mientras se recogen los productos deseados ha demostrado ser difícil.

Suministro de fármacos y colorantes

Aplicaciones clínicas previas han revelado el uso de hidrogeles con el propósito de suministro local de agentes farmacológicamente activos a tejidos. En contraste, trabajos previos sobre la tinción de células "poco líquidas" por difusión de colorante desde los geles (poliacrilamida o gelatina) se ha restringido al uso de gel sistemas que carecen de las propiedades termorreversibles únicas de geles basados en PBP. Dichos estudios se han descrito por Smolweski *et al.*, 2001, *Cytometry* 44(4):355-60. Se observó el suministro de colorante a células pero requería un aumento de 2 a 4 veces en la concentración normal de tinción de colorantes de ADN.

Saim *et al.*, 2000 (*The Laryngoscope*, 110(11):1694-1697) describe un método de ingeniería tisular de cartílago que implica suspender células de condrocitos en una solución al 30 % (p/v) de Pluronic® F-127.

Zahn *et al.*, 1999 (*FEBS Let.*, 443(3):337-340) describe un ensayo celular de múltiples parámetros basado en el uso de un aparato de múltiples cámaras. El aparato comprende cuatro cámaras periféricas (o "satélite") recubiertas con un copolímero de bloque no adhesivo (Pluronic® F-68) conectadas mediante canales a una cámara central recubierta con proteína adhesiva de mejillón (MAP). El copolímero de bloque no adhesivo se recubre sobre las cuatro cámaras satélite y las células se inyectan en cavidades dentro de la cámara recubierta.

El documento US 2004/033598 se refiere a composiciones de células multipotentes tipo espora y a su uso en la formación de piel artificial. Las células tipo espora se siembran en una matriz de soporte hecha de un hidrogel, que puede ser un polímero Pluronic®.

El US 6.171.825 B1 se refiere a un método de producción de factor VIII humano recombinante a partir de células completas en ausencia de proteínas derivadas de animal. El medio de cultivo se suplementa con una concentración

no gelificante de polímero *Pluronic®* como tensioactivo.

El documento US 5.628.981 A se refiere a formulaciones de contraste de rayos X para diagnóstico gastrointestinal que contienen partículas radio-opacas insolubles en agua y una concentración no gelificante de polímero *Pluronic®* (para actuar como tensioactivo con propiedades bioadhesivas).

Smolewski et al., 2001 (Cytometry 44:355-360) se refiere a la tinción de células o secciones tisulares en portaobjetos de microscopio por difusión no convectiva de colorante usando geles hidratados impregnados con colorantes aplicados a células a baja presión.

El documento JP 6 343451 A se refiere a un aparato para inmovilización caracterizado por una capa de compuesto polimérico (un copolímero de bloque de óxido de polialquíleno, una celulosa eterificada, un derivado de quitosana, etc.,) compuesto por varios bloques que tienen un punto de enturbiamiento y bloques hidrófilos y una solución acuosa de que muestra una temperatura de transición sol-gel.

El documento US 2002/098588 A1 se refiere a una placa de ensayo y métodos para ajustar los sistemas de formación de imágenes de fluorescencia que implican usar una placa con micropelículas fluorescentes unidas a una superficie.

El documento US 4 689 307 A se refiere a un método y a una estructura para montar muestras fluorescentes, por ejemplo, micropelículas fluorescentes, basándose en la inmovilización de las muestras en un gel que conserva las propiedades espectrales de las muestras, y el montaje del gel que contiene las muestras en un portaobjetos y debajo de un cubreobjetos.

El documento US 2003/104347 A1 se refiere a materiales de recubrimiento para tejidos biológicos que hacen posible conservar los tejidos biológicos durante un largo periodo de tiempo usando un material de recubrimiento que contiene al menos un polímero formador de hidromel y muestra transferencia sol/gel termorreversible.

Sumario de la invención

En este documento se describe un medio general para combinar las cuatro metodologías indicadas anteriormente explotando las características de los geles de polímero de bloque (por ejemplo, basados en polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno [PBP]) concretamente las propiedades termorreversibles (transición gel-sol que posibilita la manipulación; como se define a continuación), la formación de micelas en condiciones gelificantes (que posibilita que el gel actúe como matriz de soporte/inmovilización), propiedades ópticas (baja absorbancia y no fluorescencia que posibilitan análisis ópticos basados en luz), propiedades controlables de tensioactivo (que posibilitan el suministro de moléculas indicadoras modificadas a células y un medio de solubilización celular), propiedades de tamiz molecular (que proporcionan suministro controlado, es decir, modificado y regulado, de moléculas indicadoras exógenas) y baja toxicidad (que posibilita el procesamiento de células vivas). En este documento también se describe un medio general para hacer ensayos modulares posibilitando el control y manipulación de células/partículas y regulando el acceso de reactivos y moléculas indicadoras para su uso en dichos ensayos basados en células. Formulaciones específicas de geles PBP proporcionarían rendimiento óptimo para una aplicación dada o propiedad excipiente.

Por 'termorreversibles' se hace referencia a la propiedad de formación de gel tras elevar la temperatura de una composición PBP por encima de un punto de transición crítico mientras existe una forma líquida o de sol de la composición a temperaturas por debajo de ese punto de transición.

En este documento también se describe un medio para la recuperación de inóculos de ensayo sin traumatismo adicional y el uso de gel en sistemas eucariotas (por ejemplo, células humanas y animales).

La propiedad de tamiz molecular de los geles de polímero de bloque proporciona un medio de suministro y comportamiento coherente de analitos (tales como moléculas de información molecular) para el propósito de suministro secuencial o controlado a un sistema en análisis.

Las propiedades gelificantes termorreversibles de los geles de polímero de bloque también evitan el daño térmico proporcionando de este modo una vía ventajosa para la recogida y recuperación de células. Una estrategia es encapsular las células en una matriz que permita la difusión de moléculas pequeñas a y desde células. La encapsulación ofrece resultados prometedores, ya que los polímeros PBP a menudo son biocompatibles y proporcionan una estructura tridimensional para la simulación de condiciones de soporte en sistemas multicelulares. En alguna medida el éxito de la encapsulación celular depende del tipo celular. El propósito del gel es proporcionar un entorno de matriz-gel que permita a las células, aisladas de diferente tejido, mantener su fenotipo celular original. En una situación ideal, el gel debe proporcionar un entorno inerte (es decir, no actúa estimulando o activando células a hacer algo anormal). Las células colocadas en dichos geles son capaces de funcionar normalmente y quizás organizan de forma extraordinaria el gel con la síntesis de macromoléculas secretadas para formar explantes pseudo-tisulares. La presente invención incorpora todas las características requeridas de una matriz de

encapsulación celular. Permite a las células incorporarse mientras el gel PBP está en forma líquida. Tras la formación del gel, las células quedan atrapadas. Es posible administrar los reactivos necesarios mientras el gel está en cualquier fase asegurando de este modo que las células sean capaces de absorber los agentes necesarios mientras están en un entorno sostenido. El gel con las células atrapadas puede colocarse a una temperatura inferior permitiendo de este modo que las células se extraigan por transición a la fase líquida incluso desde regiones seleccionadas del gel permitiendo de este modo la micro-selección de poblaciones celulares con características dadas sin ningún efecto adverso. Lo mismo se aplica a cualquier partícula fijada de este modo.

Las ventajas potenciales de los geles de polímero de bloque para el suministro de colorantes incluyen su utilidad en condiciones de microgravedad y condiciones donde no es deseable el derramamiento. Las preparaciones termorreversibles de PBP que contienen excipientes potencialmente peligrosos (por ejemplo, colorantes mutagénicos) tendrían la característica de seguridad adicional de formar un gel de temperaturas cutáneas y por encima reduciendo de este modo el suministro transdérmico limitado por difusión. El suministro seguro de moléculas de colorante puede proporcionar acceso a una gama más amplia de aplicaciones y excipientes. La presente invención también permite la formación de fase sólida de sistemas de suministro de colorante con ventajas de seguridad significativas y la formulación en frío de preparaciones con excipientes termostables.

Por tanto, un primer aspecto de la invención proporciona el uso de una composición que comprende un copolímero de bloque de polioxietileno y polioxipropileno como matriz de soporte en el análisis de partículas, donde el copolímero de bloque está presente en la composición a una concentración gelificante, donde la matriz de soporte muestra las siguientes propiedades:

1. termorreversibilidad gel-sol;
2. formación de micelas en condiciones gelificantes;
3. compatibilidad óptica (es decir compatible con ensayos ópticos basados en luz; espectro electromagnético de 350 a 1300 nm);
4. propiedades tensioactivas controlables;
5. propiedades de tamiz molecular; y
6. biocompatibilidad,

donde la composición comprende adicionalmente perlas fluorescentes y/o un colorante, y donde las partículas están inmovilizadas dentro de la composición de copolímero de bloque.

Los especialistas en la técnica apreciarán que la composición de polímero de bloque puede usarse como matriz de soporte para cualquier material particulado.

En una realización preferida, las partículas se obtienen de o constituyen una muestra biológica. Preferiblemente, las partículas son células, por ejemplo células procariotas o eucariotas fijadas o vivas. Las células pueden ser adherentes o no adherentes.

De forma ventajosa, las células se seleccionan entre el grupo que consiste en los siguientes tipos celulares:

1. Células animales incluyendo células humanas y de mamífero derivadas de muestras de biopsia (por ejemplo, mediante aspirados con aguja fina), como explantes tisulares, como cultivos primarios (por ejemplo, fibroblastos de piel humana), como líneas celulares transformadas (por ejemplo, linfoblastos transformados con virus de Epstein Barr), como líneas celulares inmortalizadas (por ejemplo, líneas celulares inmortalizadas con transcriptasa inversa telomerasa humana [hTERT]), y como líneas celulares tumorales establecidas.
2. Líneas celulares tumorales humanas incluyendo aquellas que representan sitios específicos y enfermedades de interés terapéutico, diagnóstico y analítico, por ejemplo: cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon y rectal, cáncer de endometrio, cáncer renal (células renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de tiroides.
3. Líneas celulares con propiedades adherentes (por ejemplo, líneas celulares de cáncer de mama MCF-7) o no adherentes (por ejemplo, la línea celular de leucemia CCRF-CEM o la línea celular clásica de carcinoma pulmonar microcítico NCI-H69).
4. Líneas celulares de mamífero usadas en estudios de genómica funcional (por ejemplo, línea celular murina NIH 3T3)
5. Líneas celulares de células tumorales humanas disponibles para el propósito de metodologías de exploración de fármacos tales como las indicadas en el panel de líneas celulares tumorales del US National Cancer Institute (ref: http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html), que comprenden, aunque sin limitación: CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, A549/ATCC, EKVK, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522, COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620, SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251, LOX IMVI, MALME-3M, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-25, UACC-25, UACC-62, IGR-OV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3, 786-0, A498, ACHN, CAKI-1, RFX 393, SN12C, TK-10, UO-31, PC-3, DU-145, MCF7, NCI/ADR-RES, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D, LXFL 529, DMS 114, SHP-77, DLD-1, KM20L2, SNB-78, XF 498, RPMI-

7951, M19-MEL, RXF-631, SN12K1, MDA-MB-468, P388, P388/ADR.

6. Líneas celulares tumorales humanas seleccionadas por su expresión funcional de entidades moleculares específicas tales como transportadores de moléculas xenobióticas (por ejemplo, el transportador de fármacos ABCA3 que se expresa en líneas de cáncer de pulmón H522M, A549, y EKVX).

5 7. Células tumorales humanas seleccionadas por su rendimiento conveniente en estudios de transferencia génica (por ejemplo, células de osteosarcoma humano U2-OS).

8. Formas uni- y multicelulares de vertebrados (por ejemplo, embriones no humanos, formas larvarias o preparaciones celulares disociadas derivadas de pez cebra *Danio (Brachydanio) rerio*).

10 9. Líneas celulares usadas en protocolos de exploración ADME/Tox (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación/Toxicidad) (por ejemplo, líneas celulares derivadas de hepatocito tales como HepG2).

10 10. Células madre embrionarias derivadas de fuentes murinas.

11. Neuronas y/o células de soporte del sistema nervioso central (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células de Schwann).

15 12. Híbridos de células somáticas inmortales incluyendo híbridos que secretan anticuerpos (por ejemplo, hibridomas)

13. Levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*)

14. Células derivadas de plantas (por ejemplo, para el análisis de metodologías de propagación in vitro para nueva variedades de cultivo, especies raras, y plantas difíciles de propagar).

20 15. Células de respuesta inmune (por ejemplo, células dendríticas presentadoras de antígeno)

16. Formas extra- e intra-celulares de parásitos animales (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*).

25 17. Microorganismos incluyendo bacterias patogénicas de interés diagnóstico (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina).

18. Hongos incluyendo aquellos usados en control de plagas (por ejemplo, hongos entomopatogénicos incluyendo los géneros Beauveria, Metarhizium y Tolypocladium).

25 19. Formas uni- y multicelulares de animales de vida libre tales como el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

20 20. Células derivadas de cultivos organotípicos (por ejemplo, grupos celulares, esferoides y cortes cerebrales).

21. Células derivadas de material de explante (por ejemplo, cartílago, piel y disco intervertebral).

30 Convenientemente, las células son capaces de expresar una molécula fluorescente. Por ejemplo, las células pueden modificarse por ingeniería por técnicas de ADN recombinante para que expresen proteína verde fluorescente (GFP) y/o variantes espectrales y/o variantes de estabilidad de la misma.

Preferiblemente, la composición proporciona un entorno inerte para las células. Más preferiblemente, la composición es estéril antes de su uso.

35 En una realización preferida alternativa, las partículas son perlas fluorescentes. Dichas perlas pueden proporcionar una partícula para calibración que tiene un tamaño específico (grande hasta 30 µm y subresolución, por ejemplo por debajo de 200 nm), cantidad fija de fluoróforo, espectros únicos de fluoróforo y mezclas de los mismos. Las perlas adecuadas están disponibles en Molecular Probes (Invitrogen), Carlsbad, EEUU (por ejemplo, FluoSpheres™).

40 Los especialistas en la técnica apreciarán que la composición de copolímero de bloque para su uso en la presente invención debe mostrar termorreversibilidad gel-sol. Preferiblemente, la composición comprende un copolímero de bloque de polioxietileno y polioxipropileno, tal como un poloxámero.

45 Los poloxámeros son polímeros de bloque de polietileno-polipropilenglicol que contienen moles de óxido de etileno (PEO) y óxido de propileno (PPO) de acuerdo con la fórmula (véase la Tabla 1):

(PEO).sub.a -(PPO).sub.b -(PEO).sub.c.

50 **Tabla 1**
Pesos moleculares de poloxámeros

Poloxámero Nº	Pluronic®	Peso Mol. Prom.	Valores prom.		
			a	b	c
401		4.400	6	67	6
402		5.000	13	67	13
403		5.750	21	67	21
407	F127	12.000	98	67	98
331		3.800	7	54	7
333		4.950	20	54	20
334		5.850	31	54	31
335		6.000	38	54	38
338	F108	15.000	128	54	128
282		3.650	10	47	10
284		4.600	21	47	21
288	F98	13.500	122	47	122
231		2.750	6	39	6

234		4.200	22	39	22
235		4.600	27	39	27
237	F87	7.700	62	39	62
238	F88	10.800	97	39	97
212		2.750	8	35	8
215		4.150	24	35	24
217	F77	6.600	52	35	52
181		2.000	3	30	3
182		2.500	8	30	8
183		2.650	10	30	10
184		2.900	13	30	13
185		3.400	19	30	19
188	F68	8.350	75	30	75
122		1.630	5	21	5
123		1.850	7	21	7
124		2.200	11	21	11
101		1.100	2	16	2
105		1.900	11	16	11
108	F38	5.000	46	16	46

Cierta cantidad de los poloxámeros anteriores también se conoce como Pluronic®, que es una marca registrada de BASF Corporation.

