

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 242**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012** E 12174200 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** EP 2679670

54 Título: **Soporte de cultivo celular biomimético**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2017

73 Titular/es:

PARAK, WOLFGANG (33.3%)
Neustadt 2
35037 Marburg , DE;
MAHMOUDI, MORTEZA (33.3%) y
SHARIFI, SHAHRIAR (33.3%)

72 Inventor/es:

PARAK, WOLFGANG y
MAHMOUDI, MORTEZA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 609 242 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

Soporte de cultivo celular biomimético

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un soporte de cultivo celular con una superficie.

10 **Antecedentes de la invención**

- 15 Existen varias estructuras de soporte conocidas para cultivar células. La solicitud de patente del Reino Unido GB 2 482 612 A describe un soporte de cultivo celular para cultivar células madre mesenquimatosas con una superficie que comprende una pluralidad de pocillos, en la que la superficie tiene una raíz de la rugosidad cuadrática media (Rq) de 100 a 280 nm y una densidad lineal de 1,6 a 3,0 por 1 μm de longitud. Las formas de los pocillos y los tamaños de abertura de los pocillos se pueden usar para controlar la estructuración 3D de los agregados de células madre mesenquimatosas y sus tamaños durante el cultivo en el pocillo. El soporte de cultivo celular descrito puede inducir la diferenciación de las células madre mesenquimatosas en células de tejido, tales como condrocitos hialinos, adipocitos y osteoblastos.
- 20 La solicitud de patente europea EP 0 684 309 A1 se refiere a un sustrato de cultivo celular que comprende películas secas de colágeno fibrilar nativo producido mediante un método, en el que las fibras de colágeno se hidrolizan en ácido, se solubilizan y se vuelven a formar como geles en superficies porosas y en condiciones de sales no fisiológicas para producir fibras grandes con las estriaciones características de las fibras de colágeno que se encuentran *in vivo*. Tales sustratos de cultivos celulares mejoran la expresión de la función de barrera en células epiteliales intestinales en comparación con los sustratos de cultivo celular de colágeno de la técnica anterior. Además, las células epiteliales intestinales cultivadas en los sustratos de colágeno fibrilar nativos expresan funciones de barrera más rápidamente incluso en ausencia de agentes inductores de diferenciación.
- 30 J. Lock et al. informan en "nanomaterials enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells similar to a short peptide of BMP-7", International Journal of Nanomedicine, 2011:6, páginas 2769 to 2777, que la nano-hidroxiapatita y los compuestos de nano-hidroxiapatita-PLGA proporcionan una posibilidad de dirigir la adhesión y diferenciación de las células madre mesenquimatosas humanas. Dichos compuestos estimulan la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimatosas humanas comparable con la inyección directa de un péptido corto derivado de una proteína morfogenética ósea.
- 35 M. Guvendiren et al. describen en "The control of stem cell morphology and differentiation by hydrogel surface wrinkles", BIOMATERIALS, vol. 31, n.º 25, 1 septiembre de 2010, páginas 6511-6518, que los hidrogeles arrugados pueden servir como sustrato para las células madre mesenquimatosas humanas (CMMh). Con el fin de producir resultados reproducibles, se produjeron hidrogeles arrugados como geles de réplica de los maestros de poli(2-hidroxietilmetacrilato) (PHEMA) arrugados. Dependiendo del tipo de arrugas que muestran los maestros, las CMMh se diferencian en un fenotipo osteogénico o un fenotipo adipogénico.
- 40 H. V. Unadkat et al. en "An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate", PNAS, vol. 108, n.º 40, 4 de octubre de 2011, páginas 16565-16570, indican que "desafortunadamente, la naturaleza no prescribe la topografía de superficie óptima para una aplicación biomédica dada". Por lo tanto, los autores seleccionan 2.176 topografías de superficie distintas, diseñadas al azar, sobre las cuales cultivan células estromales mesenquimatosas humanas (CMMh). Dependiendo de la topografía de la superficie, cuando se cultivan las células individuales, se indujeron proliferación y diferenciación osteogénica en grados diferentes.
- 50 K. A. Kilian et al. observan en "Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells", PNAS, vol. 107, n.º 11, 16 de marzo de 2010, páginas 4872-4877 que se puede utilizar la forma para estimular la diferenciación de CMM a linajes distintos. Con este fin, las células se cultivaron con formas de flores y estrellas. Los autores encontraron que las formas que estimulan la contractilidad aumentada condujeron a la osteogénesis preferente, cuando las células fueron expuestas a una mezcla de señales del linaje. Por el contrario, las células con formas que estimulan una contractilidad baja preferían seguir un linaje adipogénico.
- 60 Sungjune Park et al., "Artificial Leaves via Reproduction of Hierarchical Structures by a Fast Molding and Curing Process", Macromolecular Rapid Communications, vol. 33, n.º 15, 11 de mayo de 2012, páginas 1300-1303 describen un enfoque práctico para la replicación de estructuras jerárquicas sobre una superficie nativa de la hoja mediante un proceso de moldeo rápido de dos etapas que combina tanto la durabilidad rápida para evitar el encogimiento de las células como la fuerte resistencia a compuestos químicos para otras aplicaciones. Las mediciones del ángulo de contacto con agua estática mostraron que las superficies biomiméticas muestran una humectabilidad similar a las hojas nativas.

