

"Método para a marcação de células viáveis e processo de preparação de composições à base de corantes de cianina"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION,  
pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um método de marcação reprodutível de células viáveis, com corantes de cianina, método que compreende o contacto da célula com um corante de cianina num meio contendo um agente regulador de osmolaridade que não afecta significativamente a viabilidade das células e que proporciona uma marcação reprodutível.

Este invento inclui ainda o processo de preparação de composições compreendendo dissolver um corante de cianina num agente regulador de osmolaridade que não afecta significativamente a viabilidade das células.

As aplicações de células marcadas incluem a utilização de glóbulos vermelhos marcados para distinguir as hemorragias pós-transfusionais da reacção imunológica e a utilização da diluição para medir a velocidade de crescimento de células de cultura.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVAANTECEDENTES DO INVENTOÂMBITO DO INVENTO

O presente invento refere-se a novos processos que proporcionam a marcação de células viáveis sem afectar adversamente a morfologia ou a função celular.

INFORMAÇÃO ANTECEDENTE

Os métodos de detecção de fluorescência são utilizados em Biologia Celular e Imunologia como ferramentas analíticas para medir as propriedades específicas de muitas células. A vantagem das medições de fluorescência é que uma única molécula marcada pode sofrer excitação e voltar ao estado fundamental milhares de vezes por segundo emitindo o mesmo número de fotões de luz. Assim, se uma molécula de anticorpo for marcada com duas ou três moléculas de corante, podem obter-se vários milhares de fotões de luz a partir de um único ponto de ligação antigénio-anticorpo. Esta é uma técnica de aumento de sinal fantástica.

Têm-se utilizado os corantes de dioxacarbocianina para efectuar determinações de diferenciais de glóbulos brancos. Gunter Valet, Max Planck Ges Wissensch; Patente N<sup>o</sup> 84-102307/17, Simultaneous Quantitative Determination of Blood Cells by Selective Staining and Measuring Volume and Fluorescence. Os corantes utilizados nestes estudos, no entanto, são corantes de carbocianina de cadeia curta (inferior a 10) e respondem a variações nos potenciais da membrana. Mais ainda, os corantes de carbocianina de cadeia curta entram na mitocôndria celular, são citotóxicos, e quando as células são lavadas os corantes são facilmente removidos da célula quer tenha havido quer não uma variação no potencial da membrana. Os corantes de cadeia longa do processo do presente invento são confinados às membranas celulares e são apenas minimamente afectados pelo potencial de membrana. Os

-3-

corantes do presente invento não abandonam as células.

Outros tipos de corantes utilizados para conseguir a marcação de glóbulos brancos não pertencem ao grupo da cianina e não sofrem partição nos lípidos. Os compostos pirílio ou tiapirílio têm sido utilizados para diferenciar as classes de glóbulos brancos (David S. Frank, R.T. Belly, Patente Nº 84-166275/27, Distinguishing Cells in Biological Samples by Staining With Pyrylium or Thiapyrylium Compounds. Estes corantes, no entanto, ligam-se aos elementos citoplasmáticos e nucleares da célula; não se ligam especificamente às membranas celulares. Têm sido também utilizados outros corantes catiónicos (L. Kass, Patente Nº 81-78187/43, Determination of Different Leucocyte Categories by Staining with Meta: Chromatic Cationic Dyes, L. Kass, Patente U.S. Número 4,400370, Agosto 23, 1983, Metachromatic Dye Sorption Means for Differential Determination of Leukocytes, L. Kass, Patente Nº 83-771982/39, Analysis of Human Blood Cells By Staining Unfixed Cells With Specified Basic Dyes) para efectuar a diferenciação de glóbulos brancos, no entanto estes corantes não sofrem uma partição significativa nos lípidos da membrana mas coram diversos organitos no interior da célula. Outro corante metacromático utilizado para efectuar a diferenciação de glóbulos brancos é o laranja de acridina ("acridine orange") (P. J. Natale, Patente U.S. Número 4,336,029, Junho, 22, 1982, Method and Reagents For Quantitative Determination of Reticulocytes and Platelets in Whole Blood, R. J. Gershman Patente U.S. Número 4,325,706, Abril, 20, 1982, Automated Detection of Platelets and Reticulocytes in Whole Blood). O laranja de acridina cora o ARN e o ADN de uma célula e não sofre uma partição significativa nos lípidos da membrana.

Noutra aplicação utiliza-se a merocianina 540 para distinguir células normais de células malignas. Este corante possui uma cauda de hidrocarbonetos longa, com até 15 átomos de carbono, no entanto esta molécula possui um grupo hidrofílico na extremidade da cauda de hidrocarbonetos e é citotóxica quando a célula é exposta à luz. Valinsky, J.E.

-4-

Reich. E. and Easton, T.G., Patente U.S. Número 4,424,201, Janeiro, 3, 1984, Employment of a Merocyanine Dye for the Detection of Malignant Leukocytic Cells. A merocianina é incorporada de forma diferente nas membranas de células normais e malignas.

Os corantes de cianina de cadeia alifática curta são utilizados numa série de testes biológicos. Estas moléculas de cadeia alifática curta, no entanto, respondem aos potenciais de membrana e atravessam-na, penetrando na mitocôndria da célula. H.M. Shapiro, Patente U.S. Número 4,343,782, Agosto, 10, 1982. Os corantes de cianina de cadeia curta são também tóxicos para as células e não podem ser utilizados para detecção de células in vivo uma vez que são rapidamente removidos das células.

Os corantes de tricarbocianina (Fox, I.J., et al., Proc. Mayo Clinic 32:478-484, 1957) e o corante azul de Evans ("Evans-blue") (Schad, H., et al., Pflugers Arch Eur J. Physiol. 370(2):139-144, 1977) têm sido utilizados in vivo para estimar o débito cardíaco por um método de diluição. Dow (Dow, P., Physiol. Rev. 36:77-102, 1956) descreve o método como uma injeção de uma quantidade conhecida de um indicador intravascular no lado venoso dos pulmões e medição da variação da concentração arterial de indicador com o tempo para determinar o volume entre os pontos de injeção e amostragem. Estes corantes não são utilizados para corar células.