5 Se prefieren poloxámeros en los que;

- a es 46 a 128;
- b es 16 a 67; y
- c es 46 a 128.

Sin más preferidos poloxámeros en los que;

- a es 46, 52, 62, 75, 97, 98, 122 y 128;
- b es 16, 30, 35, 39, 47, 54 y 67; y
- c es 46, 52, 62, 75, 97, 98, 122 y 128.

Más preferiblemente, el polímero de bloque se selecciona entre los siguientes poloxámeros con capacidad reconocida de formar geles (véase http://www.bASF.com/static/OpenMarket/Xcelerate/Preview_cid-982931200587_pubid-974236729499_c-Article.html):

	<i>Nombre genérico</i>	<i>Nombre patentado</i>
25	Poloxámero 407	Pluronic® F127
	Poloxámero 338	Pluronic® F108
	Poloxámero 288	Pluronic® F98
	Poloxámero 237	Pluronic® F87
	Poloxámero 238	Pluronic® F88
	Poloxámero 217	Pluronic® F77
	Poloxámero 188	Pluronic® F68
30	Poloxámero 108	Pluronic® F38

En una realización particularmente preferida, el polímero de bloque es poloxámero 407 (Pluronic® F127, BASF).

35 El polímero de bloque puede prepararse en cualquier medio acuoso adecuado. Por ejemplo, el polímero de bloque se prepara en agua destilada o un tampón fisiológico, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Preferiblemente, la composición tiene un pH de 7,2 a 7,4.

40 En una realización preferida, el polímero de bloque está presente en la composición a una concentración del 24 % (p/v).

De forma ventajosa, la composición está en una forma líquida (sol) en condiciones refrigeradas (por ejemplo, 0 a 5 °C) pero en una forma de gel semi-sólido a temperaturas ambiente y superiores. Por ejemplo, la composición puede conseguir una forma de gel a una temperatura de transición entre temperatura ambiente y 37 °C.

45 Se apreciará que la temperatura de transición de la composición puede modificarse alterando la formulación de la composición, por ejemplo cambiando la concentración del polímero de bloque en la composición. Como alternativa,

la temperatura de transición de la composición de polímero de bloque puede modificarse mediante la adición de uno o más excipientes, ejemplos de los cuales se dan en la Tabla 2.

Tabla 2

Efecto de aditivos específicos en la temperatura de transición sol-gel para una preparación de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PPB) 407 al 24 % p/v.	
Aditivo	Efecto sobre la temperatura de transición (°C)
sorbitol al 1 % p/v	-1,4
sorbitol al 5 % p/v	-3,0
hidroxietilcelulosa al 1 % p/v	-0,3
hidroxietilcelulosa al 5 % p/v	-2,2
glicerol al 1 % p/v	-0,2
glicerol al 5 % p/v	-2,4
cloruro sódico al 1 % p/v	-4,2
cloruro sódico al 5 % p/v	-10,3
propilenglicol al 1 % p/v	-0,8
propilenglicol al 5 % p/v	-3,4
polietilenglicol 400 al 1 % p/v	0,0
polietilenglicol 400 al 5 % p/v	+0,2
polietilenglicol 2000 al 1 % p/v	+1,1
polietilenglicol 2000 al 5 % p/v	+2,8

- 5 En una realización preferida, la composición se aplica a una superficie de un portaobjetos de microscopio, un cubreobjetos o una placa de múltiples cámaras (por ejemplo, una placa multipocillo).
- 10 En una realización preferida adicional, la composición sirve como matriz de soporte para el análisis de partículas que implican recogida de luz, incluyendo transmisión, contraste de fase, fluorescencia, vida de fluorescencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, anisotropía, dispersión de luz, e índice de refracción. Por ejemplo, la composición puede servir como matriz de soporte para el análisis de partículas por formación de imágenes, microscopía o plataformas de detección basadas en placa no de imágenes.
- 15 Preferiblemente, las partículas se analizan por microscopía de fluorescencia convencional.
- 20 15 Más preferiblemente, las partículas se analizan por microscopía de barrido de láser confocal, microscopía de barrido de láser con excitación de múltiples fotones o microscopía de fluorescencia en que los datos de imagen recogidos se someten a procesamiento matemático (incluyendo desconvolución) para proporcionar información específica de profundidad.
- 25 De forma conveniente, la luz se origina a partir de una construcción codificada genéticamente en una célula para expresar una molécula fluorescente tal como células manipuladas para expresar una molécula fluorescente, por ejemplo la proteína verde fluorescente y/o variantes espectrales y/o variantes de estabilidad de la misma.
- 30 En una realización preferida adicional, la composición sirve como matriz de soporte para el análisis multi-dimensional de partículas, por ejemplo por imágenes 3D (x,y,z), análisis de tiempo (cinética) y análisis lambda (espectral).
- 35 En otra realización preferida, la matriz de soporte es para su uso en la calibración, alineación óptica u orientación en metodologías que requieren la recogida de luz. Por ejemplo, el análisis puede ser para propósitos de calibrado, determinación de la función de propagación de punto y orientación de eventos en cortes ópticos de dos o más dimensiones.
- 40 Preferiblemente, la composición comprende adicionalmente perlas fluorescentes. Por ejemplo, pueden depositarse perlas sobre una superficie o capa dentro de dicha composición.
- De forma ventajosa, la composición comprende perlas fluorescentes de diferentes tamaños y/o diferentes colores (dichas perlas están disponibles en el mercado en Molecular Probes [Invitrogen Corporation], Carlsbad, EEUU).

- Como alternativa, o adicionalmente, la composición comprende adicionalmente un colorante, tal como un fluorocromo de ADN. Los colorantes adecuados están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Molecular Probes [Invitrogen Corporation], Carlsbad, EEUU). Preferiblemente, el colorante muestra propiedades de penetración celular con longitudes de onda de excitación y emisión en el espectro de rango visible, incluyendo el infrarrojo cercano.
- 5 Ejemplos de colorante adecuados incluyen calceína, yoduro de propidio y la serie SYTO de colorantes.
- Más preferiblemente, la composición comprende 1,5-bis {[2-(metilamino)etil]amino}-4,8-dihidroxi antraceno-9,10-diona (DRAQ5™; disponible en BioStatus Limited, Shepshed, RU) o un derivado del mismo.
- 10 La composición también puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes aditivos:
1. un agente químico de fijación celular, tal como paraformaldehído (PFA);
 2. un quimio-atrayente, es decir un agente químico, presente de forma exógena, que provoca motilidad direccional en una célula sensible;
 - 15 3. un excipiente con fines de protección celular protección o modificación biológica (tal como un factor de crecimiento o molécula de señalización); y/o
 4. un excipiente con fines de modificar los efectos fotofísicos y/o fotoquímicos de iluminación de luz sobre células o moléculas indicadoras (por ejemplo, el excipiente puede reducir el fotoblanqueo de moléculas indicadoras fluorescentes o potenciar el fotoblanqueo de moléculas indicadoras fluorescentes extracelulares).
- 20 De forma conveniente, la composición se aplica a una superficie de un portaobjetos de microscopio, un cubreobjetos o una placa de múltiples cámaras (por ejemplo, una placa de 96 pocillos, 384 pocillos o 1536 pocillos).
- 25 En una realización preferida adicional, la composición es adecuada para el análisis de partículas que implica la recogida de luz, por ejemplo por formación de imágenes (por ejemplo, imágenes 3D), microscopía (por ejemplo, microscopía de fluorescencia) o ensayos basados en placa no de imágenes. Preferiblemente, la luz que se analiza es emisiones de fluorescencia, bioluminiscencia o quimioluminiscencia. Más preferiblemente, la composición descrita en este documento es adecuada para exploración de alto rendimiento.
- 30 La composición descrita en este documento puede ser adecuada para calibración, alineación óptica u orientación en metodologías que requieren la recogida de luz. Por ejemplo, la composición puede usarse para calibrado, determinación de la función de propagación de punto y orientación de eventos en cortes ópticos de dos o más dimensiones.
- 35 Como alternativa, la composición descrita en este documento puede servir como soporte de partículas y/o puede proporcionar un medio para controlar el acceso de reactivos y moléculas indicadoras a las partículas.
- La composición puede comprender perlas fluorescentes. Por ejemplo, pueden depositarse perlas fluorescentes sobre la superficie en la composición. Preferiblemente, la composición comprende perlas fluorescentes de diferentes 40 tamaños y/o diferentes colores (es decir, propiedades espectrales fluorescentes).
- 45 La composición puede comprender un colorante, tal como un fluorocromo de ADN (por ejemplo, DRAQ5™ o un derivado del mismo; disponible en Biostatus Limited, RU). De forma ventajosa, la composición de matriz de soporte forma una serie dirigible con fines de suministro mecánico de analitos y posteriores análisis ópticos que requieren la recogida de luz incluyendo transmisión, contraste de fase, fluorescencia, vida de fluorescencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, anisotropía, dispersión de luz, e índice de refracción.
- 50 La composición de matriz de soporte puede proporcionarse sobre el portaobjetos de microscopio, cubreobjetos o placa de múltiples cámaras en una forma seca que requiere rehidratación antes de su uso.
- Propiedades para PBP en geles termorreversibles para análisis de células y partículas/perlas usando tecnologías basadas en fluorescencia
- 55 La presente invención surge de las combinaciones únicas de propiedades de polímero de bloque para nuevas aplicaciones. Estas propiedades son formación termorreversible de gel-sol donde la formación de sol está favorecida a bajas temperaturas, inmovilización de partículas/células, baja toxicidad, compatibilidad óptica, tamizado molecular y tensioactivo. La formación rápida de un gel a la temperatura de transición reduce las propiedades tensioactivas de PBP acuoso proporcionando una matriz de inmovilización y soporte para la manipulación, análisis o procesamiento de células vivas. En una realización preferida ensayos de investigación, diagnóstico y exploración usando muestras 60 biológicas que tienen que inmovilizarse durante análisis continuos o periódicos por microscopía o métodos de formación de imágenes reduciendo de este modo los efectos comprometedores de: motilidad celular, desprendimiento celular de un sustrato, los efectos del movimiento browniano, la alteración física de localizaciones celulares o la pérdida de inter-relaciones durante la manipulación de muestras. Las metodologías de inmovilización compatibles con células vivas son vitales para la formación de imágenes secuenciales de diferentes planos ópticos durante re-construcción 3D o adquisición de imágenes con el tiempo para análisis cinéticos usando enfoques de 65 microscopía de barrido láser y basada en cámara. Las propiedades del gel PBP pueden modificarse mediante

formulación proporcionando polímeros de bloque con diferentes temperaturas de transición adecuadas para diferentes aplicaciones.

Descripción del protocolo y consideraciones generales

- 5 La invención se refiere al uso de una matriz de soporte/inclusión de partículas basada en formulaciones acuosas de un gel termorreversible que comprende copolímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) que proporciona propiedades ventajosas para análisis.
- 10 Los siguientes protocolos describen métodos típicos para la preparación de geles termorreversibles ejemplificados con Pluronic® F-127. Puede disolverse F-127 (poliol F-127 fabricado por BASF Corp., NJ) en polvo en tampón 1X (por ejemplo, ejemplificado aquí usando solución salina tamponada con fosfato) en agua desionizada a aproximadamente 1-4 °C. La temperatura baja de 4 °C es necesaria porque ambos copolímeros de bloque puede disolverse fácilmente en medios acuosos a esa temperatura. Esto produce una solución homogénea, que consiste principalmente en moléculas uniméricas. Por ejemplo, una solución al 21,2 % (p/v) de F-127 en tampón 1X tiene una baja viscosidad a temperaturas de aproximadamente 4 °C, en que el fluido puede manipularse por ejemplo por presión, centrifugación, etc. En esta forma fluida pueden introducirse células o partículas a baja temperatura conservando la función celular o integridad de la partícula sin el potencial de choque térmico del uso de geles que solamente quedan líquidos a temperaturas elevadas (>37 °C). En la forma fluida la mezcla de células y partículas puede conseguirse de forma simple. En la forma fluida pueden introducirse otros excipientes, tales como colorantes (sondas fluorescentes) y moléculas indicadoras, para generar preparaciones homogéneas. La recuperación de células o partículas de la fase líquida, o de diluciones del gel en tampones refrigerados, puede conseguirse por métodos convencionales incluyendo métodos de centrifugación, filtración o separación magnética.
- 15
- 20
- 25 A temperatura ambiente (por encima de los 15 °C seleccionados por formulación para conseguir una forma de gel a temperatura ambiente hasta 37 °C), el bloque P central de copolímero F-127 se convierte en hidrófobo. La viscosidad aumenta repentinamente y el sistema se convierte en tipo gel y proporciona una fase de inmovilización. Pluronic® F-127 en una solución de baja concentración (no gelificante) tiene tanto propiedades detergentes no iónicas como propiedades de dispersión ("Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes." Negulescu PA, Machen TE. *Methods Enzymol* **192**, 38-81 (1990)) que puede no ser siempre aceptable para la manipulación de células, especialmente en estudios en que interacciones detergente-lípidos pueden influir en los parámetros de la membrana celular.
- 30
- 35 La forma de gel PBP puede actuar como matriz de soporte para inmovilizar células o partículas por ejemplo para reducir el movimiento con fines de formación de imágenes. La inmovilización es importante para permitir la inspección de campos de alta densidad y ricos en información (por ejemplo, recuento de subconjuntos de células/partículas marcados por diferentes colorantes fluorescentes o características), la formación de imágenes de cambios en las características de las células/partículas con el tiempo, el análisis combinado de células/partículas que requiere adquisición secuencial, la formación de imágenes de eventos asincrónicos en campos de células/partículas, y la formación de imágenes de alta resolución de eventos sub-celulares que podría comprometerse si la propia célula fuera móvil. La formación de gel también reduce la tasa de suministro de moléculas colorantes, por ejemplo a células integradas, y por lo tanto proporciona un elemento de control que puede explotarse para potenciar o extender la forma o intervalo dinámico de un ensayo (por ejemplo, separaron poblaciones de tinción rápida y lenta con un espacio de tiempo de análisis conveniente dentro de un sistema de difusión limitada) y para permitir la manipulación de preparaciones de colorante en formulaciones de mayor viscosidad y por tanto más seguras (por ejemplo, reduciendo la tasa de formación de aerosol o de suministro transdérmico en accidentes de laboratorio).
- 40
- 45
- 50 La Figura 1 muestra un perfil típico de viscosidad-temperatura de PBP que indica los parámetros y el intervalo de valores que son pertinentes para la utilización de una formulación termorreversible para la manipulación de células/partículas y suministro de colorantes. La temperatura de transición sol-gel (t₅₀ %) es una medida de la temperatura a la cual se obtiene la mitad de la viscosidad máxima del gel. Los valores t₂₅ % y t₇₅ % se refieren a la temperatura al 25 y 75 % de la viscosidad máxima respectivamente. Además de la medición de estos valores, el pH de la formulación (por ejemplo, ajustado a pH 7,2-7,4 a través del uso de solución salina tamponada con fosfato como tampón) es importante para la viabilidad celular.
- 55 El concepto de manipulación detrás del gel es que se almacenaría de forma rutinaria en frío (proporcionando una forma de reactivo líquido). La forma líquida se manipula fría pero forma un gel en segundos según se aumenta la temperatura. El control del proceso de calentamiento proporcionará diferentes calidades de micelas en términos del grado de ordenamiento. La rapidez permite la incorporación en ensayos rápidos. La conversión instantánea de fase sol-a-gel proporciona una vía para la incorporación en ensayos. La forma líquida puede usarse para atrapar, dar soporte, recubrir o suspender partículas, perlas, células etc. antes de o durante manipulación (por ejemplo, resuspender un sedimento celular). Tras el desplazamiento de temperatura (por ejemplo, calentamiento positivo o pasivo) el gel se endurece proporcionando un soporte para células/partículas.
- 60
- 65 Pueden describirse metodologías generales que proporcionan aplicaciones en que pueden incorporarse células vivas o fijadas, partículas o perlas en el gel con formulaciones que pueden incluir colorantes de información u otras

moléculas indicadoras. Estos protocolos básicos pueden adaptarse para aplicaciones específicas en exploración de productos candidatos en descubrimiento de fármacos, biotecnologías basadas en células y partículas/perlas y numerosas aplicaciones en formación de imágenes y microscopía y ensayos basados en placa no de imágenes.

