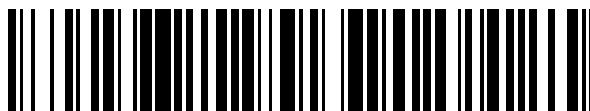


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 711**

51 Int. Cl.:
C12M 1/22 (2006.01)
C12M 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04805559 .4**
96 Fecha de presentación: **26.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1687395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Cajas bioactivas para cultivos celulares**

30 Prioridad:
28.11.2003 FR 0313993

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.06.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
CENTRE DE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE DU
MANS y
UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE**

72 Inventor/es:
**NAGEL, Marie-Danielle y
LEGEAY, Gilbert**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 382 711 T3

DESCRIPCIÓN

Cajas bioactivas para cultivos celulares.

5 La presente invención tiene como objeto unas cajas bioactivas para cultivos celulares, y sus usos para la puesta en práctica de procedimientos para el estudio del envejecimiento celular, de la diferenciación celular y de la apoptosis, de procedimientos de cribado de moléculas antiedad, de procedimientos de cribado de moléculas antitumorales, de procedimientos de diagnóstico *in vitro* de la malignidad de las células tumorales y por lo tanto de procedimientos de diagnóstico *in vitro* de tumores, o de procedimientos de estudios que se refieren a las investigaciones sobre la
10 señalización que regula la morfología, la bioadhesión, la proliferación celular y la comunicación intercelular.

Los estudios de los inventores se centraron inicialmente en la utilización de membranas de cuprofano que se colocaban en el fondo de las cajas de Petri, después se ensayaron los revestimientos PVP (polivinilpirrolidona), HEC (hidroxietilcelulosa), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y CMC (carboximetilcelulosa). Las ventajas e inconvenientes
15 de dichos materiales se resumen a continuación.

1) la membrana de cuprofano

Características principales:

- 20
- Estabilidad: 48 horas
 - Morfología celular agregada (formación de agregados celulares) y/o redondeados
 - 25 - Resulta conveniente para los estudios de señalización celular a los 45, 90 y 180 minutos (Faucheux *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, y 2002, y Duval *et al.*, 1999)
 - proliferación celular reducida
 - 30 - inductora de la apoptosis (principalmente sobre los fibroblastos Swiss 3T3).

Principales inconvenientes:

- 35
- difíciles de utilizar (pliegues),
 - imposibilidad de transferencia a nivel industrial,
 - ya no se fabrican comercialmente.

2) revestimiento de PVP

40 Características principales:

- morfología celular extendida (resultados idénticos a los obtenidos sobre el control poliestireno (PS))

45 Por lo tanto, este revestimiento es inutilizable.

3) revestimiento de HEC

Características principales:

- 50
- Estabilidad: 48 horas
 - morfología celular agregada
 - proliferación celular ligeramente reducida

Principales inconvenientes:

- 55
- dificultad de puesta en práctica para tener un depósito regular sobre el soporte

4) revestimiento de HPMC

60 Características principales:

- 65
- Estabilidad: 48 horas
 - morfología celular agregada
 - proliferación celular reducida

- revestimiento que cubre bien y de forma homogénea y fácil de aplicar
- revestimiento utilizable para la inyección de células agregadas a los 90 minutos (cuprofano desfavorable debido a los pliegues) por ejemplo, estudio de funcionalidad de las juntas comunicantes mediante la inyección de amarillo de Lucifer.

Su principal inconveniente radica en el hecho que no permite la activación de las células por un tiempo superior a algunas horas.

5) revestimiento de CMC

Características principales:

- Estabilidad: 48 horas y más
- morfología celular agregada y/o redondeada
- proliferación celular reducida

Inconveniente: recubrimiento incompleto del soporte: un anillo de PS resulta accesible para las células en la periferia (puesta en práctica bastante difícil, poco industrializable).

La presente invención deriva de la puesta en evidencia por parte de los inventores de que la bicapa HPMC (o alcohol polivinílico (PVA))-CMC permite paliar los inconvenientes de los revestimientos estudiados anteriormente.

