

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 702**

51 Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)

G01N 21/59 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/025316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14775318 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2972337**

54 Título: **Técnica de imagen nanoplasmónica para el mapeo espacio-temporal de las secreciones de células únicas en tiempo real**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361778652 P

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY (100.0%)
Office of Naval Research ONR/NRL One Liberty Center 875 North Randolph Street Suite 1425 Arlington, VA 22203, US**

72 Inventor/es:

**RAPHAEL, MARC P.;
CHRISTODOULIDES, JOSEPH A.;
BYERS, JEFF M. y
DELEHANTY, JAMES B.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 705 702 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

Técnica de imagen nanoplasmonica para el mapeo espacio-temporal de las secreciones de células únicas en tiempo real

5

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a la medición de señal paracrina y, más específicamente, al mapeo de resonancia de plasmón de superficie localizada sin marcador de secreciones de células vivas individuales en tiempo real.

10

Antecedentes de la invención

La señalización paracrina es una forma de comunicación de corto alcance entre células, típicamente mediada por la secreción de proteínas. Los tipos de proteínas secretadas, así como sus distribuciones espaciales y temporales, dan lugar a una amplia gama de respuestas posibles entre las células receptoras, incluida la migración y proliferación celular. No es sorprendente entonces que se descubra que la señalización paracrina desempeña un papel central en una amplia gama de procesos, como la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la respuesta inmune, que dependen en gran medida del movimiento y la división celular. La capacidad de mapear la naturaleza espacio-temporal de las secreciones celulares individuales es, por lo tanto, fundamental para comprender estos procesos.

15

20

Sin embargo, se encuentran varios obstáculos en el intento de medir la señalización paracrina debido a que las proteínas están altamente localizadas y son externas a la célula. Si bien las etiquetas de proteínas de fusión fluorescentes actualmente son estándar para el seguimiento de la señalización intracelular, el enfoque es problemático para el estudio de proteínas secretadas. Primero, la presencia de una etiqueta relativamente grande (27 kDa para GFP) puede dificultar la capacidad de la célula para secretar la proteína de interés. En segundo lugar, incluso si la molécula y su etiqueta de proteína fluorescente se secretan con éxito, el resultado es un brillo difuso en las proximidades de la célula que es difícil de rastrear cuantitativamente en el espacio y el tiempo.

25

Como resultado, las mediciones directas de proteínas secretadas de células individuales se realizan normalmente utilizando técnicas basadas en ensayos de inmunosándwich que utilizan anticuerpos fluorescentes o reacciones enzimáticas colorimétricas. Mientras que en el pasado tales mediciones tenían resoluciones de tiempo en el orden de días, los avances tecnológicos que combinan los ensayos de inmunosándwich con micropozos con patrones litográficos y microfluidos han permitido la monitorización cuantitativa de la secreción con resoluciones de tiempo en el orden de horas. Tales avances han expuesto comportamientos cíclicos en las ratas a las cuales las células T estimuladas secretan citoquinas, y en un sentido más general, han demostrado cómo la mejora de las resoluciones de tiempo puede mejorar la comprensión de la señalización intercelular. Las resoluciones temporales mejoradas prometen detectar el tiempo para que las células individuales comiencen la secreción después de la estimulación externa, correlacionando las tasas de secreción con las etapas del ciclo celular y, como se muestra en la presente invención, se distinguen las secreciones en forma de ráfagas de las que son de estado más constante en la naturaleza. Los ensayos basados en inmunosándwich ahora son capaces de medir cientos o miles de células individuales por experimento, pero su resolución temporal está limitada por la introducción de la sonda de anticuerpo que necesariamente detiene o finaliza el estudio de secreción. Una técnica complementaria que se enfoca en un pequeño número de células pero con una resolución espacial y temporal más alta promete ayudar a completar la imagen de la comunicación de célula a célula de rango cercano al cerrar la brecha de la escala de tiempo de segundos a días.

30

35

40

45

El documento EP 2901136 A0, técnica anterior según el Artículo 54(3) EPC, describe un método para calibrar múltiples nanoestructuras en paralelo, usando un chip para resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), una serie de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas que se han estampado en cubreobjetos de vidrio del chip. Usando imágenes LSPR de cada nanoestructura individual y datos espectrales LSPR del arreglo, la ocupación fraccional de cada nanoestructura se determina a partir de la ocupación fraccional del arreglo y los datos de imágenes, estampados como una función de ocupación fraccional.

50

Raphael, Marc P et al, "Quantitative LSPR Imaging for Biosensing with Single Nanostructure Resolution", Biophysical Journal, vol. 104, no. 1, 8 de enero de 2013, páginas 30-36, describe un método para el mapeo espacio-temporal de anticuerpos secretados contenidos en el sobrenadante de células cultivadas en tiempo real, también utilizando un chip LSPR de este tipo.

55

El documento US 2006/210984 A1 describe un método para normalizar las variaciones en la intensidad de la señal observadas en un ensayo de unión biomolecular en un cartucho de celdas de flujo, en donde un arreglo de calibración está en una ubicación diferente del arreglo analítico.

60

Divulgación de la invención

La presente invención proporciona un método para el mapeo espacio-temporal de las secreciones de proteínas de células vivas individuales en tiempo real, de acuerdo con la reivindicación 1. Las características opcionales de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Por lo tanto, el método de la invención usa un chip para imágenes de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). El chip es un cubreobjetos de vidrio compatible para su uso en un microscopio estándar que tiene al menos una serie de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas estampadas en él. Después de colocar una célula en el chip, las secreciones de la célula se mapean espacial y temporalmente mediante imágenes de LSPR. La imagen de luz transmitida y/o la imagen de fluorescencia se realizan simultáneamente con la imagen LSPR.

La aplicación de imágenes nanoplasmonicas al estudio de la señalización extracelular conlleva una serie de ventajas: (1) Las secreciones de proteínas se miden en tiempo real con la frecuencia de los puntos de tiempo limitados solo por el tiempo de exposición de la cámara, típicamente 250-400 ms. (2) Las, por ejemplo, nanoestructuras plasmónicas de Au están estampadas litográficamente en cubreobjetos de vidrio estándar que permiten que las técnicas de imagen más tradicionales, como la fluorescencia y las imágenes de campo brillante, se integren fácilmente en los experimentos. Por lo tanto, los cambios morfológicos y las etiquetas fluorescentes intracelulares se pueden monitorizar simultáneamente en tiempo real. (3) Las nanoestructuras pueden calibrarse para la determinación cuantitativa de la concentración de proteínas secretadas en función del tiempo y el espacio. (4) Los arreglos de nanoestructuras Au ubicadas lo suficientemente lejos de las células se pueden utilizar como arreglos de control utilizadas para distinguir las variaciones globales en la señal de las secreciones celulares localizadas. (5) La técnica es aplicable a líneas celulares tanto adherentes como no adherentes. (6) A diferencia de las sondas fluorescentes, las nanoestructuras plasmónicas de Au no exhiben destellos o fotodecoloración, las cuales son problemáticas en los métodos previos descritos anteriormente.