- 5 Se describen aspectos preferidos de la invención y ejemplos comparativos en los siguientes ejemplos no limitantes, con referencia a las siguientes figuras:

10 La Figura 1 muestra un perfil típico de viscosidad-temperatura de PBP que indica los parámetros y el intervalo de valores que son pertinentes para la utilización de una formulación termorreversible para manipulación de células/partículas y suministro de fármacos.

15 La Figura 2 muestra imágenes de cámara de fluorescencia asociada a EGFP en células tumorales humanas U2-OS mantenidas en gel, que demuestra el mantenimiento de la integridad celular y la expresión de EGFP en el citoplasma (flecha). (Paneles: a, célula en medio de cultivo completo; b-d, células recubiertas con gel y plasmadas en imagen a 0 [b], 10 [c] y 60 [d] min a 37 °C.

20 La Figura 3 muestra imágenes de cámara de células tumorales humanas U2-OS que expresan EGFP, montadas en gel después de exposición al colorante fluorescente de localización nuclear DRAQ5 (a: b)

25 La Figura 4 muestra imágenes de cámara de DRAQ5 en células SU-DHL-4 teñidas en gel mantenidas en gel.

La Figura 5 muestra detección por microscopía de barrido láser de núcleos celulares e inmunotinción de un antígeno de superficie celular para células fijadas en soporte de gel (barra = 10 μm). El panel de la izquierda muestra la imagen de transmisión, el panel central muestra inmunofluorescencia con verde Alexa 488-NCAM, y el panel de la derecha muestra fluorescencia nuclear con rojo lejano DRAQ5.

30 La Figura 6 muestra las etapas en un protocolo simple para montar una muestra pre-mezclada en gel en un portaobjetos convencional de microscopio.

35 La Figura 7 muestra las etapas en protocolos modificados para la preparación de muestras en gel en portaobjetos y sistemas multi-pocillo.

40 La Figura 8 muestra que la formación de imágenes en un espacio de tiempo de perlas en PBS o gel revela captura eficaz de objetos fluorescentes para la recogida de imágenes secuenciales.

45 La Figura 9 muestra los efectos de un campo magnético sobre perlas magnéticas dispersadas en un gel de PF-127 al 24 % a temperatura ambiente.

50 La Figura 10 muestra resultados típicos para células cargadas de calceína (células de carcinoma de mama humano MCF-7 cultivadas usando metodologías rutinarias en cámaras con fondo de vidrio y usando un sistema basado en cámara.

55 La Figura 11 muestra una serie de enfoques de campo abierto (cámara CCD) a través de una perla de 170 nm montada en PF-127 al 24 % p/v en agua (contraste invertido). El portaobjetos se montó en un microscopio vertical de plataforma fija Nikon, y se plasmó en imágenes usando un objetivo aéreo x40 ELWD NA 0.6 (resolución de píxeles de 0,23 μm). En el modo de fluorescencia (excitación 470/40 y emisión 525/50) se recogió una serie de enfoques usando etapas z de 0,15 μm , se capturó un total de 51 planos que es un equivalente de 7,5 μm de distancia total. Se cortó una única perla de la pila total y se montó para mostrar los anillos de difracción. Una imagen de una perla fluorescente a subresolución (es decir más pequeña de 200 nm) mostró un disco espacioso que consiste en una mancha central rodeada por anillos de tenue luz y oscuros.

60 La Figura 12 muestra la proyección máxima de una serie de enfoques a través de una perla de 170 nm montada en PF-127 al 24 % p/v en agua (contraste invertido). Las condiciones fueron idénticas a las descritas anteriormente. Las perlas permanecen estacionarias durante toda la serie completa que lleva aproximadamente 3 minutos en recoger. Cada perla consiste en un centro brillante (negro) y anillos alrededor del centro; lo que muestra que cada una de las perlas es estacionaria.

65 La Figura 13 muestra dos funciones típicas de propagación de punto (PSF) de campo abierto obtenidas por remuestreo de los datos en xz. La imagen asimétrica surge debido a aberraciones esféricas (es decir un objetivo aéreo (índice de refracción examinando una muestra de gel de PF-127 al 24 % con índice de refracción 1,357). Ésta es una situación típica en pantallas de instrumentos de exploración de alto contenido donde se usan objetivos aéreos de forma rutinaria, mientras la muestra viva descansa en gel dentro de una placa multipocillo. La PSF descansa en una ligera inclinación debido al hecho de que la alineación del instrumento está ligeramente fuera de eje. Tomadas juntas, las imágenes de las perlas proporcionan una evaluación cuantitativa del rendimiento del instrumento en condiciones idénticas a las usadas para una configuración típica para la formación de imágenes de células vivas en múltiples pocillos. No sería posible la inmovilización de las perlas en

medio o tampón fisiológico solamente para este tipo de evaluación.

La Figura 14 muestra una comparación de la cinética de captación de colorante DRAQ5 en células tumorales humanas U2-OS mantenidas en PBS o gel.

La Figura 15 muestra la tinción diferencial de células de linfoma de células B humanas vivas y muertas (indicadas con flechas) vistas por transmisión (panel a) o fluorescencia de núcleos de células teñidos con yoduro de propidio.

10 Ejemplos

Ejemplo II - Aspectos metodológicos

Un protocolo típico para la preparación de soluciones acuosas estériles de poloxámero PF-127

(i) Se prepararon soluciones acuosas de poloxámero en una base porcentual de peso en volumen, mediante el proceso en frío similar al descrito por Schmolka en 1972 (Schmolka, I.R. (1972) Artificial skin 1. Preparation and properties of Pluronic® F-127 gels for treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.* **6**, 571-582.). Se añade PBP lentamente a agua destilada y se agita constantemente. El sol se mezcla minuciosamente y se almacena a 4 °C hasta que se requiera.

(ii) Se obtuvo PF-127 (por ejemplo, número de lote WPDL-510B) de BASF Corporation (Preston Lancashire, RU). Las soluciones de PF-127 usadas en protocolos de montaje celular se preparan usando, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS). Pueden usarse diferentes formulaciones de PBS. Formulaciones típicas para solución salina tamponada con fosfato son:

(a) PBS como un líquido 1X, pH: 7,4 ± 0,05 (fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) 1,06 mM, cloruro sódico (NaCl) 155,17 mM, fosfato sódico dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2,97 mM)

(b) Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) (1X) líquida que contiene calcio y magnesio (cloruro cálcico (CaCl_2) (anhid.) 0,901 mM, cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,493 mM, cloruro potásico (KCl) 2,67 mM, fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) 1,47 mM, cloruro sódico (NaCl) 137,93 mM, fosfato sódico dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8,06 mM). [REFERENCIA: Dulbecco, R. y Vogt, M., (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **98**:167].

(iii) Las soluciones de PF-127 que requieren esterilización por vapor se transfieren a frascos de vidrio de 100 ml, sometidos a autoclave a 120 °C durante 20 minutos (USP, XX11NFV11) y posteriormente se almacenan a 4 °C hasta que se requieren. Se pesa PF-127 sólido que requiere disolución en D-PBS o un tampón de elección tal como medio de cultivo RPMI (en solitario, completamente suplementado o suplementado con glutamina y antibióticos) en condiciones asépticas y se añade al medio estéril sin mezcla y se almacena a 4 °C durante 12 horas. Después de este periodo, se dispersa cualquier grumo de PF-127 restante en condiciones asépticas usando una espátula estéril y la mezcla se almacena durante 24 horas adicionales a 4 °C hasta completarse la hidratación de PF-127 juzgada por la presencia de una solución transparente (definida por referencia al índice de refracción).

(iv) La presencia de componentes inestables al calor en el tampón usado en cualquier experimento de cultivo celular puede evitar la esterilización por vapor de PF-127 hidratado en dicho medio. En su lugar, inmediatamente antes de su uso pueden esterilizarse por filtración las soluciones de PF-127 (filtros con tamaño de poro de 0,2 µm). Este enfoque también permite la preparación de excipientes termoinestables, un procedimiento no posible con disolución en geles que requieren calentamiento para conseguir la forma líquida.

v) Se usan soluciones de PF-127 sobre-resistentes para disolver excipientes, por ejemplo soluciones madre de fármacos, de modo que tras la mezcla se obtenga la concentración requerida de un colorante (por ejemplo, DRAQ5™ 20 mM o 1 µg/ml de yoduro de propidio) y gel PF-127.

B Protocolo típico por etapas para la manipulación física de gel PBP (ejemplificado aquí como una preparación de PF-127 al 24 % p/v en PBS) para su uso como soporte de células/partículas

i) Se hacen preparaciones celulares mediante un método convencional de cultivo celular de elección, incluyendo: el uso de células adheridas que crecen en una superficie de portaobjetos de microscopio (por ejemplo, un portaobjetos con cámara o placa de múltiples cámaras) o sobre un cubreobjetos (por ejemplo, cultivo en cubreobjetos), o depositadas en un portaobjetos de microscopio (por ejemplo, por formación de frotis o suministro de gotas o cito-centrifugación).

ii) El gel PBP se prepara en un recipiente conveniente. Aquí se describe una preparación en frasco gotero para células físicamente mezcladas en el gel PBP o para células depositadas sobre la superficie de un portaobjetos

de microscopio o que crecen sobre un cubreobjetos).

5 iii) Se retira el frasco gotero de gel PBP del refrigerador a 4 °C (se almacena vertical durante una noche a 4 °C antes de su uso, y se intenta no introducir burbujas en la forma líquida cuando se usa el gotero) y se coloca en hielo triturado para mantener el gel PBP en forma líquida y para refrigerar adicionalmente el gotero de vidrio dentro del frasco.

10 iv) Se coge un portaobjetos de vidrio de microscopio (temperatura ambiente), se coloca en una superficie plana y se usa rápidamente el gotero para depositar una gota de gel PBP en el centro del portaobjetos. Se devuelve el gotero al frasco refrigerado inmediatamente. El gel endurecerá rápidamente sobre la superficie del portaobjetos de microscopio. No se debe tocar.

15 v) Se coge un cubreobjetos convencional (temperatura ambiente) y se coloca suavemente/uniformemente sobre la parte superior del montón central de gel sin presionar o atrapar aire en el punto de contacto. El cubreobjetos parecerá un "sombbrero" balanceándose sobre el gel.

20 vi) Se coloca el portaobjetos de microscopio sobre un lecho de hielo (o preferiblemente sobre una placa metálica plana en un lecho de hielo o un dispositivo Peltier para proporcionar una superficie de refrigeración conveniente).

25 vii) Se observa el gel cuidadosamente y en segundos el gel experimentará transición inversa y se convertirá en un líquido, propagándose como soporte para el cubreobjetos.

30 viii) Cuando ha sucedido la propagación del gel, se retira el portaobjetos de la placa de refrigeración y se coloca la parte inferior del portaobjetos en contacto con una superficie de calentamiento, por ejemplo la palma de la mano. El gel endurecerá rápidamente, y retendrá el cubreobjetos en su sitio incluso a temperatura ambiente. El portaobjetos puede invertirse sin movimiento del cubreobjetos. El gel puede retirarse de la superficie por irrigación usando agua o tampón enfriado.

35 ix) Con práctica, la deposición de la cantidad correcta de gel PBP sobre los portaobjetos, la aplicación del cubreobjetos y la secuencia de desplazamientos de temperatura pueden producir una muestra montada en 30 segundos con perfecto llenado del cubreobjetos y sin burbujas atrapadas.

40 x) La preparación entonces se analiza por métodos convencionales de microscopía.

45 C Protocolo típicos para la tinción in situ de células vivas a temperatura ambiente usando una solución acuosa estéril de poloxámero PF-127 preparada en solución salina tamponada con fosfato at 24 % p/v con el fin de teñir ADN nuclear

50 i) Se preparó una solución acuosa sobre-resistente de poloxámero en una base porcentual de peso en volumen como se ha descrito y se mezcló con una solución madre concentrada del colorante de ADN DRAQ5™ para producir una concentración final de 20 µM de DRAQ5™ en PF-127 al 24 %.

55 ii) Usando una pipeta refrigerada en hielo se superpuso una solución a 4 °C de DRAQ5™/PF-127 rápidamente sobre un cultivo de monocapa celular (por ejemplo, línea celular de osteosarcoma humano U2-OS que crece en un portaobjetos con cámara), obtenido usando métodos convencionales de cultivo celular. Antes de sobreponer el gel se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa usando solución salina tamponada con fosfato refrigerada y el portaobjetos con cámara se coloca en una superficie refrigerada.

60 iii) Después se coloca un cubreobjetos sobre el gel superpuesto y se completa el procedimiento de montaje como se ha descrito anteriormente.

65 iv) Entonces se analiza la preparación por métodos convencionales de microscopía de fluorescencia para examinar la morfología nuclear de las células ya que se tiñen in situ con la preparación de DRAQ5™/PF-127.

70 D Protocolo típico para la tinción in situ de células vivas a temperatura ambiente usando una solución acuosa estéril de PBP preparada en PBS al 24 % p/v con el fin de distinguir células vivas y muertas (apoptóticas) usando tinción diferencial por yoduro de propidio

75 i) Se preparó una solución acuosa sobre-resistente de PBP en una base porcentual de peso en volumen como se ha descrito y se mezcló con una solución madre concentrada del colorante de viabilidad yoduro de propidio para producir una concentración final de 1 µg/ml de yoduro de propidio en PF-127 al 24 %).

80 ii) Usando una pipeta refrigerada en hielo se mezcla una solución a 4 °C de PI/PBP con una suspensión de elevada densidad de células para su análisis (por ejemplo, línea celular de linfoma de células B humanas que crecer como un cultivo en suspensión), obtenida usando métodos convencionales de cultivo celular. La muestra refrigerada, mezclada se pipetea en un portaobjetos de microscopio refrigerado y se añade un cubreobjetos

como se ha descrito anteriormente.

5 iii) La preparación entonces se analiza por métodos convencionales de microscopía de fluorescencia para examinar la presencia de células teñidas rápidamente que muestran morfología nuclear anormal (apoptótica o necrótica) o células resistentes a tinción que representan aquellas con membranas plasmáticas intactas. Aquí la captura en la célula permite observar la cinética de tinción y permite el análisis repetido de un campo de células inmovilizadas, que normalmente se perdería en un ensayo basado en imágenes/microscopía.

10 iv) Las muestras celulares pueden pre-teñirse con yoduro de propidio en suspensiones acuosas antes de su transferencia a una solución acuosa de PBP, por ejemplo, la transferencia de muestras inicialmente preparadas para citometría de flujo y posteriormente analizadas por formación de imágenes en gel.

E Protocolo típico para la preparación de células fluorescentes (por ejemplo, que expresan proteína verde fluorescente) en gel PBP para la formación de imágenes de células vivas

15 i) Se preparan células que portan un indicador fluorescente usando métodos convencionales de cultivo celular como cultivos adheridos o células resuspendidas a alta densidad en un medio de elección.

20 ii) Para cultivos celulares adheridos, se superpone gel PBP en fase líquida como se ha descrito anteriormente.

