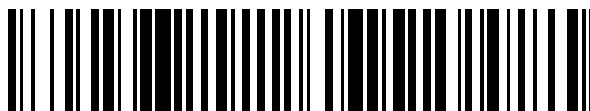


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 640**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008** **E 08800437 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 2342317**

54 Título: **Placa para gotas en suspensión**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ZURICH PROREKTORAT  
FORSCHUNG (100.0%)  
Rämistrasse 71  
8006 Zurich, CH**

72 Inventor/es:

**MORITZ, WOLFGANG;  
KELM, JENS;  
CLAVIEN, PIERRE-ALAIN y  
HOERSTRUP, SIMON PHILIP**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 401 640 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

## Placa para gotas en suspensión

De acuerdo con la parte genérica de la reivindicación 1 independiente, la presente invención se refiere a una placa para gotas en suspensión. Esta placa para gotas en suspensión comprende un cuerpo con una primera superficie y una segunda superficie que es esencialmente coplanaria a la primera superficie. La segunda superficie comprende al menos un área de contacto de gota para recibir de manera adherente un volumen líquido. En este volumen líquido, pueden cultivarse células o pueden producirse agregados moleculares. Este área de contacto de gota se diferencia de un área circundante por una estructura en relieve o un revestimiento hidrófobo selectivo que impide la dispersión del volumen líquido sobre la segunda superficie del cuerpo de la placa para gotas en suspensión.

Generalmente se acepta que las células cultivadas en una configuración 3D son fisiológicamente más relevantes que las células cultivadas en cultivos monocapa clásicos (véase, por ejemplo, Yamada y Cukiermann, Cell, 2007; Pamploni y col. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007). La coacción de células en tres dimensiones supone la quinta esencia de los problemas de diseño. Las tecnologías actuales se basan principalmente en el uso de materiales de soporte o apilamiento de monocapas para dar forma a las células. Sin embargo, a pesar del beneficio biológico, las tecnologías actuales del estado de la técnica no son rutinarias de laboratorio o se usan a una escala industrial para aplicaciones tales como descubrimiento de fármacos o ensayos de toxicidad dado que el proceso de cultivo celular es más complejo, lleva tiempo y requiere biomateriales adicionales. La re-agregación de células es una estrategia alternativa para empujar a las células hasta la tercera dimensión Sin embargo las tecnologías actuales de re-agregación se han constatado principalmente con líneas celulares neoplásicas y carecen de posibilidades de cocultivo controladas. Se ha demostrado que la tecnología de gotas en suspensión (HD, *Hanging Drop*) es un procedimiento universal que permite cultivar células en 3D con células neoplásicas así como primarias (véase Kelm y Fussenegger, 2004, Trends in Biotechnology Vol. 22, No. 4: 195-202). Las gotas del medio de cultivo celular con células en suspensión se colocan sobre una superficie de cultivo celular y la placa se invierte. Al no disponer de un sustrato sobre el que las células puedan adherirse, estas se acumulan en la parte inferior de la gota y forman un microtejido.

El cultivo de células en gotas que están suspendidas en una superficie es bien conocido por el experto en la técnica. A partir del documento DE 103 62 002 B4, se conoce, por ejemplo, la manera normal de depositar gotas de una suspensión celular en un medio nutriente con una pipeta sobre la superficie interna de una tapa de una placa de Petri. Después la tapa de la placa de Petri debe invertirse y colocarse sobre una placa base de placa de Petri apropiada. En la placa de Petri cerrada de esta manera, las gotas están suspendidas desde la superficie de la cubierta. Con frecuencia la placa de Petri contiene papel de filtro húmedo para proporcionar a las gotas en suspensión una atmósfera húmeda que impide que las gotas en suspensión se sequen. Una de las etapas más críticas de esta técnica de gotas en suspensión convencional es invertir la placa en la que las gotas están adheridas; por tanto, esta etapa crucial con frecuencia debe realizarla manualmente un investigador con experiencia.

A partir del documento WO 03/078700 A1, la aplicación de la técnica de gotas en suspensión se conoce para el cultivo de células madre y para la producción de cristales de proteínas. Las ventajas de la tecnología de gotas en suspensión comprende el hecho de que las sustancias que se están investigando están completamente rodeadas de medio nutritivo que proporciona todos los factores necesarios, tales como iones, factores de diferenciación, sustancias tóxicas etc. Además, se promueve la agregación de células (por ejemplo células madre) ya que las células se hunden hacia el ápice de la gota donde confluyen y forman un agregado (por ejemplo, cuerpos embrionarios) sin haberse puesto en contacto con ninguna superficie sólida. La tensión superficial de la gota impide que las células, así como los agregados celulares, penetren en la superficie de la gota. Sin embargo, las gotas aplicadas con una pipeta pueden comprender solo un pequeño volumen ya que las gotas pueden desplazarse sobre la superficie durante la inversión de la superficie para proporcionar la posición correcta para establecer las gotas en suspensión. Para proporcionar gotas más grandes del mismo tamaño y por tanto permitir idénticos medios de cultivo o de reacción, se proponen estructuras en relieve con aristas bien definidas que limitan un área de contacto de gota sobre una superficie particular.

Más recientemente (véase, por ejemplo, Kelm y col. 2004 o Khademhosseini y col. 2006, PNAS Vol. 103, No. 8: 2480-2487), al cultivo celular en gotas en suspensión se le había denominado ingeniería tisular a microescala usando ensamblajes celulares forzados por gravedad. Por lo cual Khademhosseini y col. parecieron preferir la ingeniería tisular a microescala usando ensamblajes celulares basados en moldes en micropocillos de polietilenglicol (PEG); Kelm y Fussenegger aplicaron la técnica de gotas en suspensión en pocillos de una placa multipocillo o Terasaki.

Todos estos documentos informan sobre la necesidad de invertir el sustrato en el cual se adhieren las gotas para habilitarlas correctamente como gotas en suspensión. Después de invertirse, se informa que los sustratos se encuentran en posición horizontal o incluyen un ángulo de al menos 90° con la dirección horizontal (véase el documento WO 03/078700 A1). Dicha inversión es difícil de realizar manualmente e incluso es más difícil que la realice un robot. Por tanto, la inversión de la placa, que requiere que se realice manualmente, hace que no sea posible compatibilizar la producción en masa y la automatización. Es por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar una placa para gotas en suspensión que haga que no sea necesaria la inversión del sustrato

en el cual se adhieren las gotas. Otro objetivo de la presente invención es la posibilidad de realizar cambios de medio de manera repetitiva con un riesgo mínimo de aspiración y/o pérdida de microtejidos.

El documento WO 2008/123741 A1 desvela una placa de cultivo celular para la formación de cuerpos embrionarios a partir de células madre embrionarias en surcos en los extremos inferiores de varillas de soporte unidas a la parte inferior de una tapa cobertora que se coloca sobre una placa de cultivo. La configuración está destinada a las gotas en suspensión que, sin embargo, tienen que aplicarse desde abajo hacia los extremos inferiores de las varillas de soporte.

El documento US 2003/0235519 A1 desvela una tapa que cubre los pocillos en una microplaca y está destinada para aplicar gotas en suspensión en el lado inferior de la tapa. La configuración permite cargar el líquido desde arriba mediante algún tipo de canales microfluidos incorporados en la tapa. Sin embargo, dichos canales no están definidos con exactitud y por tanto no permiten controlar con precisión la etapa de carga del líquido.

Por consiguiente, es otro objetivo de la presente invención proporcionar una placa para gotas en suspensión mejorada que permita, de manera muy reproducible y fácil, manipular la carga del líquido de gota desde arriba.

Estos objetivos se consiguen con una placa para gotas en suspensión de acuerdo con los aspectos de la reivindicación 1 independiente. Esta placa para gotas en suspensión, como se propone al principio y de acuerdo con la presente invención, se caracteriza porque el cuerpo comprende adicionalmente al menos un conducto que desemboca dentro de al menos un área de contacto de gota desde la dirección de la primera superficie del cuerpo comprendiendo el conducto un compartimento de cultivo que se sitúa cerca de la segunda superficie del cuerpo y que comprende al menos una parte del área de contacto de gota. Adicionalmente la invención y aspectos preferidos derivan de las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con una realización de la placa para gotas en suspensión, el conducto penetra parcialmente en el cuerpo en una dirección esencialmente perpendicular en la región de al menos un área de contacto de gota y de manera esencial, se extiende parcialmente en paralelo a la segunda superficie. En una realización, el conducto comprende una conexión de entrada que se sitúa en un lado frontal del cuerpo. En otra realización, el conducto penetra además en la primera superficie del cuerpo en una dirección esencialmente perpendicular.