Problema de acuerdo con la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un soporte de cultivo celular mejorado y un método mejorado para cultivar células.

5

Solución de acuerdo con la invención

Con el fin de resolver el problema anterior, la invención enseña un soporte de cultivo celular con una superficie, en el que la estructura de la superficie es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células como se indica en la reivindicación 1. Además, el problema se resuelve mediante el uso de una superficie de soporte de cultivo celular para cultivar células, en el que la estructura de la superficie es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células como se describe en la reivindicación 3. Una solución adicional se proporciona en la reivindicación 4 mediante un método para cultivar células, en la que las células se llevan cerca de una superficie del soporte de cultivo celular y en el que la estructura de la superficie es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células. La reivindicación 7 resuelve el problema proporcionando un método para producir un soporte de cultivo celular, en el que se registra la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células y se reproduce sobre el soporte de cultivo celular una estructura de superficie que se asemeja a la estructura de superficie registrada. Por otra parte, el problema de acuerdo con la invención se resuelve mediante la reivindicación 9, que divulga un método para cultivar células con el fin de producir un tipo celular específico, en el que las células se cultivan sobre un soporte de cultivo celular cuya estructura superficial es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación del tipo de célula específico.

10

15

20

25

30

35

40

45

En el caso de las reivindicaciones 1 a 4 y 9, la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular es una derivación positiva de la estructura de la superficie original. Esto significa que los elementos topográficos que sobresalen de la estructura de la superficie original también sobresalen de la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular derivado. En otras palabras, la estructura de la superficie producida es un positivo de la estructura de la superficie original. Como alternativa, la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular puede ser la forma negativa de la estructura de la superficie original, tal como puede ser el caso con un molde obtenido a partir de la estructura de superficie original. Si la estructura de la superficie del soporte del cultivo celular es una positiva, por lo que un positivo impresiona una forma sobre las células iniciales, que es similar a la forma que imprimiría la estructura de la superficie original. Por otra parte, si la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular es un negativo de la estructura de la superficie original, las células iniciales son forzadas a la forma de las células originales. Sin perjuicio, los inventores han obtenido datos que sugieren que forzar una célula inicial a la forma de una célula original cambiará las características de la célula inicial, lo que puede conducir, en última instancia, a que la célula inicial asuma el mismo destino que la célula original. Ventajosamente, la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular derivada de una medición de una estructura de la superficie original muestra un alto grado de similitud con la estructura de la superficie original.

De acuerdo con la reivindicación 7, se reproduce sobre el soporte de cultivo celular una estructura de superficie que se asemeja a la estructura de superficie registrada. Al registrar la estructura de superficie original y, después, reproducirla sobre el soporte de cultivo celular, se pueden hacer cambios en la estructura de la superficie antes de reproducirla. Por ejemplo, se puede introducir un grado de abstracción mientras se sigue produciendo un soporte de cultivo celular con las propiedades deseadas. Además, se pueden corregir errores en el registro. La separación de de registro y reproducción también facilita la producción en masa de la superficie del soporte del cultivo celular. Por ejemplo, se puede registrar un área pequeña y reproducir su estructura de superficie aplicándola repetidamente sobre una superficie más grande, como un pavimento de elementos idénticos.

50

55

60

Una asociación de células de acuerdo con la invención comprende al menos dos células, preferentemente varias células, que pueden o no estar conectadas entre sí. Las células conectadas en la asociación de células pueden formar un contacto directo entre sí y/o pueden estar conectadas a través de componentes extracelulares, tales como proteínas de la matriz extracelular. La asociación de células puede contener células de diferentes tipos. Cuando la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular y la estructura de la superficie de una célula o la asociación de células se asemejan entre sí, significa que las dos dichas estructuras de la superficie tienen al menos uno, preferentemente dos, más preferentemente tres, lo más preferentemente cinco características esenciales, en las que son iguales o muestran un alto grado de similitud. En la medida en que la característica se puede expresar como un valor numérico, un alto grado de similitud en una característica significa que su valor para una primera estructura de superficie está, preferentemente, dentro del 50 % y 150 %, preferentemente dentro del 75 % y 125 %, preferentemente dentro del 90 % y 110 %, preferentemente dentro del 95 % y 105 %, preferentemente dentro del 98 % y 102 %, preferentemente dentro del 99 % y 101 %, preferentemente dentro del 99% y el 100,1 % de su valor de una segunda estructura de superficie para comparar con la primera estructura de la superficie.