25 iii) Para suspensiones celulares, se mezclan alícuotas directamente en el gel PBP en fase líquida y se pipetean directamente en un portaobjetos de microscopio con un cubreobjetos añadido como se ha descrito anteriormente.

30 iv) Entonces se analizan las preparaciones de células vivas por métodos convencionales de microscopía de fluorescencia para examinar características de interés.

Puede usarse polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a concentraciones gelificantes para actuar como medio ópticamente compatible para capturar e inmovilizar partículas con fines de calibración, alineación óptica y orientación en metodologías que requieren la recogida de luz incluyendo fluorescencia de emisiones de bioluminiscencia. En una realización preferida se usarían perlas fluorescentes depositadas sobre una superficie dentro de un gel PBP en sistemas de microscopía de fluorescencia (por ejemplo, sistema de microscopía de barrido láser confocal o microscopía de barrido láser con excitación de múltiples fotones) para proporcionar un medio de calibración, determinación de la función de propagación de punto y orientación de eventos dentro de cortes ópticos de dos o más dimensiones.

35 Las muestras de calibración incluyen la co-mezcla de perlas con células dentro del gel PBP para proporcionar una corrección de profundidad frente a fluorescencia frente a dispersión para la determinación de la función de propagación de punto en las mismas condiciones de muestra viva. Dichas muestras también pueden usarse para proporcionar una indicación del rendimiento de elementos ópticos o configuración instrumental. Dicho método sería apropiado para cualquier tipo de imágenes multi-dimensionales que requieran calibración de la resolución del eje x, y o z. Se requiere calibración para medir y corregir en consecuencia las aberraciones derivadas de la muestra. Por lo tanto son apropiadas perlas incorporadas co-mezcladas con la muestra celular para la medición de la resolución multi-dimensional particularmente la resolución del eje x,y,z, incluyendo la función de propagación de punto obtenida de perlas a subresolución. Otras aberraciones requieren corrección dependiente de profundidad de la fluorescencia, solapamiento espectral de fluorescencia y medición de interferencia cruzada.

40 Puede usarse polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a concentraciones gelificantes para actuar como medio ópticamente compatible para capturar e inmovilizar células vivas y fijadas con fines de análisis en metodologías que requieren la recogida de luz incluyendo fluorescencia o emisiones de bioluminiscencia. Las células pueden ser no adherentes o suspensiones celulares procesadas. En una realización preferida, la fluorescencia se originaría a partir de una molécula fluorescente manipulada para expresarse por la célula tal como una proteína verde fluorescente (GFP).

45 Puede usarse polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a concentraciones gelificantes como soporte de recubrimiento para cultivos adherentes o preparaciones planas de células vivas o fijadas que proporciona un soporte conveniente para la protección de células y tinción o marcaje *in situ* de células. Aquí, la transición sol-gel como función de la temperatura proporciona un nuevo medio para propagar un soporte a baja temperatura y controla la profundidad del gel deteniendo la propagación a través de la formación de gel elevando la temperatura local de la preparación. Las propiedades adherentes permitirían la inversión de una muestra montada de modo que pueden usarse formatos invertidos de microscopía. Aquí el gel proporciona una fase acuosa-de gel entre la muestra y otra interfaz óptica para la formación de imágenes. En una realización preferida, la fluorescencia se originaría a partir de una molécula fluorescente manipulada para expresarse por la célula tal como proteína verde fluorescente (GFP).

55 Puede usarse polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a concentraciones gelificantes en un método de preparación de partículas, perlas o células ('analitos') mediante la centrifugación de suspensión acuosa

- en una fase de gel PBP dentro del mismo recipiente. En una realización preferida, el gel PBP está presente por debajo de una fase acuosa de recubrimiento que comprende una suspensión de dichos analitos y mantiene una superficie de contacto gel-acuosa por control de la temperatura. La centrifugación fuerza la entrada de analitos en el gel. Los analitos depositados en la fase de gel pueden recuperarse por transición controlada por temperatura a un sol después de la retirada del recubrimiento acuoso.
- Los analitos pueden pre-marcararse con sondas fluorescentes o bioluminiscentes. Además pueden estar presentes analitos que son sondas moleculares fluorescentes o bioluminiscentes en la fase acuosa o en la fase de gel para posibilitar un análisis óptico de las partículas, perlas o células suspendidas. En una realización preferida, la sonda molecular fluorescente es la antraquinona DRAQ5™.
- El polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a bajas concentraciones no gelificantes tiene propiedades tensioactivas que pueden proporcionar alteración celular o propiedades líticas para la liberación de moléculas para análisis primarios y/o secundarios. La modulación de las propiedades requeriría un desplazamiento en la concentración de PBP por dilución *in situ* y/o un desplazamiento en la temperatura. En una realización preferida, geles PBP solubilizados *in situ* conferirían propiedades tensioactivas y proporcionarían una metodología de análisis secuencial de células vivas-células lisadas.
- Puede combinarse polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) a concentraciones gelificantes con agentes químicos de fijación celular (por ejemplo, paraformaldehído) y/o colorante (por ejemplo, un fluorocromo de ADN) para proporcionar agentes multi-funcionales únicos para fijación *in situ*, soporte de inmovilización/estructural y tinción celular. En una realización preferida, dichos agentes multi-función reducirían el tiempo de procesamiento, minimizarían la pérdida celular a través de una reducción en la cantidad de etapas de procesamiento (por ejemplo, en el programa de fijación que requiere etapas de lavado y eliminación de fluidos) y proporcionarían un medio para mantener entornos osmóticos, gradientes metabólicos e integridad estructural/mecánica.
- La formación de geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) posibilita la preparación e inmovilización de células procariotas encapsuladas sobre superficies porosas o no porosas con fines de cultivo a corto plazo y/o un análisis secuencial en que se reconoce la localización de la muestra con fines de vinculación de datos. En una realización preferida, podría usarse la encapsulación en fase líquida a baja temperatura con desplazamiento de temperatura de una o más células procariotas para capturar células en una localización específica en que pudiera suministrarse un fármaco con fines de ensayo de quimiosensibilidad.
- La formación de geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) posibilita la preparación e inmovilización de células eucariotas encapsuladas sobre superficies porosas o no porosas con fines de cultivo a corto plazo y/o un análisis secuencial en que se reconoce la localización de la muestra con fines de vinculación de datos. En una realización preferida, se usa la encapsulación en fase líquida a baja temperatura con desplazamiento de temperatura de una o más células eucariotas para capturar células en una localización específica en que realizar un análisis posterior de una o más secuencias génicas y/o proteínas u otras moléculas de origen celular.
- La formación de geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) posibilita la preparación e inmovilización de células encapsuladas sobre superficies porosas o no porosas con fines de cultivo a corto plazo y/o un análisis secuencial en que se reconoce la localización de la muestra con fines de vinculación de datos. En una realización preferida, se usa la encapsulación en fase líquida a baja temperatura con desplazamiento de temperatura de una o más células eucariotas para capturar células en localizaciones específicas con el propósito de detectar y analizar la presencia o ausencia de parásitos incluyendo las formas intracelulares de especies de Plasmodium en el diagnóstico de la malaria y con el propósito de identificación de especies y variantes.
- La formación de geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) posibilita la preparación de células encapsuladas o partículas con fines de protección, manipulación o análisis de muestras. En una realización preferida, la encapsulación en fase líquida a baja temperatura de una célula o partícula permite la generación de gotas con el propósito de preparar series o réplica a través del suministro de dichas gotas a una superficie receptora o recipiente antes de o después del análisis de características informativas de la muestra encapsulada.
- Una metodología proporciona un medio para la pre-construcción de sistemas/dispositivos de ensayo modular para el procesamiento secuencial regulado por las propiedades de los geles termorreversibles. En el paso a través de la temperatura de transición, por ejemplo en el punto de formación o suministro de la gota, las muestras encapsuladas sufrirían tensión de evaporación reducida para preparaciones de células vivas pero tendrían propiedades de adhesión superficial aumentadas. En una realización preferida, las células encapsuladas ofrecen una protección física para las células contra tensión mecánica transmitida por instrumentación de clasificación y selección.
- La rápida formación del gel de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) proporciona inicialmente una capa de inmovilización sobre las células. Con la adición de quimioatractantes potenciales dentro del gel o en una capa por encima del gel, este gradiente se convierte en una capa activa para estimular células o atraer/clasificar células entre sus equivalentes no estimulados. La capacidad termorreversible permite retirar selectivamente y procesar adicionalmente estas células.

- El entorno micelar del polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) proporciona un vehículo controlado y el suministro de moléculas (por ejemplo, reactivos, fluorocromos indicadores o conjugados de los mismos) a células o partículas por difusión pasiva o electroforesis con el propósito de metodologías de análisis controlado. En una realización preferida, los efectos de tamiz molecular del gel PBP producirían un suministro secuencial de reactivos y moléculas indicadoras fluorescentes o bioluminiscentes dentro de las preparaciones de muestra.
- La adición de excipientes con fines de protección celular o modificación biológica conferiría funcionalidades adicionales a los geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP). Por ejemplo, la inclusión de factores de crecimiento o moléculas de señalización para mantener o modificar fenotipos celulares.
- La adición de excipientes con el propósito de modificar los efectos fotofísicos y fotoquímicos de iluminación con luz sobre células o moléculas indicadoras conferiría funcionalidades adicionales a los geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP). Por ejemplo, pueden incluirse excipientes para reducir el fotoblanqueo de moléculas indicadoras fluorescentes.
- La formación de geles de polímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (PBP) posibilita la presentación controlada de forma térmica de células o partículas a superficies, lo que potencia o posibilita el rendimiento del ensayo. En una realización preferida, el ensayo exploraría los efectos de resonancia de plasmón superficial o la recogida de luz de profundidades altamente restringidas en interfaces ópticas.
- El copolímero de bloque relevante de esta invención comprende polioxietileno y polioxipropileno. Por consiguiente, las preparaciones formadoras de gel incluyen aquellas descritas como Pluronics® F127, F108, F98, F87 y F88 (Pluronic® es una marca registrada de BASF Corporation).
- Ejemplo II - Uso de composiciones de polímero de bloque en el análisis de células fluorescentes o teñidas**
1. Métodos generales para la preparación de una línea celular que expresa EGFP y su análisis óptico
- Preparación de construcción.* La construcción de ADN marcador de la fase del ciclo celular (GE Healthcare; Cardiff RU) se preparó a partir de tres fragmentos de ADN que se fusionaron en fase y se clonaron en un vector pCI-Neo (Promega) que se había cortado con BglII y NheI para retirar el promotor CMV. Los tres fragmentos usados fueron el promotor de la ciclina B1, los 171 aminoácidos N-terminal de la región codificante de ciclina B1 humana y EGFP. El promotor de la ciclina B1 se amplificó a partir de una construcción descrita previamente²² usando PCR y los cebadores 5'-CGCGGCAGCTGCCGAGAGCGCAGCGC-3' y 5'-CGCAAGCTTCCTTCACCAGGCAGCAGCTC-3'. La región N-terminal del ARNm de ciclina B1, que codifica la caja de destrucción de ciclina B1 y el CRS pero excluyendo el sitio de unión a CDK se amplificó con extremos Hind III y BamHI usando PCR y los cebadores 5'-GGGAAGCTTAGGATGGCGCTCCGAGTCACCAGGAAC-3' [SEC ID Nº 1] y 5'-GCCGGATCCCACATATTCACTACA AAGGTT-3' [SEC ID Nº 2] a partir de un ADNc de ciclado descrito previamente⁵. El gen para EGFP se amplificó a partir de pEGFP-N2 (Clontech) con los cebadores 5'-GGTACGGGCCACCATGGGATCCAAGGGCGAG GAGCTGTTCAC [SEC ID Nº 3] y 5'-GGTACGGGTTAACCGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG 3' [SEC ID Nº 4]. Los tres fragmentos se fusionaron y se confirmó la integridad del clón final por análisis de secuencia.
- Sistema indicador celular.* La línea celular parental usada en estos estudios fue una línea celular de osteosarcoma humano derivada de una mujer caucásica de 15 años de edad U-2 OS (American Type Culture Collection [ATCC] HTB-96). Las células U-2 OS se transfecaron con la construcción de ADN marcador del ciclo celular usando Fugene (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de selección con 1000 µg/ml de genetina (Sigma G7040) se enriquecieron las células de expresión usando clasificación celular actividad por fluorescencia de alta velocidad (MoFlow; DAKO-Cytomation) y se almacenaron en placas de 96 pocillos (1 célula/pocillo fluorescente verde). Las colonias se expandieron y se expandieron los clones cuya fluorescencia verde variaba con el ciclo celular predicho por un indicador basado en ciclina, determinado por citometría de flujo convencional, y se mantuvo una sublínea de expresión.
- Tanteo y condición de mantenimiento.* Las células transfectadas de forma estable se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 % usando técnicas convencionales de cultivo tisular. Los medios usados fueron McCoys 5A modificado (Sigma) suplementado con glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, suero de ternera fetal al 10 % y 1000 µg/ml de genetina.
- Imágenes de espacio de tiempo/cámara.* Se realizó un seguimiento celular con fluorescencia de alta resolución con células sembradas en cámaras cubreobjetos de vidrio Nunc de 8 pocillos (Labtek Inc). Las placas de cultivo se colocaron en un instrumento de espacio de tiempo diseñado para capturar imágenes de fase de campo brillante y fluorescencia GFP (excitación 480/25 nm y emisión 525/30 nm). Se equipó un microscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss, Welwyn Garden City, RU), con una incubadora durante el mantenimiento a 370C/5 % CO₂ (Solent Scientific, Portsmouth, RU), y una cámara CCD ORCA-ER de 12-bit (Hamamatsu, Reading, RU). La iluminación se controló mediante un obturador delante de la lámpara de transmisión, y una plataforma de posicionamiento x,y con enfoque z separado (Prior Scientific, Cambridge, RU) controlado en adquisición de múltiples campos. La captura de imágenes

se controló por AQM 2000 (Kinetic Imaging Ltd). Todas las imágenes se recogieron con un objetivo apocromático aéreo 40x, 0,75 NA que proporciona un tamaño de campo de 125x125 mm. Se capturaron secuencias según lo necesario. Cuando se requería análisis de las imágenes, se realizaba con el paquete de software integrado AQM 2000 (Kinetic Imaging Ltd). Cada célula en el campo se siguió individualmente. El seguimiento de fluorescencia en una base de célula individual se consiguió en Lucida (KI Ltd). La fluorescencia se registró en una región de interés.

2. Análisis típico de células fluorescentes en gel

La Fig. 2 muestra resultados típicos para fluorescencia asociada a EGFP en células de expresión captadas en imágenes en medio de cultivo (panel a), en que la región marcada muestra la presencia de un grupo de 3 células que expresan elevados niveles de EGFP en el citoplasma (flecha). Después de la captura de las imágenes celulares, se aspiró el medio de cultivo y la monocapa celular se superpuso con un gel refrigerado (4 °C) del 24 % p/v (PF-127; en forma de sol) preparado en PBS, se devolvió a la plataforma de imágenes (a 37 °C; formando la superposición un gel de soporte a esta temperatura) y se volvió a buscar la localización del campo. Se capturaron imágenes de fluorescencia adicionales de las mismas células a los 0, 10 y 60 min de incubación en gel. Las imágenes muestran claramente el mantenimiento de la integridad celular (células aplanadas) y la expresión de GFP en el citoplasma.