Las ventajas de la bicapa HPMC o PVA sobre CMC son las siguientes:

- Revestimiento que cubre fácilmente y fácil de fabricar
- Estabilidad: por lo menos 5 días
- Esterilizable
- Morfología celular agregada (fibroblastos Swiss 3T3, L929, melanomas, líneas de osteoblastos como MC 3T3 E14 y MC 3T3 E1 24) o redondeadas (fibroblastos humanos)
- Proliferación celular reducida (melanomas B16C3, B16F0, B16F10), MC 3T3-, fibroblastos murinos Swiss 3T3 y L929.
- Diferenciación de las células control mediante la síntesis de melanina y una actividad tirosinasa aumentada para las 3 líneas de melanoma.
- Apoptosis inducida a las 24 y 48 horas: actividad caspasa 3 aumentada a las 24 y 48 horas y actividad caspasa 9 aumentada a las 6 horas para los fibroblastos Swiss 3T3.

La presente invención tiene como objeto unas cajas bioactivas para cultivos celulares que presentan en el fondo una bicapa que comprende una capa primaria interna de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o de alcohol polivinílico (PVA), en contacto con el fondo de las cajas, y una capa bioactiva externa de carboximetilcelulosa situada sobre dicha capa interna.

Las cajas bioactivas mencionadas anteriormente de la invención se caracterizan además porque se presentan en forma de cajas de Petri, como las cajas de petri en poliestireno de origen comercial, o en forma de placas con varios pocillos, en el fondo de las cuales se sitúa la bicapa.

Ventajosamente, las capas bioactivas mencionadas anteriormente en la invención se caracterizan porque los grosores de la capa interna de HPMC o de PVA, y de la capa externa de CMC, son de algunas micras, principalmente de 1 a 5 micras.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de cajas bioactivas como las mencionadas anteriormente, caracterizada porque comprende:

- una etapa de activación de la superficie del fondo de las cajas mediante descargas electromagnéticas,
- el depósito de la capa interna de HPMC sobre el fondo de las cajas y después el secado,
- el depósito de la capa bioactiva externa sobre la capa primaria seca obtenida mediante la etapa anterior, después secado.

La invención tiene como objeto asimismo la utilización de cajas bioactivas como las definidas anteriormente, para poner en práctica:

- 5 - unos procedimientos de estudio del envejecimiento celular, de la diferenciación celular y de la apoptosis,
- unos procedimientos de cribado de moléculas antiedad destinadas a prevenir y retrasar los efectos del envejecimiento,
- 10 - unos procedimientos de cribado de moléculas antitumorales destinadas al tratamiento de los cánceres (búsqueda de un efecto potenciador o acumulativo en relación con el efecto inductor del revestimiento),
- unos procedimientos de diagnóstico *in vitro* de la malignidad de las células tumorales midiendo la capacidad residual de las células cancerosas para diferenciarse, y para entrar en apoptosis y por lo tanto de procedimiento
- 15 de pronóstico *in vitro* de tumores,
- o unos procedimientos de estudios que se refieren a investigaciones sobre la señalización que regulan la morfología, la bioadhesión, la proliferación celular y la comunicación intercelular.

20 La invención tiene como objeto más particularmente un procedimiento de estudio del envejecimiento celular, la diferenciación celular y de la apoptosis, caracterizado porque comprende:

- una etapa de cultivo de las células a estudiar en las cajas definidas anteriormente,
- 25 - la observación de las células mediante microscopio para estudiar su morfología,
- y/o la detección, incluso la cuantificación, de una diferenciación celular, mediante la proliferación celular, de las proteínas sintetizadas, de los marcadores de membrana específicos expresados,
- 30 - y/o la detección, incluso la cuantificación, de la apoptosis de las células, midiendo la viabilidad (ensayo de exclusión al azul de tripán) de la activación de las caspasas (procedimientos fluorométricos o colorimétricos, transferencia western), de la fragmentación de la cromatina (ensayo TUNEL) o de la formación de cuerpos apoptóticos (coloración de Hoechst).