65

Las características esenciales de dichas estructuras de superficie incluyen rugosidad, densidad de cavidad, dimensiones de la cavidad, relaciones de las dimensiones de la cavidad y otras características topográficas. Las cavidades de acuerdo con la invención pueden ser estructuras que contienen un volumen por debajo, así como estructuras que contienen un volumen por encima del plano de superficie de la estructura de la superficie, si dicho

plano de la superficie existe. En otras palabras, las cavidades pueden contener porciones elevadas y/o rebajadas. La escala de la estructura de la superficie de acuerdo con la invención puede ser, cuando se hace referencia a una característica, una escala del orden de milímetros, micrómetros y/o nanómetros. Las características de una estructura de superficie pueden diferir según la escala aplicada. Una estructura superficial puede, por ejemplo, parecer lisa a una escala milimétrica, pero contiene numerosas cavidades a escala micrométrica.

La rugosidad se puede medir en al menos uno de sus parámetros clave, tales como los especificados en la norma internacional ISO 25178 (cuyas porciones relevantes se incluyen en la presente divulgación por referencia) incluyendo, pero sin limitarse a, la raíz de la altura cuadrada media de la superficie, el sesgo de la distribución de la altura, la kurtosis de la distribución de la altura, la altura máxima de los picos, la altura máxima de los valles, la altura máxima de la superficie, la media aritmética de la altura de la superficie, la tasa de autocorrelación del decaimiento más rápido, la relación de aspecto de la textura de la superficie, la dirección de la textura de la superficie, la raíz media cuadrática del gradiente de la superficie, la relación del área desarrollada, la relación del área de apoyo de la superficie, la altura de la relación del área de apoyo de la superficie, la altura extrema del pico, el volumen del material a una altura dada, el volumen de vacío a una altura dada, el volumen del material de los picos, el volumen del material del núcleo, el volumen de vacío del núcleo, el volumen de vacío de los valles, la densidad de picos, la media aritmética de la curvatura de los picos, la altura de 10 puntos, la altura del pico de 5 puntos, la altura del valle de 5 puntos, el área de los valles cerrados, el área de las colinas cerradas, el volumen de los valles cerrados y el volumen de las colinas cerradas. La densidad de la cavidad es una medida para las cavidades presentes por área de la estructura de la superficie. Las dimensiones de la cavidad se pueden determinar midiendo las dimensiones de las cavidades a lo largo de los ejes x, y y z de la estructura de la superficie o, como alternativa, a lo largo de dichos ejes que están definidos por las dimensiones más largas y/o más pequeñas de las cavidades respectivas. Por ejemplo, las dimensiones de la cavidad se pueden medir a lo largo del eje de longitud de las cavidades, si existe un eje de longitud, y dos ejes adicionales perpendiculares al eje de longitud. Si dichas estructuras de superficie muestran al menos cierto grado de autosimilitud, su dimensión de Hausdorff puede verse como una característica topográfica. Otra característica topográfica es la dirección, en la que apuntan los ejes de longitud de las cavidades. La forma concreta de las cavidades, por ejemplo, una forma redonda, ovalada, cuadrada, rectangular, poligonal, estelar o de huso, es también una característica esencial.

En el presente documento, la estructura de la superficie de una célula o la asociación de células, cuya estructura de la superficie se asemeja a la estructura de la superficie del soporte de cultivo celular, también se describe como la estructura de la superficie original. Por consiguiente, dicha célula y dicha asociación de células se denominan células originales. Las células que se cultivan en el soporte de cultivo celular de acuerdo con la invención se denominan células iniciales en el momento en que se colocan por primera vez en el soporte de cultivo celular. Las células que se desarrollan a partir de las células iniciales mientras están situadas sobre el soporte de cultivo celular se denominan células derivadas. Cuando la estructura de la superficie original se registra en un método para producir un soporte de cultivo celular, significa que la estructura de la superficie original se mide de modo que se registra al menos una de sus características.

Si una estructura de superficie de soporte de cultivo celular se asemeja a una estructura de la superficie de una célula o una asociación de células originales de un tipo específico y las células iniciales se cultivan sobre la estructura de la superficie de soporte de cultivo celular, se pueden producir células derivadas del tipo específico. Cuando las células originales son del mismo tipo que las células derivadas, significa que las células originales y derivadas comparten características importantes. Tales características importantes incluyen la configuración o forma de la célula y la estructura de la superficie celular en una escala micrométrica y/o nanométrica. Otras características importantes son la expresión de uno o varios genes. Las mediciones de la expresión génica se pueden obtener, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, secuenciación de ADN o de una micromatriz de ADN. Los tipos de células individuales pueden mostrar un típico patrón de expresión génica en el que un conjunto definido de genes muestran ciertos estados de nivel de expresión. El nivel de expresión puede tomar diferentes estados, incluyendo ninguna expresión, expresión baja, expresión intermedia y expresión alta. Preferentemente, el nivel de expresión de un gen se normaliza con el nivel de expresión de un gen doméstico. Los valores de umbral que separan los estados del nivel de expresión dependen del procedimiento de medición aplicado. Los patrones de expresión génica y los valores umbrales correspondientes son conocidos por el experto en la técnica y pueden usarse para identificar un tipo celular específico. Además, los patrones de expresión génica de tipos de células individuales pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas, tales como la Gene Expression Omnibus (R. Edgar et al., Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository in Nucleic Acids Res. 1 ene 2002;30(1):207-10, cuyas partes relevantes se incluyen en la presente divulgación por referencia).