Os derivados de cadeia alifática longa de fluorescência e da rodamina foram utilizados para monitorizar a fusão celular (Wanda, P. E. and Smith, J. D., J. Histochem. Cytochem 30:1297-1300, 1982). Estes corantes, no entanto, contêm apenas uma cadeia de carbono alifática e não são estáveis na membrana durante longos períodos de tempo. Mais ainda o método de detecção da formação de heterocariótas era a transferência de energia de ressonância entre as duas moléculas de corante. Em adição, a marcação era efectuada em meio salino e não foi divulgada qualquer explicação sobre a solubilidade.



-5-

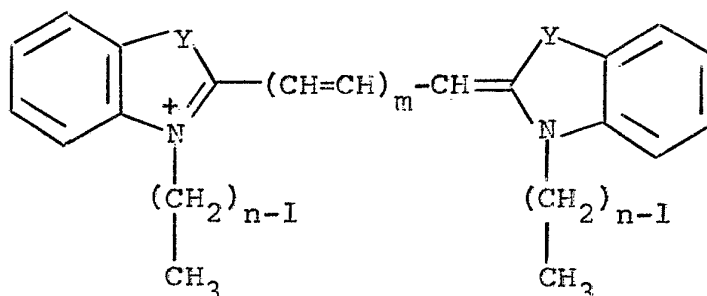
Os biofísicos utilizaram a maior aplicação dos corantes de cianina dialifáticos do tipo de cadeia longa para estudar a fluidez da membrana celular. (D. Axelrod, Biophysical J., 26, 557-574, 1979). Neste tipo de estudos o corante é aplicado a células de cultura recente em etanol. Foi constatado por diversos investigadores que a variabilidade na coloração era muito grande. Para estudos biofísicos, no entanto, é necessário focar apenas algumas células sendo cada uma das células em estudo medida várias vezes. Usaram-se também corantes de carbocianina de cadeia longa que se incorporam nas membranas do plasma para determinar a identidade original de neurões em cultura. Honig, M. G. and Hume, R. I., J. Cell Biology 103:171-187 (1986). Não se encontra nas referências acima um método uniforme de coloração de células viáveis que não afecte adversamente a morfologia ou a função celular.

#### DESCRIÇÃO SUMÁRIA DO INVENTO

O presente invento refere-se a novos processos que tornam possível a marcação consistente e reprodutível de células viáveis sem alterar significativamente a morfologia ou a função celular. De acordo com o presente invento, as células são marcadas com um corante de cianina possuidor de uma solubilidade lipídica suficiente e de um coeficiente de partição na membrana suficientemente elevado para minimizar ou prevenir a migração das moléculas de corante para fora das membranas celulares. A marcação consistente e reprodutível é conseguida pela adição do corante a uma suspensão de células num meio contendo um agente regulador de osmolaridade que não afecte significativamente a viabilidade celular e no qual o corante seja solúvel. Estes agentes reguladores de osmolaridade incluem açúcares, açúcar-álcoois, aminoácidos e certos tampões hidrogeniônicos (Tampões "Good").

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

No processo do presente invento para a marcação de diversas células sem afectar significativamente a morfologia ou função celular, utilizam-se corantes de cianina. Os compostos possuidores da estrutura seguinte são aqui referidos como corantes de cianina:



em que:

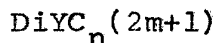
Y é oxigénio, enxofre, metileno ou metileno substituído por alquilo;

m é 0-3; e

n é 12-22.

Tal como aqui utilizado o termo metileno substituído por alquilo refere-se a metileno mono- ou di- substituído, possuindo qualquer combinação de substituintes metilo, etilo ou propilo.

Os compostos com a estrutura acima são referidos pela seguinte fórmula condensada, geralmente reconhecida:



Sims, P. J., et al., Biochem, 13:3315 (1974). Assim por exemplo, o composto em que Y é enxofre e que possui três átomos de carbono em ponte entre os anéis e duas cadeias alifáticas com 14 átomos de carbono, é referido por DiSC<sub>14</sub>(3). Do mesmo modo, DiIC<sub>14</sub>(5) indica o composto em que Y é isopropilo e que possui 5 átomos de carbono em ponte entre os anéis e duas cadeias alifáticas com catorze átomos de carbono.



-7-

Inclusos nos compostos aqui referidos como corantes de cianina, encontram-se os compostos com a estrutura acima possuindo um ou mais substituintes, desde que esses compostos substituídos sejam solúveis no meio de marcação das células durante, pelo menos o tempo necessário para a marcação e possuam um coeficiente de partição na membrana celular suficientemente elevado para se manterem associados às membranas das células marcadas. Esses compostos não deverão afectar significativamente a viabilidade das células nas concentrações requeridas para a marcação. A solubilidade no meio de marcação das células é determinado, como se mostra abaixo, dispersando o corante de cianina no meio de marcação e medindo a intensidade de fluorescência celular em função do tempo, por técnicas espectrofluorométricas usuais. A diminuição da intensidade de fluorescência indica precipitação do corante e aderência às paredes do recipiente. A manutenção da associação dos corantes com as membranas celulares é determinada, por exemplo, usando processos de citometria de fluxo conhecidos, para monitorizar a intensidade de fluorescência de glóbulos vermelhos reinjectados no animal doador, após marcação. Uma intensidade de fluorescência das células marcadas que se mantenha essencialmente constante após a re-injecção estabelece a estabilidade do corante nas membranas celulares.