Actualmente no existe un método alternativo para la obtención de imágenes libres de marcadores y en tiempo real de las secreciones de proteínas de las células individuales que integran los cubreobjetos de vidrio estándar ampliamente utilizados para la obtención de imágenes de células y el cultivo. La técnica de LSPR libres de marcadores descrita en este documento permite estudios de secreción con resoluciones de tiempo del orden de cientos de milisegundos y sin marcación, mientras que las técnicas basadas en ensayos sándwich disponibles comercialmente tienen resoluciones de tiempo del orden de horas o días y requieren etiquetas fluorescentes o sondas colorimétricas basadas en enzimas.

Estas y otras características y ventajas de la invención, así como la propia invención, se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, a las reivindicaciones adjuntas y a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los principios de la generación de imágenes localizada de resonancia de plasmón superficial (LSPR) y la medición de la secreción de una sola célula. La Figura 1(a) muestra la respuesta nanoplasmonica de un arreglo funcionalizado c-myc a 200 nM de anti-c-myc comercial en medios libres de suero, introducidos por desplazamiento de microfluidos. La intensidad media del arreglo se calculó dentro de una región de interés de $9.5 \times 9.5 \mu\text{m}$ centrada en el arreglo para cada punto de tiempo. Las ilustraciones resaltan dos regímenes de respuesta para las nanoestructuras funcionalizadas, que se representan como cilindros. En el régimen inferior, solo una pequeña fracción de los péptidos c-myc disponibles (esferas) se unen con anti-c-myc (baja ocupación fraccional, f), mientras que casi todos están ocupados en el régimen superior ($f \rightarrow 1$). No hubo células presentes en este experimento. La Figura 1(b) es una ilustración de una célula secretora de anticuerpos en el registro con dos arreglos nanoplasmonicos. El chip se carga en un microscopio invertido y el hecho de que la mayor parte del sustrato sea de vidrio transparente permite obtener imágenes de células vivas utilizando microscopía de luz y fluorescencia transmitida en paralelo con la técnica de imágenes basada en LSPR utilizada para medir las secreciones.

La Figura 2 muestra la ráfaga de secreción de una sola célula. La Figura 2(a) es una superposición de imágenes LSPR y TL con la célula visible al lado del Arreglo A como resultado de la iluminación TL, mientras que los arreglos nanoplasmonicos se iluminan en el modo LSPR. La Figura 2(b) muestra la intensidad de la imagen LSPR normalizada ($\hat{I}_{\text{célula}}$) de los Arreglos A-D. Las distancias desde el centro de la célula hasta el centro de cada arreglo fueron $15.4 \mu\text{m}$, $39.2 \mu\text{m}$, $72.2 \mu\text{m}$ y $106 \mu\text{m}$ para los arreglos A, B, C y D, respectivamente. Los valores de $\hat{I}_{\text{célula}}$ se han compensado para que sean iguales antes de la ráfaga ($t \leq 7800 \text{ s}$) para que el tiempo de detección y la intensidad de la ráfaga en cada arreglo puedan compararse más fácilmente. La Figura 2(c) muestra la intensidad media del Arreglo D, destacando el final del experimento en donde se introdujeron 250 nM de anti-c-myc comercial con el fin de normalizar la respuesta de los arreglos. Figura 2(d) muestra una superposición de imágenes LSPR y de fluorescencia que exponen partes de la membrana celular marcada con Lisamina Rodamina B. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

La Figura 3 muestra un estudio de secreción de una sola célula. Figura 3(a) es una superposición de la luz transmitida y las imágenes LSPR que resaltan la ubicación de la célula en relación con 12 arreglos. Figura 3(b) muestra las respuestas LSPR normalizadas de los Arreglos A, B y C ($\hat{I}_{\text{célula}}$) menos la respuesta normalizada promedio de los tres Arreglos de control D, E y F (\hat{I}_{control}). Los centros de los arreglos A, B y C se ubicaron a $11 \mu\text{m}$, $23 \mu\text{m}$ y $35 \mu\text{m}$,

respectivamente, desde el centro de la célula. Los arreglos D, E y F estaban ubicadas al menos a 65 μm del centro de la célula. Figura 3(c) muestra una superposición de las dos imágenes (LSPR, luz transmitida) con un mapa espacial de concentraciones de anticuerpos secretados según lo generado por el análisis de elementos finitos. Para el cálculo, la célula simulada tenía 16 μm de diámetro, tenía una mancha de adhesión de 5.5 μm y anticuerpos secretados uniformemente a 1000 anticuerpos/s. La escala de concentración tiene unidades pM y la barra de escala de distancia es de 10 μm .

La Figura 4(a) muestra una comparación de las secreciones dependientes del tiempo de cuatro estudios de células individuales, todos los cuales estaban dentro de los 15 μm de un arreglo. La intensidad de la imagen LSPR normalizada del arreglo ($\hat{I}_{\text{célula}}$) menos la intensidad normalizada de un arreglo de control (\hat{I}_{control}) se representa en función del tiempo. La Figura 4(b) muestra la ocupación fraccionaria, f , del arreglo más cercano a la célula A según se determina a partir de los espectros de LSPR que se recopilaron simultáneamente con las imágenes de LSPR. Se calculó una concentración de 312 ± 89 pM utilizando los datos en el período de 100 min a 135 min (región resaltada) en donde f fue constante con el tiempo.

Modos para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un enfoque basado en imágenes de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) sin etiquetas para la medición en tiempo real de las secreciones de proteínas de células vivas individuales. La biosensibilidad de LSPR se basa en el hecho de que la resonancia plasmónica de una nanoestructura metálica muestra tanto un desplazamiento al rojo como un aumento en la intensidad de dispersión cuando la unión del analito crea pequeñas perturbaciones en el índice local de refracción. Cuando se toman imágenes en una cámara CCD, estas firmas espectroscópicas se manifiestan como un aumento en el brillo de las nanoestructuras (Figura 1 (a)) y se pueden cuantificar en términos de la ocupación fraccional de los receptores unidos a la superficie. En contraste con los enfoques de resonancia de plasmón de superficie (SPR) basados en película delgada que requieren luz reflejada internamente para la excitación de los plasmones de superficie, las resonancias nanoplasmonicas se pueden excitar con luz visible utilizando las mismas configuraciones ópticas que se utilizan en las instalaciones tradicionales de microscopía de campo amplio (Figura 1(b)).