De acuerdo con una realización adicional de la placa para gotas en suspensión, el cuerpo comprende una parte superior y una parte inferior unidas entre sí.

En una realización, el área de contacto de gota se reviste selectivamente con un revestimiento hidrófilo. En otra realización, el área de contacto de gota se reviste selectivamente con compuestos biológicamente activos, que se seleccionan de un grupo que comprende polipéptidos y polinucleótidos.

En una realización adicional, el área circundante se reviste selectivamente con un revestimiento hidrófobo.

En una realización ventajosa, la placa para gotas en suspensión tiene esencialmente la forma de una microplaca convencional y las áreas de contacto de gota se configuran en una matriz, preferentemente de 4 x 6, de 8 x 12, o de 16 x 24 áreas de contacto de gota.

De acuerdo con una realización, un conjunto para cultivar células o para producir agregados moleculares comprende una placa para gotas en suspensión y dos placas cobertoras que se fabrican para usar como una placa cobertora inferior y/o superior.

De acuerdo con una realización adicional, se proporciona un procedimiento para el cultivo de células en el que varias células o microagregados celulares de al menos un tipo de célula:

- se desplazan a través de un conducto de la placa para gotas en suspensión hasta un volumen líquido,
- se cultivan dentro del volumen de líquido y se forma un microtejido dentro del volumen líquido de las células cultivadas.

De acuerdo con una realización adicional, se proporciona un procedimiento de producción de agregados moleculares en el que varias moléculas o microagregados moleculares:

- se suspenden en un líquido,
- se desplazan a través de un conducto de la placa para gotas en suspensión junto con un volumen líquido,
- se incuban dentro del volumen líquido, y dentro del volumen líquido se forma un agregado molecular a partir de las moléculas o microagregados moleculares incubados.

De acuerdo con otra realización más, se proporciona un procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares en el que se extrae una parte de líquido en el volumen líquido a través del conducto respectivo de la placa para gotas en suspensión que está asignada al área de contacto de gota.

De acuerdo aún con otra realización, se proporciona un procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares en el que al menos una parte del líquido extraído se reemplaza por un líquido que se suministra a través del conducto respectivo de la placa para gotas en suspensión que está asignada al área de contacto de gota.

- 5 La placa para gotas en suspensión de acuerdo con la presente invención es útil en la exploración de sistemas de fármacos, en ensayos de toxicidad basados en células y en la producción en masa de re-agregados celulares o de cristales de proteínas.

La placa para gotas en suspensión y la técnica de gotas en suspensión de acuerdo con la presente invención comprenden las siguientes ventajas:

- 10 - no se requiere armazón;  
 - es aplicable a pequeños volúmenes de líquido y a varias células;  
 - proporciona control de tamaño de los agregados celulares;  
 - puede adaptarse a una amplia diversidad de tipos celulares/tisulares tales como microtejidos hepáticos (por ejemplo HepG2), esferoides miocárdiales y microcartilago;  
 15 - puede proporcionar sistemas de tipo multicelular definidos como por ejemplo una capa endotelial externa que envuelve un núcleo de fibroblastos;  
 - pueden producirse agregados celulares necesarios en tiempos de producción cortos;  
 - se proporciona una tecnología de plataforma que hace que la tecnología de cultivo celular 3D sea tan apropiada como los procesos de cultivo celular 2D actuales;  
 20 - el sistema comprende un formato de placas - HD que se adapta a una placa multipocillo con, por ejemplo, 96 o 384 pocillos;  
 - se generan gotas en suspensión por carga superior usando, por ejemplo, un robot pipeteador multicanal automático;  
 - la siembra celular y/o el cambio de medio puede realizarla un pipeteador automático.

- 25 La placa de gotas en suspensión de la presente invención se describe ahora con más detalle en base a las realizaciones ejemplares seleccionadas que se representan en dibujos esquemáticos, que ilustrarán realizaciones preferidas sin delimitar el ámbito de la presente invención. En las siguientes figuras se observa:

- Fig. 1 una vista frontal y superior, así como una representación 3D, de una célula unitaria de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma cilíndrica/frustocónica, de acuerdo con una primera realización;  
 30 Fig. 2 una vista frontal y superior, así como una representación 3D, de una célula unitaria de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con una segunda realización;  
 Fig. 3 una vista frontal y superior de una matriz lineal de células unitarias de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con una segunda realización;  
 35 Fig. 4 una vista frontal, lateral y superior, así como una representación 3D, de una matriz bidimensional de células unitarias de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización;  
 40 Fig. 5 una vista frontal y lateral de una matriz bidimensional de células unitarias de una placa para células en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización en combinación con una placa cobertora superior e inferior;  
 Fig. 6 una vista frontal lateral y superior, así como una representación 3D, de la placa cobertora de la Fig. 5;  
 45 Fig. 7 una imagen fotográfica de una gota con medio de cultivo, suspendida en el área de contacto de gota de la placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización; estando el conducto esencialmente cargado con medio de cultivo;  
 Fig. 8 una sección transversal esquemática de la imagen fotográfica representada en la Figura 7;  
 Fig. 9 variantes alternativas de la primera y segunda realización de la placa para gotas en suspensión en la que  
 50 Fig. 9A muestra dos estructuras en relieve alternativas que impiden la dispersión del volumen líquido sobre la segunda superficie del cuerpo;  
 Fig. 9B muestra dos tratamientos de superficie diferentes que impiden la dispersión del volumen líquido sobre la segunda superficie del cuerpo;  
 Fig. 9C muestra dos estructuras en relieve alternativas que adicionalmente proporcionan minimizar o  
 55 maximizar el volumen de la gota;  
 Fig. 10 secciones transversales esquemáticas de placas para gotas en suspensión que tienen un cuerpo, que comprende una parte superior y una parte inferior unidas entre sí, en las que  
 Fig. 10A muestra una variante con una entrada lateral para fijar al conducto una línea para líquido;  
 Fig. 10B muestra una variante con un compartimento de entrada superior abierto que está en conexión fluida con dos o más conductos para suministrar líquido a una matriz de 384 gotas dispensado desde un  
 60 cabezal dispensador con 96 puntas;  
 Fig. 11 una imagen microscópica de cardiomiocitos de rata neonatales producidos con una placa para gotas

en suspensión de acuerdo con la Figura 7;  
 Fig. 12 imágenes microscópicas de células de hepatoma humano, en las que  
 Fig. 12A muestra 100 células/gota, y  
 Fig. 12B muestra 250 células/gota;  
 5 Fig. 13 imágenes microscópicas de células de los islotes pancreáticos de rata a diferentes momentos después de sembrar, en las que  
 Fig. 13A muestra las células después de 3 horas de incubación;  
 Fig. 13B muestra las células después de 24 horas de incubación; y  
 Fig. 13C muestra el microtejido después de 96 horas de incubación.

10 La Figura 1 muestra una vista frontal y superior, así como una representación 3D, de una célula unitaria de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma cilíndrica/frustocónica (que comprende un primer cono truncado, un cilindro y un segundo cono truncado), de acuerdo con una primera realización. La placa para gotas en suspensión 1 comprende un cuerpo 2 con una primera superficie 3 y una segunda superficie 4 que es esencialmente coplanaria a la primera superficie 3. La segunda superficie 4 comprende al menos un área de  
 15 contacto de gota 5 para recibir de manera adherente un volumen líquido 6 (véanse las Figs. 7 y 8) para el cultivo de células o para producir agregados moleculares en su interior. La al menos un área de contacto de gota 5 se diferencia de un área circundante 7 por una estructura en relieve 8 que impide la dispersión del volumen líquido 6 sobre la segunda superficie 4 del cuerpo 2. El cuerpo 2 comprende adicionalmente al menos un conducto 9 que desemboca en el al menos un área de contacto de gota 5 desde la dirección de la primera superficie 3 del cuerpo 2.