3. Análisis típicos de más de un flúor en células vivas en gel: células que expresan EGFP en gel (PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS) co-teñidas con un colorante de ADN (DRAQ5)

La Fig. 3 muestra resultados típicos para fluorescencia asociada a EGFP en 3 muestras teñidas para el ADN nuclear usando el agente fluorescente DRAQ5. Las imágenes emparejadas muestran fluorescencia de rojo lejano asociada a DRAQ5 (Fig. 3 paneles a, c y e de la izquierda) o fluorescencia verde de EGFP (Fig. 3 paneles b,d y f de la derecha). Los paneles a y b muestran resultados para las mismas células teñidas en PBS con DRAQ5 (20 mM x 10 min) y captadas en imágenes en PBS permitiendo la identificación de células (presencia de un núcleo; marcado con flecha) con expresión alta (hgfp) o baja (lgfp) de EGFP dentro del citoplasma (marcado con flecha). Los paneles c y d muestra células también pre-teñidas usando DRAQ5 en PBS pero superpuestas con gel (véase anteriormente) después de aspiración de la solución de DRAQ5. Las imágenes en los paneles c y d muestran la capacidad continuada de distinguir las células de expresión hgfp y lgfp. Los paneles e y f muestran células teñidas con DRAQ5 en la superposición de gel durante 1 h (DRAQ5 20 mM en PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS; a 37 °C), que demuestra la capacidad de distinguir células hgfp y lgfp usando una metodología de tinción en gel. Las imágenes muestran claramente el mantenimiento de la integridad celular (células aplanadas) y la expresión de GFP en el citoplasma.

35 4. Transmisión típica de luz y análisis de fluorescencia de células teñidas en gel usando un colorante de penetración celular (DRAQ5).

Se cultivaron células de linfoma de células B humanas (línea SU-DHL-4) en suspensión usando metodologías rutinarias. El cultivo celular normalmente contiene células vivas y un fondo de células agonizando, desechos y ocasionalmente partículas no celulares. En un análisis típico para distinguir objetos, pueden hacerse una comparación de imágenes de transmisión y fluorescencia. Una metodología típica comprendería muestras celulares pre-mezcladas con gel refrigerado (PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS y que contiene DRAQ5 20 mM) y montado en un cubreobjetos sobre un portaobjetos de microscopio refrigerado. El portaobjetos después se elevó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la tinción continuada en gel de ADN nuclear por DRAQ5. La Fig. 4 muestra un campo típico captado en imágenes para transmisión (panel a) o fluorescencia de rojo lejano de un colorante de ADN (DRAQ5; excitación de luz azul panel b). Las imágenes (véanse las flechas) revelan la tinción positiva en gel de células intactas, que permite la distinción de objetos bi-nucleados (es decir células en división), desechos (señal nuclear indistinta) o inclusiones no celulares (que no contienen ADN). El análisis ejemplifica la formación de imágenes de células/objetos no adherentes, mantenidos en gel, que posibilita el examen secuencial de características de la célula/objeto sin pérdida de localización en 3 dimensiones.

5. Ejemplos del uso de composiciones de polímero de bloque para la inmovilización de células no adherentes para el uso imágenes de alta resolución para determinar la localización de inmunofluorescencia

Una característica importante de las formulaciones de gel PF-127 es que proporcionan un método fácil para inmovilizar células en suspensión tales como aquellas preparadas para citometría de flujo. Esto posibilita realizar imágenes de alta resolución sobre células que no están originalmente fijadas a una superficie óptica.

Por lo tanto, las formulaciones PF-127 proporcionan una vía para interconectar diferentes plataformas de citometría (por ejemplo, una muestra de citometría de flujo analizada por formación de imágenes) particularmente aquellas que requieren el análisis secuencial de células en suspensión. Es de particular interés la localización de una señal dada de fluorescencia en un compartimento celular (por ejemplo, la expresión de la molécula de adhesión celular neural [NCAM] sobre la superficie celular de células de carcinoma pulmonar microcítico [células SCLC]) o la expresión de una señal en relación a células adyacentes donde se requiere una matriz de soporte para mantener una agrupación celular durante, por ejemplo, múltiples exploraciones ópticas de un microscopio confocal o multifotón.

- Aquí se describe el uso de gel como matriz de soporte para células fijadas sondeado con un anticuerpo apropiado marcado de forma fluorescente y un colorante de ADN. Se cultivaron células NCI-H69 como células en suspensión en medio de cultivo RPMI-1460 con FCS al 10 % usando metodologías convencionales de cultivo celular. Las células se recogieron y fijaron en metanol enfriado en hielo durante 20 minutos. Después de lavar en solución salina tamponada con fosfato, las muestras se procesaron para inmunofluorescencia convencional como la usada para análisis citométrico de flujo y microscopía de fluorescencia. Estas suspensiones se prepararon como análisis de flujo para detección de NCAM (CD-56), usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano (CD-56; BD Pharmingen, RU), seguido de una tinción secundaria usando un anticuerpo anti-Alexa 488 de ratón (Molecular Probes, InVitrogen, USA). Finalmente las preparaciones se marcaron con DRAQ5 para distinguir el núcleo.
- Se colocó una pequeña muestra de células ($50 \mu\text{l}$ a 1×10^6 células por ml) en un cubreobjetos con cámara (Nunc) y sol PF-127 al 24 % p/v en PBS sobre la capa celular, y se dejó a temperatura ambiente para formar una capa de gel (véase la parte A para la preparación de portaobjetos con cámara). Las células y agrupaciones de células llegaron a inmovilizarse bajo la matriz de gel.
- Se realizó microscopía confocal de barrido láser de alta resolución (BioRad 1024MP; BioRad Microscience Ltd) para obtener una imagen de tres canales del agrupamiento celular (Fig. 5). La imagen de transmisión mostró compatibilidad óptica con luz de 488/647 nm. La estabilidad de la muestra posibilitó la captura de imágenes de las células firmemente acopladas y proporcionó bordes distintivos entre células que representan la localización de NCAM. La localización nuclear representaba la localización celular y muestra claramente la cantidad de células dentro del agrupamiento. No hubo fondo detectable o problemas de dispersión óptica asociados con el soporte de gel. El ejemplo demuestra el uso del gel con preparaciones celulares fijadas, en un protocolo compatible con análisis citométricos de flujo y la capacidad de señales de inmunofluorescencia de alta resolución en gel.
- Ejemplo III - Ejemplo de la producción de un portaobjetos de microscopio o placa multipicillo recubierto en una composición de polímero de bloque**
1. Protocolo simple para montar una muestra pre-mezclada en gel sobre un portaobjetos de microscopio convencional (Fig. 6 paneles a-e)
- ETAPA a: Se mezcla en gel una muestra para análisis (en forma de sol; mantenida en un tubo de muestra en hielo) por ejemplo mediante la adición de una suspensión concentrada de células (por ejemplo, 4×10^5 células en un volumen de $10 \mu\text{l}$ de PBS preparado usando metodología convencional de centrifugación) a un volumen de $250 \mu\text{l}$ de F-127 al 24 % p/v preparado en PBS. Pueden usarse preparaciones sobre-resistentes de gel para proporcionar una concentración final del 24 % de p/v F-127 preparado en PBS si se requiere.
- ETAPA b: La muestra se estría rápidamente a través de la superficie de un portaobjetos de microscopio convencional a temperatura ambiente y el gel se endurece en segundos.
- ETAPA c: Se coloca un cubreobjetos sobre el gel.
- ETAPA d: El portaobjetos se coloca en una compresa de hielo y el gel se transforma a un estado líquido y se propaga en el cubreobjetos en segundos.
- ETAPA e: La retirada del portaobjetos de la compresa de hielo provoca el calentamiento por aire del portaobjetos hasta temperatura ambiente y el entorno del gel en segundos.
2. Protocolo modificado para montar una o más muestras en gel en localizaciones dadas en un portaobjetos de microscopio convencional (Fig. 7 paneles a-k)
- Se pre-preparan células teñidas o no teñidas, perlas o partículas en una suspensión acuosa, se aspira el sobrenadante y se mantiene el sedimento en hielo. La Fig. 2 (paneles a-k) muestra las posteriores etapas para la preparación de una única muestra en un portaobjetos de microscopio, repitiéndose el procedimiento para múltiples muestras según se requiera.
- ETAPA a: Se presiona un aislante de silicio (tipo mostrado en el panel a es un aislante de silicio S2560 con 8 orificios [cada uno de 2 mm de profundidad, 9 mm de diámetro]; obtenido de Sigma-Aldrich RU) en un portaobjetos de microscopio sobre una compresa de hielo.
- ETAPA b: Se añaden $90 \mu\text{l}$ de gel PF-127 al 35 % frío en un pocillo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, usando una punta de micropipeta pre-refrigerada de 1 ml.
- ETAPAS c y d: Se inyecta la muestra de células/perlas o partículas a través del gel en la parte inferior del pocillo en un volumen de $10 \mu\text{l}$ y la suspensión se eleva en columna hasta el área central de la superficie del gel.
- ETAPA e: Se transfiere el portaobjetos hasta un bloque de calentamiento caliente (mantenido a 37°C) y el gel se endurece.
- ETAPA f: Se desprende cuidadosamente el aislante.
- ETAPA g: El disco de gel revelado es auto-sostenido.
- ETAPA h: Se coloca el portaobjetos en una compresa de hielo hasta que la superficie inferior del gel empieza

- a licuar.
- 5 ETAPA i: Se coloca un cubreobjetos sobre la superficie del disco de gel mientras el portaobjetos permanece sobre la compresa de hielo. El disco continúa licuando y empieza a propagarse.
- ETAPA j: Se superponen los portaobjetos con un papel absorbente y se presiona suavemente para completar la propagación de la muestra y para retirar el exceso de líquido.
- ETAPA k: Se devuelve al bloque de calentamiento caliente para endurecer el gel y completar la preparación. Se devuelve a temperatura ambiente para almacenamiento (por ejemplo, hasta 24 h).
- 10 3. Protocolo modificado para montar una muestra en una cámara/pocillo (por ejemplo, portaobjetos con cámara convencionales de 8 pocillos de fondo de vidrio) (Fig. 7 paneles l y m)
- 15 Se pre-preparan células teñidas o no teñidas, perlas o partículas en una suspensión acuosa, se aspira el sobrenadante y se mantiene el sedimento en hielo. Se invierte el procedimiento para la adición del gel y la muestra del descrito anteriormente. La Fig. 2 muestra las etapas principales para introducir la muestra de células/perlas o partículas en un volumen de 10 µl en un pocillo/cámara vacía de un portaobjetos con múltiples cámara mantenida sobre una compresa de hielo (panel 1). Después se añaden 90 µl de gel PF-127 al 35 % frío en el pocillo (panel m). Esto puede conseguirse, por ejemplo, usando una punta de micropipeta pre-refrigerada de 1 ml. El gel líquido recubre la suspensión de muestra. El portaobjetos después se calienta (por ejemplo, en un bloque de calentamiento a 37 °C) para endurecer la superficie de contacto muestra-gel, como se ha descrito anteriormente, antes del análisis.
- 20 4. Protocolo ejemplar simple para la preparación de películas secas de polímero de bloque y su reconstitución en una placa multi-pocillo (Tabla 3)
- 25 Se describe un ejemplo de una metodología para la preparación de películas secas de PF-127 y su reconstitución mediante la adición de diferentes volúmenes de agua (o una solución dada) para proporcionar un rango de concentraciones potenciales de gel/líquido para la inmovilización o manipulación de células/perlas o partículas. Las etapas se resumen a continuación.
- 30 ETAPA a: Se preparó una solución al 19,3 % p/v de PF-127 en agua. Esta concentración permite que se forme fácilmente un estado líquido cuando se refrigerara (por ejemplo, a 4 °C) pero aún retiene algún grado de estado de gel/líquido suelto a temperatura ambiente (20 °C).
- ETAPA b: Se dispensaron volúmenes de gel frío en una matriz de 48 pocillos en una placa de plástico transparente convencional de 96 pocillos (de fondo plano) como se indica en la Tabla.
- 35 ETAPA c: La placa se mantuvo sobre un bloque de calentamiento a 37 °C durante 24 h para permitir la desecación del gel en películas secas que cubren la base de cada pocillo. Aquí el proceso puede acelerarse, por ejemplo, por secado al vacío.
- ETAPA d: En esta fase las películas secas pueden almacenarse antes de realizar la rehidratación.
- ETAPA e: Se dispensan volúmenes de PBS enfriado en hielo en cada pocillo como se indica en la Tabla y la placa se rota brevemente para ayudar a humedecer lo seco. Aquí el proceso puede acelerarse por vibración mecánica.
- 40 ETAPA f: La placa entonces se mantiene con la tapa sellada durante 24 h a 4 °C. Aquí las condiciones de rehidratación pueden variarse (por ejemplo, incubando a 37 °C en una atmósfera humidificada).
- ETAPA g: Después de la rehidratación, la placa se devuelve a temperatura ambiente durante la evaluación de la calidad de formación de gel en los pocillos por examen directo y microscópico de la transparencia y las propiedades mecánicas agitando los contenidos de los pocillos con una punta de pipeta.
- 50 *Resultados:* La Tabla 3 muestra la capacidad para preparar fases líquidas y tipo gel en todas las combinaciones cuando se evalúan a temperatura ambiente. Aquí la reconstitución se consiguió usando PBS que demuestra la preparación in situ de geles con un tampón de elección. Algunos pocillos que muestran fase líquida (es decir 'líquido') a temperatura ambiente serían capaces de formar geles si se elevará la temperatura. Además, solamente algunas combinaciones provocaron la formación de un gel transparente y ópticamente aceptable (es decir 'gel transp.') con, en otros casos, formación de un gel/pasta turbio-opaco (es decir 'gel'). La combinación de una película de gel seco PF-127 al 19,3 % de 75 µl reconstituida con un volumen de PBS de 50 µl proporcionó un gel transparente (reversible a un sol por refrigeración) con una concentración nominal de poloxámero del 29 %. Esta combinación preferida permitiría la retención de propiedades de inmovilización a temperatura ambiente (y 37 °C) y permitiría la adición adicional de volúmenes de muestra encima (por ejemplo reduciendo la concentración final de gel hasta el 24 %).
- 55

Tabla 3

Reconstitución de películas secas de PF-127 (gel al 19,3 % p/v en agua) y los efectos de reconstitución con diferentes volúmenes de PBS						
Gel seco reconstituido con PBS (μl)						
	10	25	50	100	150	200
μl de gel seco:						
10	gel trans.	líquido	líquido	líquido	líquido	líquido
20	gel trans.	gel trans.	líquido	líquido	líquido	líquido
25	gel trans.	líquido	líquido	líquido	líquido	líquido
50	gel trans.	líquido	líquido	líquido	líquido	líquido
75	gel trans.	gel trans.	gel trans.	líquido	líquido	líquido
100	gel	gel trans.	gel trans.	líquido	líquido	líquido
150	gel	gel	gel	líquido	líquido	líquido
200	gel	gel	gel	gel trans.	líquido	líquido

Ejemplo IV - Ejemplo de la producción de una composición de polímero de bloque que comprende perlas fluorescentes y/o un colorante

5 1. Protocolo simple para preparar perlas fluorescentes en un gel co fines de inmovilización y análisis

10 El análisis de perlas puede requerir, por ejemplo, la determinación de la localización de la perla y las propiedades ópticas tales como fluorescencia. Un ejemplo de un protocolo típico para el análisis de características de fluorescencia y localización de perlas se muestra en la Fig. 8 para perlas de aproximadamente 1 μm de diámetro fluorescentes rojas (por ejemplo, perlas Becton Dickinson Calbrite APC; BD Biosciences, EEUU) usando condiciones de excitación y emisión descritas por el fabricante. Las metodologías generales para preparar perlas en gel se han descrito anteriormente. Se concentró una preparación de perlas (por ejemplo, 1 gota en 0,5 ml de gel y se mezcló en hielo usando una punta de micropipeta. Se preparó una muestra de gel en un portaobjetos de microscopio. Se usó un sistema de imágenes de espacio de tiempo descrito anteriormente para captar imágenes secuencialmente de la fluorescencia de las perlas en PBS (como una película atrapada bajo un cubreobjetos) o en gel al 24 % p/v (PF-127 preparado en PBS). Las imágenes a d muestran el mismo campo de visión para perlas en PBS, captadas en imagen 4 veces con un intervalo de 1 segundo entre cada captura de imagen. La imagen e muestra las 4 imágenes combinadas de a-d. Asimismo, las imágenes f-i muestran imágenes de 1 segundo de intervalo para perlas en gel a 20 temperatura ambiente con la correspondiente imagen combinada mostrada en el panel j. Las perlas se mueven claramente en la preparación de PBS, debido al movimiento fluido y el movimiento browniano, produciendo una imagen combinada confusa. Las perlas permanecen en localizaciones fijas en el gel durante el periodo de exploración, lo que demuestra las propiedades de inmovilización del gel para perlas.