La metodología de la presente invención ha sido validada mediante el uso de imágenes LSPR para mapear espacial y temporalmente la secreción de anticuerpos anti-c-myc de células de hibridoma 9E10 individuales. Los arreglos cuadrados de nanoestructuras de oro se estamparon en cubreobjetos de vidrio No. 1.5 utilizando nanolitografía por haz de electrones como se describe en Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84, 1367-73 (2012). Cada arreglo (6 \times 6 μm) consistía en 400 nanoestructuras separadas uniformemente separadas por un paso de 300 nm. Las bases de las nanoestructuras fueron circulares en sección transversal con diámetros de 70 ± 5 nm y las alturas fueron de 75 ± 2 nm, lo que dio un pico de resonancia plasmónica centrado en aproximadamente 625 nm cuando se sumergió en medios de cultivo de células libres de suero (SFM). Los arreglos se separaron en 33 μm , lo que permitió incorporar hasta 12 arreglos en el campo de visión (FOV) cuando se utiliza un objetivo de microscopio 63X y hasta 35 arreglos en el FOV cuando se utiliza un objetivo 40X. Como tal, el 97% del FOV era de vidrio transparente, lo que permite ver las células en la porción de vidrio mediante técnicas de microscopía tradicionales, como las imágenes de fluorescencia y luz transmitida (TL). El 3% restante se modeló con los arreglos de nanoestructuras de Au y se utilizó para las mediciones de secreción celular mediante imágenes de LSPR. Además de las imágenes, se colocó un divisor de haz antes de que la cámara CCD dirigiera la mitad de la luz recolectada a un espectrómetro acoplado de fibra óptica. La fibra se alineó para recoger los espectros del arreglo más cercano a la célula y esta información espectral se analizó para determinar la ocupación fraccional de los receptores unidos a la superficie. Se recopiló un conjunto de datos por minuto que comprende una combinación de tres imágenes (LSPR, TL y fluorescencia), así como el espectro LSPR del arreglo individual.

Los cubreobjetos estampados se limpiaron por calcinación con plasma de hidrógeno y las nanoestructuras de oro se funcionalizaron con una monocapa autoensamblada (SAM) de dos componentes de tioles que consiste en una relación 3:1 de SH-(CH₂)₈-EG₃-OH (SPO) a SH-(CH₂)₁₁-EG₃-NH₂ (SPN). El componente SPN se conjugó covalentemente con el péptido c-myc disponible comercialmente. Los chips funcionalizados se montaron en un conjunto de perfusión de transporte de microfluidos hecho a medida para la introducción de medios nuevos y se cargaron en un microscopio invertido Zeiss Axio Observer. El conjunto se encerró dentro de una cámara de incubación regulada con 5% de CO₂ y 98% de humedad a 37°C.

En el modo de imágenes LSPR, los arreglos aparecen como cuadrados brillantes sobre un fondo oscuro y solo es visible la parte de la célula adherida a la superficie, mientras que en las imágenes TL es visible la célula completa y se puede monitorizar para detectar cambios morfológicos (Figura 2(a)). La resolución de un minuto permitió la detección de ráfagas de anticuerpos secretados en el modo de imágenes LSPR que de otra manera no hubieran sido detectadas (Figura 2(b)). En particular, en la marca de 130 minutos del experimento, la célula que había crecido constantemente hasta un diámetro de 27 μm , se contrajo a 25 μm dentro del intervalo de tiempo de 1 minuto entre los puntos de datos. Simultáneamente, se detectó un fuerte aumento en la señal de imagen LSPR en el arreglo más cercano (Figura 2(b), Arreglo A). Los arreglos B y C también detectaron un pulso, tiempo de retraso de 1 min y 3 min, respectivamente. El hecho de que el tamaño y la pendiente de la señal disminuyeran al aumentar la distancia entre la

célula y el arreglo es consistente con una onda pulsada de anticuerpos que se originan en la célula y se difunden hacia el exterior. La onda difusora se midió fácilmente en arreglos ubicados a distancias superiores a 70 μm desde la célula.

Para tener en cuenta las variaciones en la intensidad del arreglo y el rango dinámico, la respuesta de cada arreglo se normalizó individualmente. El procedimiento consistió en introducir una solución saturante de anticuerpos anti-c-myc comerciales (250 nM) al final del experimento (Figura 2(c)). La intensidad media, $I(t)$, dentro de una región de interés (ROI) de $9.5 \times 9.5 \mu\text{m}$ centrada alrededor del arreglo se normalizó en cada punto de tiempo, t , con la ecuación $\hat{I}(t) = [I(t) - I(t_0)]/[1I(t_f) - I(t_0)]$, donde $I(t_0)$ e $I(t_f)$ fueron las intensidades de retorno de la inversión medias al comienzo del experimento y después de la saturación, respectivamente.

La información espacial y temporal de la forma de onda viajera permitió estimar la constante de difusión para los anticuerpos secretados. Suponiendo un emisor esférico que produce un pulso de propagación hacia el exterior de anticuerpos con un perfil de concentración Gaussiano, el inicio del pulso medido se asoció con el pico de la onda. En este límite, $D = r^2/6 \cdot t$, donde D es la constante de difusión, r es la distancia desde el centro de la célula al centro del arreglo y t es el tiempo transcurrido desde que la célula se contrajo. Al analizar todos los arreglos en el FOV que detectó el pulso, se obtuvo un rango para D de $0.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} < D < 5.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, que es consistente con el valor de $4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ medidos para anticuerpos IgG en solución salina tamponada. El rango calculado en D es en gran parte resultado de la incertidumbre en t , debido a la resolución de tiempo de 1 minuto elegida para este experimento, así como a la asociación del inicio de la señal en el arreglo con una característica particular del frente de onda Gaussiano. Sin embargo, la detección de una onda viajera de proteínas secretadas de una sola célula y la capacidad para estimar D es ilustrativa de la aplicabilidad general de la presente invención para el mapeo espacio-temporal de la señalización paracrina.

La membrana plasmática celular también se marcó con el colorante de localización de membrana Lisamina Rodamina B, lo que permite que las imágenes basadas en fluorescencia de la dinámica de la membrana se monitoricen conjuntamente con las imágenes LSPR y TL (Figura 2(d)). La capacidad de integrar la microscopía de fluorescencia con imágenes LSPR es un ejemplo de cómo la presente invención permite que los métodos de fluorescencia bien establecidos para estudios intracelulares se integren con las investigaciones de secreción extracelular.