20 En este caso, la estructura en relieve 8 se realiza como un reborde circular y el conducto 9 penetra en todo el cuerpo 2 en una dirección esencialmente perpendicular desde la primera superficie 3 a la segunda superficie 4. El conducto 9 comprende un compartimento de entrada 12 que se sitúa cerca de la primera superficie 3 del cuerpo 2. En este caso, el compartimento de entrada 12 se realiza como una parte ensanchada 13 del conducto 19 dentro del cuerpo 2, que se realiza como un elemento integral. El conducto 9 comprende un compartimento de cultivo 17 que se sitúa  
 25 cerca de la segunda superficie 3 del cuerpo 2 y que comprende al menos una parte del área de contacto de gota 5. En esta realización, el compartimento de cultivo 17 se realiza como una depresión en forma de embudo con paredes rectas. El conducto 9 comprende una parte capilar 18 con un diámetro de al menos 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 10  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ . La parte capilar cilíndrica 18 del conducto 9 tiene una longitud entre 0,1 mm y 30 mm, preferentemente entre 0,5 mm y 2 mm. Como puede observarse en la Figura 1, el  
 30 conducto 9 se realiza como un canal no ramificado que esencialmente se extiende perpendicularmente hacia la primera y segunda superficies 3,4 y todas las partes del conducto 9 están coaxialmente alineadas.

La Figura 2 muestra una vista frontal y superior, así como una representación 3D, de una célula unitaria de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con una segunda  
 35 realización. En este caso, también se aplica la mayoría de lo que se ha dicho sobre la primera realización. Sin embargo, en esta realización, el compartimento de cultivo 17 se realiza como una depresión en forma de embudo con paredes curvadas. El conducto 9 comprende una parte capilar 18 con un diámetro de al menos 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 10  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ . En este caso, la parte capilar cilíndrica 18 del conducto 9 tiene una longitud de 0 mm y el conducto 9 de nuevo se realiza como un canal no  
 40 ramificado que esencialmente se extiende perpendicularmente hacia la primera y segunda superficies 3,4 estando todas partes del conducto 9 coaxialmente alineadas. Dejando la presentación de la Figura 2, la longitud de la parte capilar cilíndrica 18 del conducto 9 también podría ser de hasta 30 mm.

La Figura 3 muestra una vista frontal y superior de una matriz lineal de células unitarias de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización (véase la Fig. 29). Los ejes de las células unitarias están separados por una distancia axial repetitiva 23, que es  
 45 preferentemente de 18 mm, 9 mm, o 4,5 mm de acuerdo con las distancias axiales de las microplacas convencionales bien conocidas con 24, 96 o 384 pocillos (véanse las dimensiones convencionales de microplacas publicadas en el American National Standards Institute/Society for Biomolecular Sciences: ANSI/SBS 1-2004, ANSI/SBS 2-2004, ANSI/SBS 3-2004, ANSI/SBS 4-2004).

La Figura 4 muestra dos vistas frontales y una vista superior, así como una representación 3D, de una matriz  
 50 bidimensional de células unitarias de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización. Se indican las dimensiones preferidas y están muy próximas a las dimensiones de una microplaca convencional. Realmente, en esta figura se representa una matriz bidimensional de 384 áreas de contacto de gota 5 y conductos 9. Por tanto, las distancias axiales son preferentemente de 4,5 mm para cumplir la norma ANSI/SBS y poder incorporar la matriz de 384 áreas de contacto de gota 5 y conductos 9 en  
 55 una placa para gotas en suspensión 1 con las dimensiones que son, al menos aproximadamente, las dimensiones de una microplaca convencional. Mientras que las células unitarias de la placa para gotas en suspensión 1 están preferentemente en estrecho contacto entre sí (como también se representa en la Fig. 3), la matriz de estas células unitarias está preferentemente rodeada por una placa horizontal 24. La propia placa horizontal 24 está preferentemente rodeada por un reborde vertical 25 que presenta una red inferior 26 y una depresión superior 27. La red 26 y la depresión 27 son de tales dimensiones que sirven como medios de apilamiento para apilar fuertemente  
 60 las placas para gotas en suspensión 1 y para sujetar con seguridad las placas apiladas en el sitio. Como puede

observarse en la Figura 4, la altura de la red 26 y la depresión 27 es preferentemente de aproximadamente 2 mm en cada caso.

Dejando la presentación de la Figura 4, la posición de la red 26 y la depresión 27 podrían intercambiarse sin perder su función como medio de apilamiento. Además las dimensiones de la placa horizontal 24 y el reborde vertical 25 podrían cambiarse sin alejarse del espíritu de la presente invención. Sin embargo, se prefiere en cualquier caso que el reborde vertical 25 se proyecte sobre la primera superficie 3 y por debajo de la segunda superficie 4 de la placa para gotas en suspensión 1. Se prefiere especialmente (véase la Figura 4) que el reborde vertical 25 también se proyecte por debajo de la estructura en relieve 8 de la segunda superficie 4 de la placa para gotas en suspensión 1. Adicionalmente, dicha proyección del reborde vertical 25 protege a la primera y segunda superficies 3,4, de la placa para gotas en suspensión 1, de daños y contactos. Además, el reborde vertical 25 reduce enormemente el peligro de contaminación de estas dos superficies.

La Figura 5 muestra una vista frontal y lateral de una matriz bidimensional de células unitarias de una placa para gotas en suspensión con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización en combinación con una placa cobertora superior e inferior. Al igual que en la Fig. 4, en esta figura se representa una matriz bidimensional de 384 áreas de contacto de gota 5 y conductos 9. De nuevo, la matriz de estas células unitarias está preferentemente rodeada por una placa horizontal 24, que está preferentemente rodeada por un reborde vertical 25 que presenta una red inferior 26 y una depresión inferior 27. La red 26 y la depresión 27 son de tales dimensiones que sirven como medios de apilamiento para apilar fuertemente las placas para gotas en suspensión 1 y para sujetar con seguridad las placas apiladas en el sitio. Se prefiere especialmente que la placa cobertora 22 también presente una red inferior 26 y una depresión inferior 27 que se corresponde con las de la placa para gotas en suspensión 1. Es de particular preferencia una placa cobertora 22 que se realiza para usarse como una placa cobertura inferior y/o superior según sea el caso. Esto tiene la ventaja de que la misma placa cobertora 22 puede usarse como carcasa por debajo de la placa para gotas en suspensión 1 o como una tapa ajustada en la parte superior.

Especialmente, durante el cultivo o la incubación en el proceso de cultivo de células o de producción de agregados moleculares, en al menos un volumen líquido 6, que se adhiere al área de contacto de gota 5 de una placa para gotas en suspensión 1, se prefiere cubrir la placa para gotas en suspensión 1, sobre el lado superior e inferior para impedir que se produzca una evaporación inaceptable del líquido en el volumen líquido 6 o en el conducto 9. Preferentemente, en la parte inferior de una primera placa para gotas en suspensión 1, se coloca una placa cobertora 22 como una placa de carcasa inferior. Esta primera placa para gotas en suspensión 1 puede cubrirse con una segunda placa cobertora 22 que ahora se usa como una tapa. Entre dicho "sándwich" de dos placas cobertoras 22 y una placa para gotas en suspensión 1 está la unidad más pequeña preferentemente formada para la conservación, cultivo o incubación, y transporte seguro de una placa para gotas en suspensión, tanto si está cargada con volúmenes líquidos y células y/o moléculas como sino (véase la Figura 5).

Para la incubación o cultivo en dispositivos con un control de temperatura, en la parte superior de cada una de ellas pueden apilarse directamente diversas placas para gotas en suspensión 1 y cubrirse solo, con una placa cobertora 22, la parte superior e inferior de la parte más superior e inferior de la placa para gotas en suspensión 1. Esto se prefiere especialmente cuando todas las placas para gotas en suspensión de un apilamiento están cargadas con las mismas muestras sin temor ninguno de que se produzca contaminación cruzada. Sin embargo, si se cargan diferentes muestras (dentro de las mismas o diferentes placas para gotas en suspensión 1, de un apilamiento), se prefiere separar las placas para gotas en suspensión 1 con una placa cobertora colocada entre medias 22 entre cada una de las placas para gotas en suspensión 1.