35 La invención tiene asimismo como objeto un procedimiento de cribado de las moléculas antiedad destinadas a prevenir y a retrasar los efectos del envejecimiento, caracterizado porque comprende:

- una etapa de cultivo de células, como los fibroblastos, en presencia de las moléculas antiedad que se deben estudiar, en las cajas de cultivo definidas anteriormente,
- 40 - la observación de las células mediante microscopio para estudiar su morfología,
- y/o la detección, incluso la cuantificación, de la proliferación, de síntesis, principalmente de las proteínas celulares como el colágeno,
- 45 - y la comparación con las observaciones y resultados obtenidos en cultivos de células utilizadas como control, dichos cultivos control se preparan cultivando dichas células en ausencia de dichas moléculas antiedad a estudiar, en las cajas definidas anteriormente.

50 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de cribado de moléculas antitumorales destinadas al tratamiento de los cánceres, caracterizado porque comprende:

- una etapa de cultivo de las células, como unas células de melanoma animales u humanas, en presencia de moléculas antitumorales que se deben estudiar, en las cajas de cultivo definidas anteriormente,
- 55 - la observación de las células al microscopio para estudiar su morfología y su diferenciación (melanogénesis),
- y/o la detección, incluso la cuantificación, de su proliferación, diferenciación (detección de la síntesis de melanina y actividad tirosinasa, síntesis de fibronectina, de la expresión de marcadores tumorales como MelCam, la expresión de cadherinas (evidenciada mediante transferencia western, por ejemplo) y de la apoptosis (estudio de las actividades caspasas por espectrofluorimetría, transferencia western por ejemplo y otros procedimientos como TUNEL, coloración de Hoechst....)
- 60 - y la comparación con las observaciones y resultados obtenidos sobre unos cultivos celulares utilizados como controles, dichos cultivos control se pueden llevar a cabo mediante el cultivo de dichas células en ausencia de dichas moléculas antitumorales que se deben estudiar, en las cajas de los cultivos definidas anteriormente.
- 65

La invención tiene asimismo como objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la malignidad de las células tumorales que mide la capacidad residual de las células cancerosas para diferenciarse, caracterizado porque comprende:

- una etapa de cultivo de células cancerosas, como unas células de melanomas humanos obtenidos a partir de biopsias, en las cajas de cultivo definidas anteriormente;
- La observación al microscopio de las células para estudiar su morfología y diferenciación, y/o la detección es decir la cuantificación, de su proliferación (detección de la síntesis de melanina intracelular según el procedimiento descrito por De Pauw-Gillet *et al* (*Anticancer Research* 1990, 10, 391-96), de la actividad tirosinasa (procedimiento de dosificación utilizado descrito por Steinberg *et al* (*J Cell. Physiol.*, 1976, 87, 265-76), de fibronectina (inmunocitoquímica, RT-PCR)), de su viabilidad y de la apoptosis.

La invención se refiere asimismo a la aplicación del procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente al pronóstico *in vitro* de tumores.

La invención tiene asimismo como objeto unos procedimientos de estudio que se refieren a las investigaciones de señalización celular (vías del AMPc y de los MAPK en particular), sobre la morfología, la bioadhesión (en relación con el estado de activación o de inactivación de las integrinas), la proliferación, la comunicación intercelular (detección de cadherinas, conexinas, integrinas), a partir de unos procedimientos diferentes como las observaciones microscópicas, transferencia, RT-PCR, citometría de flujo, inmunomarcajes, inyección de amarillo de lucifer en los agregados, dichos procedimientos se realizan cultivando unas células que se deben estudiar en las cajas de cultivo definidas anteriormente, la observación y medida de los eventos anteriormente.

La invención se ilustrará con mayor detalle a partir de la descripción detallada siguiente de un procedimiento de obtención de una placa de cultivo que comprende una bicapa como la que se ha definido anteriormente según la invención, así como su utilización en el contexto del cultivo de las células.