La mayoría de las células estudiadas mostraron secreciones continuas durante el transcurso del experimento en oposición a las ráfagas (Figura 3). Las secreciones de las células individuales se aislaron y se cuantificaron con arreglos adyacentes a la célula mediante la normalización de la respuesta de cada arreglo en el FOV como se describió anteriormente y luego se usaron los arreglos ubicados más alejados de la célula como controles para la sustracción de fondo (Figura 3(b)). Se observaron secreciones de anticuerpos a los pocos minutos del inicio del experimento y, como se esperaba, la intensidad de la señal disminuyó al aumentar la distancia entre la célula y el arreglo. En comparación con las ráfagas secretas que fueron detectables a distancias superiores a 70 μm desde la célula, se detectaron secreciones continuas a distancias de 40 μm o menos. Con frecuencia, se observó un ruido estocástico adicional en el arreglo más cercano a la célula (Figura 3(b), Arreglo A) debido a los cambios en la morfología de la célula que crearon variaciones en la luz dispersada en el borde de la célula. En el caso de que la célula se extendiera sobre la superficie durante el experimento y se pusiera en contacto con el arreglo, la intensidad dispersada de las nanoestructuras plasmónicas aumentó considerablemente en el borde del arreglo adyacente a la célula, en marcado contraste con la detección de anticuerpos secretados en que la intensidad del arreglo aumentó uniformemente.

El procedimiento de análisis de datos para la sustracción de fondo fue importante para aislar las secreciones de tipo continuo de las células individuales. El propósito de la sustracción de fondo fue eliminar los cambios globales en la señal que afectan a todos los arreglos en el FOV durante el transcurso del experimento, como los cambios volumétricos en la composición del medio, la desviación del enfoque y las variaciones en la intensidad de la fuente de luz. Los arreglos suficientemente distantes de la célula eran insensibles a sus secreciones y, por lo tanto, podían servir como arreglos de control, convenientemente integrados en el mismo experimento por el proceso litográfico. Para ayudar a determinar la distancia de separación mínima requerida entre la célula y los arreglos de control, se utilizó el análisis de elementos finitos (FEA) para resolver la ecuación de difusión en la vecindad de una célula modelo que emite anticuerpos a una tasa constante. La tasa de secreción de 1000 anticuerpos/s utilizada en los cálculos fue un promedio determinado experimentalmente basado en estudios de tasa de secreción en masa de 4×10^6 células. Los resultados de FEA (Figura 3(c)) muestran que una separación entre la célula y un arreglo de más de 65 μm reduce la concentración de anticuerpo secretado por debajo del límite de detección para las escalas de tiempo bajo investigación ($\sim 100 \text{ pM}$). Esto coincidió con la observación experimental de que los arreglos D, E y F, ubicados a 70 μm , 68 μm y 81 μm del centro de la célula, respectivamente, tenían respuestas normalizadas que no se distinguían estadísticamente en el transcurso del experimento de tres horas.

A partir de una recolección de mediciones de una sola célula de este tipo, se midieron concentraciones locales que variaron desde tan altas como $312 \pm 89 \text{ pM}$ sobre algunas células hasta por debajo del límite de detección del arreglo para otras (Figura 4(a)). En cada estudio, la célula estaba adyacente al arreglo con el centro de la célula a menos de 15 μm del arreglo. La concentración en el arreglo se calculó utilizando $c(f) = K_D f / (1 - f)$ donde f es la ocupación fraccionada de c-myc unido a la superficie en el arreglo determinada a partir de los datos espectroscópicos recopilados simultáneamente de la respuesta de pico LSPR y K_D es la constante de disociación de equilibrio de 1.8 nM. La ecuación es válida si f es constante con el tiempo, una condición que a menudo se aplicaba de dos a tres horas en la medición

(Figura 4(b)) y que está de acuerdo con las predicciones de FEA de que la concentración de anticuerpos que rodean un hibridoma de secreción continua la célula se acerca mucho a un estado estable dentro de los 30 minutos posteriores a la introducción de la célula en un nuevo entorno.

5 La técnica experimental descrita en el presente documento permitió el mapeo cuantitativo espacio-temporal de proteínas secretadas de una a tres células por experimento. Como tal, se erige como una metodología complementaria a las técnicas de ensayo de inmunosándwich de células unitarias de alto rendimiento que miden cientos o miles de células individuales pero con resoluciones espacio-temporales más bajas. Además, la arquitectura de chips está diseñada para imitar la de una instalación de placa de cultivo con fondo de vidrio. Como tales, se pueden agregar matrices de polímeros (es decir, fibronectina, colágeno) al sustrato para permitir estudios de células adherentes. Se espera una señal amplificada de las células que permanecen en dicha matriz y están ubicadas directamente sobre un arreglo debido a la captura de las proteínas secretadas entre la membrana celular y el sustrato, lo que permite la medición de tasas de secreción menores. Muchos ensayos de inmunosándwich también incorporan la multiplexación para la detección simultánea de múltiples analitos, lo que se puede realizar mediante la impresión por puntos de antígenos específicos en arreglos diseñados. Finalmente, la naturaleza libre de etiquetas de las imágenes de LSPR, así como su compatibilidad con TL y las técnicas de imágenes de fluorescencia, proporciona una flexibilidad experimental, ya que se pueden investigar células modificadas o no modificadas.

20 Litografía por haz de electrones de nanoestructuras de Au

Las resistencias por haces de electrones usadas para la litografía fueron polimetacrilato de metilo al 4% en anisol (PMMA A4) y 6% de copolímero de metacrilato de metilo y lactato de etilo (MMA EL6), ambos de Microchem. El grabador de cromo CR-7 se adquirió de Cyantek y se usó metil isobutil cetona (MIBK) + alcohol isopropílico (IPA) en una proporción de 1:2 para desarrollar las resistencias. Los sustratos utilizados para estampar las nanoestructuras eran cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro con un espesor nominal de 170 μm . La limpieza de los cubreobjetos, la deposición de una película delgada de cromo para evitar la carga y el giro de la bicapa de resistencia se han descrito previamente en Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84, 1367-73 (2012). Las muestras se estamparon mediante litografía por haz de electrones utilizando dosis de área en el rango de 200 a 400 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$. Las muestras se desarrollaron durante 1 minuto en un baño de IPA/MIBK y la capa de cromo se grabó en húmedo desde la parte inferior del patrón utilizando el grabador CR-7. Se depositó una capa de Ti/Au utilizando un evaporador de haz de electrones Temescal. Después de la deposición del metal o del grabado químico, la bicapa de PMMA/copolímero se eliminó empapando en acetona durante 4 horas.