Las células derivadas y las células originales se consideran pertenecientes al mismo tipo específico cuando al menos el 50 %, preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 90 % y, lo más preferentemente, el 100 % de los genes que forman parte del patrón de expresión del tipo específico en cuestión muestran los mismos estados de nivel de expresión.

Como alternativa, la identificación del tipo de célula puede llevarse a cabo midiendo los niveles de expresión proteicos, por ejemplo usando transferencia Western, ELISA, citometría de flujo de células marcadas con anticuerpos, micromatrices de anticuerpos, electroforesis en gel 2D o RMN de proteínas. Se puede determinar si las

células originales y derivadas son del mismo tipo específico basado en la expresión de proteínas en analogía con el análisis basado en los niveles de expresión génica como se indicó anteriormente.

5 Cuando la célula derivada se produce a partir de la célula inicial, significa que la célula derivada ha permanecido sin cambios o que ha cambiado. Este cambio puede ser una diferenciación, una desdiferenciación o un cambio "lateral", en el que una célula diferenciada puede convertirse en otra célula diferenciada en una trayectoria de diferenciación distinta.

10 Para decir que las células originales en la asociación de células son del tipo específico, al menos un 0,1 %, preferentemente al menos un 1 %, preferentemente al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, preferentemente al menos un 50 %, preferentemente al menos un 70 % y, lo más preferentemente, al menos un 90 % de las células originales necesitan ser del tipo específico.

15 Producir las células del tipo específico significa que se producen al menos algunas células del tipo específico, es decir se producen al menos un 0,1 %, preferentemente al menos un 1 %, preferentemente al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, preferentemente al menos un 50 %, preferentemente al menos un 70 % y, lo más preferentemente, al menos un 90% de las células del tipo específico. Preferentemente, se producen más células del tipo específico que el cultivo de las células iniciales en una estructura de soporte no estructurada en condiciones de cultivo de células, de otro modo idénticas.

20 Proporcionando un soporte de cultivo celular con una estructura de la superficie, que imita las características esenciales de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células, es posible cultivar células en un entorno más natural. Al registrar una estructura de la superficie de una célula o una asociación de células, es posible fabricar soportes de cultivo celular con estructuras de la superficie que se asemejan mucho a la estructura de la superficie de la asociación de células. Cuando las células se cultivan para producir un tipo celular específico, es ventajoso cultivar las células sobre una estructura de la superficie, que se parece a una célula o una asociación del tipo específico. De esta manera, el medio fisiológico se puede replicar más estrechamente. El ambiente de cultivo celular más natural puede producir datos biológicamente y médicamente más relevantes, ya que los resultados podrían ser menos distorsionados por estímulos artificiales.

30 ***Realizaciones preferidas de la invención***

Las características preferidas de la invención, que pueden aplicarse solas o en combinación, se tratan a continuación y en las reivindicaciones dependientes.

35 Las mediciones de la estructura de la superficie original pueden obtenerse, por ejemplo, utilizando un procedimiento sin contacto, incluyendo mediciones ópticas, preferentemente usando un láser, para determinar la estructura de la superficie original. Un método sin contacto puede producir datos estructurales de alta resolución, mientras que a menudo es posible dejar intacta la estructura de la superficie original. Se puede emplear un microscopio de fuerza atómica (MFA) en un procedimiento sin contacto. En este caso, el MFA se puede colocar en modo de derivación, en el que el soporte del MFA oscila por encima de la estructura de superficie original sin tocarla y la altura del soporte por encima de la estructura de la superficie original se determina mediante los cambios en su frecuencia de resonancia. La estructura de la superficie original puede estar recubierta con metal antes de la medición del MFA. De esta manera, a menudo se pueden obtener datos con una resolución espacial muy alta.

45 Como alternativa, se pueden usar técnicas basadas en contacto, por ejemplo, instrumentos similares a un estilete. Además, se puede usar un MFA en un procedimiento basado en contacto. Con este fin, el MFA se puede colocar en modo de contacto, en el que el soporte del MFA está tocando la estructura de superficie original y la altura de la estructura de la superficie se determina ajustando el soporte de tal manera que la desviación del soporte permanezca constante. Las técnicas basadas en contacto a menudo son menos complejas y pueden implementarse con costes menores.

50 En una realización preferida de acuerdo con la invención, la estructura de la superficie del soporte del cultivo celular se asemeja a la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células de un tipo celular específico y el cultivo de las células sobre el soporte de cultivo celular da lugar a células del tipo específico. Sin perjuicio, el soporte de cultivo celular de acuerdo con la invención puede obligar a las células iniciales a tomar la forma de las células originales, lo que a su vez puede hacer que las células iniciales se desarrollen en células derivadas del tipo celular de las células originales. De esta manera, las células del tipo específico pueden producirse de forma fiable.