25 2. Protocolo simple para la preparación de perlas magnéticas en gel y su manipulación en un campo magnético

30 La tecnología de perlas magnéticas es de uso común para metodologías de separación. Se dispersan perlas magnéticas no marcadas (obtenidas de The Reagent Mine Ltd., Melton Mowbray, RU; aproximadamente 2 μm de diámetro) en gel (PF-127 al 24 % p/v preparado en agua) a 4 °C en un tubo de muestra de polipropileno de 2 ml. La suspensión entonces se preparó sobre un portaobjetos de microscopio para la formación de imágenes por luz transmitida usando un microscopio convencional equipado con un sistema de cámara. La Fig. 9 (panel a) muestra las perlas dispersadas inmovilizadas en gel a temperatura ambiente. Después se coloca un imán de neodinio (The Reagent Mine Ltd., Melton Mowbray, RU) 2,5 cm desde el centro del campo de visión y la misma altura que la superficie del portaobjetos y después de 30 segundos se vuelven a captar imágenes del campo. La Fig. 9 (panel b) muestra el efecto del campo magnético que provoca la alineación de las perlas a lo largo de las líneas de fuerza, que demuestra la capacidad de mover perlas en un gel de soporte con fines de alineación y relocalización dentro del gel.

40 3. Preparación de un colorante en gel

45 Las metodologías de marcaje vital a menudo requieren la captación de una forma no fluorescente de un colorante que se convierte en fluorescente tras procesamiento intracelular. Aquí se describe la preparación del colorante vital calceína-AM para la tinción en gel de células vivas recubiertas con la preparación de gel-colorante. Se mezcló el colorante calceína (calceína AM; 0,1 μg/ml; C3099 de N° Cat., Molecular Probes, InVitrogen) en un PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS y se superpuso en un cultivo de monocapa de células MCF-7 humanas en un portaobjetos con cámara y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se recogieron imágenes usando metodologías convencionales de microscopía confocal (sistema: BioRad 1024MP, BioRad Microsciences, RU). La Fig. 10 muestra

una sección óptica a través de las células que demuestra una compartimentalización típica del colorante en algunas células con tinción más difusa en otras. Los resultados demuestran la capacidad de preparar un colorante en gel para el marcaje y función de células vivas.

5 **Ejemplo V - Ejemplos del uso de composiciones de polímero de bloque en la calibración de equipos para análisis óptico (por ejemplo, la determinación de la unión de propagación de punto)**

1. Las preparaciones de gel usadas para la inmovilización tienen ventajas

- 10 Los instrumentos de imágenes (microscopios y instrumentos HCS) producen una serie muestreada espacialmente de fluorescencia. Pueden producirse imágenes por el sistema óptico directamente (basado en cámara) o construirse por escaneo (microscopio de barrido láser). Son ventajosos menos cambios en el índice de refracción en las diferentes interfaces ópticas. La disponibilidad de geles de base acuosa proporciona un medio ventajoso en términos de índice de refracción en comparación, por ejemplo, con soportes basados en glicerol de mayor RI. Se usó refractometría convencional para medir los valores RI para preparaciones típicas de gel y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.
- 15

Tabla 4

Valores típicos para el índice de refracción obtenido para preparaciones de gel	
Muestra	Índice de refracción (RI)
PF-127 al 24 % p/v preparado en agua; a 37C	1,357
PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS; a 37C	1,359
PBS	1,333
agua	1,331

- 20 *Resolución espacial en la teoría:* Se seleccionan longitudes de onda de iluminación (desde una lámpara de arco) mediante un filtro de excitación o espectrómetro y la luz se propaga en una apertura de campo mediante una lente condensadora de alta apertura numérica. Entonces se refleja desde un espejo dicroítico a 45 grados y se demagnifica una imagen de la apertura de campo en la muestra mediante un objetivo. De este modo, se baña uniformemente la muestra completa en luz. Se recoge la fluorescencia por el objetivo y forma una imagen en el microscopio que se inspecciona visualmente, usando una pieza ocular de aumento, o se pasa hasta un foto-detector apropiado tal como una cámara CCD. Todas las partes de la muestra iluminada contribuyen a la imagen que contiene características afiladas (en enfoque) así como características fuera de enfoque. Es importante considerar las características de rendimiento de cualquier instrumento de imágenes de fluorescencia. Una imagen de una perla fluorescente en subresolución (es decir más pequeña que aproximadamente 200 nm) mostrará un disco espacioso que consiste en una mancha central rodeada por anillos de tenue luz y oscuros. La medición del disco espacioso da parámetros que describen el rendimiento del microscopio. La distancia desde el centro hasta el primer anillo oscuro describe la resolución horizontal (x, y) y se da por:
- 25
- 30

$$dxy = 0,61\lambda/NA$$

- 35 Si se recoge una serie de enfoques de imágenes de la perla, la resolución axial (z) correspondiente es:

$$dz = 3,7 dxy \eta/NA$$

40 *n = índice de refracción del medio de muestra*

X = longitud de onda

NA = apertura numérica del objetivo

- 45 La intensidad total en cualquier plano horizontal es proporcional a NA²(aumento) y es constante cerca del centro, de modo que no existe seccionamiento óptico en un microscopio convencional.

- 50 *Resolución espacial en la práctica:* El rigor en que puede implementarse un ensayo sobre cualquier sistema de imágenes depende de la reproducibilidad y calibración del instrumento. Es esencial entender el rendimiento espacial del sistema de imágenes para extraer información cuantitativa o de hecho emprender el procesamiento de desconvolución para extraer información 3D. Como el índice de refracción del medio de muestra influye de forma lineal en la resolución axial y los cambios en el rendimiento axial son profundos debido a aberraciones esféricas, es importante calibrar la resolución axial '*in situ*'. El método aceptado para obtener el rendimiento x,y,z de un microscopio es adquirir imágenes de una perla a subresolución en las mismas condiciones exactas usadas para la formación de imágenes de la muestra. Sin embargo, en muestras basadas en agua (tampones fisiológicos y medios) es esencial mantener las células vivas y adquirir información de calibración xyz de una perla. Colocando la muestra
- 55

(células) y las perlas en composiciones de polímero de bloque, pueden obtenerse imágenes de alta resolución de perlas inmovilizadas posibilitando la extracción del rendimiento axial.

Para exemplificar el uso de composiciones de polímero de bloque con perlas en subresolución integradas, somos capaces de obtener información sobre el rendimiento óptico del instrumento a diferentes profundidades a través de la muestra.

Materiales y preparación de la muestra:

10 (i) Pueden obtener perlas en subresolución de muchos fabricantes diferentes, en este caso Molecular Probes. PS-speck Microscope point Source Kit: fluoroesferas 505/515 nm microesferas modificadas con carboxilato 0,17 mm fluorescentes amarillo-verde (concentración 107 por ml).

(ii) Se preparó una composición de polímero de bloque (PF-127) en una formulación del 24 % p/v en agua como se ha descrito previamente más arriba.

15 Etapa 1: Se cogen 0,5 ml de Pluronic® F127 al 24 % mantenido a 4oC y se mezclan con 5 µl de solución de perlas.

Etapa 2: Se mantiene a 4oC en hielo hasta que están lista para su uso

Etapa 3: Se colocan 50 µl en un portaobjetos de microscopio (la gota se convierte en gel)

Etapa 4: Se coloca un cubreobjetos (22mm x 22 mm) sobre la gota

Etapa 5: Se refrigerara el portaobjetos sobre un bloque de hielo y se propaga la gota y el cubreobjetos queda horizontal.

25 Obtención de una serie de enfoques de imágenes a través de la perla a lo largo del eje óptico (véanse las figuras)

20 Etapa 1: Se fija firmemente el portaobjetos al microscopio (las vibraciones alterarán la recogida de imágenes)

Etapa 2: Se eligen las condiciones apropiadas para la captación de imágenes para obtener la serie de enfoques.

30 Los resultados se muestran en las Figuras 11 a 13.

Referencia

35 White NS, Errington RJ. Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Ene 2; 57(1):17-42.

Ejemplo VI - Ejemplos del uso de composiciones de polímero de bloque en el suministro controlado de reactivos a células

1. Suministro de un colorante de ADN de penetración celular a células en gel

40 El suministro de reactivos a células, perlas o partículas inmovilizadas en gel permite el análisis de cinética de interacción modificada sobre períodos prolongados. En este documento se describe un ejemplo del impacto del suministro basado en gel de un reactivo, colorante de ADN de penetración celular, DRAQ5, en comparación con la cinética obtenida por la tinción en PBS solamente. Aquí se cultivaron células U-2 OS adheridas (American Type Culture Collection [ATCC] HTB-96) en portaobjetos con cámaras con fondo de vidrio usando metodologías convencionales de cultivo celular. El uso de cultivos adheridos permitió su inmovilización para tinción en PBS y una comparación directa con la tinción en gel. El medio de cultivo se aspiró y remplazó con PBS suplementado con DRAQ5 (20 µM) o recubierto con gel (PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS) que también contenía DRAQ5 (20 µM). Despues se tomaron imágenes de las muestras usando un microscopio de espacio de tiempo y se analizaron los cambios en la fluorescencia de rojo lejano asociado de forma nuclear controlado en células individuales. La Fig. 14 muestra la cinética de captación en PBS frente a gel para células individuales. La naturaleza asincrónica bien reconocida de los cultivos celulares en condiciones normales de crecimiento produce un intervalo (factor 2) de contenidos de ADN celular que representa la distribución del periodo del ciclo celular de la población. En PBS existe una rápida tinción de células con la propagación esperada en valores casi en equilibrio para intensidad de fluorescencia nuclear. En tinción en gel también se reitera la propagación en valores pero con cinética más lenta (factor >10) a la esperada de una tinción limitada por difusión en gel de células.

60 2. Tinción diferencial de células vivas y muertas en gel usando un colorante fluorescente

65 En la Fig. 15, el yoduro de propidio (PI) entra en células dañadas (que experimentan muerte celular) debido a la incapacidad de las membranas plasmáticas dañadas de excluir el colorante catiónico. Las células sanas intactas no se tiñen si se conserva la integridad de la membrana. Aquí se describe un análisis típico para la discriminación de células vivas/muertas en gel. La línea celular DoHH2 (células de linfoma de células B humanas) tiene un fondo normal de células apoptóticas (que están muriendo) que son normalmente distinguibles por la tinción positiva usando

PI. La Fig. 2 muestra una comparación de las imágenes de transmisión y fluorescencia roja, tras excitación con luz azul, de células mantenidas y teñidas en gel (PF-127 al 24 % p/v preparado en PBS; que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio) a temperatura ambiente durante 15 min. Existe una clara capacidad de distinguir células con tinción positiva y negativa que demuestra que el suministro en gel de un reactivo puede usarse con fines de discriminación de eventos.

5

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un copolímero de bloque de polioxietileno y polioxipropileno como matriz de soporte en el análisis de partículas,
 5 en donde el copolímero de bloque está presente en la composición a una concentración gelificante, en donde la composición muestra las siguientes propiedades:
- (a) termorreversibilidad gel-sol;
 - (b) formación de micelas en condiciones gelificantes;
 - 10 (c) compatibilidad óptica;
 - (d) propiedades tensioactivas controlables;
 - (e) propiedades de tamiz molecular; y
 - (f) biocompatibilidad
- 15 en donde la composición comprende adicionalmente perlas fluorescentes y/o un colorante; y en donde las partículas se inmovilizan dentro de la composición de copolímero de bloque.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas se obtienen de o constituyen una muestra biológica.
 20
3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en el que las partículas son células.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que las células están fijadas.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que las células están vivas.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que las células son no adherentes.
- 30 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en el que las células se seleccionan entre el grupo que consiste en células humanas, células animales, líneas celulares cultivadas, híbridos de células somáticas inmortales, células de levadura, células vegetales y células fúngicas.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en el que las células son capaces de expresar una molécula fluorescente.
 35
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas son perlas fluorescentes.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el copolímero de bloque se selecciona entre el grupo que consiste en poloxámero 407, poloxámero 338, poloxámero 288, poloxámero 237, poloxámero 238, poloxámero 217, poloxámero 188 y poloxámero 108.
 40
11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la composición se aplica a una superficie de un portaobjetos de microscopio, un cubredobletes o una placa de múltiples cámaras.
 45
12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la composición sirve como matriz de soporte para el análisis de partículas que implica la recogida de luz.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la composición sirve como matriz de soporte para el análisis de partículas por formación de imágenes, microscopía o ensayos basados en placa no de imágenes.
 50
14. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 ó 13 en el que la luz es fluorescencia, bioluminiscencia o quimioluminiscencia.
15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el análisis es para calibración, alineación óptica u orientación en metodologías que requieren la recogida de luz.
 55
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el análisis es para calibración, determinación de la función de propagación de punto y orientación de eventos en cortes ópticos de dos o más dimensiones.
 60
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el colorante es un fluorocromo de ADN.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que el colorante es 1,5-bis {[2-(metilamino)etil]amino}-4,8-dihidroxi antraceno-9,10-diona (DRAQ5™).
 65