Também incluídos nos compostos aqui referidos como corantes de cianina encontram-se os compostos com a estrutura acima que incorporam um átomo que possa ser detectado por ressonância magnética nuclear. Esses compostos/<sup>são</sup>preparados, por exemplo, por incorporação de um átomo de flúor num dos grupos metilo das cadeias alifáticas. Os compostos com a estrutura acima, marcados com um emissor gama como  $^{125}\text{I}$ , são aqui referidos como corantes de cianina.

Os corantes de cianina utilizados no presente invento podem ser obtidos a partir de várias fontes tais como Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, e podem ser preparados a partir de compostos de partida disponíveis utili-

-8-

zando métodos de síntese conhecidos. Hamer, F. M., The Cyanine Dyes and Related Compounds, Interscience Publishers (1964).

Utilizando os processos do presente invento qualquer célula viável pode ser marcada com corantes de cianina. Tal como aqui utilizado, o termo célula inclui células procarióticas tais como bactérias, células eucarióticas nucleadas tais como glóbulos brancos, várias células de tumores, e células de mamíferos em cultura, por exemplo células do ovário do "hamster chinês", leveduras e células não-nucleadas tais como glóbulos vermelhos e plaquetas. Uma célula nucleada é viável se for capaz de crescer ou funcionar essencialmente de acordo com o esperado para células do seu tipo; uma célula nucleada é viável se for capaz de desempenhar as suas funções, por exemplo um glóbulo vermelho viável é capaz de transportar oxigénio e dióxido de carbono; e as plaquetas viáveis comportam-se essencialmente de acordo com o esperado em, por exemplo, testes de agregação e libertação.

A marcação das células é efectuada num meio que não é letal para as células e que proporciona uma marcação celular reprodutível. Para conferir ao meio as características necessárias, usam-se agentes reguladores de osmolaridade nos quais os corantes de cianina formam soluções estáveis durante, pelo menos, o tempo requerido para a marcação. Agentes reguladores de osmolaridade aceitáveis incluem agentes ou combinações de agentes como açúcares, por exemplo monossacáridos como glucose, frutose, sorbose, xilose, ribose, e dissacáridos como sacarose, açúcar-álcoois, como manitol, glicerol, inositol, xilitol e adonitol, aminoácidos como glicina e arginina e certos tampões de Good como o ácido N-tris(hidroximetil)-metil-3-aminopropanossulfónico e os listados na Tabela II, abaixo, Good, N. E., et al., Biochem. 15, 467-477 (1966), Good, N. E. e S. Izawa, Methods Enzymol., 24, Parte B, 53 (1968), Feguson, W. J., et al., Anal. Biochem. 104:301-310 (1980). Alguns tipos de células, no entanto podem ser sensíveis a um ou mais dos agentes regulado

-9-

res de osmolaridade, em especial aos açúcar-álcoois. Assim, antes de se efectuar a marcação, realizam-se testes padrão para ter a certeza de que as células são viáveis no agente regulador de osmolaridade pretendido. Adicionalmente, podem adicionar-se pequenas quantidades de agentes tampão ao meio de marcação para regular a concentração de ião hidrogénio.

O efeito de exposição a uma série de agentes reguladores de osmolaridade sobre a viabilidade das células foi determinado, medindo o tempo de duplicação de células yac após estas terem sido expostas, durante trinta minutos, a uma série de agentes reguladores de osmolaridade. As células yac são um tipo de célula de cultura de tecido de linfoma de ratos, publicamente postas à disposição pelo American Type Culture Collection e são descritas por Kiessling, R., European J. Immunology 5:112-117 (1975). Tal como demonstram os dados apresentados na Tabela I, em comparação com a solução salina tamponada com fosfato, a exposição a sacarose, glucose e aos tampões de Good: TAPS, CAPS, EPPS, HEPPSO, e DIPSO resulta em efeitos negligenciáveis no tempo de duplicação celular o que indica a ausência de uma relação entre a toxicidade celular e a exposição ao agente regulador de osmolaridade.



-10-

TABELA 1

<u>Agente Regulador de Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Solução Salina Tamponada com fosfato	31,0
Sacarose	41,0
Glucose	34,5
TAPS	32,7
CAPS	45,8
EPPS	32,2
HEPPSO	23,4
DIPSO	36,7
Ácido 3-amino-1-propanosulfônico	99,6
Ácido sódio-3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS)	A
2-Amino-metil-1,3-propanodiol	B
2-Amino-2-metil-1-propanol	B
Ácido N-tris(hidroximetil)metilaminoetanossulfônico (TES)	B
Ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanossulfônico (BES)	A
Ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfônico (CAPS)	A
Trietanolamina	B
Tris(hidroximetil)aminoetano (TRIZMA)	B
Bis-tris propano	B
Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES)	B

-11-

TABELA 1 (Continuação)

<u>Agente Regulador de Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Ácido 3- $\gamma$ -dimetil(hidroximetil)metilamino $\gamma$ -2-hidroxiopropanosulfônico (AMPSO)	A
N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (BICINE)	57,7
3- $\gamma$ -(3-colamidopropil)dimetilamônio $\gamma$ -1-propanosulfonato (CHAPS)	B
Ácido 3- $\gamma$ -N-tris(hidroximetil)metilamino $\gamma$ -2-hidroxiopropanosulfônico (TAPSO)	63,6
Ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi-propanosulfônico (MOPSO)	178,4
Ácido 2- $\gamma$ -(2-amino-2-oxoetil)amino $\gamma$ etanosulfônico (ACES)	1038,4
Bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano (BIS-TRIS)	A
Ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfônico (CHES)	51,5
N-tris-(hidroximetil)metilglicina (TRICINE)	A
Glucosamina	288,4
Imidazol	B
Glicilglicina	66,9

A - Não permite crescimento ou parcialmente citotóxico.

B - Extremamente citotóxico.