35 Limpieza y funcionalización de la nanoestructura de Au.

El chip se limpió mediante calcinación por plasma a 40 W en 300 mTorr de una mezcla de 5% de hidrógeno, 95% de argón, y luego se funcionalizó por inmersión en una solución de tiol de base etanólica de dos componentes (0.5 mM), que consiste en relación 3:1 de SH-(CH₂)₈-EG₃-OH a SH-(CH₂)₁₁-EG₃-NH₂ durante 18 horas (Prochimia). El componente SPN de la capa SAM se hizo reaccionar primero con una solución de 10 mg/mL del sulfo-N-succinimidil-4-formilbenzamida reticuladora heterobifuncional (Solulink) en regulador PBS (pH 7.4) y luego se conjugó con el péptido c-myc (HyNic-c-myc-tag, Solulink) en regulador PBS (pH 6.0) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti-c-myc obtenidos comercialmente (Genscript) se utilizaron para saturar la superficie de c-myc unida a la superficie y normalizar la respuesta del arreglo al final de cada experimento.

45 Microscopía de fluorescencia, luz transmitida y LSPR

Todas las imágenes se adquirieron utilizando el software Zeiss AxioVision, un microscopio Zeiss Axio Observer invertido y una cámara CCD de 16 bits enfriada termoeléctricamente con píxeles de 6.45 \times 6.45 μm (Hamamatsu ORCA R²). Los experimentos utilizaron un objetivo de inmersión en aceite 63X (Figuras 1-3) o un objetivo de inmersión en aceite 40X (Figura 4) y la iluminación Koehler. La cámara se operó en modo de agrupación de 2 \times 2, con resoluciones de imagen de 323 nm y 205 nm para los objetivos 40X y 63X, respectivamente. Las imágenes LSPR basadas en CCD y los espectros LSPR se recolectaron en una geometría de luz reflejada utilizando una lámpara halógena de 100 W para iluminación y polarizadores cruzados para reducir la contribución de fondo de la luz dispersada por el sustrato. Las imágenes y los espectros se obtuvieron simultáneamente colocando un divisor de haz en el puerto de salida del microscopio y un filtro de paso largo con una longitud de onda de corte de 593 nm se colocó ante la cámara CCD. Para las mediciones espectrales, la imagen enfocada de todo el arreglo de nanoestructuras se proyectó en el extremo de una fibra óptica de 600 μm de diámetro y los espectros se midieron posteriormente con un espectrofotómetro (Ocean Optics QE65000). La iluminación con luz transmitida se obtuvo con la misma configuración pero utilizando una fuente de luz halógena de 100 W ubicada sobre el chip. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando un módulo LED de 540-580 nm (Zeiss Colibri) y un cubo de filtro optimizado para la fluorescencia de rodamina. Los tiempos de exposición para imágenes LSPR, imágenes de luz transmitida, imágenes de fluorescencia y colección de espectros fueron 300 ms, 300 ms, 1 segundo y 1 segundo, respectivamente. Las imágenes TL fueron mejoradas con contraste y se agregó color falso a las imágenes de fluorescencia de escala de grises para visualizar mejor la célula. Todas las fuentes de luz se obturaron cuando no se estaban capturando datos, con el fin de minimizar la posibilidad de efectos fototóxicos en las células.

Incubación microscópica. Ambiente y estabilidad

5 El microscopio estaba equipado con un recinto de temperatura controlada que mantenía la temperatura de la etapa a $37.0 \pm 0.04^\circ\text{C}$ (Zeiss). Un recinto de incubación adicional sobre la muestra regulaba la humedad y el contenido de CO_2 a 98% y 5%, respectivamente. En estas condiciones, las desviaciones en las direcciones x, y y z fueron inferiores a 3 nm/min. La desviación del enfoque se corrigió en gran parte, aunque no del todo, durante el experimento utilizando un sistema de enfoque definido Zeiss. La deriva en el plano se corrigió con el software de alineación de imagen postexperimento disponible comercialmente (Zeiss Axio Vision).

10 Cultivo y etiquetado de células de hibridoma

15 Se cultivaron células de hibridoma (clon 9E10, ATCC) en medio de crecimiento completo (RPMI-1640, ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% (Sigma) usando matraces T75 en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37°C bajo 5% de atmósfera de CO_2 . Las células se mantuvieron a una densidad de $3\text{-}5 \times 10^5$ células/mL y se realizó un subcultivo cada dos días para mantener la viabilidad celular al 90-95%. Las densidades celulares y la viabilidad se determinaron utilizando un contador de células automatizado Countess (Invitrogen). Antes de introducirse en el microscopio, las células se recolectaron en medio de crecimiento completo, se contaron y se evaluó la viabilidad. Todas las preparaciones celulares utilizadas para la obtención de imágenes tenían una viabilidad $> 92\%$. Las células se sedimentaron por centrifugación (3000 rpm x 5 min), se lavaron 20 dos veces con RPMI-1640 SFM para eliminar los anticuerpos secretados y se ajustaron a una densidad celular de 2×10^6 células/mL. Para obtener imágenes, se inyectaron manualmente 75 μL de solución celular en la cámara de imágenes. Después de 5 minutos, típicamente 50-75 células se habían adherido a la superficie; las células restantes se lavaron con SFM fresco utilizando la configuración de perfusión de transporte de microfluidos. Para la imagen de fluorescencia, la membrana plasmática de las células vivas se marcó con el colorante localizador de la membrana Lisamina rodamina B 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (rodamina DHPE) (Ex, 560 nm/Em, 580 nm) (L-RB, Invitrogen). Las células se lavaron y se incubaron durante 20 minutos con L-RB 10 μM en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía HEPES 25 mM (Invitrogen) en un agitador rotatorio a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con SFM y se prepararon para la obtención de imágenes como se describe anteriormente.

30 Análisis de elementos finitos

35 El análisis de elementos finitos se realizó utilizando el software FlexPDE (versión 5.0.8) asumiendo una célula esférica de $8 \mu\text{m}$ de radio con la parte inferior de la célula aplanada a un punto de adhesión de $5.5 \mu\text{m}$ donde hace contacto con el sustrato de vidrio.