Por supuesto es posible producir placas de gotas en suspensión 1 individuales (véase la Fig. 4) y distintas placas cobertoras 22 (véase la Fig. 6); simplemente se prefiere tener las mismas dimensiones que las de la red inferior 26 y una depresión superior 27 en cada caso. Sin embargo, el conjunto más preferido para cultivar células o para producir agregados moleculares comprende preferentemente una placa para gotas en suspensión 1 y dos placas cobertoras 22.

La Figura 7 muestra una imagen fotográfica de una gota de medio de cultivo, suspendida en el área de contacto de gota 5 de la placa para gotas en suspensión 1 con un conducto 9 que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con la segunda realización. Es obvio que el conducto 9 está esencialmente cargado con medio de cultivo. Esta suspensión de gota (es decir el volumen líquido 6) en el área de contacto de gota 5 se debe a una acción combinada de diferentes elementos:

- a) La fuerza capilar del conducto 9 actúa en contra de la gravedad y la fuerza hidrostática en el conducto 9 y el volumen líquido 6 que atraen la gota.
- b) Un revestimiento hidrófilo selectivo eventualmente presente en el área de contacto de gota 5 mantiene la adhesión del volumen líquido 6 y actúa contra la fuerza hidrostática y la gravedad.
- c) La estructura en relieve 8 (realizada en este caso como un reborde) estabiliza el volumen líquido 6 y mantiene la definición del contenido real del volumen líquido.
- d) La tensión superficial de la gota estabiliza adicionalmente el volumen líquido 6.
- e) Adicionalmente, un revestimiento hidrófobo selectivo 21 aplicado al área circundante 7 de la placa para gotas

en suspensión 1 puede estabilizar el volumen líquido 6.

Realmente, la imagen se ha tomado de un prototipo de una matriz lineal de células unitarias de una placa para gotas en suspensión 1 con un conducto que presenta una forma hiperboloide, de acuerdo con una segunda realización (véanse las Figuras 2 y 3). Para colocar el prototipo en una placa de Petri que se usó como una carcasa inferior, el prototipo se había equipado con una placa horizontal 24, un reborde vertical 25 y una placa soporte 28 rodeando todo ello las células unitarias de la placa para gotas en suspensión 1. Por tanto, entre las células unitarias, la placa horizontal 24 y el reborde vertical 25 de la placa prototipo para gotas en suspensión 1 y la placa de Petri por debajo (no visible en este caso), se formó un espacio prácticamente cerrado que permitió mantener una atmósfera húmeda saturada alrededor de los volúmenes líquido 6 situados en las áreas de contacto de gota 5 respectivas.

Para reforzar la comprensión de la imagen, la Figura 8 muestra una sección transversal esquemática de la imagen fotográfica de la Figura 7. Como en todas las Figuras, los mismos números de referencia se refieren a las mismas o similares características, incluso si no se analizan con detalle en cada caso.

La Figura 9 muestra variantes alternativas de la primera y segunda realización de la placa para gotas en suspensión. La disposición de la placa para gotas en suspensión 1 es de acuerdo con el prototipo mostrado en las Figuras 7 y 8. Sin embargo, también células unitarias sencillas o placas para gotas en suspensión 1 completas con la forma y dimensión aproximadas de una microplaca convencional podrían también mostrar células unitarias de acuerdo con las variantes aquí mostradas.

La Figura 9A muestra dos estructuras en relieve 8 alternativas que impiden la dispersión del volumen líquido 6 sobre la segunda superficie 4 del cuerpo 2 de la placa para gotas en suspensión 1 de acuerdo con la invención. La estructura en relieve 8 (en lugar de ser un reborde) puede realizarse como una depresión en forma de anillo (véase lado izquierdo) o como una elevación en forma de anillo (véase lado derecho). En cualquier caso, un cambio brusco de dirección en el perfil de la estructura en relieve 8 define de manera segura el borde del volumen líquido 6 o la gota.

La Figura 9B muestra dos tratamientos de superficie diferentes que impiden la dispersión del volumen líquido 6 sobre la segunda superficie 4 del cuerpo 2 de la placa para gotas en suspensión 1 de acuerdo con la invención. En el lado izquierdo, el área de contacto de gota 5 se reviste selectivamente con compuestos biológicamente activos, que se seleccionan de un grupo que comprende polipéptidos (anticuerpos, factores de crecimiento, enzimas) y polinucleótidos (ARN, ADN mono o bicatenario). En el lado derecho el área circundante 7 se reviste selectivamente con un revestimiento hidrófobo 21. También se prefiere especialmente una combinación de estos dos tratamientos. La utilización de un revestimiento hidrófobo 21 puede incluso dispensarse con la necesidad de incorporar una estructura en relieve en forma de un reborde o depresión adicional en la segunda superficie 4. Por tanto, la arista 29 mostrada en este caso es suficiente como una estructura en relieve 8.

La Figura 9C muestra dos estructuras en relieve alternativas que adicionalmente proporcionan minimizar o maximizar el volumen de la gota. En el lado izquierdo, se forma una depresión con una arista 29. En esta figura, el volumen de la gota está maximizado. En el lado derecho, se forma una elevación con una arista 29; por tanto, se minimiza el volumen de la gota. Además, en esta figura se muestra una placa para gotas en suspensión 1, cuyo conducto 9 comprende un compartimento de entrada 12 que está situado cerca de la primera superficie 3 del cuerpo 2. Preferentemente, el compartimento de entrada 12 se realiza con una parte estrechada 13 del conducto 9 dentro del cuerpo 2 (véanse, por ejemplo, las Figuras 9A y 9B) o como una taza 14 en la primera superficie 3 del cuerpo 2 como se representa en esta figura. También es posible una combinación de dicha parte estrechada 13 y una taza 14 (no mostrada).

Es importante observar que aquí puede utilizarse cualquier combinación de las características mostradas en las Figuras y/o descritas en la memoria descriptiva y que se incluye en el espíritu de la invención.

La Figura 10 muestra secciones transversales esquemáticas de placas de gotas en suspensión 1 que tienen un cuerpo 2, que comprende una parte superior 15 y una parte inferior 16 unidas entre sí. Esta configuración en dos partes facilita enormemente la producción de una placa para gotas en suspensión 1 alternativa con un conducto 9 que penetra parcialmente en el cuerpo 2 en una dirección esencialmente perpendicular en la región de el al menos un área de contacto de gota 5 y que esencialmente se extiende parcialmente paralelo a la segunda superficie 4 de la placa para gotas en suspensión 1.

La Figura 10A muestra una variante con una entrada lateral para fijar una línea para líquido al conducto. En este caso, el conducto 9 comprende una conexión de entrada 10 que está situada en un lado frontal 11 del cuerpo 2. A diferencia de las realizaciones mostradas en las Figs. 1 a 8, en este caso los líquidos se suministran preferentemente por los conductos 9 de la placa para gotas en suspensión 1 con una o más pipetas o con un robot pipeteador, las líneas 30 pueden conectarse directamente a una placa para gotas en suspensión 1. A través de dichas líneas 30, los líquidos, así como células o moléculas, pueden suministrarse en cualquier momento a los volúmenes líquidos 6 de una placa para gotas en suspensión 1. Por tanto, se facilita el cambio de líquidos, tales como tampones o líquidos de lavado en los volúmenes líquidos 6.

La Figura 10B muestra una variante con un compartimento de entrada superior abierto que está en conexión fluida con dos o más conductos para suministrar líquido a una matriz de 384 gotas dispensado desde un cabezal dispensador con 96 puntas. En este caso, el conducto 9 también penetra en la primera superficie 3 del cuerpo 2 en una dirección esencialmente perpendicular y el conducto 9 se realiza como un canal ramificado que comprende partes de canal 19 que esencialmente se extienden perpendicularmente hacia la primera y segunda superficies 3,4 y partes ramificadas 20 que esencialmente se extienden paralelas a la segunda superficie 4. Mientras que las áreas de contacto de gota 5 pueden estar separadas por una distancia axial 23 de 4,5 mm, los compartimentos de entrada superior abiertos 12 están preferentemente separados por una distancia de 9 mm o el doble de la distancia axial 23. En una placa para gotas en suspensión 1 de matriz lineal (compárese con la Fig. 3), dos partes ramificadas 20 se unen en una parte de canal común 19. En una placa para gotas en suspensión 1 de matriz 2D (compárese con la Fig. 4), cuatro partes ramificadas 20 se unen en una parte de canal común 19. Por tanto, con un robot que comprenda un cabezal dispensador de 96 puntas a una placa para gotas en suspensión 1 con una matriz de 384 gotas puede proporcionarse al mismo tiempo líquido y/o células o moléculas.