1) Descripción experimental de la realización de los revestimientos de las placas de Petri

Los estudios se han realizado con unas cajas de origen comercial, generalmente en poliestireno. Pueden ser de tamaño pequeño, mediano o grande. Pueden ser asimismo unos sistemas de varios pocillos.

Los estudios se realizan con unas placas procedentes de Greiner® Bio One.

Las placas se utilizan tal como están (no se produce lavado previo que puede contaminar o alterar el estado de la superficie).

Los tratamientos se llevan a cabo en varias etapas que se realizan en "una sala limpia o sala blanca".

1) Activación de la superficie mediante descargas electromagnéticas (plasma, descargas corona)

Por ejemplo, en el plasma se utiliza un sistema RF 13,56 MHz, con un reactor de aproximadamente 20 litros de capacidad. Se procede de la manera siguiente:

Los objetos se colocan en el interior del reactor, después se aplica el vacío (hasta aproximadamente 1 Pa), después se introduce el gas, por ejemplo oxígeno hasta una presión parcial de 5 a 10 Pa. La descarga electromagnética se inicia y se mantiene (es automático) a un determinada potencia (por ejemplo 50 W) y durante 5 minutos.

Al final este periodo de tiempo, se recuperan las placas. La eficacia del tratamiento se aprecia mediante el efecto mojado utilizando el ensayo de la gota de agua (el ángulo de contacto es inferior a 25°).

2) Depósito de una capa (primaria)

En los minutos posteriores a la activación de la superficie se deposita una capa de polímero HPMC E4M a partir de una solución acuosa, que se habrá desgasificado para sacar el aire disuelto, a 0,2%/eppi. Las placas se llenan y después de vacían tras algunos instantes, se ponen a escurrir en un medio aireado y después se secan en una estufa ventilada a una temperatura de 50°C durante aproximadamente 1 hora.

La eficacia del tratamiento se aprecia mediante el efecto mojado con el ensayo de la gota de agua: el ángulo de contacto es del orden de 50 a 60°C.

3) Depósito de una capa bioactiva

La segunda capa del polímero CMC 7LF se deposita como se ha descrito anteriormente a partir de una solución

acuosa (agua ppi) anteriormente desgasificada, y a una concentración de 0,2%.

Después de escurrirla y secarla a una temperatura de 50°C las cajas se embalan ya sea individualmente o bien en lotes de 10 y bajo una corriente de nitrógeno.

5 Para el control de la calidad de la eficacia del tratamiento se aprecia por el efecto de mojado con el ensayo de la gota de agua: el ángulo de contacto se encuentra en el intervalo de 40 a 45°.

10 A continuación, las cajas obtenidas de este modo se designarán principalmente cajas untadas de celulosa o Cajas Bioactivas para Cultivo celular (BCB).

II) Aspectos biológicos

15 1) Preparación de las placas untadas de celulosa

Antes de su utilización, las placas untadas de celulosa se tratan durante 1 hora a la temperatura del laboratorio con una solución de antibióticos (penicilina, estreptomocina) al 1% en agua ultrapura. Después se enjuagan 3 veces con agua ultrapura.

20 Recientemente, las soluciones de HPMC y CMC se filtran de forma estéril antes de utilizarse para el recubrimiento. Entonces, las placas sólo se han sometido a un baño de agua ultrapura durante 1 hora a la temperatura del laboratorio antes de sembrarlas con las células.

25 Después de la esterilización de las cajas bioactivas para cultivo celular (BCB) con óxido de etileno y la desorción del gas según los procedimientos lento o acelerado utilizados clásicamente en la industria, los agregados celulares se pueden mantener en cultivo durante una semana si se les añade de nuevo medio completo al 3^{er} o 4^o día del cultivo.