FIGURA 1

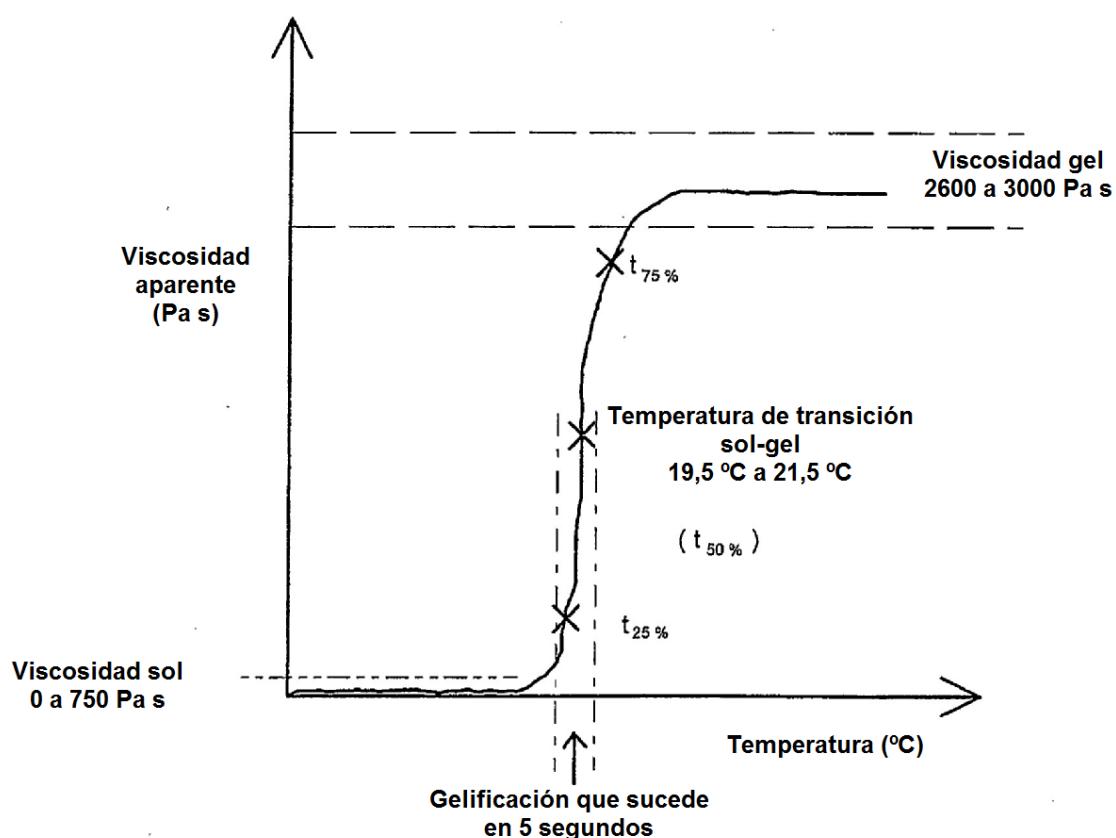


FIGURA 2

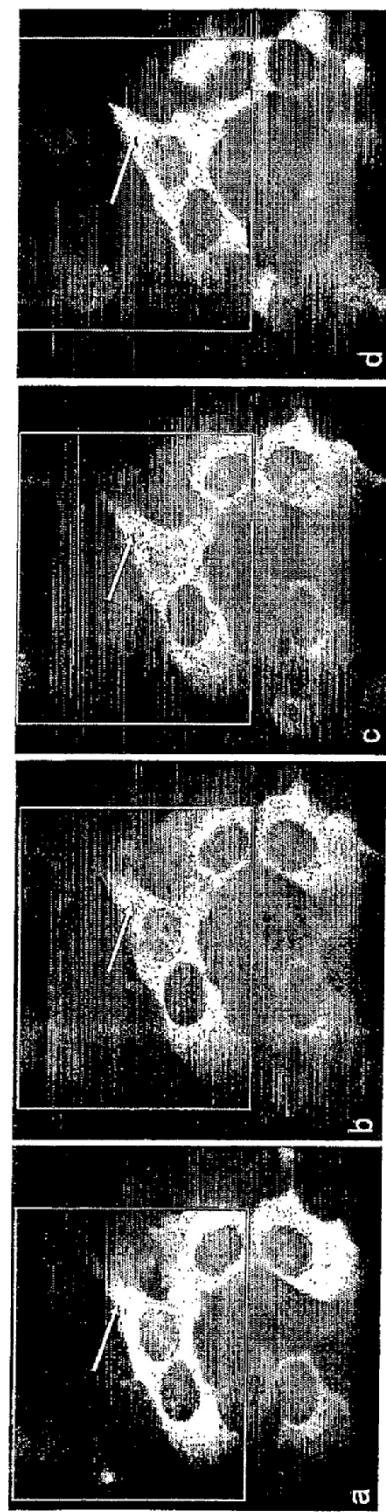


FIGURA 3

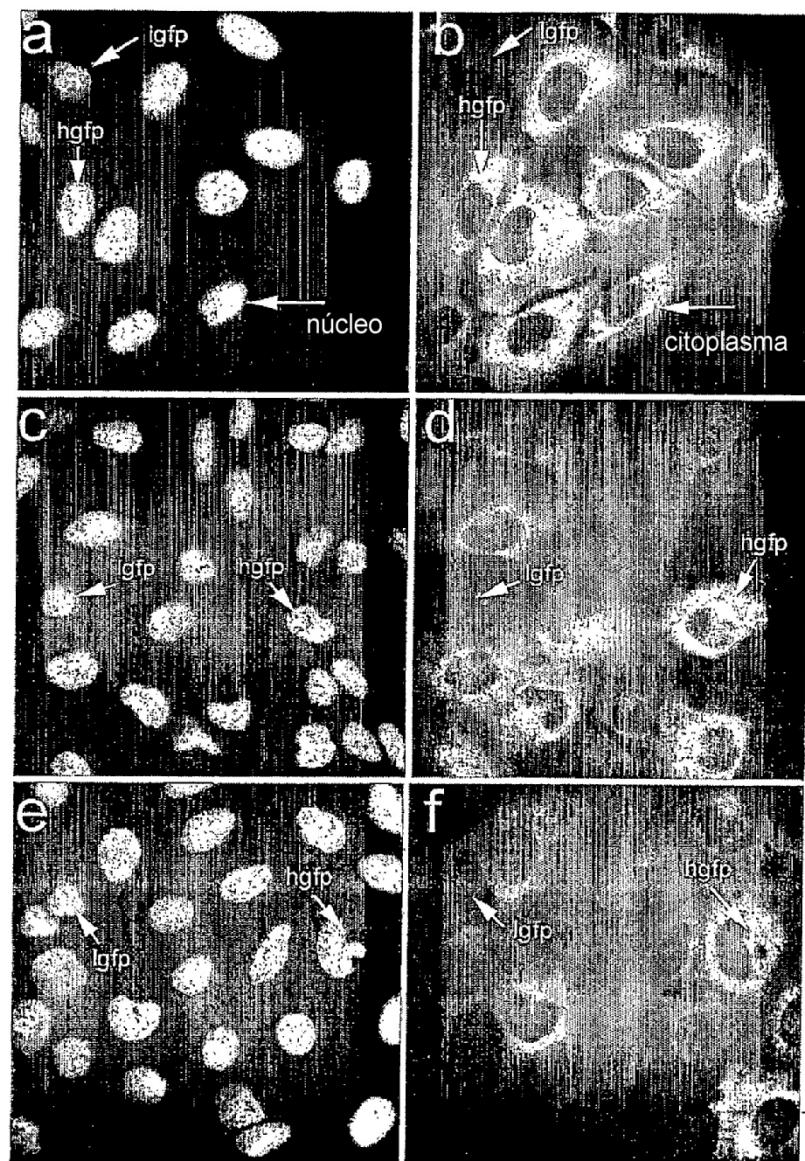


FIGURA 4

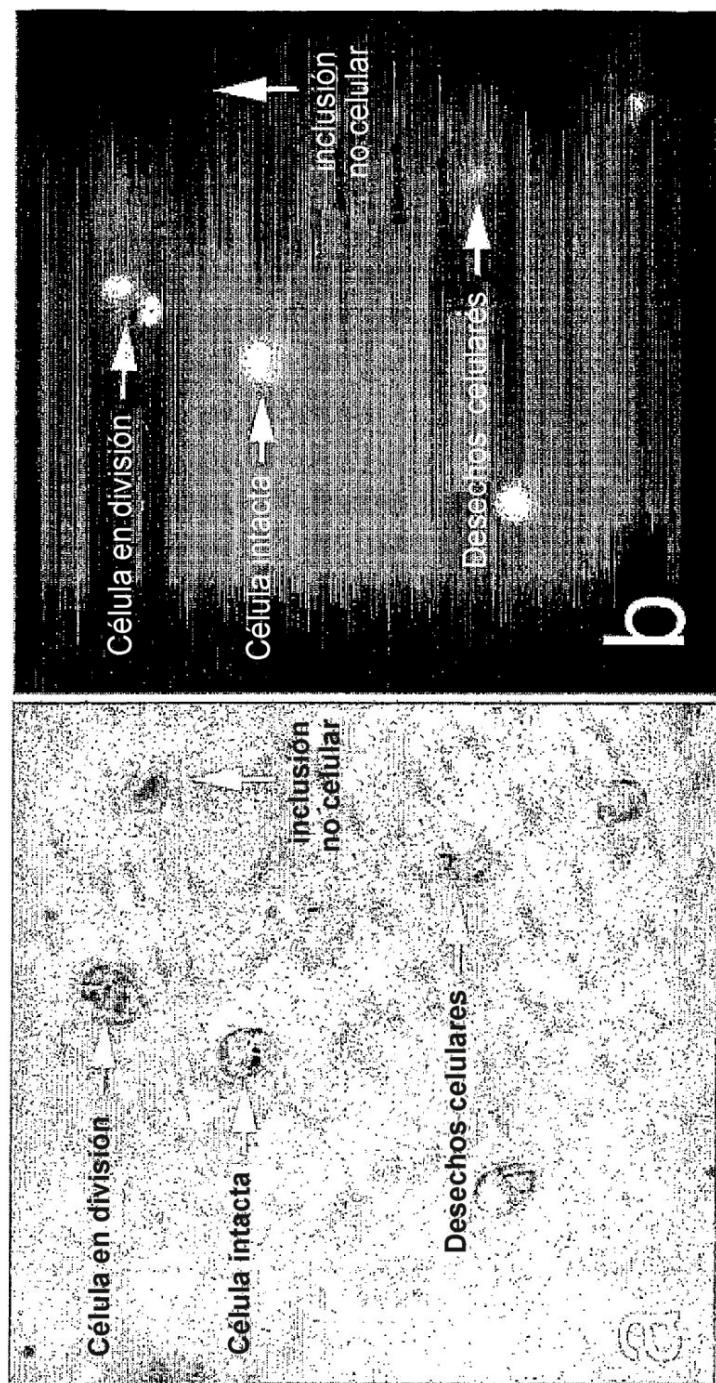


FIGURA 5

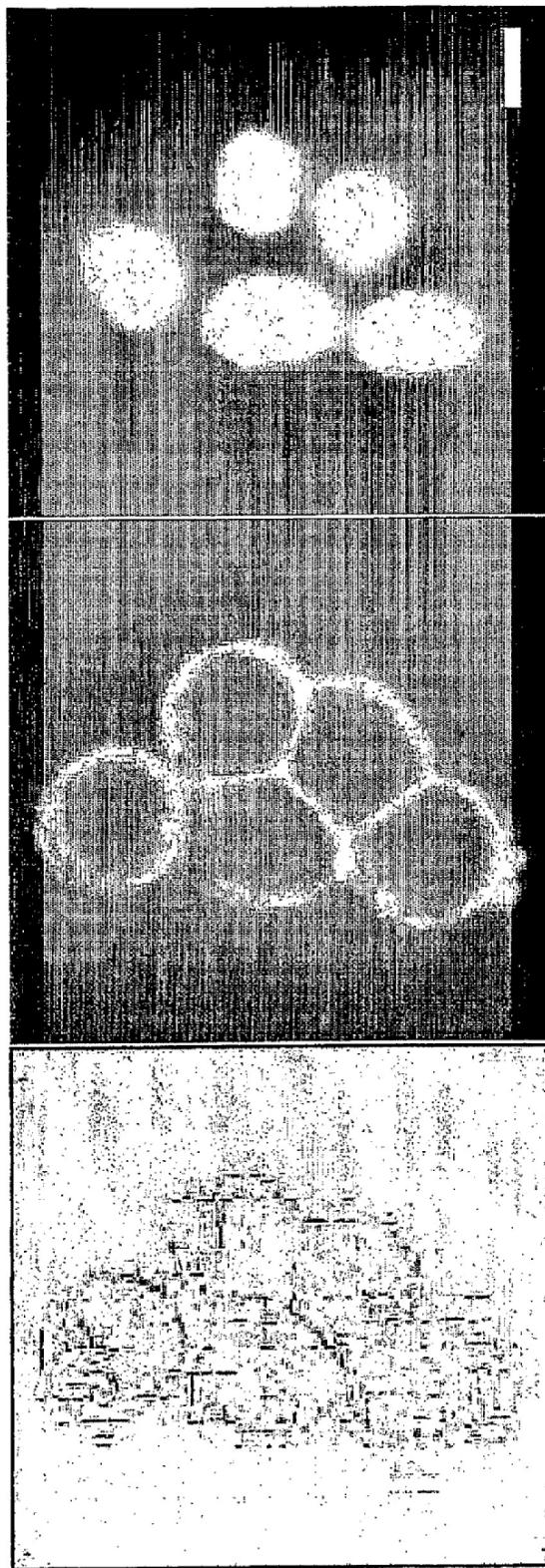


FIGURA 6

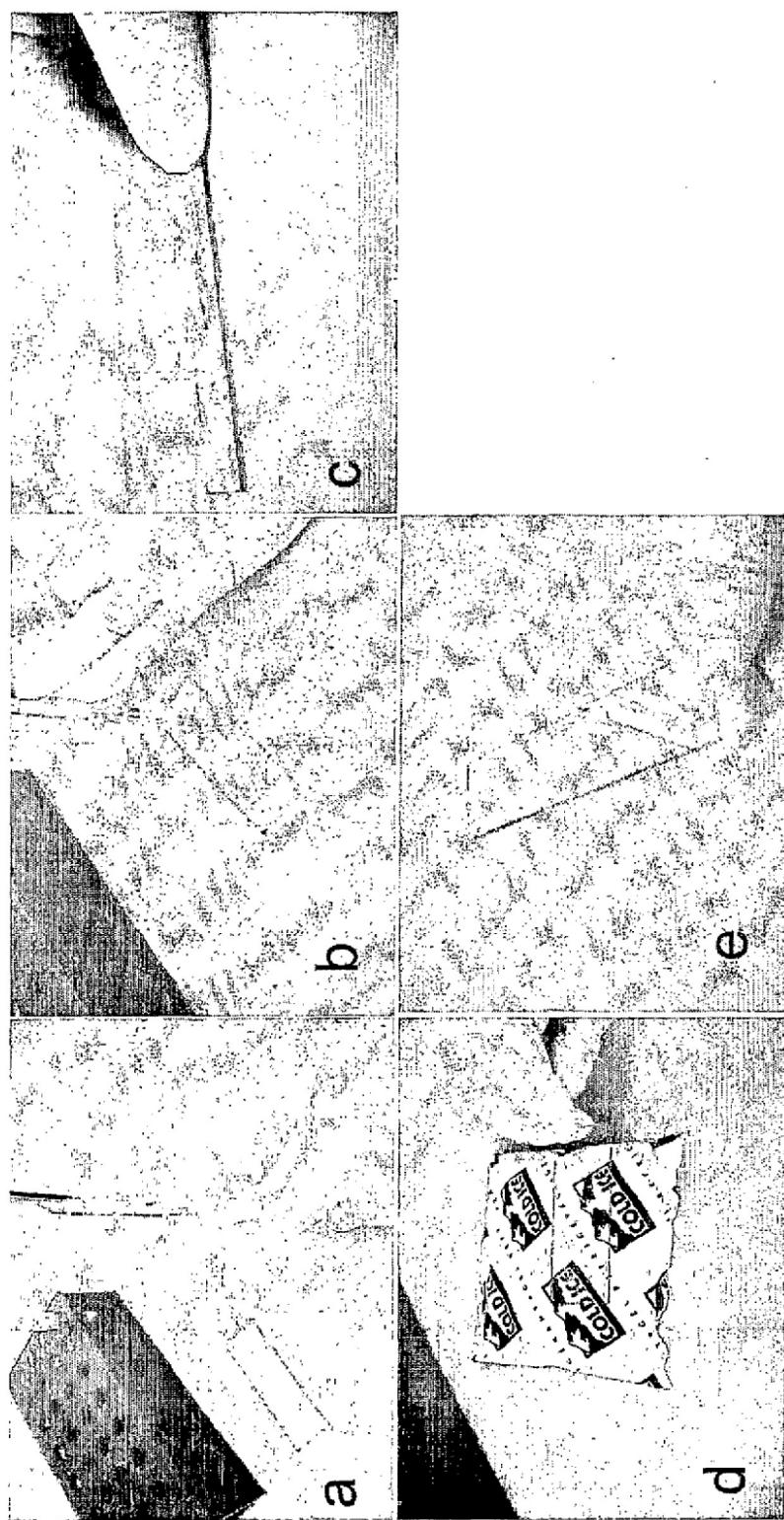


FIGURA 7

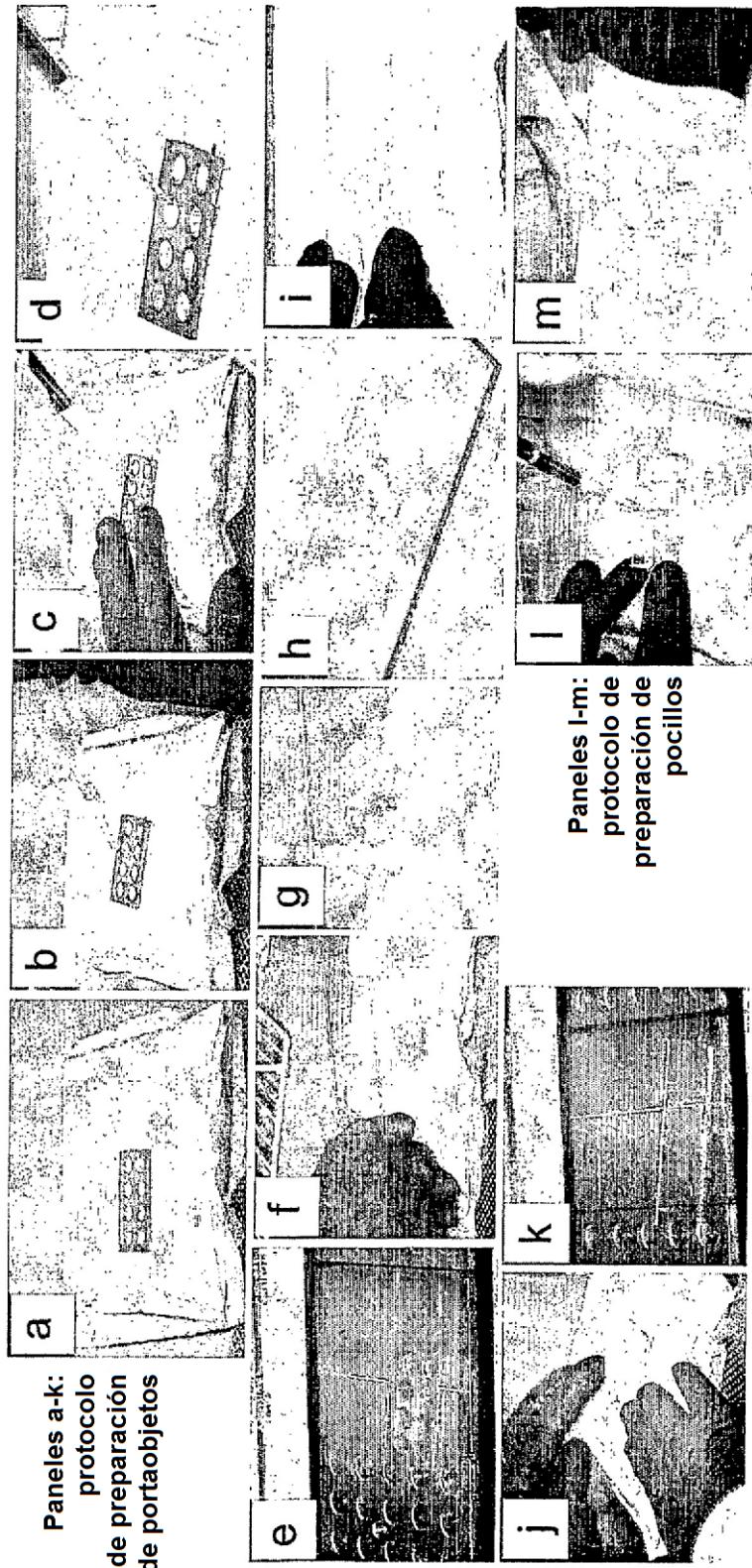