Puede obtenerse un control complementario de la forma y posición de la gota por revestimiento selectivo de la superficie interna del compartimento de cultivo 17, el reborde 8 y la placa circundante 7 para conseguir áreas hidrófilas e hidrófobas. Además, las superficies internas de ambos compartimentos 12, 17 y el conducto 9 pueden revestirse con una película superficial que impida que las células se adhieran a la superficie. Como alternativa la superficie puede modelarse directamente usando técnicas de micro- y nanomecanizado para impedir la adhesión.

Las placas para gotas en suspensión 1 son preferentemente placas de cultivo tisular de dimensiones externas convencionales (ANSI/SBS 1-2004) compatibles con sistemas de alto rendimiento. Como se muestra, el conjunto de placa para gotas en suspensión 1 preferentemente consiste en dos elementos:

- a) una placa para gotas en suspensión 1 que contiene los pocillos para gotas en suspensión o las áreas de contacto de gota 5; y
- b) una cubierta 22 que soporta la placa para gotas en suspensión 1.

Ambos elementos (placa para gotas en suspensión 1 y cubierta 22) están constituidos, o al menos comprenden, en sus respectivas superficies, un material plástico biocompatible (por ejemplo Policarbonato, Polietileno, Poliestireno o Polipropileno). Ambos elementos (placa para gotas en suspensión 1, cubierta 22) son compatibles con lectores fotométricos (que leen desde la parte superior e inferior, preferentemente leen desde la parte inferior). La placa para gotas en suspensión 1 contiene preferentemente 96 o 384 unidades de pocillos para gotas en suspensión. Preferentemente la placa para gotas en suspensión 1 está equipada con un reborde vertical 25 para la manipulación robótica independiente de la cubierta. La cubierta 22 proporciona el suficiente espacio para la formación de gotas dentro de cada unidad sencilla de la placa para gotas en suspensión 1. Las placas para gotas en suspensión 1 se diseñan para apilarse una con respecto a la otra. Las cubiertas 22 pueden equiparse con un sistema de canal estrecho o depresión a lo largo del lado interno de la base lo que permite que se llene con agua/solución salina para minimizar la evaporación de la gota. Las cubiertas 22 pueden usarse para carcasas inferiores y superiores de placas de gotas en suspensión 1 para minimizar la evaporación y proteger de la contaminación.

Las gotas en suspensión pueden generarse cargando líquidos por la parte superior en el compartimento de entrada 12 mediante un solo canal convencional o pipetas multicanales, de una manera manual o automática. El diseño del pocillo de gotas en suspensión permite el cambio repetido de líquidos a través del compartimento de entrada 12.

La presente invención proporciona un dispositivo para coaxionar y cultivar células en tres dimensiones sin interacciones sustrato-célula artificiales. El dispositivo comprende un sistema microfluído con dos compartimentos (compartimento de entrada 12 y compartimento de cultivo 17). El volumen del compartimento de entrada 12 es preferentemente de 5  $\mu$ l y 50  $\mu$ l, más preferentemente entre 10  $\mu$ l y 30  $\mu$ l. El volumen del compartimento de cultivo 17 es preferentemente entre 10  $\mu$ l y 100  $\mu$ l, más preferentemente entre 10  $\mu$ l y 50  $\mu$ l. Las formas del compartimento de entrada 12 y compartimento de cultivo 17 pueden ser cilíndricas, cónicas o hiperbólicas. Cada volumen de cultivo de una unidad sencilla se conecta preferentemente con un reborde 8 que sobresale desde la parte inferior del compartimento de cultivo para estabilizar y separar gotas individuales. La altura del anillo separador de gota o estructura en relieve 8 en forma de un reborde es preferentemente entre 0,1 mm y 5 mm, más preferentemente entre 1 y 2 mm.

La placa para gotas en suspensión 1 de acuerdo con la invención puede realizarse directamente mediante moldeo por inyección o lateralmente por moldeo réplica. Los procedimientos de producción alternativos comprenden técnicas de microtrituración y/o pegar o soldar entre sí partes de la placa para gotas en suspensión 1.

A continuación se describen brevemente los materiales y procedimientos así como los resultados conseguidos cuando se usa el prototipo de la placa para gotas en suspensión 1 de acuerdo con la presente invención.

Un protocolo típico para la producción de un cultivo de gotas en suspensión se realiza de la siguiente manera:

- a) Recoger células de cultivo 2D convencional mediante tripsinización convencional.
- b) Lavar las células con medio de cultivo celular normal.
- c) Absorber las células en un volumen apropiado de medio de cultivo celular normal con una densidad de 3,333



a 333,333 células/ml que corresponde a de 100 a 10.000 células/30 µl de gota o volumen líquido 6 respectivamente dependiendo de los requisitos del experimento.

d) Agitar suavemente el matraz que contiene las células y dispensar gotas de 30 µl de suspensión celular en los compartimentos de entrada 12 de la placa para gotas en suspensión 1 mediante una carga superior.

e) Colocar la placa para gotas en suspensión 1 en una caja humidificada en una incubadora de cultivo celular normal.

f) Las células se agregarán y formarán microtejidos al cabo de 1-3 días, dependiendo del tipo de células.

g) Las incubaciones o los protocolos experimentales prolongados requerirán eventualmente un cambio de medio. Esto se realiza aspirando simplemente hasta 25 µl de medio empobrecido desde los compartimentos de entrada 12 sobre el lado superior de la placa para gotas de suspensión 1 y sustituyendo por un volumen similar de medio recién preparado que se pipetea en los compartimentos de entrada 12.

h) Recoger los microtejidos aclarando las áreas de contacto de gota 5 con de 50 a 100 µl de medio suministrado a los compartimentos de entrada 12 sobre el lado superior de la placa para gotas en suspensión 1 y aclarando así los microtejidos en el dispositivo de recogida (es decir, una placa de Petri o una microplaca con 96 o 384 pocillos).

### Ejemplo I

Se produjeron cardiomiocitos aislados recientes de ratas neonatales de acuerdo con el protocolo anterior sin incluir la recogida de células de cultivos 2D (punto a del protocolo). Los microtejidos resultantes producidos a partir de 10.000 células/gota corresponden a un tamaño de microtejido de aproximadamente 250 µm de diámetro. Esto se demuestra en la Figura 11 que muestra una imagen microscópica de microtejidos compuestos por cardiomiocitos de rata producidos con una placa para gotas en suspensión de acuerdo con la Fig.7.

### Ejemplo II

Se trataron células de hepatoma humano (HepG2) de acuerdo con el protocolo anterior. La Figura 12 muestra imágenes microscópicas de microtejidos de hepatoma humano 48 horas después de sembrar con 100 células por gota (Fig. 12A) y 250 células por gota (Fig. 12B). Estas densidades celulares dieron como resultado microtejidos de 100 µm y 200 µm de diámetro respectivamente.

### Ejemplo III

Se trataron células de islotes pancreáticos de rata (250 células por gota) de acuerdo con el protocolo anterior como se demuestra en la Figura 13 que muestra imágenes microscópicas de células de islotes pancreáticos de rata a diferentes momentos después de la siembra. La formación del microtejido de islote pancreático de rata puede realizarse de la siguiente manera: Después de 3 horas de incubación, prácticamente solo están presentes células sencillas (véase la Fig. 13A). Después de 24 horas de incubación, prácticamente todas las células se han agregado (véase la Fig. 13B). Después de 96 horas de incubación, se ha formado un microtejido de islote pancreático de rata esférico con un diámetro de aproximadamente 100 µm (véase la Fig. 13C).