40 Las descripciones anteriores son las de las realizaciones preferidas de la invención. Por lo tanto, debe entenderse que la invención reivindicada puede ponerse en práctica de manera diferente a la descrita específicamente. Cualquier referencia a elementos de reivindicación en singular, por ejemplo, utilizando los artículos "un", "una", "el/la" o "dicho/dicha", no debe interpretarse como una limitación del elemento al singular.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el mapeo espacio-temporal de secreciones de proteínas de células vivas individuales en tiempo real, que comprende:
- 5 generación de imágenes de las secreciones de proteínas de una célula viva usando un chip para imágenes de resonancia de plasmones de superficie localizada sin etiqueta (LSPR), que incluye un cubreobjetos de vidrio compatible para su uso en un microscopio estándar y al menos una serie de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas estampadas en el cubreobjetos de vidrio;
- 10 colocar la célula viva en el cubreobjetos de vidrio; y
mapear espacial y temporalmente las secreciones de la célula viva utilizando generación de imágenes LSPR; observar la célula viva utilizando generación de imágenes de luz transmitida de la célula viva y generación de imágenes de fluorescencia simultáneamente con la generación de imágenes LSPR; y
15 distinguir una secreción en ráfaga de una secreción de estado estable por la célula viva; en donde una distancia de un centro de la célula viva al arreglo es menor que 15 μm .
2. El método de la reivindicación 1, en donde las nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas comprenden nanoestructuras de oro.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde las nanoestructuras fueron funcionalizadas con una monocapa autoensamblada que comprende SH-(CH₂)₈-EG₃-OH (SPO) y SH-(CH₂)₁₁-EG₃-NH₂ (SPN).
4. El método de la reivindicación 3, en donde el componente SPN fue conjugado covalentemente con un péptido c-myc.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la normalización del mapeo espacial y temporal.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente usar un arreglo de control para comparar la generación de imágenes, en donde el arreglo de control está a al menos 65 μm de la célula viva.
- 30 7. El método de la reivindicación 3, en donde la monocapa autoensamblada comprende una proporción de tres a uno de SPO a SPN.

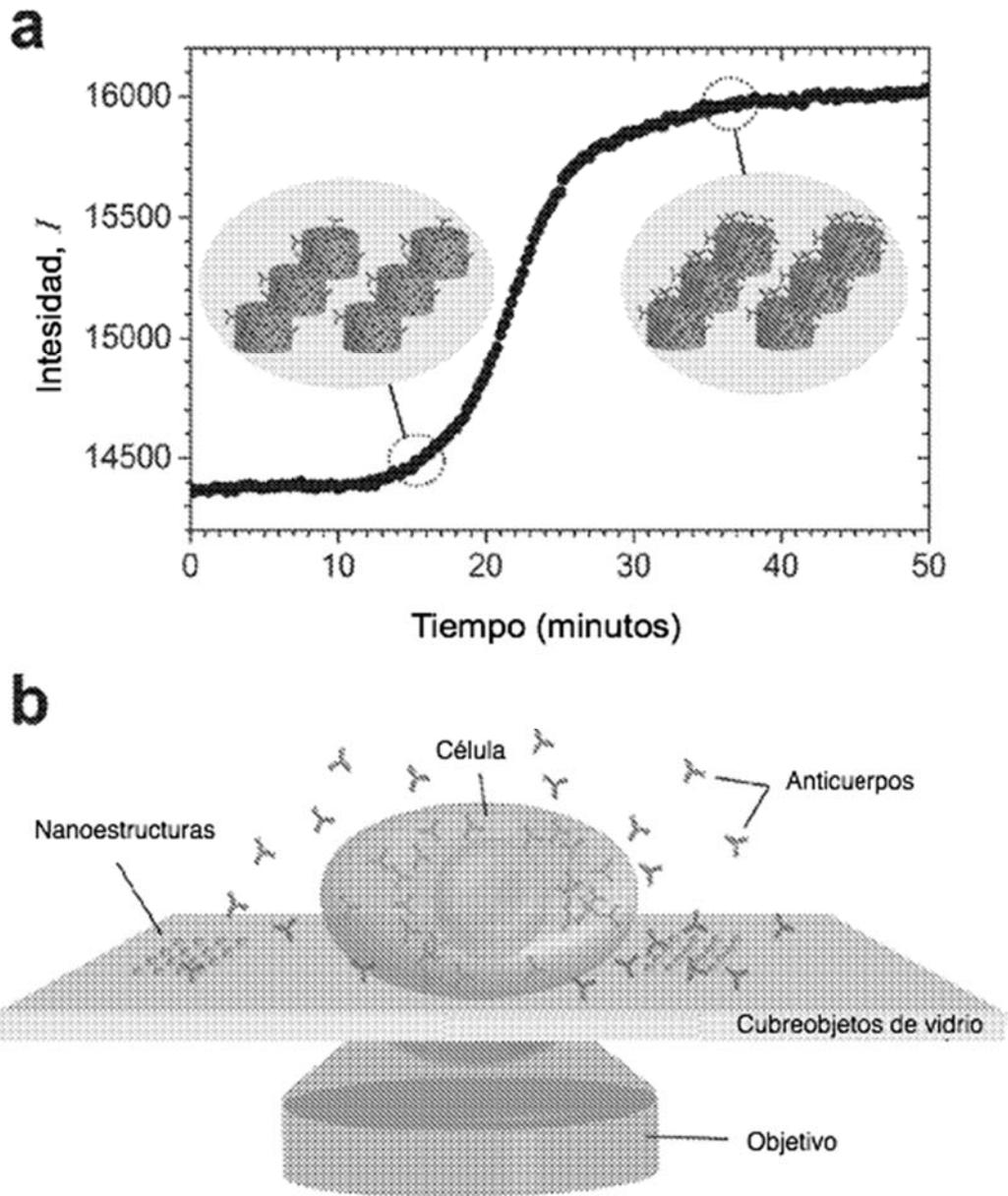


FIG. 1

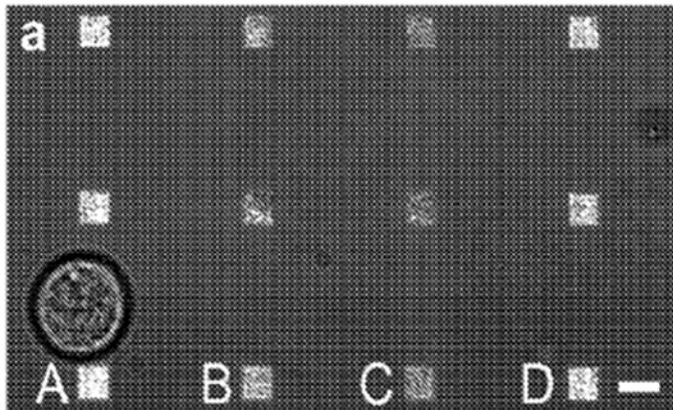


FIG. 2(a)