60 En una realización preferida del método para cultivar células de acuerdo con la invención, las células que se van a cultivar son células madre. Las células madre son células que no se han diferenciado totalmente en un tipo celular al final de una trayectoria de diferenciación. Los ejemplos de células madre son células madre omnipotenciales, que pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula, células madre pluripotenciales, que pueden diferenciarse en muchos tipos de células, pero no en todos, y células madre multipotenciales, que solo pueden diferenciarse en un número limitado de tipos celulares, es decir, los de una familia de células estrechamente relacionadas. El cultivo de células madre sobre el soporte de cultivo celular de acuerdo con la invención conlleva la ventaja de que se puede

producir un gran número de tipos de células diferentes. No obstante, la invención no está limitada a las células madre. En principio, se puede cultivar y/o producir cualquier tipo de célula en el método para cultivar células de acuerdo con la invención. Esto se aplica en particular a las células que pueden formar un tejido, incluyendo, por ejemplo, fibroblastos, células de tejido cardíaco y células neuronales.

5 En un método preferido de acuerdo con la invención, el cultivo sobre la superficie del soporte del cultivo celular produce un tipo celular específico. Cuando las células iniciales se cultivan en la parte superior del soporte de cultivo celular de acuerdo con la invención, se pueden producir células derivadas del tipo celular específico. Esto puede ser una manera fácil de producir células del tipo específico.

10 En una realización preferida de la invención, el registro se realiza mediante la producción de un molde de una célula o una asociación de células. El molde se puede obtener vertiendo un líquido, que posteriormente se endurece, en una célula o en la asociación de células. El líquido es, preferentemente, un polímero reticulable tal como, por ejemplo, poli(metacrilato de metilo (PMMA) o poli (etilenglicol)-co-fumarato (PEGF). Empleando dichas sustancias, se puede obtener un alto grado de similitud de la estructura de la superficie del molde con la estructura de la superficie de una célula o asociación de células

Breve descripción de las figuras

20 La invención se ilustra con mayor detalle con la ayuda de gráficos, una imagen de microscopia y dibujos esquemáticos.

La figura 1 muestra células cultivadas en un soporte de cultivo celular;

25 La figura 2 muestra los resultados de los experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y

La figura 3 muestra la producción, una imagen de microscopia de fuerza atómica y un perfil de un molde.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

30 Se aislaron condrocitos de láminas de cartilago de conejos New Zealand. Los condrocitos aislados se cultivaron en placas de poliestireno de cultivo de tejidos como cultivo monocapa. Una semana después del aislamiento, los condrocitos en el cultivo de tejidos tenían una forma esférica. Tres semanas después del aislamiento, los condrocitos se habían desdiferenciado en fibroblastos en forma de huso (figura 3a, primer dibujo esquemático de M la izquierda). Posteriormente, se obtuvieron moldes tanto de los cultivos de condrocitos esféricos como de los fibroblastos en forma de huso. Esto se consiguió vertiendo silicona por encima de la asociación de células originales 1, que, en este caso, eran condrocitos esféricos o fibroblastos en forma de huso, contenidos en las placas de cultivo de tejidos (figura 3a, segundo dibujo esquemático de la izquierda). La silicona fue seleccionada por su facilidad de manipulación, su capacidad para reproducir estructuras de superficie a escala nanométrica, la capacidad de entrar en contacto estrecho con las células originales 1 en cultivo, su propiedad de transparencia, gomosidad y elasticidad. La silicona utilizada fue polidimetilsiloxano (PDMS, nombre de la marca: Sylgard, que es vulcanizable a temperatura ambiente y se obtuvo en Dow Corning, EE.UU.). Después de que la masa de silicona hubiera curado sobre las células originales 1, se retiró de las placas de cultivo celular (figura 3a, tercer dibujo esquemático de la izquierda). A continuación, la silicona se lavó extensamente con solución de hidróxido de sodio 1 M con el fin de eliminar restos de células y residuos de proteína (figura 3a, cuarto dibujo esquemático de la izquierda). De este modo, se adquirió un molde negativo 2 de fibroblastos en forma de huso, demostrado en la figura 1b. Además, se obtuvo un molde negativo 2 de condrocitos esféricos como se muestra en la figura 1a. La figura 3b muestra una imagen y un perfil de microscopia de fuerza atómica obtenidos a partir de uno de dichos moldes de silicona 2 de condrocitos esféricos. La imagen demuestra la formación de formas celulares 3D en el molde de silicona 2. A continuación, se usaron los moldes 2 como soportes de cultivo celular 3 con una superficie 4, cuya estructura 5 se asemejaba a una asociación de células originales 1.