Por tanto, la presente invención comprende un procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares en al menos un volumen líquido 6 que se adhiere a un área de contacto de gota 5 de una placa para gotas en suspensión 1 como se describe en la base de las Figuras 1 a 10. La placa para gotas en suspensión 1 comprende un cuerpo 2 con una primera superficie 3 y una segunda superficie 4 que es esencialmente coplanaria a la primera superficie 3 y que comprende al menos un área de contacto de gota 5 para recibir de manera adherente el al menos un volumen líquido 6 en su interior. El al menos un área de contacto de gota 5 se diferencia de un área circundante 7 por una estructura en relieve 8 que impide la dispersión del volumen líquido 6 sobre la segunda superficie 4 del cuerpo 2. El procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque un volumen líquido 6 se aplica a un área de contacto de gota 5 a través de un conducto 9 que desemboca en el área de contacto de gota 5 desde la dirección de la primera superficie del cuerpo 2.

Cuando se realiza el procedimiento de cultivo de células, preferentemente, varias células o micro-agregados celulares de al menos un tipo de célula se

- suspenden en un líquido,
- desplazan a través de un conducto 9 de la placa para gotas en suspensión 1 junto con un volumen líquido 6,
- cultivan dentro de un volumen líquido 6; y

se forma un microtejido dentro del volumen líquido 6 a partir de las células cultivadas.

Como alternativa, cuando se realiza el procedimiento de cultivo de células, varias células o microagregados celulares de al menos un tipo de célula se

- desplazan a través de un conducto 9 de la placa para gotas en suspensión 1 hasta un volumen líquido 6,
- cultivan dentro de un volumen líquido 6; y

se forma un microtejido dentro del volumen líquido (6) a partir de las células cultivadas.

Cuando se realiza el procedimiento de producción de agregados moleculares, preferentemente, varias moléculas o micro-agregados moleculares se

- suspenden en un líquido,
- desplazan a través de un conducto 9 de la placa para gotas en suspensión 1 junto con un volumen líquido 6,
- incuban dentro del volumen líquido 6; y

se forma un agregado molecular dentro del volumen líquido 6 a partir de las moléculas o micro-agregados moleculares incubados.

Preferentemente cuando se realiza el procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares, una parte líquido en el volumen líquido 6 se extrae a través del conducto 9 respectivo de la placa para gotas en suspensión 1 que está asignada al área de contacto de gota 5. A continuación, se prefiere reemplazar al menos una parte del líquido extraído por un líquido que se suministra a través del conducto 9 respectivo de la placa para gotas en suspensión 1 que está asignada al área de contacto de gota 5.

Es de particular interés el uso de la placa para gotas en suspensión 1 de acuerdo con la invención en:

a) Exploración y desarrollo de fármacos: La placa para gotas en suspensión proporcionan una plataforma para la generación manual (volumen reducido) o automática (volumen elevado) de agregados celulares 3D biomiméticos; es decir, microtejidos, con una función específica tisular mejorada. La total compatibilidad con los sistemas de manipulación robóticos de líquidos permitirá la exploración de los compuestos a alto rendimiento para conducir a una identificación y optimización posterior al proceso de re-agregación sin la necesidad de realizar pases celulares adicionales. Los ensayos basados en microtejido pueden realizarse de una manera regular al igual que los ensayos convencionales basados en células 2D con determinación de criterios de valoración por mediciones microscópicas, fotométricas, fluorométricas y/o luminométricas (lectura inferior) y/o procesamiento tisular aguas abajo adicional (análisis histológico).

b) Ensayos de toxicidad basados en células (ADME/tox): La placa para gotas en suspensión proporciona una plataforma para la generación manual o automática de agregados celulares 3D, es decir, microtejidos, con una función específica tisular mejorada. La total compatibilidad con los sistemas de manipulación robóticos de líquidos permitirá realizar ensayos de alto rendimiento de posibles candidatos farmacológicos que implican los aspectos de adsorción, metabolismo, excreción y toxicología. Los ensayos basados en microtejido pueden realizarse de una manera regular al igual que los análisis convencionales basados en células 2D con determinación de criterios de valoración por mediciones microscópicas, fotométricas, fluorométricas y/o luminométricas (lectura inferior) y/o procesamiento tisular aguas abajo adicional (análisis histológico).

c) Terapia basada en células: Los microtejidos presentan diversas ventajas para las terapias basadas en células en comparación con el tratamiento de células sencillas que comprende (i) mayor funcionalidad, (ii) matriz extracelular pre-formada, (iii) secreción de factores proangiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular y menor motilidad que las células sencillas. Por lo tanto los microtejidos tienen un mayor potencial para la regeneración/repación tisular para tratar diversos trastornos orgánicos tal como infarto de miocardio o diabetes. La producción en masa es un requisito previo indispensable para su uso en terapias basada en células. La placa para gotas en suspensión proporciona una producción en masa compatibilizando las siguientes características anteriormente destacadas:

1. requiere un volumen de cultivo bajo
2. carga o extracción simultánea superior mediante un dispensador con hasta 384 canales
3. compartimento de entrada en conexión fluida con dos o más conductos, que sirven dos o más gotas por canal dispensador
4. apilabilidad de las placas de gotas en suspensión

Adicionalmente, la placa para gotas en suspensión facilita la aplicación de procedimientos complejos tales como expansión y tiempo posterior dependiente de protocolos de diferenciación, lo que implica cambios de medio repetitivos para la conversión de células precursoras omni- o pluripotentes en agregados celulares muy diferenciados con funcionalidad específica tisular.

d) Cristalización de proteínas: Para investigar el funcionamiento de las proteínas, la comprensión de la estructura 3-dimensional es obligatoria. Se generaron cristales de proteínas aumentando lentamente la concentración de las proteínas en las gotas en suspensión de líquidos específicos por procesos de evaporación. La placa para gotas en suspensión permite la siembra, generación y recogida robótica compatible de cristales de proteínas/moleculares.

Números de referencia

- 1 placa para gotas en suspensión
- 2 cuerpo
- 3 primera superficie

- 4 segunda superficie
- 5 área de contacto de gota
- 6 volumen líquido
- 7 área circundante
- 8 estructura en relieve
- 9 conducto
- 10 conexión de entrada
- 11 lado frontal de 2
- 12 compartimento de entrada
- 13 parte ensanchada
- 14 taza
- 15 parte superior de 2
- 16 parte inferior de 2
- 17 compartimento de cultivo
- 18 parte capilar
- 19 partes de canal
- 20 partes ramificadas
- 21 revestimiento hidrófobo
- 22 placa cobertora
- 23 distancia axial
- 24 placa horizontal
- 25 reborde vertical
- 26 red inferior
- 27 depresión superior
- 28 placa recta
- 29 arista
- 30 línea

## REIVINDICACIONES

1. Placa para gotas en suspensión (1), que comprende un cuerpo (2) con una primera superficie (3) y una segunda superficie (4) que es esencialmente coplanaria a la primera superficie (3) y que comprende al menos un área de contacto de gota (5) para recibir de manera adherente un volumen líquido (6) para cultivar células o para producir agregados moleculares en su interior, diferenciándose la por lo menos un área de contacto de gota (5) de un área circundante (7) por una estructura en relieve (8) o un revestimiento hidrófobo selectivo (21) que impide la dispersión del volumen líquido (6) sobre la segunda superficie (4) del cuerpo (2), **caracterizada porque** el cuerpo (2) comprende adicionalmente al menos un conducto (9) que desemboca en la por lo menos un área de contacto de gota (5) desde la dirección de la primera superficie (3) del cuerpo (2), comprendiendo el conducto (9) un compartimento de cultivo (13) que está situado cerca de la segunda superficie (3) del cuerpo (2) y que comprende al menos una parte del área de contacto de gota (5).
2. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el compartimento de cultivo (17) tiene una forma seleccionada del grupo que consiste en una forma cilíndrica, cónica e hiperbólica.
3. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el compartimento de cultivo (17) es una depresión en forma de embudo con paredes rectas o curvadas, comprendiendo el conducto (9) un compartimento de entrada (12) que se sitúa cerca de la primera superficie (3) del cuerpo (2), realizándose el compartimento de entrada (12) como una parte ensanchada (13) del conducto (9) dentro del cuerpo (2), como una taza (14) sobre la primera superficie (3) del cuerpo (2), o como una combinación de una parte ensanchada (13) tal y una taza (14).
4. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** el compartimento de cultivo (17) tiene un volumen de entre 10 y 100  $\mu\text{l}$ , preferentemente de entre 10 y 50  $\mu\text{l}$ .
5. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el conducto (9) tiene una forma cilíndrica/frustocónica o hiperbólica.
6. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** el conducto (9) comprende una parte capilar (18) con un diámetro de entre 10  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , preferentemente de entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ .
7. Placa para gota en suspensión (1) de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** la parte capilar (18) cilíndrica o hiperbólica del conducto (9) tiene una longitud de entre 0,1 mm y 30 mm, preferentemente de entre 0,5 mm y 2 mm.
8. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** tiene una estructura en relieve (8) que se selecciona de un grupo que comprende un reborde, una protuberancia, una depresión, una elevación y cualquier combinación de las mismas y se localiza en o sobre la segunda superficie (4).
9. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el conducto (9) penetra en todo el cuerpo (2) en una dirección esencialmente perpendicular desde la primera superficie (3) a la segunda superficie (4).
10. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el conducto (9) se realiza como un canal no ramificado que esencialmente se extiende perpendicularmente hacia la primera y segunda superficies (3,4), en el que todas las partes del conducto (9) están alineadas coaxialmente.
11. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** el conducto (9) se realiza como un canal ramificado que comprende partes de canal (19) que esencialmente se extienden perpendicularmente hacia la primera y segunda superficies (3,4) y partes ramificadas (20) que esencialmente se extienden paralelas a la segunda superficie (4).
12. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el área de contacto de gota (5) se reviste selectivamente con un revestimiento hidrófilo.
13. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** el área de contacto de gota (5) se reviste selectivamente con compuestos biológicamente activos que se seleccionan de un grupo que comprende polipéptidos y polinucleótidos.
14. Placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** al menos esencialmente tiene la forma de una microplaca convencional y **porque** las áreas de contacto de gota (5) se disponen en una matriz, preferentemente de 4 x 6, de 8 x 12 o de 16 x 24 áreas de contacto de gota (5).

