

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 313**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/02** (2006.01)

**C12M 1/42** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 13/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2011 PCT/US2011/046183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13019212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2011 E 11869510 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2739717**

54 Título: **Hardware para cultivo magnético en 3D**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**NANO3D BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**7000 Fannin Street Suite 2140**  
**Houston, TX 77030, US**

72 Inventor/es:

**SOUZA, GLAUCO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 644 313 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**

Hardware para cultivo magnético en 3D

Solicitudes anteriores relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad para el documento US N° de serie 61/372.164, presentado el 10 de Agosto de 2010 e incorporado por referencia en su totalidad.

Declaración de investigación patrocinada por el Gobierno Federal

No se aplica.

Referencia a apéndice de microficha

No se aplica.

10 Campo de la invención

El invento se refiere a distintos dispositivos para manipular células magnéticas que tienen partículas magnéticas en ellas o unidas a ellas, lo que es importante en la investigación y aplicaciones biológicas. Más particularmente, la invención se refiere a recipientes simples, duraderos y económicos, para cultivar células magnéticas y una propipeta magnética para mover las células magnéticas.

15 Antecedentes de la invención

20 El cultivo celular, el cual es el crecimiento celular en un entorno in vitro artificial, es una técnica crucial en la investigación y desarrollo en ciencias de la vida y muchas aplicaciones de biotecnología y salud. Un entorno de cultivo celular ideal es uno que promueve el crecimiento rápido y robusto de células sanas, en donde la morfología y la función de las células son dominadas por interacciones célula a célula, señalización de célula específica, y/o variables de control experimentales, en vez de ser influenciadas por las propiedades del entorno de cultivo artificial. A menudo, se desea cultivar células que se asemejan mucho a las células que crecen en organismos vivos, incluyendo su expresión genética, características funcionales de células diferenciadas, y la formación de una matriz extracelular. El coste y la capacidad de aumento de producción son también consideraciones críticas para la potencial aplicación de tales tecnologías.

25 Como el interés en nanotecnología, materiales, y biología celular ha crecido, ha resultado evidente que una limitación importante en nuestra capacidad para manipular, hacer crecer y usar células y tejidos ha sido nuestra falta de capacidad para controlar el diseño celular y tejidos útiles para biología celular y medicina.

30 Durante el desarrollo de organismos vivos, la estructura y orden en la forma de diseños emerge naturalmente a través de mecanismos que aún no han sido completamente comprendidos. Si uno quiere estudiar o replicar tejido vivo en un entorno artificial, es crítico ser capaz de reproducir los diseños existentes de manera natural. La capacidad para dirigir y controlar manualmente los diseños de células vivas, especialmente en tres dimensiones y sobre superficies, habilitará muchas aplicaciones de bioingeniería y médicas hasta ahora no realizadas.

35 El cultivo celular tradicional en placas Petri produce el crecimiento de células bidimensionales (2D) con expresión genética, señalización, y morfología que puede diferir significativamente de las condiciones en organismos vivos en 3D, y comprometiendo así la relevancia clínica de las células o tejido para uso médico.

Aunque se han desarrollado biorreactores giratorios o entornos de gel a base de proteínas en intentos de permitir cultivo de células tridimensionales (3D), la aplicación amplia de tales métodos ha sido obstaculizada severamente por costes elevados o complejidad. Así, una plataforma de tecnología para habilitar el cultivo de células en 3D es aún una necesidad insatisfecha.

40 Además, ya que el uso de células cultivadas continúa desarrollándose, es cada vez más difícil desarrollar sistemas para manipular y manejar de forma segura estas entidades. Por ejemplo, las entidades de normalización y reglamentación y las buenas prácticas de laboratorio intentan a menudo minimizar la cantidad de exposición de células a objetos externos, de modo que se minimice la contaminación. Así, son deseables dispositivos que pueden manipular células y tejido sin exposición a entorno externo.

45 Un desarrollo reciente en técnicas de cultivo de células en 3D es utilizar fuerzas magnéticas sobre células o sobre micro-portadores magnéticos revestidos con células, para crear cultivos de células tridimensionales (por ejemplo, Akira en US2006063252, WO2004083412, WO2004083416; Becker en US2009137018, WO2005003332; Felder en US2005054101, WO2005010162; Souza en WO2010036957; Ito y col., Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING 100(1): 1-11 (2005); y Souza, G.R. y col., Three-dimensional Tissue Culture Based on Magnetic Cell Levitation. Nature Nanotechnol. 5, 291-296, doi: 10.1038/nano.2010.23(2010)).

El estado actual de la técnica en dispositivos de cultivo magnético es el imán simple en la parte superior de una placa Petri utilizada por Souza en el documento WO 2010036957 y Souza y col., Three-dimensional Tissue Culture Based on Magnetic Cell Levitation. Nature Nanotechnol. 5, 291-296, doi: 10.1038/nnano.2010.23(2010). Mientras, que en principio, simples y al menos eficaces, tales dispositivos no son susceptibles de ampliación, se liberan fácilmente, y no permiten manipulaciones complejas de condiciones de cultivo o células magnéticas.

Ito y col., Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles, Journal of Bioscience and Bioengineering 100(1): 1-11 (2005), y US2006063252, WO2004083412, WO2004083416 usa simplemente un imán de neodimio situado fuera de la parte inferior de la cavidad. Como el imán sobre una tapa, estos no son susceptibles de ampliación, se liberan fácilmente, y no permiten manipulaciones complejas de condiciones de cultivo.

Los documentos US2005054101 y WO2005010162 describen una máquina para mantener y mover imanes para mover, colocar y agitar micro portadores magnéticos y células fijadas. Sin embargo, este dispositivo no es compatible con herramientas de microscopios, y requiere un dispositivo complejo independiente. Tampoco proporciona acceso fácil a los cultivos levitados, haciendo así difícil manipular los cultivos. Además, las células tienen que ser en primer lugar fijadas a la superficie de los micro-portadores, que son varias veces más grandes que una sola célula. Esto introduce un sustrato artificial con el cual interactúan las células, en vez de promover rápidamente las interacciones naturales célula a célula. Los campos magnéticos y los gradientes de campo producidos por esta disposición son relativamente débiles y requieren que las células sean fijadas a grandes micro-portadores que contienen una gran cantidad de material magnético con el fin de manipularlos.

Los documentos US2009137018 y WO2005003332 han descrito una disposición estática de imanes para levitación de micro-portadores. Este dispositivo es difícil de manejar sin embargo, y no adecuado para ampliación. También, este dispositivo requiere que las células sean colocadas en una bolsa y que un gran imán esté por encima o alrededor de la gran bolsa de plástico. Así, el dispositivo no es compatible con herramientas de microscopios. Tampoco proporciona acceso fácil a los cultivos levitados, haciendo difícil manipular los cultivos. Además, otra vez las células son en primer lugar fijadas a la superficie de los micro-portadores, que como se ha descrito antes introduce un sustrato artificial en el cultivo. Los campos magnéticos y gradientes de campo producidos por esta disposición son también relativamente débiles y requieren que las células sean fijadas a grandes micro-portadores que contienen una gran cantidad de material magnético con el fin de manipularlos.

Para hacer cultivo de células en 3D con fuerzas magnéticas más conveniente, flexible y seguro para usuarios, hay una gran necesidad de mejorar los métodos y hardware para mantener imanes en la orientación apropiada con respecto a las células y el recipiente que las contiene. Hay también una gran necesidad de métodos y hardware para manipular los imanes y células durante y después del cultivo. En muchos casos sería ventajoso que tales sistemas sean compatibles con recipientes de cultivo de célula comúnmente utilizados como frascos y placas Petri, placas de múltiples cavidades, y sistemas de cultivo de rendimiento elevado.

Así, lo que es necesario en la técnica son dispositivos de cultivo magnéticos y pipetas magnéticas que pueden ser utilizadas con robótica existente y placas de micro-titulación o Petri, y que son simples, robustas, fácilmente ampliables y económicas. Además los dispositivos deberían ser adaptables para la aplicación de interés. Así, idealmente la forma o intensidad del campo magnético pueden ser variadas fácilmente de una manera que es simple, conveniente, reproducible y consistente con técnicas de cultivo celular estéril.

#### Compendio de la Invención

La presente invención se refiere a dispositivos para mantener imanes en una orientación apropiada con respecto a los recipientes para cultivo de células de 3D de células magnetizadas, bien como un componente del recipiente, o bien como un componente separado que trabaja con el recipiente. En particular, la presente invención se refiere a un sistema de cultivo de células magnéticas, que comprende un recipiente (3) de cultivo de células y un capuchón (1) conformado para ajustarse sobre o bajo dicho recipiente (3) de cultivo de células, incluyendo dicho capuchón (1) un labio (6) alrededor de un borde exterior de dicho capuchón, en donde dicho labio (6) ajusta sobre y alrededor de un borde exterior de dicho recipiente (3) de cultivo, teniendo dicho capuchón (1) una o más depresiones en las que uno o más imanes (2) son fijados de tal manera que dichos imanes (2) se sitúan por encima o por debajo de dicho recipiente (3) de cultivo de células y no tocan un medio en dicho recipiente.

Como se ha utilizado en este documento "recipiente" o "cavidad" se refiere a cualquier contenedor para cultivar células, tal como una placa Petri, frasco, o placa de cultivo de múltiples cavidades.

"Imán" se refiere a cualquier material que crea un campo magnético y puede ser un imán permanente o un electroimán.