Células iniciales 6, en particular células madre mesenquimatosas derivadas de adipocitos (CMMA) se cultivaron sobre el molde esférico de condrocitos 2 (mostrado en la figura 1a, izquierda) y sobre el molde 2 de fibroblastos en forma de huso (mostrado en la figura 1b, izquierda). Se confirmó que las CMMA se unían a la superficie del soporte de cultivo celular 3 de la silicona. Después de 1 semana, se obtuvieron células derivadas 7 a partir de las células iniciales 6. Al comparar las células derivadas 7 cultivadas en los dos moldes de silicona 2 diferentes mediante microscopia óptica, de fluorescencia y de fuerza atómica, se encontró que las CMMA se habían transformado en dos tipos de células morfológicamente diferentes. Cuando se cultivan sobre el molde de silicona derivado de condrocitos esféricos 2, las CMMA asumen una forma esférica (figura 1a, derecha). Por el contrario, las CMMA cultivadas en el molde derivado de fibroblastos en forma de huso 2 se desarrollaron en células derivadas 7 que tenían una configuración tipo huso (figura 1b, derecha).

65 Para confirmar los hallazgos morfológicos a nivel molecular, se midieron los niveles de expresión génica de las células derivadas 7 cultivadas sobre los moldes de silicona 2. Con este fin, las CMMA se cultivaron durante 5 semanas en los moldes de silicona obtenidos de condrocitos y fibroblastos, así como en placas de cultivo de tejido

de poliestireno regular (figura 1c). Se aisló el ARN de las células derivadas 7 y se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Específicamente, se midió la expresión de los genes *agrecano*, *col1* y *col2*. Los resultados se muestran en la figura 2 normalizados al nivel de expresión del gen doméstico de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Las CMMA cultivadas en moldes de silicona derivados de condrocitos 2 expresaron niveles altos de los marcadores de condrocitos *agrecano*, *col1* y *col2* (figura 2a). Las CMMA sobre los moldes derivados de fibroblastos 2 también expresaron niveles altos de *agrecano* y *col1*, sin embargo, no hubo expresión de *col2* (figura 2b). Además, mientras que las CMMA cultivadas en las placas de poliestireno regular expresaron niveles altos de *col1*, no expresaron ni *col2* ni *agrecano* (figura 2c). Esto muestra que los niveles de expresión génica difieren, dependiendo de a partir de cual superficie de cultivo celular 4 derivó. Además, la expresión también difiere de las células derivadas 7 cultivadas en la placa de poliestireno "neutra". Particularmente sorprendente es la expresión del condrocito marcador *col2*, que solo estaba presente en las CMMA cultivados en moldes derivados de condrocitos.

Sin perjuicio, los inventores concluyen que las superficies de cultivo celular 4 derivadas de cultivos celulares pueden dirigir la diferenciación de células 8. Los inventores presumen, sin perjuicio, un mecanismo que puede describirse como diferenciación inducida por la forma. En este mecanismo, cuando una célula inicial es conformada por una fuerza externa aplicada a través del soporte de cultivo celular, se producen cambios en las vías de señalización celular, obligando a las células iniciales a adoptar el mismo tipo que las células originales.

Las características divulgadas en la descripción anterior, las reivindicaciones y las figuras pueden ser de importancia tanto individualmente como en cualquier combinación deseada para la realización de la invención en sus diversas realizaciones.

Protocolos

Aislamiento de células madre y condrocitos

El aislamiento de las CMMA y los condrocitos se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: se realizaron láminas de cartílago articular de conejo (conejos blancos New Zealand) y se digirieron con una solución de tripsina-EDTA (0,25 %, Sigma, EE.UU.) durante 1 hora y una solución de colagenasa de tipo II (0,08 mg/ml, Sigma, EE.UU.) durante 24 horas a 37 °C. Con el fin de aislar las CMMA, se recogió el tejido adiposo de la parte superior del intestino y se digirió en colagenasa de tipo I (0,02 mg/ml, Sigma, EE.UU.) durante 1 hora en una incubadora. Se cultivaron las CMMA en placas de poliestireno de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 3×10^4 células por pocillo.

Protocolo de cultivo de células madre sobre los sustratos de silicona

Las CMMA se cultivaron sobre los moldes a una densidad de 3×10^4 células durante 1 semana. La morfología de las células se evaluó mediante examen óptico con y sin tinción fluorescente de los microtúbulos. Las células se fijaron en paraformaldehído (4 %, Sigma, EE.UU.) durante 15 minutos y se permeabilizaron en triton x100 (0,01 %, Sigma, EE.UU.) durante 10 minutos. Los filamentos de actina se tiñeron con faloidina conjugada con FITC (Sigma, EE.UU.) durante 45 minutos en oscuridad y se visualizaron mediante microscopia de fluorescencia (Zeiss, Axioscope, Alemania). Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante Hoechst 33258 (Sigma, EE.UU.) y se fusionaron con tinción de actina.