-12-

A Tabela II, apresenta vários agentes reguladores de osmolaridade que foram examinados relativamente à solubilização de corantes de cianina. Todas as medidas de concentração foram efectuadas após remoção dos precipitados por centrifugação e dissolução de pequenas alíquotas dos agentes reguladores de osmolaridade contendo corantes de cianina em etanol para análise espectrofluorométrica. Os corantes utilizados foram o DiSC<sub>14</sub>(5) e o DiOC<sub>14</sub>(3), e os agentes reguladores de osmolaridade encontravam-se em concentrações iso-osmóticas. As reduções na intensidade de fluorescência na solução padrão de etanol, correlacionam-se directamente com reduções na solubilidade do corante de cianina.

TABELA II

<u>Agente Regulador de Osmolaridade</u>	<u>Intensidade relativa de Fluorescência (CONC)</u>	
	<u>DiSC<sub>14</sub>(5)</u>	<u>DiOC<sub>14</sub>(3)</u>
Etanol	100	100
Glucose	31	100
Frutose	35	100
Sorbose	40	100
Sacarose	41	100
Xilose	36	19-52
Ribose	24	100
Lixose	0,12	1,8
Glicina	31	93
Arginina	17	17,2
Glicerol	39	99,5
Inositol	42	92
Xilitol	34	76,4
Manitol	29	*
Adonitol	34	ND

-13-

TABELA II (Continuação)

<u>Agente Regulador de Osmolaridade</u>	<u>Intensidade relativa de Fluorescência (CONC)</u>	
	<u>DiSC<sub>14</sub>(5)</u>	<u>DiOC<sub>14</sub>(3)</u>
Ácido tris(hidroximetil)-metilaminopropanosulfônico (TAPS)	18	ND
Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico (CAPS)	40	ND
Ácido N-(2-hidroxietil)piperzina-N-3-propanosulfônico (EPPS)	18	ND
Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-hidroxiopropanosulfônico (HEPPSO)	20	ND
Ácido 3-N,N-bis(2-hidroxietilamino)-2-hidroxiopropanosulfônico (DIPSO)	43***	ND
NaCl	6	1,7
Solução Salina Tamponada com fosfato	2,1	6,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,4	1,6
NaI	1,1	0,14
Cloreto de Colina	11**	6,3
Iodeto de Colina	0,16	2,3

\* Precipita em etanol, não foi possível obter resultados.

\*\* Artefacto devido à existência de cristais grandes que não pelotizaram.

\*\*\* Precipita em etanol (resultados questionáveis).

ND-Não determinado.

-14-

Como se pode verificar na Tabela II, os corantes de cianina são muito menos solúveis na presença de sais clássicos que na presença de açúcares, excepto lixose, açúcar-álcoois, aminoácidos e dos tampões de Good; TAPS, HEPPSC, DIPSO, CAPS e EPPS. Adicionalmente, determinou-se a estabilidade das soluções de DiSC<sub>14</sub>(5) em açúcares como glucose, frutose, ribose, sorbose, sacarose e xilose, açúcar-álcoois como glicerol, inositol, xilitol e adonitol, e aminoácidos como glicina e arginina. O corante de cianina mostrou ser estável nas soluções testadas durante pelo menos vinte minutos, tempo este que é suficiente para uma marcação reprodutível, e em muitos dos agentes a quantidade de corante de cianina não tinha diminuído significativamente ao fim de sessenta minutos.

Mais ainda avaliou-se a solubilidade dos corantes de cianina num meio contendo sais clássicos e reguladores de osmolaridade nos quais os corantes são solúveis. A solubilidade do DiSC<sub>14</sub>(5) numa solução de glucose iso-osmótica não foi significativamente afectada pela diluição com água destilada. A solubilidade do DiSC<sub>14</sub>(5) na solução de glucose iso-osmótica, no entanto reduziu-se significativamente pela diluição com apenas cerca de 20% de solução de cloreto de sódio iso-osmótica. Assim, a marcação reprodutível de células com corantes de cianina pode ser efectuada num meio contendo não mais que pequenas quantidades de sais clássicos, como cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, acetato de sódio, acetato de potássio, sulfato de sódio, iodeto de sódio, cloreto de colina ou iodeto de colina e é de preferência efectuada num meio em que não se utilizem sais clássicos para regular a osmolaridade.

As células marcadas com corantes de cianina usando o processo do presente invento foram analisadas para determinar o efeito de marcação na viabilidade das células. Células V79 postas à disposição pelo American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, e descritas em Prescott, D. M., Ann. New York Acad. Sci., 397:101-109 (1982), foram co-

-15-

radas com uma solução contendo  $\text{DiOC}_{14}(3)$  a uma concentração de  $10^{-5}$  ou  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$  e as cinéticas de crescimento das células marcadas foram comparadas com células não coradas e com uma mistura em partes iguais de células marcadas e não marcadas. O tempo de duplicação das células não foi afetada pela marcação com corante de cianina. Assim, a marcação não teve qualquer efeito no crescimento celular. Por outro lado vários outros testes padrão de viabilidade celular, tais como Exclusão do azul de Tripano e Exclusão do iodeto de Propídio, confirmaram uma ausência de efeito da marcação com corantes de cianina de acordo com os processos descritos sobre a viabilidade das células.

O efeito da marcação com corantes de cianina na viabilidade das células foi também determinado por medição da fragilidade dos glóbulos vermelhos. Suspenderam-se glóbulos vermelhos, marcados e não marcados, em meio de cloreto de sódio com várias forças osmóticas obtidas por variação da concentração de sal. As distribuições volumétricas dos glóbulos foram medidas utilizando um Coulter Counter<sup>®</sup> munido de um acessório de estreitamento. Determinaram-se os volumes médios e representaram-se graficamente os valores obtidos para cada concentração de sal, verificando-se que os volumes aumentam com a diminuição da concentração de sal até aproximadamente 0,5 g/100 ml, concentração para a qual o volume apresenta uma queda brusca. Neste ponto os glóbulos vermelhos entram em lise. Mais ainda, as variações de volume foram as mesmas quer os glóbulos estivessem marcados com corante de cianina, quer não.