Los dispositivos son diseñados para colocar imanes a una distancia apropiada de las células y de los imanes vecinos (cuando los imanes vecinos están presentes) para crear los perfiles de campo magnético necesarios para levantar y/o manipular células y mantener los imanes en su lugar durante el uso. Los dispositivos pueden mejorar también la seguridad y facilidad de uso de imanes manteniéndolos alineados y evitando que colisionen.

Se han incorporado al diseño capacidades para mover los imanes en algunas realizaciones de la invención, que

5 habilitan la manipulación dirigida de crecimiento de tejido desde las células que contienen o están fijadas a material magnético. Así, en algunas realizaciones la altura de los imanes y posición horizontal de los imanes sobre los recipientes de cultivo de células son fácilmente ajustadas. En algunos casos, los dispositivos de la invención están diseñados para ser compatibles con recipientes de cultivo de células comúnmente utilizados como frascos y placas Petri, placas de múltiples cavidades, y sistemas de cultivo de alto rendimiento.

10 La propipeta magnética de la descripción consiste en un mecanismo parecido a un bolígrafo o a una pipeta, en donde las células son recogidas en una cámara estéril o sobre una superficie estéril por virtud de un campo magnético creado por un imán en el bolígrafo. Un interruptor simple mueve el imán lo suficientemente lejos de la célula para permitirle ser depositado en otra ubicación. El interruptor puede ser similar en mecanismo a un bolígrafo retráctil, o incluso de manera más simple, el imán puede ser simplemente levantado del dispositivo parecido a un bolígrafo (y/o la dirección de campo invertida). Así, las células (o tejido) puede ser fácil y suavemente levantadas y colocadas según la necesidad de una manera estéril. Son descritas también múltiples propipetas. El imán puede ser un electroimán y una batería simple u otra fuente de alimentación y la circuitería controla tanto la intensidad de campo como su direccionalidad.

15 Preferiblemente sin embargo, el imán es un imán permanente y tiene una intensidad de campo de alrededor de 0,001-2 Teslas. Sin embargo, la intensidad es inversamente proporcional al cubo de la distancia desde la fuente magnética, y así la intensidad de campo requerida puede variar dependiendo de la distancia desde el imán al cultivo de la célula. En aquellas realizaciones donde se utilizan múltiples imanes en matrices, habrá alguna interacción con campos magnéticos vecinos y así se puede necesitar alguna optimización de colocación para la aplicación y el tipo de célula.

20 El imán puede tener cualquier forma necesaria para afectar a los diseños de crecimiento requeridos. Por ejemplo, puede ser posible hacer crecer en tubos, útil para ejemplo en venas y arterias en crecimiento, con un imán en forma de arandela (anular) que establece un campo magnético con un agujero en el centro.

25 Preferiblemente, se emplea un imán de tierras raras. Ejemplos de imanes de tierras raras adecuados para utilizar con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, imanes de tierras raras de neodimio, imanes de tierras raras de samario-cobalto,  $Nd_2Fe_{14}B$ ,  $SmCo_5$ ,  $Sm(Co,Fe,Cu,Zr)_7$ ,  $YCO_5$ , o cualquier combinación de los mismos.

30 Los imanes de tierras raras de neodimio son el tipo más fuerte y más asequible de imán permanente, y son generalmente preferidos, pero los imanes de samario-cobalto tienen una temperatura de Curie más elevada (la temperatura a la cual el material pierde su magnetismo) y pueden ser preferidos para usos que implican altas temperaturas de esterilización.

35 Los tipos particulares de imanes de tierras raras pueden ser seleccionados también según se desee de acuerdo con las condiciones a las cuales pueden ser expuestos los imanes de tierras raras. Por ejemplo, cualquiera de los siguientes factores puede ser considerado para seleccionar un tipo de imán de tierras raras: remanencia (Br) (la cual mide la intensidad del campo magnético) coercividad (Hci) (la resistencia del material a ser desmagnetizado), producto de energía (BHmax) (la densidad de la energía magnética), y la temperatura de Curie (Tc). Generalmente, los imanes de tierras raras tienen remanencia más elevada, coercividad y producto energético mucho más elevados que otros tipos de imanes. Donde se desea la anisotropía magnética elevada, puede ser adecuado el  $YCO_5$  para el uso.

40 En lugar de o además de los imanes de tierras raras, imanes alimentados pueden ser incorporados a los dispositivos de la invención, y pueden utilizarse baterías para alimentar los imanes alimentados según se desee. Alternativamente, se pueden utilizar fuentes de alimentación activadas por RF u otra radiación electromagnética para alimentar el imán, tal como se utilizan con etiquetas de RFID. Sin embargo, por simplicidad, durabilidad, y razones de costes, se prefiere el imán permanente.

45 Hemos probado un número de imanes, tanto en estudios de modelado como en experimentos reales, y se puede elaborar un número de requisitos para la selección de tamaño, intensidad y forma magnética. En primer lugar, el tamaño del imán está confinado por el tamaño de las placas con las que será utilizado, ya que un imán en exceso es un desperdicio de recursos. Además, si los imanes están diseñados para ajustar dentro de la placa, sin el uso de una cubierta de placa intermedia, entonces el imán debe ajustar también dentro de cada cavidad de la placa, preferiblemente sin tocar la cavidad. En segundo lugar, la altura del imán puede variar con el incremento de la intensidad de campo, siendo mantenidos los imanes más fuertes más lejos que los imanes débiles, y siendo colocados generalmente los imanes de modo que no toquen el medio o la cubierta (si se utiliza). Estas consideraciones deben ser equilibradas contra la altura de elevación de imán del imán (como de lejos puede estar el imán y aún así levantar células), así como la altura de crecimiento deseada. La interferencia de campo magnético es también importante en el diseño de soportes de múltiples imanes. Adicionalmente, los efectos del menisco desde la forma de la superficie del medio resultan cada vez más importantes en placas con un número de cavidades creciente.

55 Cuando probamos imanes candidatos para una placa de 35 mm que incluía distintos imanes de disco procedentes de K&J MAGNETICS®. El imán MM-A-32 y MM-A- 20 produjeron resultados de levitación deseables cuando se

5 utilizaron para placas Petri de 35 mm. El MM-A-32 es un imán de forma anular de 1,26" (32 mm) x 0,32" (8 mm) con un pequeño agujero central avellanado cónico de 0,22-0,39" (5,59-9,91 mm). Es un imán de Grado 38 de NdFeN con revestimiento de Ni-Cu-Ni, polos axiales, una fuerza de tracción de 55,1 lbs (24,99 kg), Br max de 12.600 Gauss y BH max de 38 MGOe. El MM-A-20 es muy similar, 0,79" (20,06 mm) x 0,28" (7,12 mm), un agujero de 0,18-0,33" (4,32-8,38), pero debido a su tamaño menor tiene una fuerza de tracción de solamente 13,20 lbs (5,98 kg), Br max de 12.600 Gauss, y BH max de 38 MGOe. Los mismos imanes pueden ser utilizados para una placa estándar de seis cavidades (127,76 mm x 85,47 mm, las cavidades son de 35,43 mm x 17,4 mm). D42-N52, D46-N52, D48-N52 dieron como resultado una levitación deseable para una placa de 24 cavidades.

10 También probamos imanes candidatos para una placa de 96 cavidades típico que incluye D22-N52, D23, y D24-N50 de K&J MAGNETICS®. Nuestros resultados indican que el gradiente y la intensidad del campo producidos por cada imán permanente son consideraciones importantes, y que un gradiente en pendiente y una intensidad de campo elevada sirven para minimizar la interferencia entre imanes y proporcionar aún buena elevación y alturas de crecimiento. En nuestros experimentos, encontramos que D22-N52 tiene el gradiente más inclinado y produce fuerzas comparables a MM-A-20 y MM-A-32 y es una buena elección para un soporte de imán de 96 cavidades. EL  
15 D22-N52 es un imán en forma de disco (sin agujero) de 1/8 x 1/8 pulgadas (3,17 x 3,17 mm), y tiene una fuerza de tracción de 0,84-1,05 lbs (0,38-476,27 kg). El campo de superficie es de 6619 Gauss, el Br max es 14.800 Gauss, y el BH max es 52 MGOe.

20 Finalmente, la forma del imán puede ser variada para influenciar la forma del cultivo en 3D en crecimiento. Por ejemplo, imanes anulares pueden conducir a cultivos anulares (que pueden ser apilados para formar tubos), e imanes largos pueden conducir a cultivos en 3D que son más largos que anchos.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La fig. 1A-E. A. Vista despiezada ordenadamente de unidad de imán de una sola cavidad con imán y placa de cultivo y tapa. B. Unidad de imán ensamblada en su lugar bajo una placa petri típica. C. Tres placas de una sola cavidad en una fila mostrando la distancia entre imanes - I - D. Un soporte de imán de seis cavidades y placa de seis cavidades estándar. E. Imán de 24 cavidades con tapa especialmente diseñada que tiene también cavidades diseñadas para ajustar los imanes y a continuación ajustarlos dentro de las cavidades de la placa, permitiendo así una colocación muy próxima de los imanes.

30 Fig. 2A-C. A capuchón de soporte de imán modificado con superficie sobresaliente para recoger células haciendo levitar las células. B. La superficie sobresaliente puede alcanzar el medio en la placa Petri, recogiendo así las células para transferir, por ejemplo, a otra placa. C. El capuchón de soporte de imán con la superficie sobresaliente que lleva células magnetizadas.