Aislamiento y procesamiento de ARN

El núcleo RNeasy MiniKit (74104, QIAGEN, Alemania) se utilizó para la extracción de ARN de las células cultivadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN celular se cuantificó determinando el máximo de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf, Alemania). Se obtuvo el ADNc mezclando 1 µg de ARN total y 20 µl de mezcla de reacción que incluía 4 µl de tampón de PCR (15X), 2 µl de dNTP (20 mM, Roche, Alemania), 1 µl de hexámero aleatorio 10 µmol/µl (N6, Roche, Alemania), 2 µl de H₂O estéril desionizada y 1 µl de transcriptasa inversa (200 U/µl, Fermentasa, Rusia). Finalmente, la mezcla se mantuvo a 42 °C durante 45 minutos y después se incubó a 90 °C durante 5 minutos.

Análisis de PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems) con mezcla maestra de verse SYBR para PCR (Applied Biosystem) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Lista de números de referencia:

- 1 Célula original
- 2 Molde
- 3 Soportes de cultivo celular
- 4 Superficie de los soportes de cultivo celular

- 5 Estructura de la superficie de los soportes de cultivo celular
- 6 Células iniciales
- 7 Células derivadas
- 8 Células

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Soporte de cultivo celular (3) con una superficie (4), **caracterizado por que** la estructura (5) de la superficie (4) es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células (8), en el que la estructura (5) de la superficie (4) se obtiene registrando la estructura de la superficie de una célula o la asociación de células del tipo celular específico y reproduciendo sobre el soporte de cultivo celular una estructura de la superficie que se asemeja a la estructura de la superficie registrada.
- 10 2. Soporte de cultivo celular (3) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la estructura (5) de la superficie (4) es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células (8) de un tipo celular específico y el cultivo de células (8) sobre el soporte de cultivo celular (3) da lugar a células (8) del tipo específico.
- 15 3. Uso de una superficie del soporte de cultivo celular (4) para cultivar células (8), **caracterizado por que** la estructura (5) de la superficie (4) es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células (8), en donde la estructura (5) de la superficie (4) se obtiene registrando la estructura de la superficie de una célula o la asociación de células del tipo celular específico y reproduciendo sobre el soporte de cultivo celular una estructura de la superficie que se asemeja a la estructura de la superficie registrada.
- 20 4. Método de cultivo de células (8), en el que las células (8) se ponen en proximidad estrecha con una superficie del soporte de cultivo celular (4), **caracterizado por que** la estructura (5) de la superficie (4) es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células (8), en donde la estructura (5) de la superficie (4) se obtiene registrando la estructura de la superficie de una célula o la asociación de células del tipo celular específico y reproduciendo sobre el soporte de cultivo celular una estructura de la superficie que se asemeja a la estructura de la superficie registrada.
- 25 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** las células (8) que se van a cultivar son células madre.
- 30 6. Método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado por que** el cultivo en la superficie de soporte de cultivo celular (4) produce un tipo de célula específico.
- 35 7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** la estructura (5) de la superficie (4) es una derivación positiva o negativa de la estructura de la superficie de una célula o una asociación de células (8) del tipo de célula específica.
- 40 8. Método para producir un soporte de cultivo celular (3), **caracterizado por** las siguientes etapas:
 registrar la estructura de la superficie (5) de una célula o una asociación de células (8);
 reproducir sobre el soporte de cultivo celular (3) una estructura de superficie (5) que se asemeja a la estructura de superficie registrada .
- 45 9. Método para la producción de un soporte de cultivo celular (3) de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** el registro se realiza mediante la producción de un molde (2) a partir de una célula o una asociación de células (8).