- 5 15. Procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares en al menos un volumen líquido (6) que se adhiere a un área de contacto de gota (5) de una placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** un volumen líquido (6) se aplica a un área de contacto de gota (5) a través de un conducto (9) que desemboca en el área de contacto de gota (5) desde la dirección de la primera superficie (3) del cuerpo (2).
- 10 16. Procedimiento de cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** varias células o micro-agregados celulares de al menos un tipo de célula se
- suspenden en un líquido,
  - desplazan a través de un conducto (9) de la placa para gotas en suspensión (1) junto con un volumen líquido (6),
  - cultivan dentro del volumen líquido (6); y
- se forma un microtejido dentro del volumen líquido (6) a partir de las células cultivadas.
- 15 17. Procedimiento de cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** varias células o micro-agregados celulares de al menos un tipo de célula se
- desplazan a través de un conducto (9) de la placa para gotas en suspensión (1) hasta un volumen líquido (6),
  - cultivan dentro del volumen líquido (6); y
- se forma un microtejido dentro del volumen líquido (6) a partir de las células cultivadas.
- 20 18. Procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, **caracterizado porque** una parte del líquido del volumen líquido (6) se extrae a través del conducto (9) respectivo de la placa para gotas en suspensión (1) que está asignada al área de contacto de gota (5).
- 25 19. Procedimiento de cultivo de células o de producción de agregados moleculares de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado porque** al menos una parte del líquido extraído se reemplaza por un líquido que se suministra a través del conducto (9) respectivo de la placa para gotas en suspensión (1) que está asignada al área de contacto de gota (5).
20. Uso de la placa para gotas en suspensión (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la exploración de sistemas farmacológicos o en ensayos de toxicidad basados en células o en producción en masa de re-agregados celulares o cristales de proteínas.