35 Fig. 3A-B A. Soporte para múltiples imanes para placa de cultivo de tejidos de 96 cavidades. Esta realización está destinada a ser utilizada con solamente la parte inferior de una placa de 96 cavidades (no la cubierta), permitiendo que los imanes se acerquen a las células. B. La misma placa, pero con un imán de placa adicional colocado sobre la parte superior para aumentar además la intensidad de campo. En tal realización, la placa podría ser utilizada con su cubierta (no mostrada) debido a la intensidad de campo extra proporcionada por el imán de la placa.

40 Fig. 4A-B. El soporte para múltiples imanes para recipientes de cultivos sin cavidades individuales (o con una gran cavidad). Los imanes pueden bien penetrar en la placa, como se ha mostrado en la fig. 3, o bien no hacerlo como se ha mostrado aquí, dependiendo de la intensidad de campo. Si es necesario, se puede utilizar un imán de placa adicional, como en la fig. 4B.

45 Fig. 5A-B. Soportes de imanes ajustables. A. Los tornillos permiten que el imán sea ajustable en el plano horizontal. El imán puede sentarse en la parte superior del soporte de imán o sobre el lado inferior, siempre que se proporcione una tapa o borde para mantener el imán en su lugar en el eje vertical, pero permitiendo aún el movimiento en el eje lateral u horizontal. B. Un prolongador que se puede roscar permite que el imán sea ajustado en altura.

Fig. 6A-B A. La propipeta magnética o soporte de células, no forma parte de la invención reivindicada. B. Mostrando la acción de la propipeta magnética, que no forma parte de la invención reivindicada.

Fig. 7. El esquema de propipeta de célula magnética cargada elásticamente, que no forma parte de la invención reivindicada.

50 Fig. 8. Esquema de la propipeta de célula de múltiples imanes, con o sin resortes, que no forman parte de la invención reivindicada.

Fig. 9. A. Fibra óptica acoplada a la propipeta de célula magnética, que no forma parte de la invención reivindicada. B. Sección transversal de A, que no forma parte de la invención reivindicada.

55 Fig. 10. Propipeta de célula magnética con un capuchón más complejo en la extremidad para poner múltiples cultivos en contacto de un modo reproducible, o guiando las células al centro, que no forma parte de la invención reivindicada.

Fig. 11. Aguja o catéter encerrado en la propipeta magnética, que no forma parte de la invención reivindicada.

Descripción de las realizaciones de la invención

5 Hablando en términos generales la invención se refiere a una placa o sistema de cultivo de célula magnética que comprende un recipiente de cultivo de células y al menos una cavidad que tiene un capuchón correspondiente que ajusta sobre (o bajo) dicha cavidad, incluyendo el capuchón una tapa alrededor de un borde exterior del capuchón, en donde la tapa ajusta sobre y alrededor de un borde exterior del recipiente de cultivo, teniendo al menos uno de dicha cavidad o dicho capuchón un imán fijado a dicha cavidad o capuchón. Generalmente, el imán es fijado a dicho capuchón con adhesivos, sujetadores o es fijado por salto elástico con un receptáculo diseñado para aceptar un imán, tal como un receptáculo fijado por salto elástico.

10 El capuchón magnético puede ser utilizado bien por encima o bien por debajo del recipiente, y si es utilizado por encima puede situarse bien sobre la cubierta del recipiente normal o bien si es estilizado y sin aperturas puede reemplazar la cubierta.

15 En las realizaciones preferidas, el capuchón es ajustable de modo que ajuste la altura de dicho imán desde el recipiente. En otras realizaciones, la posición del imán sobre el capuchón es también ajustable. En una realización, el capuchón tiene un collarín ajustable que ajusta fuera o dentro del capuchón y que es ajustado con ranuras o crestas que coinciden con las crestas o ranuras sobre el capuchón, de tal manera que desenroscar el collarín tiene el efecto de aumentar la altura del capuchón. En vez de usar un collarín, el capuchón puede ser fijado también con tornillos u otras protuberancias que pueden ser alargadas, teniendo así el mismo efecto. Esto permitiría incluso que un capuchón cuadrado sea fácilmente ajustable.

20 El capuchón puede ser dimensionado y/o formado también para fijarse a una placa de múltiples cavidades. Así, la invención puede comprender una placa de cultivo de células magnética, que comprende una pluralidad de cavidades en una agrupación, un capuchón que cubre dicha pluralidad de cavidades, y una pluralidad de imanes en una agrupación fijados a dicho capuchón, de tal manera que cada cavidad, o cada cavidad en un subconjunto de las cavidades, tiene un imán sobre dicha cavidad cuando dicho capuchón está en su lugar sobre dicha pluralidad de cavidades. El capuchón y los imanes fue ser utilizados con accesorios de placas comercialmente disponibles, y la altura del capuchón puede ser ajustable.

30 El capuchón puede ser simplemente una cubierta de placa con agujeros taladrados o moldeados por inyección en él sobre cada cavidad, y una placa separada que tiene espigas magnéticas es proporcionada para ajustar al capuchón, sobresaliendo los imanes a través del agujero para variar grados. En esta variación, puede ser proporcionado un número de placas separadas con elementos magnéticos de diferentes longitudes o intensidades, proporcionando otra vez al usuario con un hardware para cultivo magnético en 3D fácilmente personalizable. Como anteriormente, este capuchón de placa puede ser utilizado por encima o por debajo del recipiente de cultivo de células.

35 En aún otra realización, el capuchón o unidad tiene un labio para impedir que sea fácilmente desalojado de la placa o cubierta de placa, y tiene depresiones en ella para recibir uno o más imanes. Preferiblemente, los imanes son fijados por salto elástico en estas depresiones, permitiendo que los imanes sean desconectados para diferentes intensidades o formas de imanes. Si son utilizadas diferentes formas de imanes, la invención puede proporcionar también un adaptador para cada forma, permitiendo así que los imanes sean fijados por salto elástico en el adaptador, y a continuación fijados por salto elástico en la unidad. En otras realizaciones, los imanes son más o menos fijados permanentemente, por ejemplo, mediante un adhesivo.

40 Aún otra variación de la descripción es una propipeta magnética que comprende un imán dentro de un alojamiento, sobre el cual ajusta un protector del capuchón, separando así el imán de las células. El protector del capuchón puede ser un material inerte, que se puede esterilizar o puede estar revestido con agentes (por ejemplo, colágeno o BSA) según sea necesario para el uso particular. El alojamiento contiene también medios para ajustar bien la altura del imán o bien la polaridad de manera que las células magnéticas puedan ser levantadas o depositadas, según sea necesario. En una variación tal medio es solamente un resorte u otro mecanismo de carga, y retenciones para aprehender el imán y mantenerlo bien cerca o bien lejos de la punta del protector del capuchón. A este respecto, el bolígrafo y las propipetas pueden ser adaptados fácilmente para tal uso, y la literatura de la patente que describe lo mismo proporciona muchos mecanismos posibles para fabricar tal dispositivo.

50 En variaciones que emplean electroimanes, la polaridad es fácilmente invertida con circuitería convencional, sin embargo el ajustador parecido al bolígrafo simple puede ser preferido debido a su bajo coste. El bolígrafo puede ser unitario, o puede comprender múltiples puntas e imanes, como en una propipeta múltiple, y puede comprender elementos opcionales tales como una fuente de luz, medios para desplazamiento de volumen de aire, y similares.

55 En una variación, el capuchón (superficie sobresaliente) es un capuchón desechable de un solo uso, como una punta de pipeta, pero formado de modo que sea apropiado para la transferencia de grandes cultivos en 3D, y el capuchón se fija por salto elástico o se fija a presión sobre la superficie exterior de la punta de la propipeta. El capuchón puede ser de fondo plano, o acampanado o en forma de copa de modo que permita la transferencia de cultivos mayores, y pueden hacerse una variedad de tapones para el uso con cultivos de diferentes tamaños.

Eventualmente, el cultivo resultará demasiado grande para transferir por efectos de tensión superficial, incluso con un capuchón acampanado, y puede ser deseable tener un dispositivo que se desliza bajo las células para transferir, por ejemplo, como una cuchara magnética, en donde la superficie sobresaliente se desliza bajo las células, y el imán es colocado sobre unos cables flexibles, y puede deslizar aún en la superficie sobresaliente horizontal y atraer y colocar de manera segura el cultivo.

Ejemplo 1: Soporte de imán de capuchón de una sola cavidad

Con referencia ahora a la invención en más detalle, en la fig. 1 y en la fig. 2 se ha mostrado un soporte magnético que ajusta sobre la parte superior o la parte inferior de una placa de cultivo de células de una sola cavidad. En detalle la fig. 1A muestra un soporte 1 magnético con un imán 2 fijado a él. El prototipo de unidad o soporte 1 magnético se hizo de acrílico, pero se puede utilizar cualquier polímero, resina, material cerámico, vidrio o metal. Se prefieren polímeros baratos tales como acrilato o policarbonato como duraderos, baratos, que se pueden esterilizar, y transparentes, lo que permite la visualización de los contenidos.

En este caso, el soporte 1 magnético tiene un agujero 9 a través del cual se pueden visualizar los contenidos de la placa si es utilizado un imán 2 anular. El soporte 1 magnético puede asentarse sobre una placa 3 Petri con tapa o cubierta 4, o puede asentarse bajo ella, dependiendo de la aplicación y/u orientación del imán.

Se muestra en la fig. 1 una unidad 1 magnética en forma circular o de disco, pero podría ser rectangular, triangular, hexagonal, o de cualquier otra forma. Las formas preferidas son compatibles con placas y frascos de cultivo de células existentes. Hemos mostrado el imán centrado sobre el capuchón, pero no tiene por qué ser así.