2) Caracterización biológica del revestimiento

30 Después del tratamiento habitual seguido de 1 hora de incubación a una temperatura de 37°C en presencia de una solución de fibronectina (Fn) humana o bovina a una concentración de 3 µg/cm² y 3 lavados en agua ultra-pura, las placas se siembran con unas células y la morfología de estas últimas se observa después de 3 horas. La ausencia de extensión celular indica la ausencia de adsorción de Fn por parte la superficie celulósica.

35 Dicha observación se confirma mediante la ausencia de marcaje positivo si, después de incubarlos con suero, o con unas células de melanoma que secretan Fn, la placa untada con celulosa se somete a un inmunomarcado indirecto (anticuerpos primarios de conejo que reaccionan con la Fn bovina y la Fn murina, anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a rodamina). En las mismas condiciones, se obtiene un resultado positivo con el control PS.

40 3) Efecto inductor sobre las células adherentes: control poliestireno (PS) para el cultivo de células

Las células se cultivan en un medio suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina y 0,5% de antibióticos (penicilina, estreptomocina).

45 -a- morfología celular: se observa al microscopio invertido en contraste de fase, o un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM).

50 Se utilizan unas células redondeadas y agregadas (extendidas sobre PS): líneas murinas: fibroblastos Swiss 3T3, L929, melanomas B16 C3, B16 F0, B16 F10, osteoblastos MC 3T3 E1 con unos clones 4 y 24, células primarias de metástasis de melanomas B16F10 inducidas en ratones C57 Black 6.

55 La agregación de las células de melanoma B16 es dependiente de calcio: en ausencia de Ca⁺⁺ (medio sin suero, monencina, tetrandrina), el porcentaje de células aisladas aumenta significativamente para las 3 líneas después de 1 y 3 horas.

-b- proliferación: se siembran 10 000 células por cm². Las células se cuentan (hemocitómetro de Malassez) después de 24 y 48 horas de cultivo.

60 A las 24 horas, las diferencias eventualmente observadas entre el control PS y el revestimiento celulósico no son significativas.

Al contrario, a las 48 horas, las células sobre celulosa son 2 veces menos numerosas que las de PS.

Esto se ha comprobado con todas las líneas estudiadas.

65 Se debe destacar que las líneas B16 F0 y B16 F10 proliferan más sobre celulosa que la línea B16 C3, no

metastásica. El número de células B16 F0 y F10 se multiplica por 3 sobre la celulosa. Se multiplica por 6 sobre PS, en presencia o en ausencia de MSH 10^{-7} M (melanin stimulating hormone) utilizada como segundo control. El número de células B16 C3 se mantiene estable después de 48 horas sobre la celulosa, se multiplica por 2 sobre PS tanto en presencia como en ausencia de MSH.

5 Los cultivos en medio semisólido de explantes de metástasis inducidas en los ratones por inyección de células del melanoma B16 F10 (según la técnica descrita por Duval *et al.*; 1999. Cell & Materials, 9, 31-42) han demostrado, después de 14 días en contacto con las muestras BCB, una inhibición muy significativa de la proliferación de las células alrededor del explante, comparativamente a las manchas celulares ampliamente desarrolladas en contacto con unas muestras de PS control.

-c- viabilidad: ensayo de exclusión en azul tripán

15 Después de 48 horas de cultivo, la viabilidad de las células redondas y agregadas sobre la celulosa es inferior a la medida sobre PS (aproximadamente 94% sobre celulosa y 99% sobre PS).

La viabilidad de los osteoblastos MC3T3 E1 resulta muy afectada sobre BCB. El 50% de las células inicialmente sembradas ha desaparecido a las 24 horas, y 75% a las 48 horas (cf f-apoptosis).

20 -d- síntesis:

Proteínas totales por célula (dosificación mediante el procedimiento de Bradford, kit comercial): las líneas Swiss 3T3 y B16 muestran una síntesis aumentada después de 48 horas sobre la celulosa. Las otras líneas no se han estudiado.