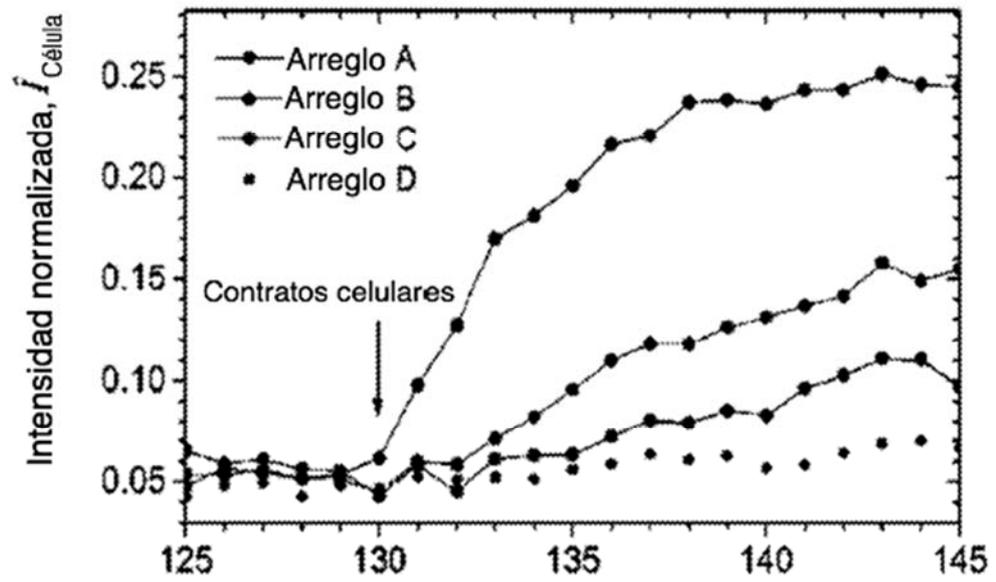


FIG. 2(b)

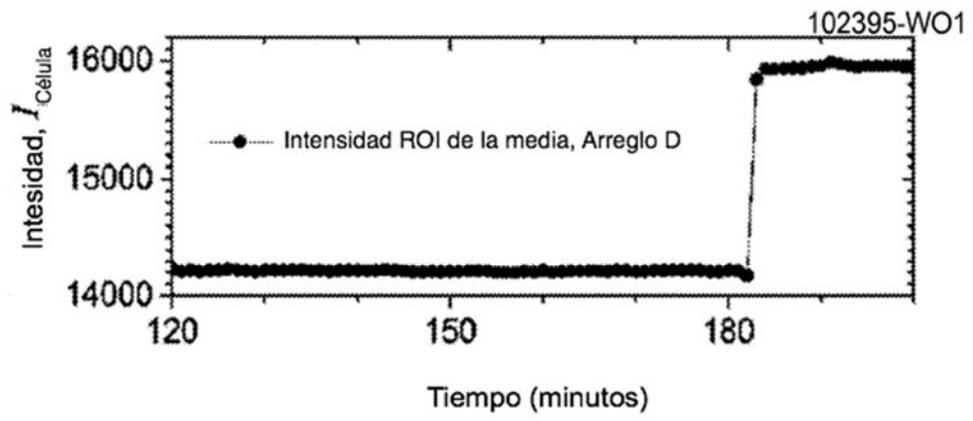


FIG. 2(c)

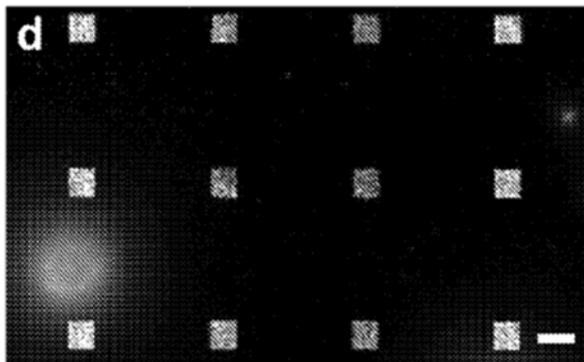


FIG. 2(d)

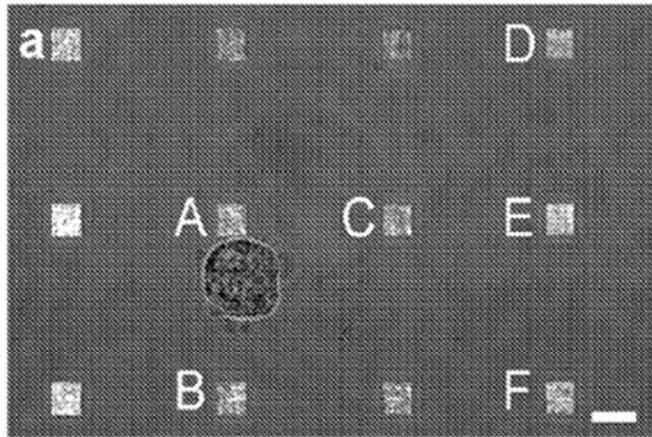


FIG. 3(a)

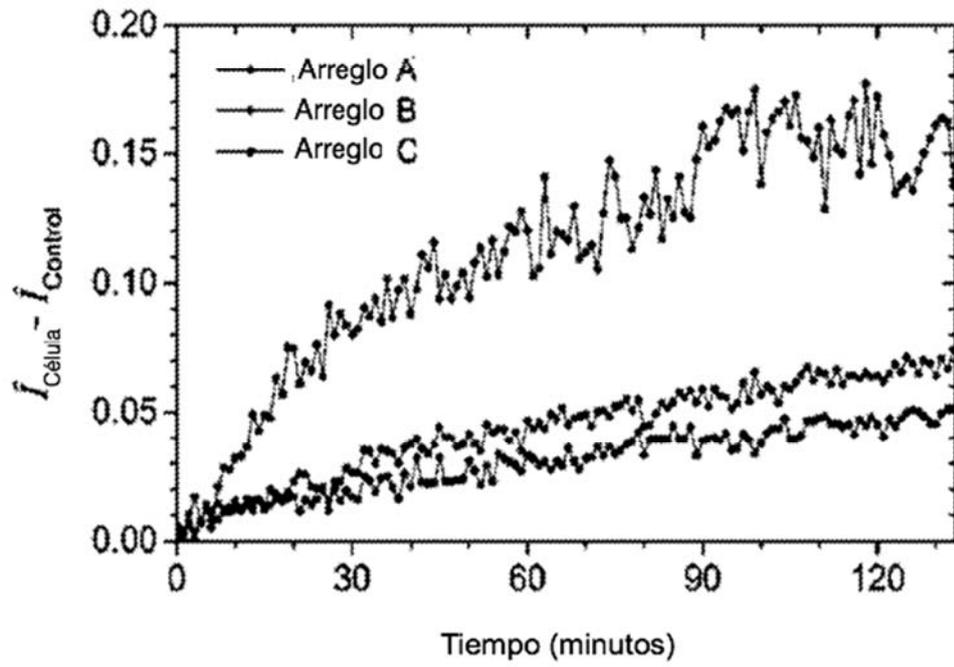


FIG. 3(b)