El soporte 1 magnético puede ser utilizado sólo, o puede depositarse sobre los capuchones 4 de recipiente existente como se ha mostrado en este documento. Una abertura 9 opcional puede estar incluida en el soporte 1 para facilitar la formación de imágenes de los cultivos si es necesario.

El tamaño de este capuchón variará dependiendo del tamaño y forma del recipiente de cultivo de tejidos y el tamaño e intensidad del campo magnético resultante del imán que es soportado. Como ejemplo, el tamaño del capuchón puede variar de 5 mm a 100 mm en diámetro exterior. Si este dispositivo ha de ser utilizado para cultivar grandes cantidades de células (tales como cultivos que comienzan con más de 50M de células por recipiente), esto puede requerir imanes mayores, por tanto los soportes podrían variar de tamaño y forma.

Ejemplos de aplicaciones que requieren cultivos a gran escala serían la producción de proteínas recombinantes, producción de proteínas de matriz extracelular, activación de la célula T por antígeno que presenta proteínas. La altura de este capuchón es una función de intensidad del imán. Imanes más potentes pueden requerir soportes más altos.

El imán 2 puede ser de forma cilíndrica o de disco, en forma de anillo o arandela, cuadrado, triangular, y similar, pero no está limitado a estas formas. Aquí mostramos un imán 2 en forma de arandela con un pequeño agujero en él para permitir la visualización del cultivo por debajo.

El tamaño del imán variará según la aplicación. Ejemplo de tamaño es 32 mm de diámetro exterior y 6 mm de altura. Éste tamaño podría ser de desde 2 mm a 100 mm, pero los tamaños no están limitados. Se puede utilizar también una combinación de imanes soportados magnéticamente juntos.

La fig. 1B muestra el soporte1 de imán ensamblado con el imán 2 en el centro, y en este caso montado bajo la placa 3 Petri, que está cubierta con la cubierta 4 Petri. La fig. 1C muestra tres placas 3 Petri lado a lado, pero con el soporte 1 magnético sobre la parte superior de la cubierta 4 Petri. La distancia mínima - l - entre el centro de los soportes del imán es definida por el tamaño del soporte y la intensidad magnética de los imanes, y debería ser tal que los campos no interfieran excesivamente.

El imán 2 puede ser soportado en su lugar sobre el soporte 1 con un adhesivo o más preferiblemente, el soporte 1 tiene un accesorio en el cual el imán 2 puede ser fijado por salto elástico. Puede ser soportado también en su lugar con cualesquiera sujetadores convencionales tales como tornillos y similares. Los tornillos o fijaciones por salto elástico pueden ser preferidos cuando se espera que los imanes 2 sean intercambiables y así permitir la fácil variación de forma, tamaño e intensidad.

El soporte 1 magnético mantiene también el imán de desplazamiento aleatorio relativo a la placa de cultivo del tejido debido a la tapa o borde 6, que ajusta sobre la placa de cultivo. En resumen, el soporte de imán mantendrá el imán en su lugar (bien sobre la parte superior o bien en la parte inferior) con relación al frasco o placa Petri de cultivo de tejido.

La distancia entre imanes -l- debería ser definida con relación al tamaño y forma del frasco de cultivo de tejido y/o la intensidad del imán. Imanes más potentes requerirán mayores distancias para evitar que imanes vecinos perturben sus cultivos levitados respectivos y/o interactuar entre sí de una manera que puede provocar que sean desplazados desde la parte superior o inferior de la placa de cultivo de tejidos. Esto es importante también por razones de seguridad, para impedir que los dedos queden atrapados entre imanes muy potentes, y evitar contaminación

cruzada entre muestras si los imanes son desplazados y el medio de cultivo desperdiciado, y/o la muestra perdida.

El uso de la unidad 1 magnética no está limitado a la parte superior de las placas de cultivo, pero podría ser colocado también en la parte inferior de la cavidad. Cuando está en la parte inferior, el soporte de imán proporciona estabilidad aumentada.

5 La fig. 1D muestra un soporte 1 magnético de 6 cavidades con seis imanes 2 diseñados para ajustar sobre (o bajo) una placa 7 de seis cavidades y la cubierta 6. Hemos mostrado los imanes 2 colocados aquí bajo la cubierta, pero también hemos hecho un dispositivo prototipo donde los imanes ajustan en depresiones de la superficie de soporte magnético, y donde cada depresión tiene también un agujero de visualización. El soporte 1 magnético puede tener un labio o borde para soportar el dispositivo en su lugar sobre una placa como se ha mostrado aquí, o puede ser una superficie plana carente de cualquier labio sobresaliente sobre el lado inferior, como en nuestro primer prototipo. Sin embargo, esto es menos estable y se prefiere un labio.

15 La fig. 1E muestra un modelo de placa de 24 cavidades en donde tanto la unidad magnética como una tapa especial están hechas para ajustar bien sobre las placas existentes o bien se hará una combinación de placa y tapa. La unidad 121 magnética será similar a la ya descrita con imanes 122 colocados en una agrupación sobre la unidad o soporte 121, que tiene una agrupación de rebajes 129 para recibir los imanes 122. El fijador epoxi será utilizado a continuación para pegar 24 imanes 122 de anillo en las cavidades 129 sobre la unidad, completando así el conjunto de levitación y formando la unidad magnética de 24 cavidades. Esto se utilizará con una placa 123 de cultivo y una tapa 124 especialmente diseñada que tiene 24 cavidades 126 previstas para recibir los imanes y prever dentro las 24 cavidades de la placa 127. De esta manera, los imanes pueden ser llevados más cerca del cultivo, levitando así las células, y se pueden utilizar imanes más pequeños, minimizando así la interferencia de campos magnéticos procedentes de cavidades vecinas.

20 La tapa especial puede ser esterilizada previamente y preservar así la esterilidad del sistema. Esto permitirá que las unidades del imán sean reutilizables, mientras la tapa será desechable o diseñada para un solo uso. El concepto de unidad magnética y tapa especial en la fig. 1E puede ser adaptado con placas de múltiples cavidades estándares o especialmente diseñadas con 6, 12, 24, 48, 96, 384 y/o 1536 cavidades.

30 En la fig. 2A se ha mostrado un soporte 21 de imán modificado con la superficie 29 sobresaliente para recoger células que levitan. En esta realización, el imán es colocado dentro de una superficie sobresaliente en forma de capuchón, (pero la superficie puede ser de cualquier forma), de tal manera que solamente está superficie contacta con el medio cuando está en uso. El recipiente 24 de cultivo de tejido es mostrado con células 25 sobre la parte inferior. En la fig. 2B, el soporte es movido lo bastante cerca de la placa 24 de manera que las células 25 son recogidas sobre la superficie 29 sobresaliente por atracción al imán 22. Una vez unidas a la superficie sumergida, las células pueden ser fácilmente retiradas de la solución como en la fig. 2C. Las células fijadas pueden ser contadas a continuación, separadas entre células que levitan y que no levitan. Las células unidas a la superficie pueden ser utilizadas también para análisis, cultivo en diferentes frascos desplazando el imán, lavado de células con medio o tripsinizar las células. Además, el dispositivo puede ser utilizado para separar, clasificar, transferir, y evaluar el rendimiento de las células magnetizadas, es posible hacer que esta superficie sobresaliente se fije por salto elástico o por presión a un borde sobresaliente (no mostrado) sobre la unidad, permitiendo así que la superficie esterilizada previamente, de un solo uso sea preparada y fijada por salto elástico en la unidad cuando sea necesario, del mismo modo que si se presiona una punta de pipeta sobre una propipeta. En esta realización, se puede prever también un medio simple para expulsar el capuchón.

35 Las figs. 3 y 4 muestran un conjunto de imán de múltiples cavidades para cultivar múltiples muestras por levitación magnética. Los componentes de la fig. 3 son una unidad 31 magnética de múltiples cavidades con una agrupación de imanes 32 que sobresalen de ella. Con más detalle, este soporte de imán de múltiples cavidades estaba hecho de acrílico o policarbonato en donde se taladraron un número de agujeros y se insertaron los imanes en ellos. En este caso, los imanes fueron mantenidos bien por un adhesivo o bien por fricción dentro de un soporte de metal, soldadura por calor, fijación por salto elástico, sujetadores o puede ser utilizado cualquier otro medio para asegurar los imanes.

45 EL soporte 31 magnético de múltiples cavidades puede ser utilizado con placas 33 de múltiples cavidades estándar o especialmente diseñadas con 6, 12, 24, 48, 96, 384, y/o 1536 cavidades 34. Hemos mostrado un imán que sobresale hacia abajo a las cavidades en el caso de múltiples cavidades, y el soporte 31 magnético es utilizado sin una cubierta de placa porque en algún punto, los imanes deben estar lo bastante cerca de las células 35 de modo que hagan levitar a las mismas, pero eviten efectos de interferencia entre cavidades. En otros casos los imanes 32 pueden ser dimensionados de modo que no sobresalgan dentro de la cavidad, y el dispositivo puede ser combinado con un imán 36 de placa, como se ha mostrado en la fig. 3B. En tal caso, el soporte 31 magnético podría ser utilizado aún con una cubierta de placa (no mostrada). Una vez que las células alcanzan el menisco del medio y los imanes 32 más pequeños tienen la intensidad para sostener la levitación, este imán 36 de placa grande podría ser retirado.

55 En la fig. 3A se ha mostrado también -G-, que es la altura de la placa 33 de la micro-cavidad. Esta altura variará dependiendo de la aplicación y/o intensidad magnética de los imanes que son utilizados. Placas más cortas de

aproximadamente 2.5 mm de altura, pero no limitadas a ella, serían óptimas para aplicaciones de rendimiento más elevado, tales como cuando se utilizan 96, 384 y 1536 placas. La longitud de la placa de múltiples cavidades es -H- y la profundidad del medio es -F-.