25 Síntesis de Fn: las células agregadas sobre las células presentan un marcaje periférico positivo después de 3 horas aumenta a las 24 horas (inmunomarcaje indirecto que utiliza un anticuerpo primario anti Fn de ratón, no reactiva en relación con la Fn bovina). La MSH favorece también un aumento de la síntesis de FN que aparece bien localizada a nivel de los contactos celulares para las tres líneas de melanomas cultivados sobre PS.

30 Síntesis de melanina intracelular: según la técnica descrita por De Pauw-Gillet *et al* (*Anticancer Research* 1990, 10, 391-96).

35 Se observa un aumento significativo de la melanina intracelular después de 48 horas para las 3 líneas B16 agregadas sobre la celulosa. El efecto inductor del revestimiento celulósico sobre la síntesis de melanina es por lo menos equivalente o incluso superior al obtenido con MSH 10^{-7} M.

40 Este resultado se completa y se confirma por un aumento de la actividad tirosinasa en las 3 líneas cultivadas sobre celulosa a las 48 horas. El procedimiento de dosificación utilizado es el descrito por Steinberg *et al* (*J Cell. Physiol.* 1976, 87, 265-76). Incluso, los resultados son equivalentes o superiores a los medidos en presencia de MSH.

45 Unos cultivos en medio semisólido de explantes de metástasis inducidas en los ratones por inyección de las células B16 F10 han demostrado, después de 14 días en contacto con las muestras BCB, una carga importante de melanina de las células que se encuentran alrededor del explante, comparativamente con las manchas celulares amelanicas ampliamente desarrolladas en contacto con las muestras de PS control.

-e- expresión de proteínas de membrana: receptores y marcadores

50 Las cadherinas N Se evalúan por inmunomarcaje y por transferencia Westen. Las células agregadas sobre celulosa muestran un aumento de las cadherinas N. Sin embargo, una disminución de las β -cateninas (inmunoprecipitación y transferencia western) sugieren una pérdida de funcionalidad las cadherinas N expresadas sobre celulosa.

55 El marcador tumoral Mel-Cam, observable a partir de las células B16 F10 (transferencia western) cultivadas 48 horas sobre PS no se expresa más en la superficie de las células cultivadas al mismo tiempo sobre celulosa.

-f- Apoptosis: determinada midiendo la actividad de la caspasa 3 por fluorometría o western blot, y el procedimiento TUNEL (kit comercial).

60 La actividad caspasa 3 aumenta generalmente a las 24 y 48 horas en las células agregadas sobre celulosa. Este resultado se confirma mediante el ensayo TUNEL. Las células ensayadas son: los fibroblastos Swiss 3T3, los osteoblastos MC 3T3 E1, y las líneas de melanomas B16. Las otras líneas y cultivos primarios de metástasis inducidas por inyección de las células B16 F10 en los ratones se comprobarán a continuación.

65 Unos ensayos complementarios por marcado en la Anexina V en citometría de flujo han demostrado una supervivencia prolongada de las células de melanomas B16 a 5 y 8 días e incluso más para las B16 C3. Por el contrario, los osteoblastos de la línea MC3T3 entran muy tempranamente en apoptosis (antes de 24 horas de

cultivo).

Por lo tanto, los BCB evidencian unas sensibilidades diferentes a la apoptosis según los tipos celulares analizados.

- 5 Unos explantes de metástasis inducidas en el ratón por inyección de células B16 F10, cultivadas 14 días en un medio semisólido, han demostrado al ponerlas en contacto con unas muestras de BCB un porcentaje de células apoptóticas significativamente más elevado que lo que se establece a partir de los controles cultivados en contacto con PS (procedimientos utilizados: marcaje de la Anexina V en citometría de flujo y TUNEL).

10 **Conclusiones**

El efecto inductor es un efecto diferenciante: cf párrafos b, d, y e anteriores.

- 15 El material presenta una eficacia igual o superior a la MSH 10^{-7} M, agente diferenciador utilizado como control en los cultivos sobre PS.

El revestimiento es inductor de apoptosis en unas células normales y cancerosas: cf párrafos c y f anteriores.

- 20 Ensayo de cultivo prolongado: 5 días, realizado con unas B16 C3.