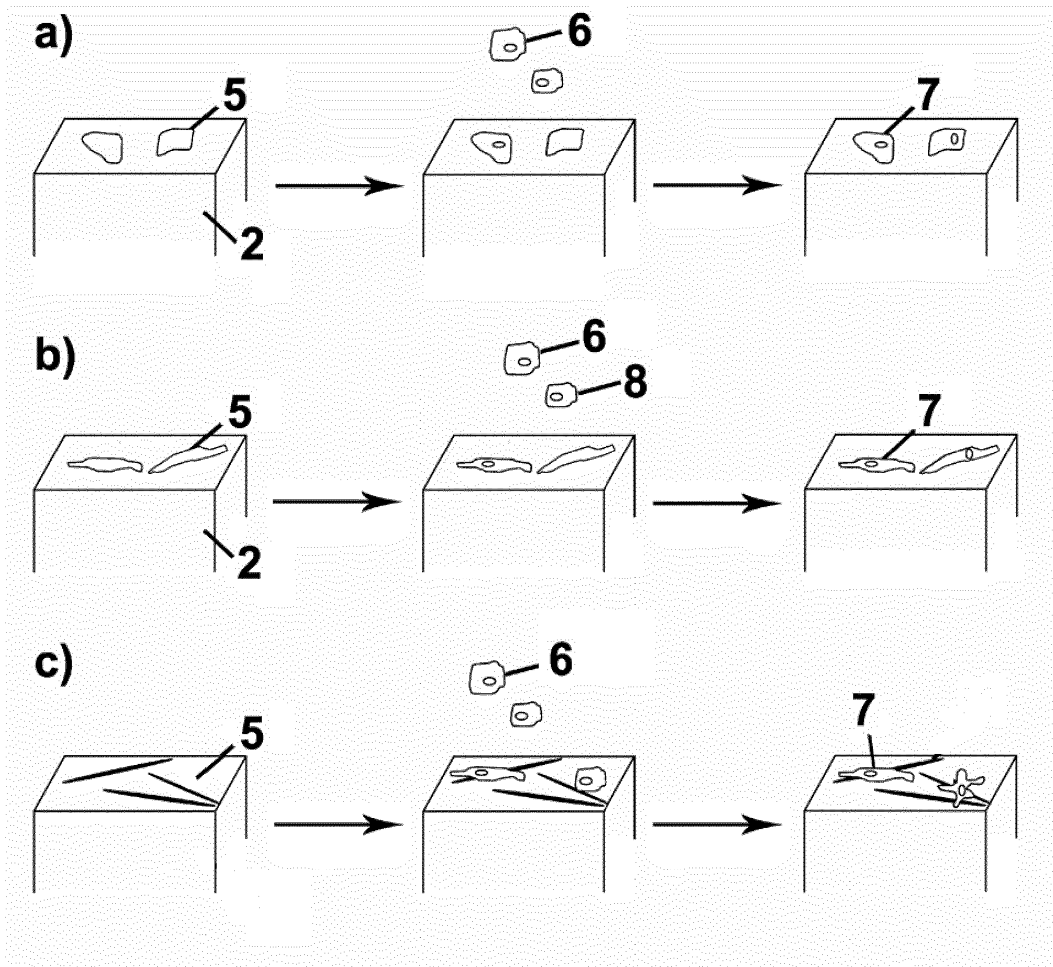


Fig. 1

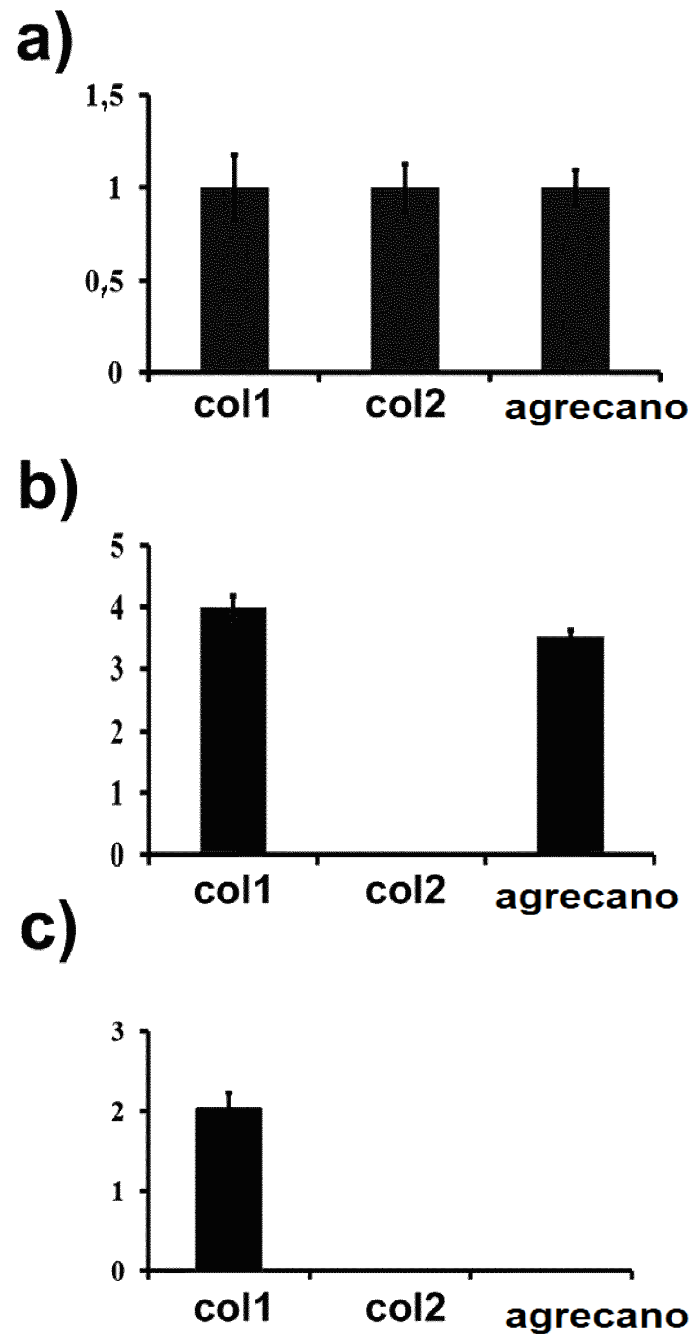


Fig. 2