5 Los imanes pueden sobresalir dentro de cada cavidad para estar lo bastante cerca de las células para proporcionar el campo magnético necesario para hacer levitar las células. Con imanes más potentes, el imán puede estar completamente por encima de las cavidades, e incluso por encima de la cubierta o tapa de la cavidad estéril. En algunas realizaciones, estos dispositivos podrían consistir de 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 imanes o cualquier número de entre ellos.

10 El soporte magnético descrito en la fig. 3 no tiene por qué ser utilizado con placas que tienen múltiples cavidades, sino que puede ser utilizado con unas pocas cavidades o incluso una sola cavidad como se ha mostrado en la fig. 4 en donde el soporte 41 magnético con imanes 42 es utilizado para una placa Petri o placa de cultivo 43 grande con tapa 44 para hacer levitar las células 45. Si es necesario, el dispositivo puede ser utilizado también con un imán 46 de placa para aumentar la intensidad de campo. Los imanes 42 pueden ser retirados también según sea necesario para ajustar, por ejemplo, una placa de seis cavidades. Así, el dispositivo no está limitado en uso a una placa que  
15 tiene el mismo número de cavidades que de imanes.

El espaciamiento entre imanes iniciará/generará cultivos de levitación individual, que son mantenidos en su lugar y separados por el campo magnético. Por lo tanto, este formato sin cavidad puede ser concebido como un límite invisible definido por el campo magnético, sin barreras mecánicas internas, tales como se ha encontrado en unas  
20 placas de múltiples cavidades. Una vez que los cultivos individuales crezcan, pueden entrar en contacto entre sí, lo que podría ser una característica deseable para crear cultivos mayores con flujo nutriente mejorado debido al espaciamiento entre cultivos individuales. Esto podría ser utilizado también para generar múltiples cuerpos esferoidales dentro del mismo medio de cultivo.

Hemos obtenido pruebas de principio de tal técnica basándose en la vigilancia sin etiquetas de células cultivadas con un prototipo de soporte magnético de seis cavidades, en donde los imanes son mantenidos en depresiones  
25 sobre la parte superior de una pieza de plástico plana, en donde cada depresión tiene también un agujero de visualización taladrado a su través. El uso del dispositivo fue tan simple como las técnicas en 2D estándares, y fue probado para ser más rápido que cualquier otro producto de cultivo de células en 3D en el mercado. Las células fueron tratadas con Nanoshuttle™ (una solución propiedad de Nano3D Biosciences™, Inc. que contiene nano partículas magnéticas que permiten que las células leviten en un campo magnético) y colocadas en cavidades  
30 individuales utilizando medios recomendados para su tipo de célula específico. La unidad magnética fue colocada inmediatamente por encima del cultivo y las fuerzas magnéticas hicieron levitar suavemente y guiaron a las células juntas para inducir rápidamente las interacciones célula-célula. Los cultivos fueron colocados en una incubadora de cultivos de células estándar y, con el tiempo, se formaron conjuntos 3D.

La ubicación del conjunto de cultivo puede ser controlada magnéticamente. Sin embargo, la morfología de los  
35 conjuntos y cantidad de tiempo necesario para alcanzar este estado son específicos de la célula. Algunos tipos de células, tales como epiteliales, forman láminas en capas y presentan morfología escamosa mientras otras, tales como células endoteliales de la vena umbilical humana, presentan estructuras de ramificación. Las estructuras levitadas pueden ser separadas para crear múltiples muestras y células viables pueden ser retiradas del cultivo en  
40 3D para otros experimentos. No se requiere equipamiento especial adicional y la unidad magnética es compatible con el cultivo simultáneo y la formación de imágenes y técnicas de diagnóstico estándar. Las células pueden ser mantenidas durante meses y las toxinas pueden ser introducidas en el cultivo y examinadas para cualesquiera efectos perjudiciales. Los cultivos crecidos con la unidad magnética proporcionan un modelo de tejido nativo, que puede ser expuesto a distintos fármacos y vigilado para su viabilidad.

La fig. 5 muestra los dibujos de un soporte con posicionamiento de imán ajustable (ejes xyz), tales como altura,  
45 traslación en los ejes xyz (posicionamiento lateral) ajustes del imán con relación al frasco de cultivo de tejido. En detalle, la unidad 51 magnética tiene un imán 52, y el imán puede ser movido alrededor mediante el posicionamiento de tornillos 57. Esto puede ser generalizado también para un formato de múltiples cavidades y el rango de movimiento puede estar restringido de tal modo que cada imán no se mueva más allá del rango de una cavidad. La altura de la unidad magnética puede ser ajustada también, por ejemplo, por el collarín 58 con guías roscadas para el  
50 movimiento/control del eje z.

El ajuste del eje xy (horizontal) puede ser deseable para trasladar las células magnetizadas lateralmente. Esto puede ser ventajoso o útil cuando las células se acumulan bajo el trayecto de visión, obstruyendo por tanto una imagen clara de las células levitadas. Esta misma acción de traslación en los ejes xy puede ser utilizada también para perturbar el cultivo.

55 En la fig. 5 mostramos un mecanismo mecánico simple para desplazar el imán (acción de roscado como consecuencia de las roscas) sin embargo esto podría ser conseguido también por acciones eléctricas (tal como, pero no limitado a, la utilización de solenoides y corriente eléctrica, electroimanes), y magnéticas. Un mecanismo adicional serían unas acciones mecánicas cargadas elásticamente (similar a un interruptor de luz) en el cual un solo movimiento mecánico levanta el imán. Este ejemplo puede ser utilizado también para reducir o retirar el campo

magnético así las estructuras levitadas caen a la parte inferior de la placa de cultivo y a continuación pueden ser levantadas de nuevo magnéticamente.

Una de las aplicaciones para retirar/reducir el campo magnético sería para formación de imágenes de mayor resolución cuando es deseable tener las células en la parte inferior de la placa más cerca del objetivo o elementos de formación de imágenes, tal como en el caso de microscopios con foco común. Con más detalle, para diseños de múltiples cavidades, puede funcionar con una palanca u otra acción mecánica en vez de un tornillo. Este mecanismo es importante también para transportar los cultivos de levitación. Cuando se transportan los cultivos, si ocurre un movimiento repentino que hace oscilar/salpicar el medio y las células de manera que el medio y las células estén demasiado cerca del imán, la fuerza magnética puede tirar de las células sobre la superficie justo bajo el imán. Las células pueden a continuación adherirse a esa superficie. Levantar el imán, impide al medio y a las células estar lo bastante cerca del imán para que sean atraídas y fijadas a la superficie bajo el imán.

Ejemplo 2 comparativo: Propipeta magnética

Las figs. 6 a 13 muestran diferentes variaciones de una propipeta magnética diseñada para facilitar la manipulación de células magnetizadas. Éste bolígrafo magnético o propipeta magnética incluye básicamente una superficie no magnética (tal como plástico, vidrio, metal o teflón y similares) para impedir a las células y/o al cultivo de células adherirse directamente al imán, un mecanismo para mover el imán hacia o lejos de esta superficie para aprehender o depositar las células.

Los componentes de la fig. 6 que muestran el esquema e imágenes de una propipeta 60 magnética incluyen la estructura de guiado 61 para soportar y mover el imán 62. Esta estructura puede ser un tubo, vástago, o cable que controla la posición y como se desliza el imán 62 dentro del capuchón 69 no adherente y no magnético. La totalidad es alojada en un alojamiento 64 adecuado con accionadores necesarios para levantar y bajar el imán 62 en una distancia -F-. Esta estructura de guiado puede ser guiada manual, mecánica, magnética, y/o electromagnéticamente. En una variación, el imán es movido del mismo modo que un bolígrafo retráctil mueve el cartucho de tinta arriba y abajo, utilizando un resorte y retenes. Se han hecho ya prototipos convirtiendo tanto un bolígrafo como una propipeta para este uso, añadiendo un imán y un capuchón no adherente. Por "no adherente" lo que se quiere decir es que el capuchón está hecho de un material al que las células no se adhieren rápidamente, tal como dichos materiales utilizados para placas no adherentes. La fig. 6B muestra la propipeta 60 magnética en uso aprehendiendo una célula 65, que puede ser colocada a continuación en cualquier lugar deseado.

El imán 62 puede variar de tamaño y forma dependiendo de la aplicación y tamaño y/o forma de la placa de múltiples cavidades. Normalmente estos imanes consistirán de anillos cilíndricos, vástagos cilíndricos, discos cilíndricos, y/o vástago cuadrados, pero no están limitados a ninguna forma particular. Los imanes más pequeños pueden ser apilados también para su uso.

El protector 69 del capuchón para mantener el imán separado de las células está formado de modo que recibe y cubre el imán, y preferiblemente se puede esterilizar y no es adherente. El capuchón está hecho de teflón en nuestro prototipo, pero se puede utilizar cualquier material inerte, que se puede esterilizar. Este capuchón podría estar hecho también de otros polímeros sólidos, polímeros inertes, metales, polímeros revestidos o tratados, metales revestidos o tratados, superficies de metal tratadas, vidrio o material cerámico.

Hemos mostrado un protector 69 del capuchón de fondo plano, pero la parte inferior puede tener también una depresión o cavidad o bordes acampanados de modo que capten fluido adicional por acción capilar o tensión superficial. Además, la propipeta magnética puede ser combinada con una pequeña cantidad de desplazamiento de aire como en una propipeta normal, dependiendo de su uso previsto, pero lo que se ha mostrado es un dispositivo magnético que aprehende células por fuerza magnética, aunque siempre estarán presentes algunos efectos de tensión superficial.