Resultados concluyentes: gran masa muy melánica, mantenimiento del estado agregado.

Referencias bibliográficas

- 25 - FAUCHEUX, N., WAROCQUIER-CLEROUT, R., HAYE, B., NAGEL, M-D.: 1998. "Cyclic AMP in cells adhering bioincompatible (cuprophan) and biocompatible (AN 69) substrates." J. Biomed. Mat. Res., 39, 506-510.
- 30 - DUVAL, J-L., FAUCHEUX, N., WAROCQUIER-CLEROUT, R., NAGEL, M-D.: 1999. "Study of melanoma cell behavior in cell and organ cultures in vitro: use of biomaterials as potential tools of cell activation." Cell & Materials, 9, 31-42.
- 35 - FAUCHEUX, N., WAROCQUIER-CLEROUT, R., DUVAL, J-L., HAYE, B., NAGEL, M-D.: 1999. "cAMP levels in cells attached to AN 69 and Cuprophan: cAMP dependence of cell aggregation and the influence of serum." Biomaterials, 20, 159-165.
- 40 - FAUCHEUX, N., HAYE, B., NAGEL, M-D.: 2000. "Activation of cyclic AMP in cells adhering to biomaterials: regulation by vitronectin and fibronectin-integrin binding". Biomaterials, 21, 1031-1038.
- 45 - FAUCHEUX, N., DUFRESNE, M., NAGEL, M-D.: 2002. "Organisation of cyclic AMP-dependent connexin 43 in Swiss 3T3 cells attached to a cellulosa substratum" Biomaterials, 23, 413-421.
- 50 - FAUCHEUX, N., CORREZE, C., N., HAYE, B., NAGEL, M-D.: 2001. "Accumulation of cyclic AMP in Swiss 3T3 cells attached to a cellulose biomaterial substratum through interaction with adenylyl cyclase." Biomaterials, 22, 2993-2998.
- 55 - FAUCHEUX, N., NAGEL, M-D.: 2002. "Cyclic AMP- dependent aggregation of Swiss 3T3 cells on a cellulose substratum (Cuprophan) and decreased cell membrane rho A." Biomaterials, 23, 2295-2301.
- FAUCHEUX, N., ZAHM J.M., BONNET N., LEGEAY G., NAGEL, M-D.: 2004. "Gap junction communication between cells aggregated on a cellulosa-coated polystyrene: influence of connexin 43 phosphorylation". Biomaterials, 25, 2501-2506.
- GEKAS J., HINDIE M., FAUCHEUX N., LANVIN O., MAZIÈRE C., FUENTES V., GOUILLEUX-GRUART V., DAVID B., MAZIERE JC., LASSOUED K., NAGEL MD.: 2004. "The inhibition of cell spreading on a cellulose substrate (Cuprophan) induces an apoptotic process via a mitochondria-dependent pathway." FEBS Lett., 563, 103-107.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cajas bioactivas para cultivos celulares que constan sobre su fondo de una bicapa que comprende una capa primaria interna de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), o de alcohol polivinílico (PVA), en contacto con el fondo de las cajas, y una capa bioactiva externa de carboximetilcelulosa (CMC) situada sobre dicha capa interna.
- 10 2. Cajas bioactivas según la reivindicación 1, caracterizadas porque se presentan en forma de cajas de petri, como las cajas de petri de poliestireno de origen comercial, o en forma de placas con múltiples pocillos, en el fondo de las cuales se sitúa la bicapa.
- 15 3. Cajas bioactivas según la reivindicación 1 o 2, caracterizadas porque los grosores de la capa interna de HPMC o de PVA, y de la capa externa de CMC, son de algunas micras, particularmente de aproximadamente 1 a 5 micras.
- 20 4. Procedimiento de preparación de las cajas bioactivas según una de las reivindicación 1 a 3, caracterizado porque comprende:
 - una etapa de activación de la superficie del fondo de las cajas mediante descargas electromagnéticas,
 - depositar la capa interna de HPMC sobre el fondo de las cajas, y secar a continuación,
 - depositar la capa bioactiva externa sobre la capa primaria seca obtenida en la etapa anterior, secar a continuación.
- 25 5. Utilización de las cajas bioactivas según una de las reivindicaciones 1 a 3, para poner en práctica:
 - los procedimientos de estudio del envejecimiento celular, de la diferenciación celular y de la apoptosis,
 - los procedimientos de cribado de moléculas antiedad destinadas a prevenir y retrasar los efectos del envejecimiento,
 - los procedimientos de cribado de moléculas antitumorales destinadas al tratamiento de los cánceres,
 - los procedimientos de diagnóstico *in vitro* de la malignidad de las células tumorales midiendo la capacidad residual de las células cancerosas para diferenciarse, y para iniciar la apoptosis y por lo tanto los procedimientos de pronóstico *in vitro* de tumores,
 - o los procedimientos de estudios que se refieren a las investigaciones sobre la señalización que regula la morfología, la bioadhesión, la proliferación celular y la comunicación intercelular.
- 35 6. Procedimiento de estudio del envejecimiento celular, de la diferenciación celular, y de la apoptosis, caracterizado porque comprende:
 - una etapa de cultivo de las células que se deben estudiar sobre las cajas definidas en una de las reivindicaciones 1 a 3,
 - observar las células al microscopio para estudiar su morfología,
 - y/o detectar, incluso cuantificar, una diferenciación celular, mediante la medición de la proliferación celular, de proteínas sintetizadas, de marcadores de membrana específicos expresados,
 - y/o detectar, incluso cuantificar, la apoptosis de las células, mediante la medición de la viabilidad, de la activación de las caspasas, de la fragmentación de la cromatina o de la formación de cuerpos apoptóticos.
- 40 7. Procedimiento de cribado de moléculas antiedad destinadas a prevenir y retrasar los efectos del envejecimiento, caracterizado porque comprende:
 - una etapa de cultivo de las células, tales como los fibroblastos, en presencia de unas moléculas antiedad que se deben estudiar, sobre las cajas de petri definidas en una de las reivindicación 1 a 3,
 - observar las células mediante microscopio para estudiar su morfología,
 - y/o detectar, incluso cuantificar, la proliferación, y la síntesis,
 - y comparar con las observaciones y los resultados obtenidos en los cultivos de las células utilizadas como control, realizándose dichos cultivos control cultivando dichas células en ausencia de dichas moléculas antiedad que se deben estudiar, sobre las cajas definidas en una de las reivindicaciones 1 a 3.