FIGURA 8

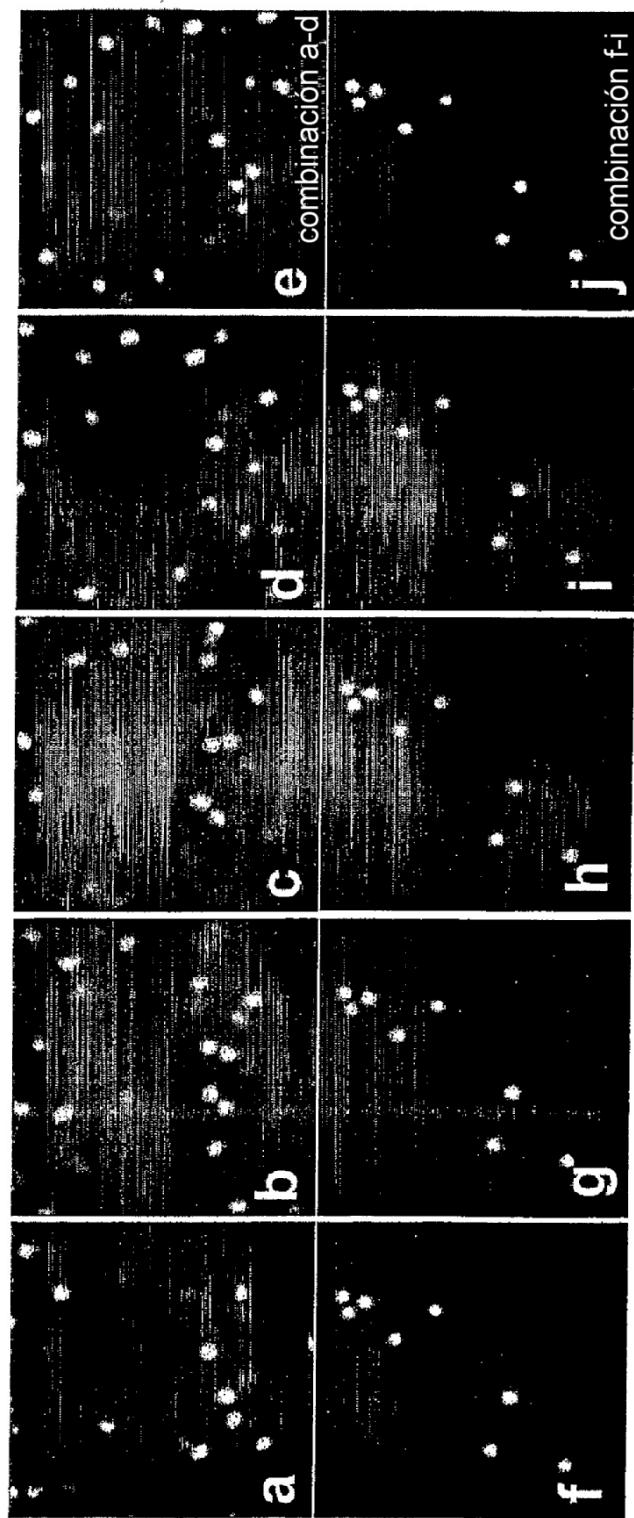
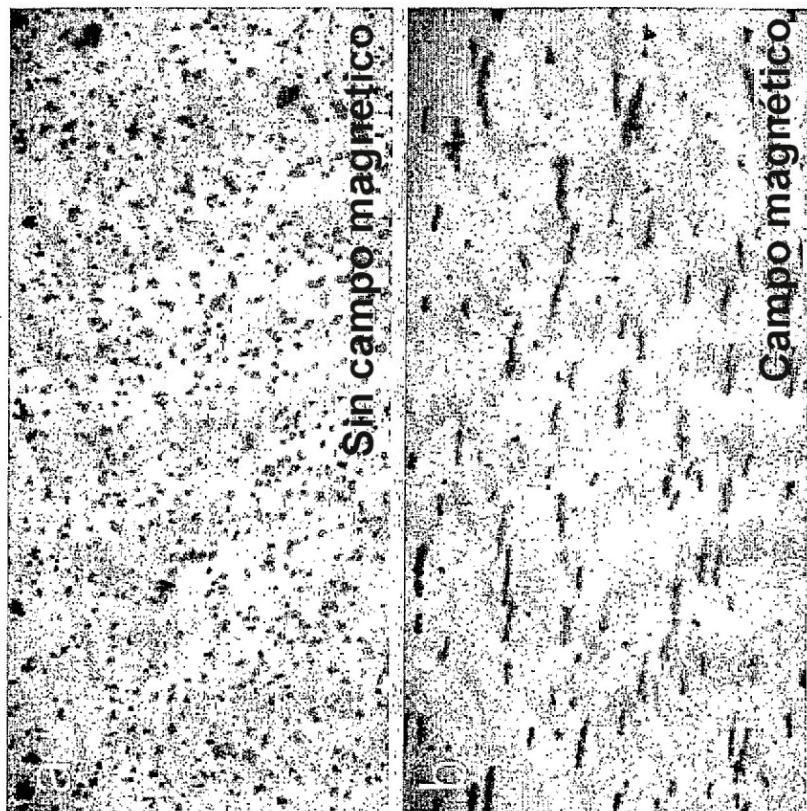
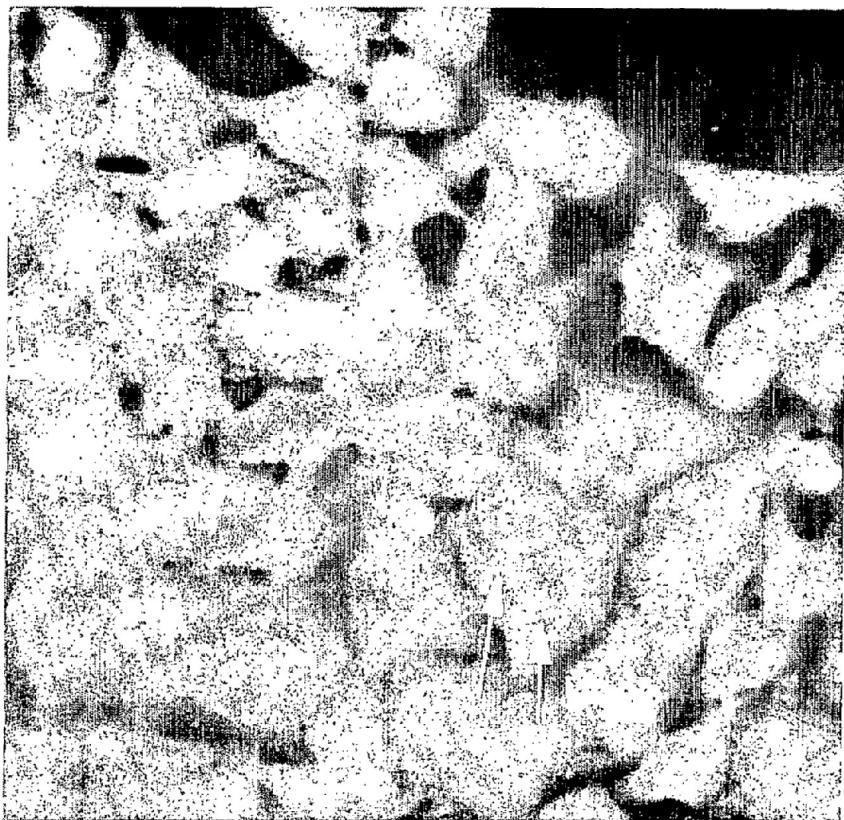


FIGURA 9



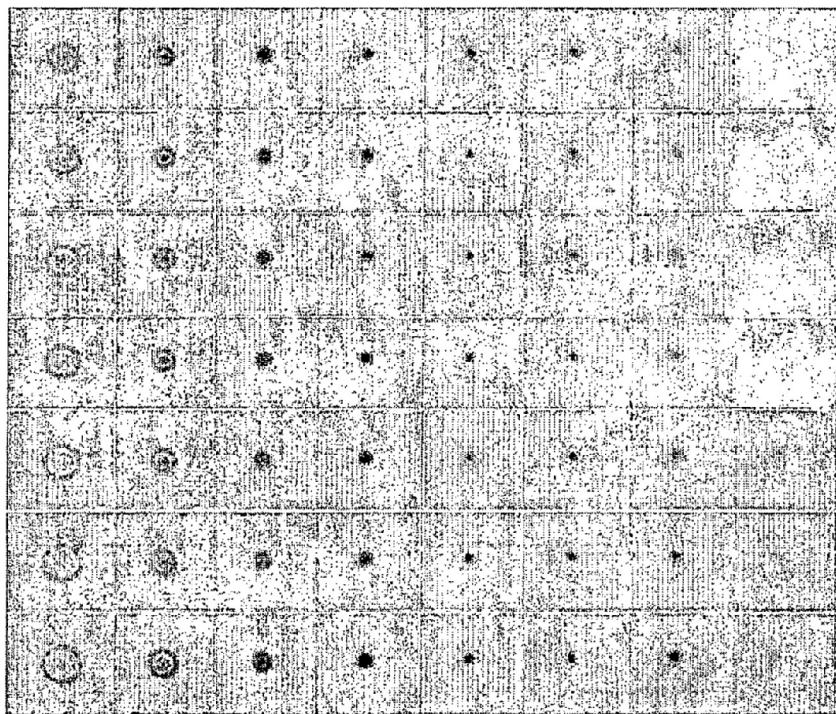
ES 2 488 847 T3

FIGURA 10



ES 2 488 847 T3

FIGURA 11



ES 2 488 847 T3

FIGURA 12



FIGURA 13



FIGURA 14

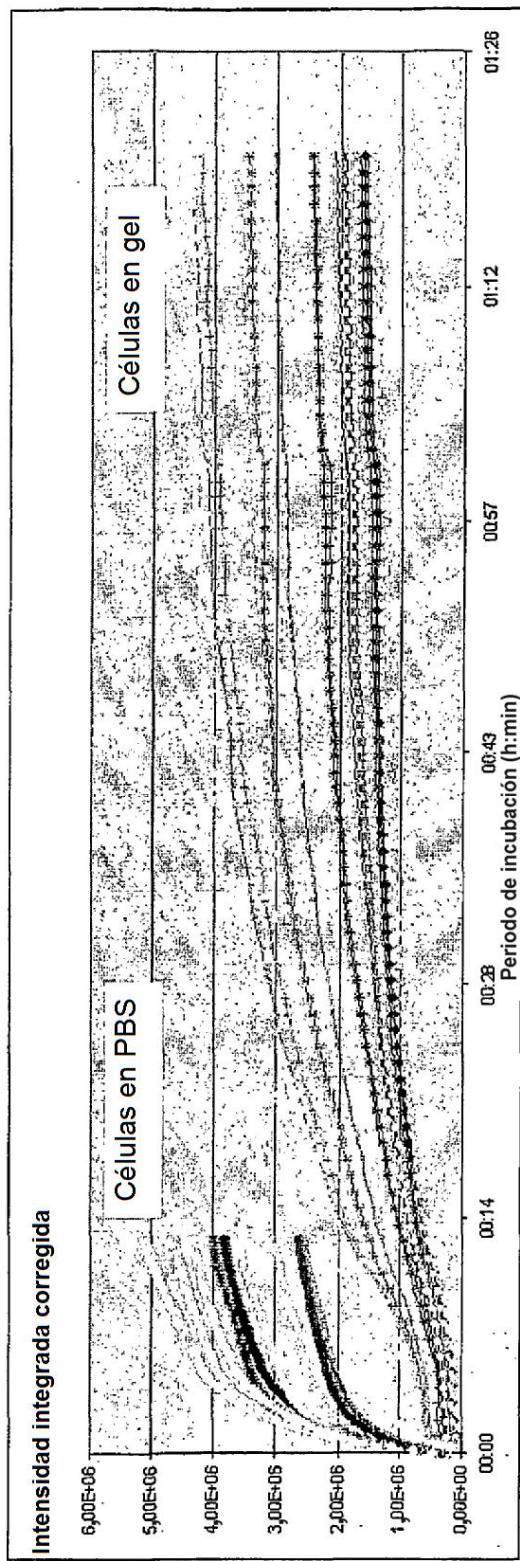


FIGURA 15