De forma semelhante, analisou-se a hemólise em amostras paralelas como função da concentração de cloreto de sódio. Depois de os glóbulos vermelhos terem sido colocados em cloreto de sódio, durante aproximadamente 2-3 minutos, centrifugaram-se as soluções para peletizar as células que não tivessem sofrido lise. As soluções sobrenadantes foram então submetidas a análise espectrofotométrica para determinar as concentrações de hemoglobina. A percentagem de lise

é determinada por comparação das concentrações de hemoglobina de cada uma das amostras com um controlo de lise total. A concentração de hemoglobina livre era relativamente baixa até se atingir aproximadamente a concentração de 0,5 gramas de cloreto de sódio por 100 ml, altura em que a hemoglobina é imediatamente liberta. Por comparação com os resultados de fragilidade dos glóbulos vermelhos, as variações de volume encontram-se directamente correlacionadas com a libertação de hemoglobina. Mais ainda, a libertação de hemoglobina foi a mesma em células marcadas e não marcadas.

Para testar in vivo a estabilidade das células marcadas com corante de cianina de acordo com o processo do presente invento, retiraram-se glóbulos vermelhos de rato, marcaram-se com  $\text{DiSC}_{14}(5)$  e re-inseriram-se os glóbulos no rato. Em seguida, retiraram-se periodicamente amostras de sangue que foram analisadas para determinação da percentagem de glóbulos marcados e da intensidade de fluorescência dos glóbulos marcados. O número de glóbulos vermelhos em circulação diminuiu linearmente em função do tempo e o tempo de vida das células marcadas medido, 52 dias, correlaciona-se razoavelmente com o tempo de vida médio, 40 a 60 dias, estabelecido para os glóbulos vermelhos de ratos. Assim, a marcação com corante de cianina não afecta a velocidade de clarificação dos glóbulos vermelhos.

Em todos, menos um, dos cinco ratos testados, a intensidade de fluorescência dos glóbulos marcados mantinha-se essencialmente inalterada 60 dias após a marcação e re-injecção. No quinto animal, não mais de 20% do corante de cianina tinha migrado para fora dos glóbulos marcados após 60 dias na circulação do rato. Estes resultados, combinados com os resultados de cultura de tecido que mostram a inexistência de transferência de corante de células marcadas para não, marcadas, demonstram que as células são marcadas de forma estável com os corantes.

As células viáveis marcadas com corantes de cianina de acordo com os processos do presente invento, são utilizadas em numerosas aplicações que requerem a capacidade de distinguir

-17-

múltiplas subpopulações de uma população de células. Por exemplo, para determinar se as reduções pós-transfusionais de glóbulos vermelhos no resultado do hematócrito resultam de perdas de sangue ou de reacção imunológica para as células obtidas por transfusão, marca-se uma alíquota das células, antes da transfusão, de acordo com o processo do presente invento e determina-se, imediatamente após a transfusão, a fracção de glóbulos vermelhos marcados em circulação. Em seguida, quando se encontra uma queda do hematócrito compara-se a fracção de glóbulos marcados com a obtida imediatamente após a transfusão e avaliam-se as velocidades relativas de redução para células marcadas e não marcadas. Reduções equivalentes para células marcadas e não marcadas indicam perdas de sangue causadas por sangramento, enquanto que reduções superiores de glóbulos marcados indicam uma reacção imunológica aos glóbulos obtidas por transfusão. Usando uma metodologia semelhante as reduções do número de plaquetas após uma transfusão de plaquetas, provocadas por sangramento podem ser distinguidas das reacções imunológicas às plaquetas obtidas por transfusão.

O processo do presente invento é também utilizado para determinar a velocidade de crescimento de células de mamíferos cultivadas. De cada vez que uma célula cultivada marcada se divide, o corante de cianina distribui-se igualmente entre as células filhas. Assim, utilizando técnicas de citometria de fluxo para comparar a intensidade de fluorescência das células após um dado período de crescimento com a intensidade de fluorescência imediatamente após a coloração, pode determinar-se o número de divisões celulares e, conseqüentemente, a velocidade de crescimento.

Os exemplos seguintes ilustram o presente invento e não pretendem de forma alguma limitar o âmbito do invento tal como acima definido e reivindicado adiante.

-18-

EXEMPLO 1Processo de marcação de células de cultura de tecidoI. Preparação das células

Utilizaram-se células de cultura de tecido em fase exponencial de crescimento para obtenção de melhores resultados. As culturas em suspensão são removidas do vaso de cultura e colocadas em tubos de centrifugação de polipropileno.

Quando se utilizam culturas de monocamada, os sobrenadantes devem ser removidos e as células aderentes lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato isento de cálcio e magnésio, para remover do frasco as proteínas de soro. Adiciona-se uma solução de tripsina-EDTA (Gibco Laboratories, Grand Island, New York, = 610-5300) para cobrir o fundo do frasco e deixa-se este a incubar à temperatura ambiente até que a monocamada de células se desprenda e desagregue. A suspensão celular resultante é transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno e adiciona-se um volume igual de meio de cultura contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Hazelton) para parar a acção enzimática da tripsina. As células são centrifugadas a 400xg durante dez minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes são removidos por aspiração e adiciona-se em sua substituição um volume igual de manitol iso-osmótico para re-suspender as pelotas celulares. Esta lavagem com manitol destina-se a remover as proteínas do plasma da suspensão celular e a preparar as células para a marcação. As células são novamente centrifugadas a 400xg durante dez minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes são removidos por aspiração e a pelota celular resultante é novamente suspensa numa solução de manitol com uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml para marcação. Alguns tipos de células, no entanto são sensíveis ao uso de um açúcar-álcool (manitol); nesses casos pode utilizar-se uma solução de glucose iso-osmótica (PM 180,16; 54,05 g/l).