Aquí, mostramos un protector cilíndrico 69 del capuchón, pero este protector del capuchón podría ser de cualquier forma incluyendo rectangular, triangular, y hexagonal, y/o cualquier forma regular o irregular. Preferiblemente, el capuchón refleja la forma de los recipientes de cultivo de tejidos en sección transversal y es algo menor que las cavidades. El protector del capuchón puede ser intercambiable, permitiendo así el uso de capuchones de diferentes tamaños para diferentes placas de cultivo o cultivos de diferentes tamaños. El capuchón puede ser desechable también, de un solo uso, capuchones expulsables, muy similares a puntas de pipetas pero en donde la punta de pipeta ha sido modificada para tener una parte inferior o punta cerrada.

La fig. 7 muestra un soporte 70 cargado elásticamente de célula magnética con el imán 72, el protector 79 del capuchón, el vástago de guiado 77 fijado al imán 72, el pulsador 76 para la acción de captura o liberación y el resorte 78. La fig. 7B muestra una propipeta múltiple que tiene tres puntas magnéticas, y la fig. 7C muestra el dispositivo en uso, aprehendiendo la célula 75 desde una placa 74 de cultivo.

La fig. 8 muestra una variación de una propipeta 80 de múltiples imanes, que es accionada con un solo botón 86 el cual acciona el vástago 87 y comprime el resorte 88 para accionar el segundo accionador 83, empujando así 83 hacia abajo (véase flecha) y accionando una serie de propipetas paralelas habiendo sido mostrado cada imán 82 deprimido y dentro del capuchón 84, así capaz de aprehender las células 85. Todo el dispositivo está contenido en el

alojamiento 89, que puede ser de cualquier forma adecuada.

Las propipetas magnéticas pueden ser acopladas a brazos robóticos y utilizadas en cultivos de células de alto rendimiento, utilizando placas de múltiples cavidades estándares o especialmente diseñadas con 6, 12, 24, 48, 96, 384 y/o 1536, y similares.

5 La fig. 9 muestra una sección transversal de una fibra óptica acoplada al soporte 90 de célula magnética en donde los accionadores para mover el imán son omitidos por simplicidad. Incluye fibra óptica 91, un capuchón 94 no adherente y no magnético para utilizar como una superficie de transferencia de células. El imán 92 puede ajustar y deslizar dentro y fuera (-E-) de este capuchón 93, y está contenido en el alojamiento 99. La fibra óptica 91 ajusta en el centro, a través de un imán 92 de anillo. Una ventana 93 óptica en la parte inferior de donde las células serán  
10 soportadas magnéticamente y la luz será entregada y recogida. Esta ventana podría comprender también filtros de luz para recoger una longitud de onda de luz específica. La fig. 9B es una vista inferior de la fibra óptica acoplada al soporte de célula magnética.

15 Con más detalle, esta fibra óptica acoplada al soporte de célula magnética puede ser utilizada para recoger la luz resultante de fluorescencia, quimio-luminiscencia, dispersión de luz (elástica, Raman, Superficie de Raman mejorada). La señal de luz puede proceder de células, nano-partículas, proteínas excretadas y/o sustratos químicos que están en la proximidad de los cultivos de células de 3D magnetizadas. Esto podría ser utilizado para evaluar el número de células, la viabilidad de la célula, y la proliferación de células y similares.

20 La fig. 10 muestra una sección transversal de un soporte 100 de célula magnética con un capuchón más complejo en la extremidad para poner en contacto cultivos múltiples de un modo reproducible, en donde la parte superior del soporte es omitida otra vez por simplicidad. En la fig. 10, el imán es 102, y el capuchón 107 tienen una extremidad acampanada. El imán se desliza arriba y abajo dentro del capuchón o una porción de guía del capuchón 109, pero se evita que toque las células 105 por la base del capuchón 106, que es la superficie no adherente con la que contacta y transfiere células.

25 El capuchón tiene aquí un borde acampanado, creando una forma envolvente, tal como cóncava y en forma de copa (no limitado a estas), que asegura que las células y los cultivos de células en 3D pueden ser transferidos dentro de la forma de copa por tensión superficial, pero aún el espacio es suficientemente grande de modo que no perturbe la estructura de un cultivo de células en 3D emergente, como ocurriría probablemente con la típica pipeta de punta estrecha.

30 Los componentes de la fig. 11 que muestran el esquema de la aguja, el cilindro hueco o el soporte magnético integrado en el catéter que incluye un capuchón 139 no adherente y no magnético para separar el imán 132 de las células. El imán 132 puede ajustar de manera reversible en este capuchón 139 y es encontrado sobre la extremidad del vástago 137, que conecta con un accionador (no mostrado) que sube y baja el imán 132 dentro del capuchón 139. Tales medios incluyen típicamente botones o palancas, resortes u otras fuerzas de carga elástica y retenes o protuberancias.

35 Ajustar estos componentes en una aguja o catéter 136 permite al dispositivo ser utilizado para perforar distintos materiales, colocando así células en lugares muy pequeños, tal como para transferencia de células a una ubicación en vivo (por ejemplo, dentro de los músculos cardíacos). El cilindro o aguja 136 hueco permite también al dispositivo ser utilizado para extraer células magnetizadas de los cultivos 3D, tal como para extraer células de diferentes regiones de un cultivo 3D, extraer células magnetizadas de una ubicación en vivo que lleva células magnetizadas,  
40 y/o extraer células para generar un corte o agujero sobre un cultivo 3D que lleva células magnetizadas.

45 Aquí mostramos el capuchón 139 que ajusta dentro de la aguja 136, en vez de sobre el borde exterior como en una punta de pipeta, pero es posible de cualquier otra manera. Sin embargo, el ajuste dentro es preferido ya que esto permite al capuchón 139 deslizar hacia arriba (retraerse) dentro de la aguja 136 (posición retraída no mostrada) durante el paso de perforación. Medios para la retracción no son mostrados pero son conocidos en la técnica, en por ejemplo bolígrafos retráctiles y pipetas, e incluyen típicamente un botón que se puede apretar, resorte u otra fuerza de carga elástica, y retenes o protuberancias para soportar el vástago en la posición apretada. El vástago /accionador de imán y los medios de accionador de capuchón pueden ser combinados también (como en un bolígrafo retráctil de dos colores), y retenes dobles, resortes etc. y botones dobles, y similares permiten el accionamiento independiente de los dos componentes.

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un sistema de cultivo magnético de células, que comprende un recipiente (3) de cultivo de células y un capuchón (1) conformado para ajustar sobre o bajo dicho recipiente (3) de cultivo de células, incluyendo dicho capuchón (1) un labio (6) alrededor de un borde exterior de dicho capuchón, en donde dicho labio (6) ajusta sobre y rodea un borde exterior de dicho recipiente (3) de cultivo, teniendo dicho capuchón (1) una o más depresiones en las que uno o más imanes (2) son fijados de tal manera que dichos imanes (2) se asientan por encima o por debajo de dicho recipiente (3) de cultivo de células y no tocan un medio en dicho recipiente.
- 10 2.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 1, en donde dicho capuchón comprende medios (57) para ajustar dichas posiciones de imán en una o más de las tres direcciones espaciales, preferiblemente en donde dicho capuchón se puede ajustar de modo que ajuste la altura de dicho imán desde dicho recipiente de cultivo de células, más preferiblemente en donde dicho capuchón tiene forma de disco, y comprende además un collarín (58) que se puede enroscar que ajusta dentro o fuera de dicho capuchón, de tal manera que desenroscar dicho collarín (58) funciona para subir el nivel de dicho capuchón desde dicho recipiente de cultivo de células.
- 15 3.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 1, teniendo dicho capuchón uno o más agujeros (9) en él, y ajustando dicho imán de manera que se puede retirar a través de uno o más de dichas agujeros.
- 4.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 1, en donde dicho capuchón incluye una o más depresiones en las que uno o más imanes pueden ajustarse de forma inversa, fijarse por salto elástico o ser adheridos, preferiblemente en donde dicha una o más depresiones incluyen también un agujero central a través de dicho capuchón, y uno o más de dichos imanes incluyen también un agujero central.
- 20 5.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 1, en donde dicho capuchón ajusta sobre una placa de cultivo de células que tiene múltiples cavidades, y una pluralidad de imanes están fijados a dicho capuchón de manera que cada cavidad tiene un imán dimensionado para ajustar dentro de dichas cavidades.
- 25 6.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 1, comprendiendo dicho sistema de cultivo de células una placa de cultivo de células (7) que tiene una o más cavidades, en donde el número de imanes es el mismo que el número de cavidades.
- 7.- El sistema de cultivo magnético de células de la reivindicación 6, en donde dicha tapa tiene una o más cavidades superiores (126) que ajustan en una o más de dichas cavidades de dicha placa de cultivo (127), y en donde dichos imanes (122) ajustan en dichas cavidades superiores.
- 30 8.- Un recipiente de cultivo magnético de células, que comprende un recipiente (33) teniendo una pluralidad de cavidades (34) en una agrupación, un capuchón (31) que cubre dicha pluralidad de cavidades, teniendo dicho capuchón un labio que rodea un borde exterior de dicho recipiente y una pluralidad de imanes (32) en una agrupación fijada a dicho capuchón (31) tal que cada una de dichas cavidades (34) tiene un imán (32) sobre dicha cavidad (34) cuando dicho capuchón (31) está en su lugar sobre dicho recipiente y dicho imán (32) no toca un medio en dicha cavidad.
- 35 9.- El recipiente de cultivo magnético de células de la reivindicación 8, en donde dicha agrupación es una agrupación de 6, 8, 12, 96, 384, o 1536 cavidades, incluyendo preferiblemente un segundo capuchón que ajusta entre dicho recipiente y dicho capuchón.