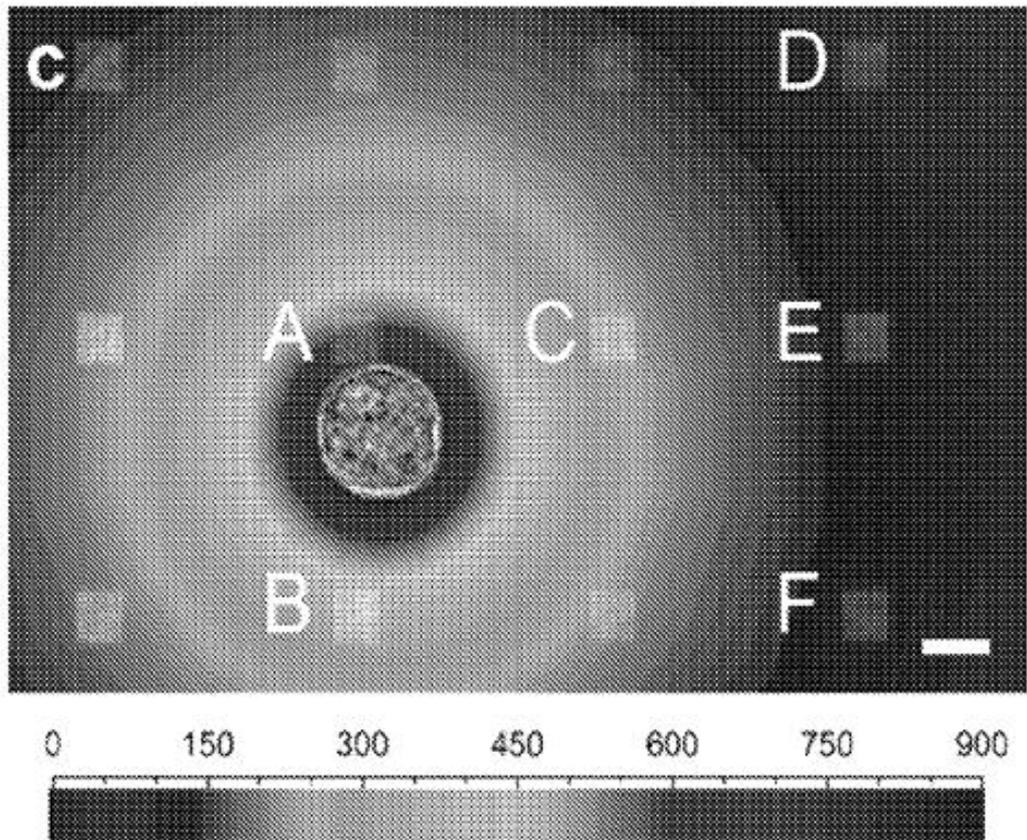


FIG. 3(c)

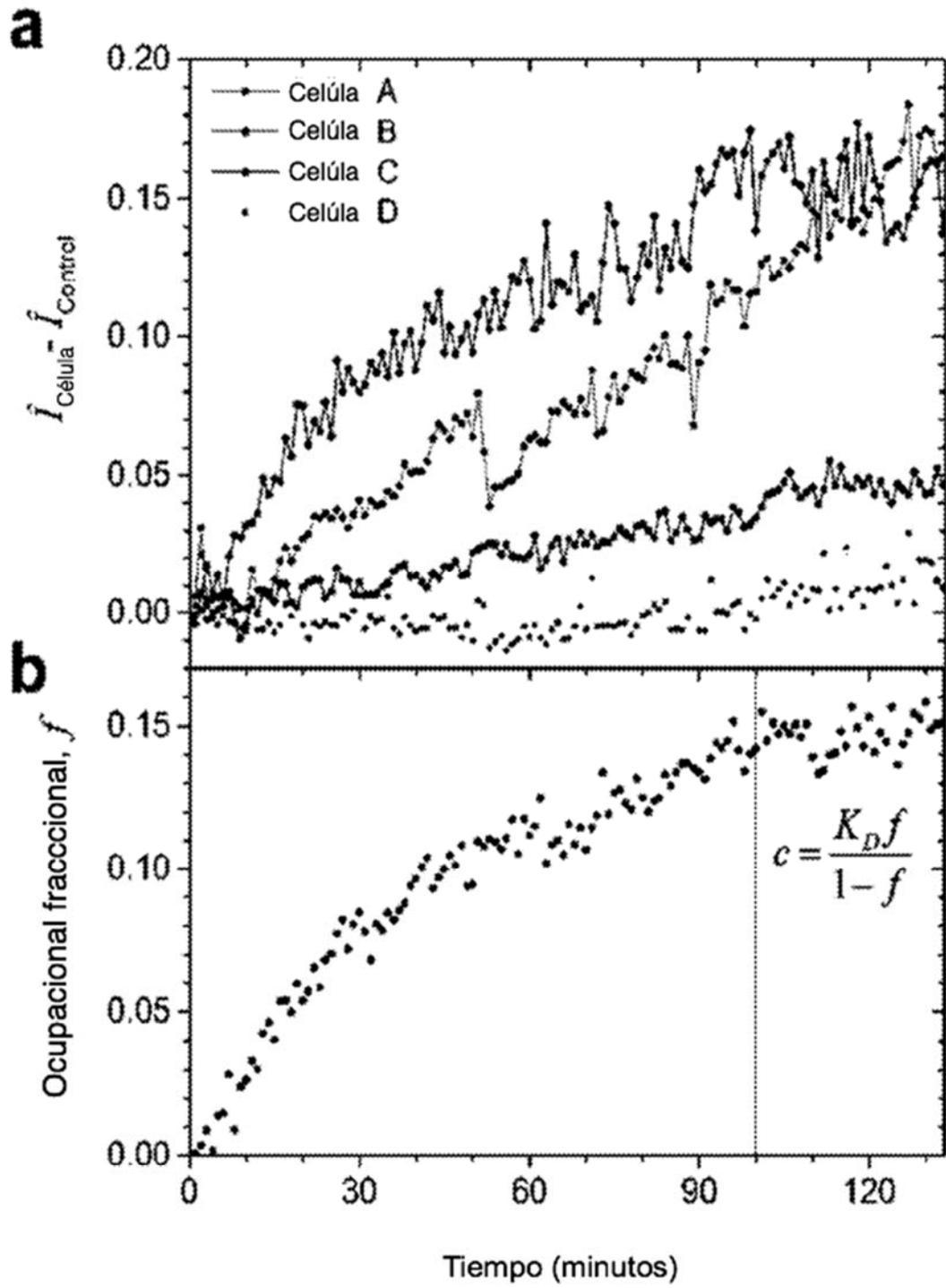


FIG. 4