-19-

## II. Preparação de soluções de corante concentradas

São preparadas soluções com uma concentração de  $2 \times 10^{-3} M$ , em etanol absoluto, da forma seguinte:

DiO-C <sub>14</sub> (3)	PM 800 (1,600 mg/ml)
DiS-C <sub>14</sub> (5)	PM 814 (1,628 mg/ml)
DiO-C <sub>18</sub> (3)	PM 936 (1,872 mg/ml)
DiI-C <sub>14</sub> (5)	PM 850 (1,700 mg/ml)

Todos os corantes foram obtidos da Molecular Probes, Eugene, Oregon.

As soluções de corante foram sonicadas para assegurar a solubilização completa do corante e para minimizar a aderência aos tubos. Utilizam-se na preparação das soluções de corante tubos de poliestireno de forma a que se possa observar a solubilidade do corante. Para efectuar a marcação das células utilizam-se no entanto tubos de polipropileno uma vez que os corantes de cianina em meio aquoso são muito menos aderentes ao polipropileno que ao poliestireno.

## III. Coloração das células

A concentração das células é ajustada a  $2 \times 10^6$  células/ml em manitol iso-osmótico. Para corar as células adiciona-se às soluções a corar a solução de corante concentrada, com uma concentração de  $2 \times 10^{-3} M$  numa quantidade de  $5 \mu l$  de corante por cada ml de suspensão celular. A amostra a corar é pipetada ou agitada no vórtex para se misturar completamente. As células são incubadas com o corante durante dez minutos, após o que se remove uma pequena alíquota que é examinada num microscópio fluorescente para assegurar que ocorreu uma coloração intensa e uniforme. A série de corantes DiO requer filtros/<sup>de</sup>microscópio selectivos a uma radiação de excitação de 488 nm, enquanto que as séries de corantes DiS e DiI requerem uma excitação próxima dos 575 nm para observação de fluorescência.

Findo o período de incubação, adiciona-se um volume



-20-

igual de solução salina tamponada com fosfato (PBS) à suspensão de células coradas. As células são então centrifugadas a 400xg durante dez minutos a 20°C. O sobrenadante é aspirado e a pelota é novamente suspensa em PBS. Repete-se o processo de centrifugação e o sobrenadante resultante é observado para averiguação da presença de corante. Se o corante for visualizado no sobrenadante, a lavagem é repetida até não se detectar nos sobrenadantes qualquer vestígio de corante livre, por medição espectrofluorométrica. Após a lavagem final o sobrenadante é removido e a pelota é novamente suspensa com a concentração desejada num meio de cultura adequado. Todos estes processos são efectuados em condições de esterilização.

## EXEMPLO 2

### Coloração de Glóbulos Vermelhos

#### I. Preparação do reagente

##### A. Anticoagulante Citrato

1,66 g	Citrato de sódio
0,206 g	Ácido cítrico
0,140 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,61 g	Glucose

Os componentes acima listados são dissolvidos em 63 ml de água destilada e o pH da solução é ajustado a 5,6. A solução final é passada através de um filtro de 0,22 micron para esterilização.

##### B. Solução de Glucose Iso-Osmótica

Dissolvem-se 54,05 g de glucose em um litro de água destilada. A osmolaridade é verificada usando um osmómetro Fiske e ajustada a 320mOsm se necessário.

-21-

## II. Preparação de Corante Concentrado

Prepara-se uma solução concentrada de DiIC<sub>14</sub>(5)  $2 \times 10^{-3}$  M por dissolução de 1,628 mg/ml de corante em etanol absoluto. Pode ser necessário efectuar uma sonicação para solubilizar completamente o corante.

## III. Processo de Coloração

Todo o sangue é recolhido assépticamente em recipientes onde foi feito o vácuo contendo citrato de sódio ou numa seringa contendo o citrato anticoagulante, anteriormente preparado, numa quantidade igual a um décimo do volume total da seringa. Reserva-se uma pequena alíquota para citometria fluída ou testes de funcionalidade. O sangue é centrifugado a 100xg durante dez minutos à temperatura ambiente para pelotizar os glóbulos vermelhos. O plasma contendo plaquetas é removido e reservado e os glóbulos vermelhos são lavados por adição de glucose iso-osmótica numa quantidade igual a cinco vezes o volume da pelota compacto de glóbulos vermelhos. As células deverão então ser novamente centrifugadas a 100xg durante dez minutos à temperatura ambiente, com remoção do sobrenadante por aspiração. Esta lavagem que remove as proteínas do plasma e que permite uma coloração mais intensa e uniforme é repetida uma vez mais. Após a centrifugação final e aspiração do sobrenadante, os glóbulos vermelhos são re-suspensos em glucose iso-osmótica com uma concentração de  $4 \times 10^8$  células/ml.

Antes da adição do corante, a amostra é pipetada ou agitada no vórtice para assegurar que não ocorreu sedimentação. Adicionam-se quinze microlitros do DiSC<sub>14</sub>(5) concentrado (2mM em ETOH) a cada mililitro da suspensão de glóbulos vermelhos. A amostra é imediatamente misturada para assegurar a distribuição rápida e uniforme do corante em solução. Após cerca de cinco minutos remove-se uma pequena alíquota para observação microscópica. Desenha-se um círculo numa lâmina de vidro do microscópio usando um lápis de cera e coloca-se no interior desse círculo uma pequena amostra das cé-



-22-

lulas da solução corada. Cobre-se a lâmina com uma lamela e observa-se a amostra. A utilização do lápis de cera minimiza a transformação discócito-equinócito devida à lâmina de vidro e à lamela. A utilização de lâminas e lamelas de plástico evitará também esta transformação. Desta forma pode assegurar-se que a estrutura dos glóbulos vermelhos se mantém durante todo o processo de coloração ao mesmo tempo que se assegura uma coloração intensa e uniforme. As células deverão encontrar-se uniformemente coradas ao fim de cinco minutos pelo que não deverão ser necessários tempos de exposição superiores a dez minutos.