Fig. 1

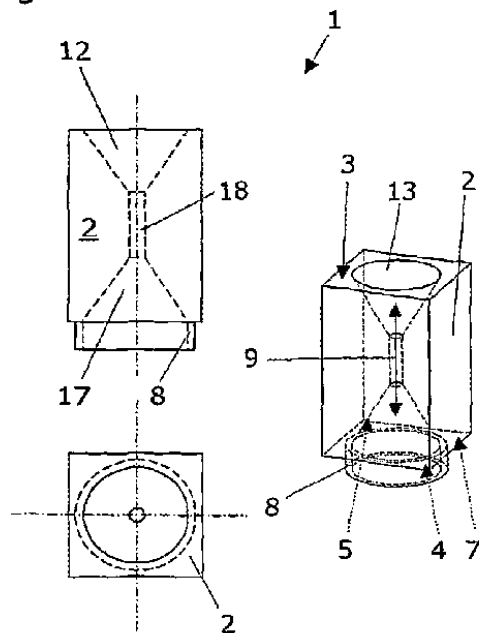


Fig. 2

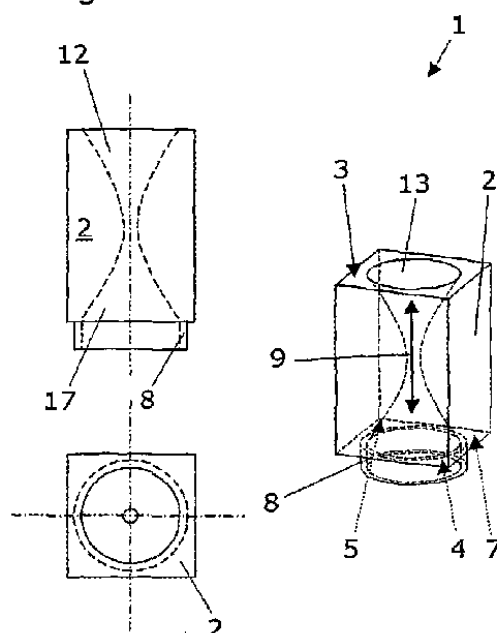


Fig. 3

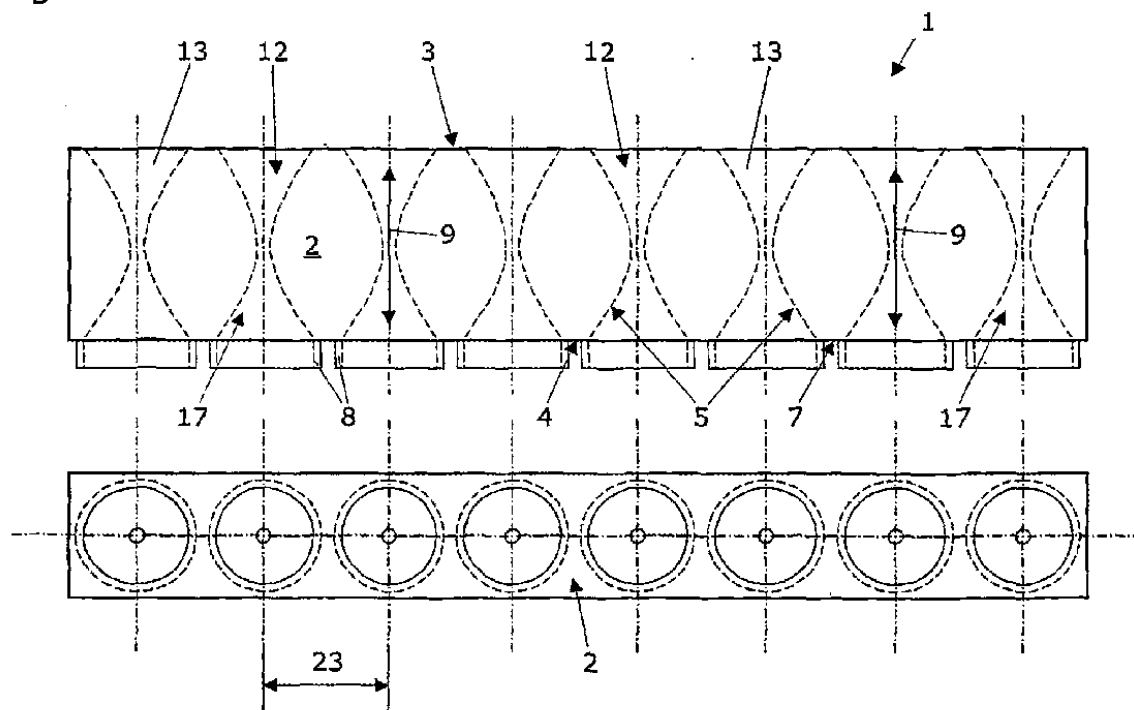


Fig. 4

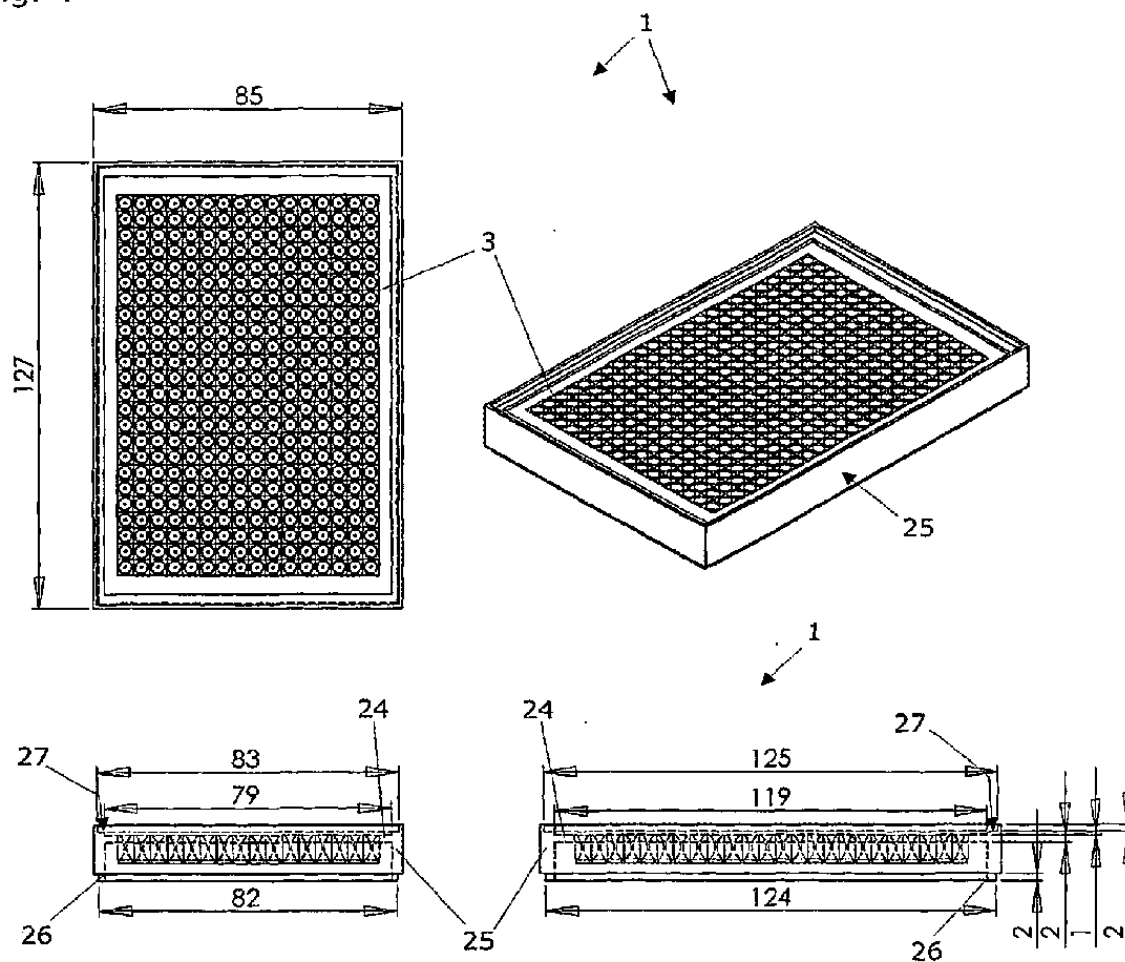


Fig. 5

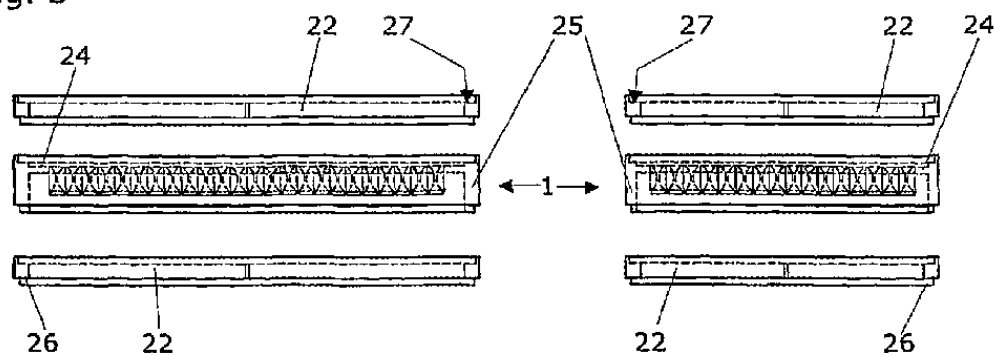


Fig. 6

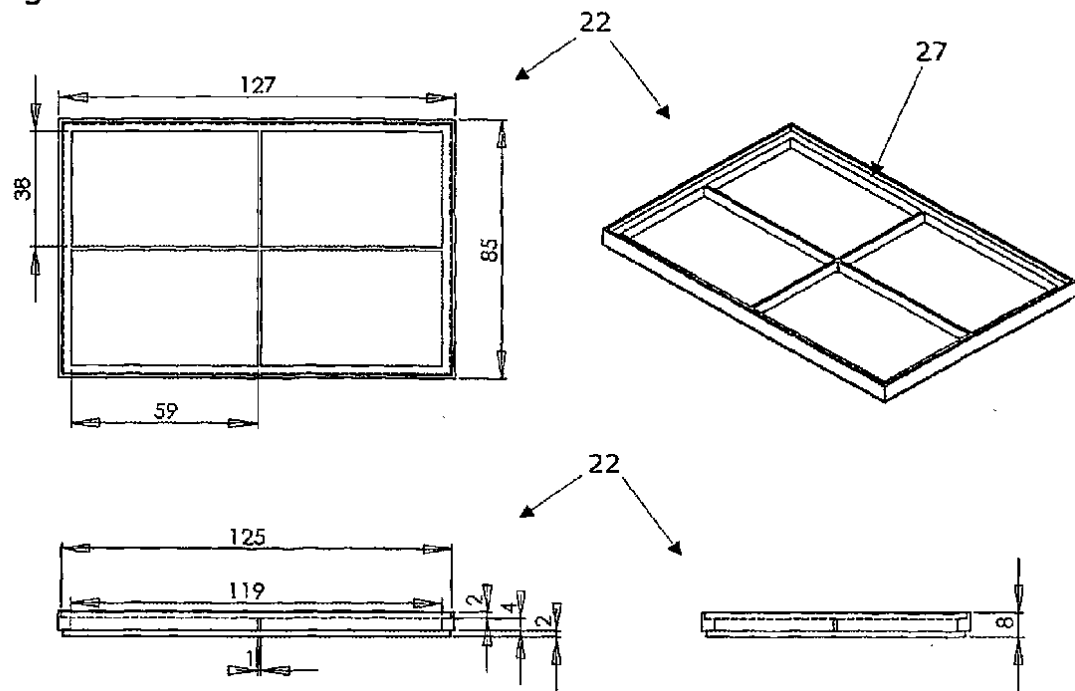


Fig. 7

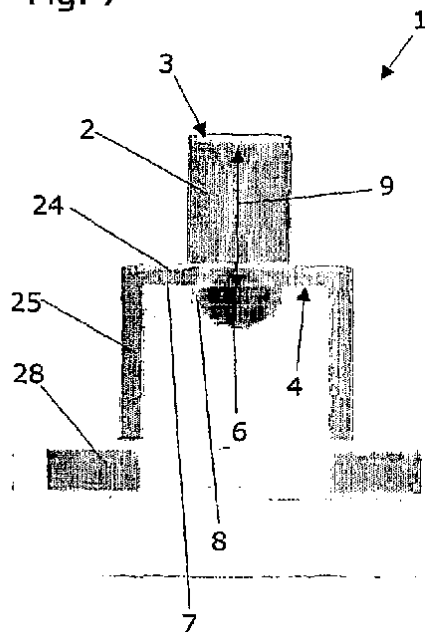


Fig. 8