8. Procedimiento de cribado de moléculas antitumorales destinadas al tratamiento de cánceres, caracterizado porque comprende:

- 5 - una etapa de cultivo de las células, tales como las células de melanoma animales o humanas, en presencia de unas moléculas antitumorales que se deben estudiar, sobre las cajas definidas en una de las reivindicación 1 a 3,
- observar las células al microscopio para estudiar su morfología y su diferenciación,
- 10 - y/o detectar, incluso cuantificar, su proliferación, diferenciación y apoptosis,
- y comparar con las observaciones y resultados obtenidos en los cultivos de las células utilizadas como control, realizándose dichos cultivos control cultivando dichas células en ausencia de dichas moléculas antitumorales que se deben estudiar, sobre las cajas definidas en una de las reivindicaciones 1 a 3.

15 9. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la malignidad de células tumorales mediante la medición de la capacidad residual de las células cancerosas para diferenciarse, caracterizado porque comprende:

- 20 - una etapa de cultivo de células cancerosas, tales como unas células de melanomas humanos obtenidas a partir de biopsias, sobre las cajas de petri definidas en una de las reivindicaciones 1 a 3;
- observar al microscopio las células para estudiar su morfología y diferenciación, y/o detectar incluso cuantificar, su proliferación, la viabilidad y la apoptosis.

25 10. Aplicación del procedimiento de diagnóstico según la reivindicación 9, al pronóstico *in vitro* de tumores.