Após se determinar que as células se encontram uniformemente coradas, adiciona-se à suspensão corada um volume igual de solução salina tamponada com fosfato. As células são centrifugadas a 400xg durante dez minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante é removido. Existirão geralmente traços visíveis de corante livre nos sobrenadantes, após a centrifugação e portanto, o processo de lavagem com solução salina tamponada com fosfato, contendo cálcio e magnésio, deve ser repetido até que não se detecte corante livre no sobrenadante, por medição espectrofluorométrica.

Neste ponto as células podem ser suspensas numa solução apropriada para se efectuarem experiências, ou em plasma pobre em plaquetas para re-injecção num animal. Para a re-injecção o processo geral utilizado é a re-suspensão dos glóbulos vermelhos corados no volume de plasma recuperado na primeira centrifugação do sangue recolhido e que foi centrifugado a 400xg para remoção das plaquetas. Todos os processos são efectuados usando técnicas estéreis.

### EXEMPLO 3

#### Coloração de plaquetas

##### I. Preparação das Células

O sangue é recolhido em recipientes onde foi feito

-23-

vácuo, contendo citrato de sódio ou em seringas contendo o citrato de sódio anticoagulante, anteriormente preparado, numa quantidade igual a um décimo do volume total da seringa. As células são centrifugadas a 100xg durante dez minutos à temperatura ambiente para obter um plasma rico em plaquetas. Em todos os processos que envolvem plaquetas utilizam-se pipetas de plástico e tubos de centrífuga de polipropileno para evitar activação.

O plasma rico em plaquetas é aspirado e transferido para outro tubo de centrífuga. As plaquetas são então pelletizadas no plasma por centrifugação a 1000xg durante dez minutos a 20°C. O plasma é então recolhido e reservado quer para testes de funcionalidade quer para ser utilizado como meio de suspensão para re-injecção. Este plasma deverá ser girado a 400xg durante dez minutos para assegurar a remoção de quaisquer plaquetas residuais, antes de ser utilizado como meio de re-suspensão, e é aqui referido como plasma pobre em plaquetas (PPP).

A pelota de plaquetas obtida na centrifugação a 1000xg deverá ser cuidadosamente re-suspensa num pequeno volume de citrato anticoagulante para obter uma suspensão de concentração uniforme. Finda esta operação pode adicionar-se glucose iso-osmótica como diluente, numa quantidade igual ao plasma originalmente presente. As plaquetas são então centrifugadas a 300xg durante cinco minutos e os sobrenadantes são removidos por aspiração. Esta lavagem com glucose remove as proteínas residuais do plasma e permite uma coloração mais intensa e uniforme. A pelota de plaquetas é re-suspensa na solução de glucose e encontra-se pronta para a coloração.

A concentração de plaquetas é ajustada a  $4 \times 10^8$  células/ml e adicionam-se 15  $\mu$ l do DiOC<sub>14</sub>(3) em "stock" (2mM em ETOH absoluto) por cada ml de suspensão de plaquetas. A suspensão é imediatamente, mas suave e cuidadosamente, misturada para assegurar uma distribuição uniforme do corante. As plaquetas são observadas, usando um microscópio fluorescen-



-24-

te, para assegurar que ocorreu uma coloração uniforme e se tal se verificar as plaquetas estão agora em condições de ser separadas do corante livre em suspensão.

## II. Utilização de uma coluna Sephadex G-100 para separação de plaquetas coradas

A Sepharose 2B tem sido tradicionalmente utilizada para isolar plaquetas de plasma rico em plaquetas. Verificou-se que o Sephadex G-100 é também eficiente para isolar plaquetas. Esta técnica é aplicada com a tecnologia de coloração e funciona da seguinte maneira. Carrega-se para a coluna uma suspensão de plaquetas-corante. As moléculas de corante de pequeno peso molecular são retidas no meio das partículas do enchimento enquanto que as plaquetas, sendo maiores, passam directamente através da coluna. Desta forma, o Sephadex G-100 pode ser utilizado para separar plaquetas fluorescentemente coradas, do corante livre em suspensão.

### A. Preparação da Coluna

O Sephadex G-100 (Pharmacia Laboratories Piscataway, New Jersey) é hidratado de acordo com as instruções do fabricante, e lavado com acetona (100%) na preparação para uso como meio de separação de plaquetas. O processo de lavagem é efectuado por centrifugação do Sephadex a 300xg durante dez minutos à temperatura ambiente, remoção do sobrenadante e re-suspensão numa solução salina equilibrada de Hantes ("Hantes Balanced Salt Solution"). O Sephadex deverá ser repetidamente lavado com solução salina equilibrada de Hantes até não se detectar qualquer odor de acetona. A solução resultante é desgaseificada por inserção num banho de água em ebulição por vácuo.

A lama de Sephadex é então utilizada para encher a coluna. Como suporte da coluna utiliza-se uma seringa de 10 cc sem êmbolo. Liga-se ao eixo da seringa um tubo de silicone e utiliza-se uma pinça ajustável para regular o cau-

-25-

dal de fluido através da coluna. Utiliza-se um crivo de nylon com quarenta e sete micra de malha como suporte na base da seringa para reter o leito de Sephadex. Deverão evitar-se as colunas convencionais de vidro com suportes filtrantes constituídos por pedaços de vidro uma vez que estes poderão activar as plaquetas. A coluna é cheia com Hantes e adicionam-se pequenas quantidades da lama/<sup>de</sup>Sephadex. A pinça é suficientemente aberta para permitir a passagem de um caudal pequeno mas consistente. Esta operação compacta uniformemente o Sephadex e evita a formação de canais e de poros cheios com ar. A operação de adição de HBSS e lama de Sephadex é repetida até se obter a altura de enchimento desejada. A coluna deve ser completamente inundada com HBSS (2 volumes vazios) antes de ser utilizada.

#### B. Separação de Plaquetas

A suspensão de plaquetas e corante é cuidadosamente acamada sobre o Sephadex. A pinça na base da coluna deverá encontrar-se aberta de forma a permitir que o nível de fluido na coluna desça até alcançar o topo do fluido de Sephadex. Nesta altura deverá aumentar-se o caudal para permitir que a suspensão penetre no Sephadex. Quando o nível atinge o topo do Sephadex deve diminuir-se novamente o caudal. Adiciona-se então cuidadosamente HBSS suficiente ao topo da coluna de forma a criar um tampão que permita efectuar facilmente adições posteriores de HBSS sem perturbar o Sephadex. Nesta altura aumenta-se novamente o caudal na coluna. A utilização deste processo permite que a suspensão de plaquetas forme uma banda estreita no gel, migrando com uma velocidade razoavelmente uniforme ao longo do comprimento da coluna. Desta maneira obtém-se um eluente com maior concentração de plaquetas. O fluxo através da coluna deverá ser continuado recolhendo-se fracções de 0,5 a 1,0 ml. As fracções contendo plaquetas serão visíveis pela sua opacidade e podem ser reunidas. As fracções reunidas são então centrifugadas a 300xg durante dez minutos. O sobrenadante é aspirado e a pelota pode ser re-suspensa num



-26-

meio adequado para efectuar experiências ou análises, ou em plasma pobre em plaquetas para determinações de funcionalidade ou re-injecção.

As concretizações preferidas do presente invento são ilustradas pelo que acima ficou exposto, no entanto, o invento não é limitado pelas ilustrações aqui descritas e reserva-se o direito de todas as modificações no âmbito das reivindicações seguintes.

-27-

REIVINDICAÇÕES

1 - Método para a marcação de células viáveis com um corante de cianina, caracterizado por compreender a obtenção de uma solução de corante de cianina com uma concentração até cerca de  $10^{-3}$ M, a obtenção de células viáveis para serem marcadas, a dispersão das células viáveis num meio contendo um agente regulador de osmolaridade que não afecta significativamente a viabilidade das células e que proporciona uma marcação celular reprodutível e, o contacto das células viáveis com uma quantidade de solução de corante de cianina suficiente para marcar as células viáveis com um corante de cianina.

2 - Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente regulador de osmolaridade ser um açúcar, um açúcar-álcool, um aminoácido, ou um tampão de Good ou uma combinação destes compostos.

3 - Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o meio ser iso-osmótico.

4 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a célula ser um glóbulo vermelho.

5 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a célula ser um glóbulo branco.

6 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a célula ser uma plaqueta.

7 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o agente regulador de osmolaridade ser um açúcar.

8 - Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o açúcar ser a glucose.

-28-

9 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o agente regulador de osmolaridade ser um açúcar-álcool.

10 - Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o açúcar-álcool ser o manitol.

11 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o agente de osmolaridade ser um aminoácido.

12 - Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o aminoácido ser a glicina.

13 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o agente regulador de osmolaridade ser um tampão de Good.

14 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o tampão de Good ser o HEPPSO (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-hidroxiopropanossulfônico).

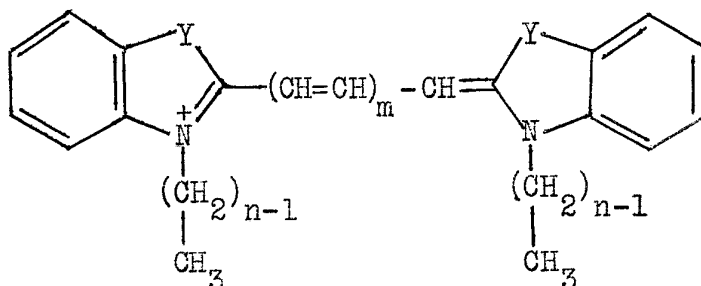
15 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o tampão de Good ser o EPPS (ácido N-(2-hidroxietil)piperazino-N'-3-propanossulfônico).

16 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o tampão de Good ser o TAPS (ácido tris(hidroximetil)metilaminopropanossulfônico).

17 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o tampão de Good ser o CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfônico).

18 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o tampão de Good ser o DIPSO (ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanossulfônico).

19 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o corante de cianina ser DiSC<sub>14</sub>(5) ou seja o composto possuindo a fórmula



na qual

Y é enxofre;

m é 2; e

n é 14

20 - Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o corante de cianina ser DiOC (3), composto com a fórmula apresentada na reivindicação anterior, na qual

Y é oxigénio;

m é 1; e

n é 14.

21 - Processo de preparação de uma composição eficaz para marcação de células viáveis com um corante de cianina, caracterizado por se dissolver um corante de cianina numa concentração de até  $10^{-3}M$ , num agente regulador de osmolaridade que não afecta significativamente a viabilidade das células.

22 - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o agente regulador de osmolaridade ser um açúcar, um açúcar-álcool, um aminoácido, ou um tampão de Good ou uma combinação destes compostos.

-30-

23 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o açúcar ser a glucose.

24 - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o açúcar-álcool ser o manitol.

25 - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o aminoácido ser a glicina.

26 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o tampão de Good ser HEPPSO, EPPS, TAPS, CAPS, ou DiPSC.

27 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o corante de cianina ser o DiSC<sub>14</sub>(5) ou o DiOC<sub>14</sub>(3).

28 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a célula ser uma célula de tecido de cultura.

Lisboa, 29. OUT. 87

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -