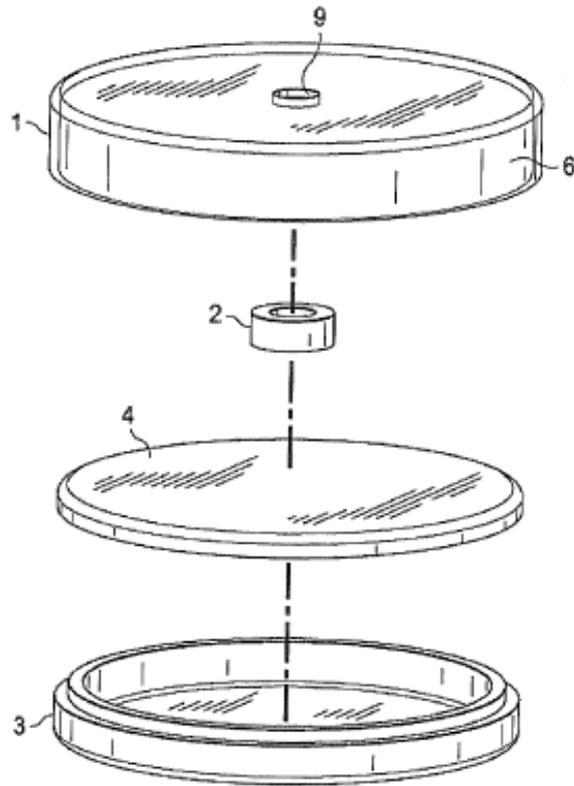


FIG. 1A

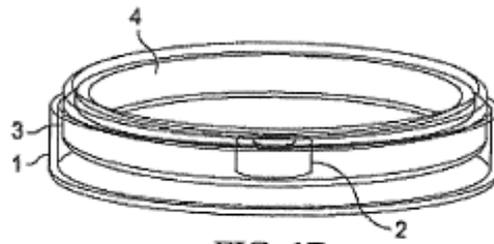


FIG. 1B

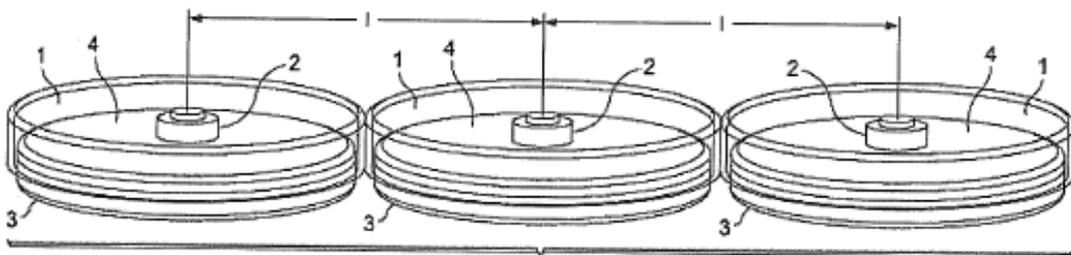
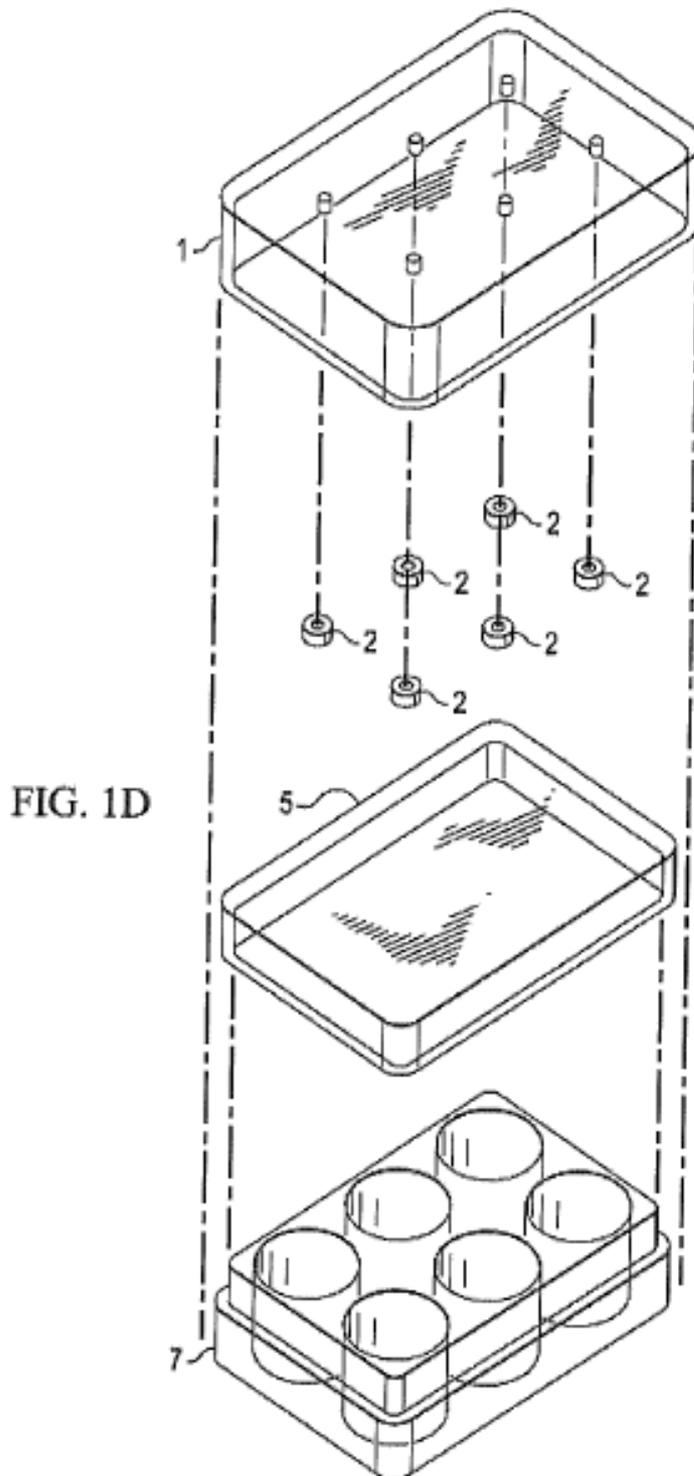


FIG. 1C



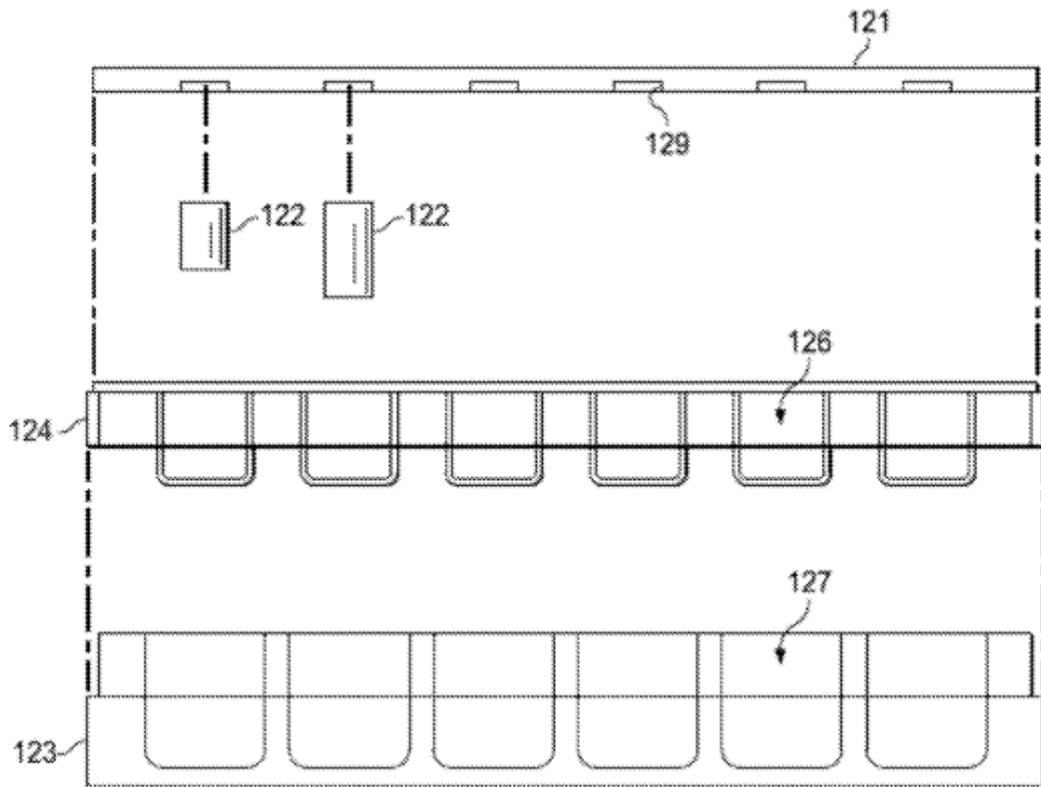


FIG. 1E

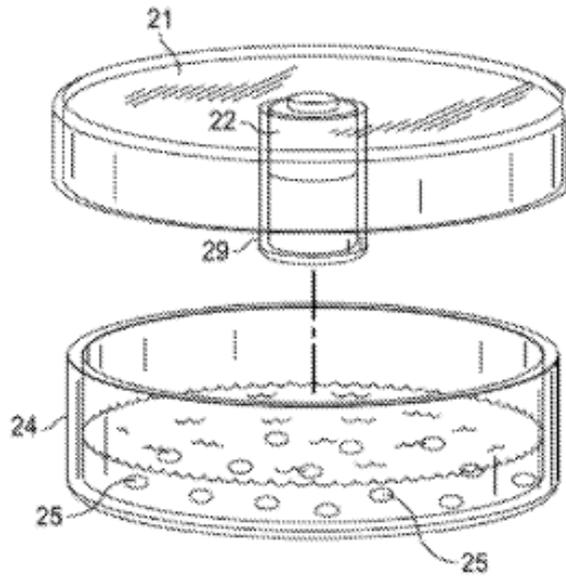


FIG. 2A

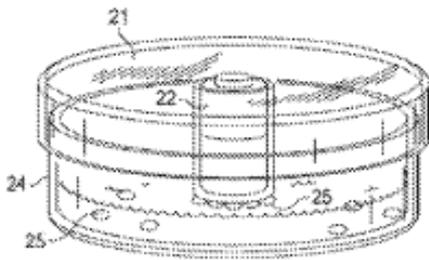


FIG. 2B

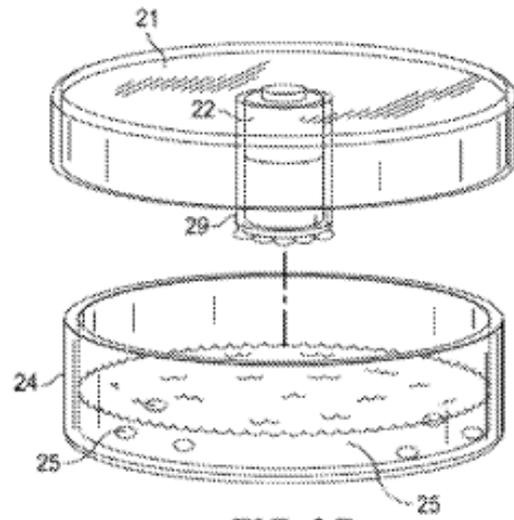


FIG. 2C

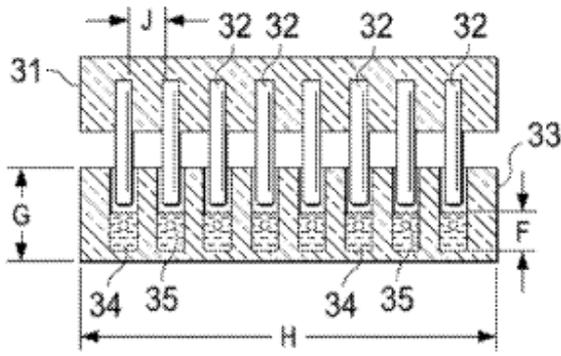


FIG. 3A

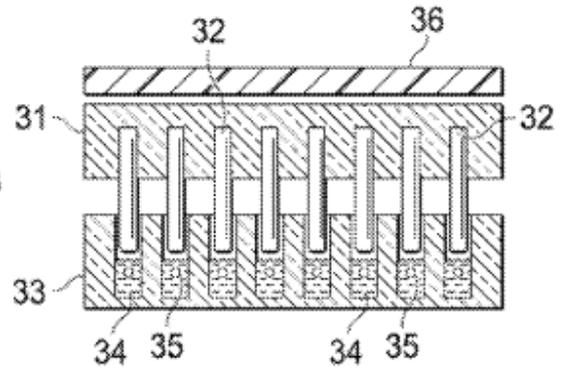


FIG. 3B

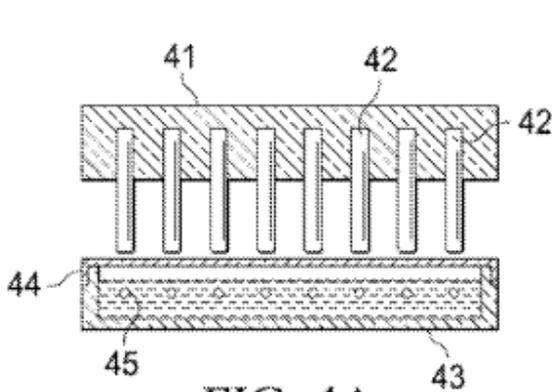


FIG. 4A

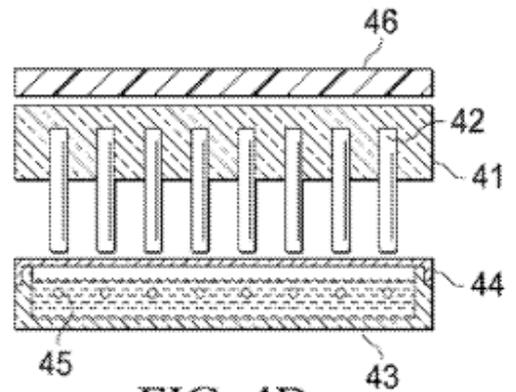


FIG. 4B

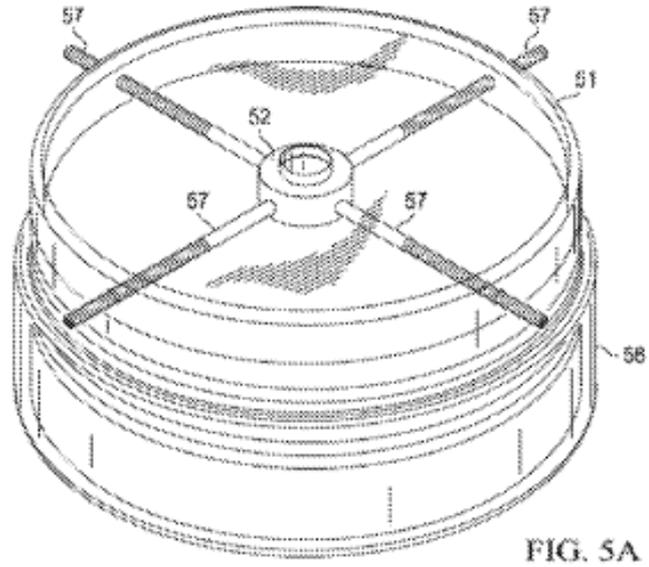


FIG. 5A

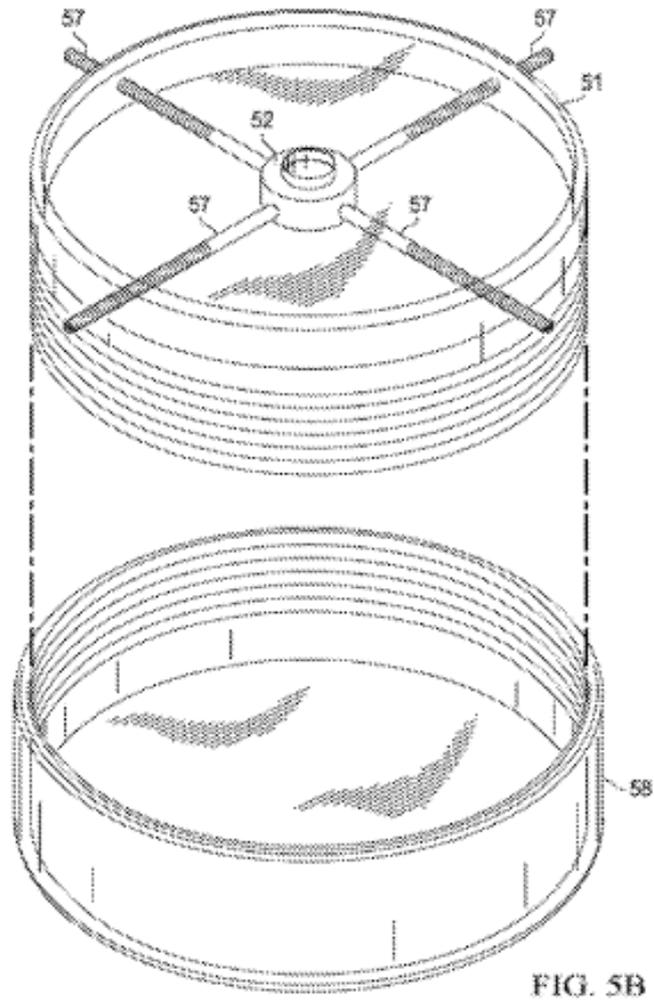


FIG. 5B

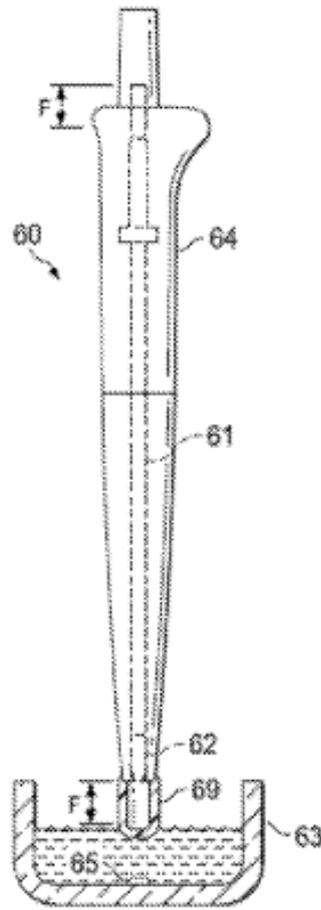


FIG. 6A

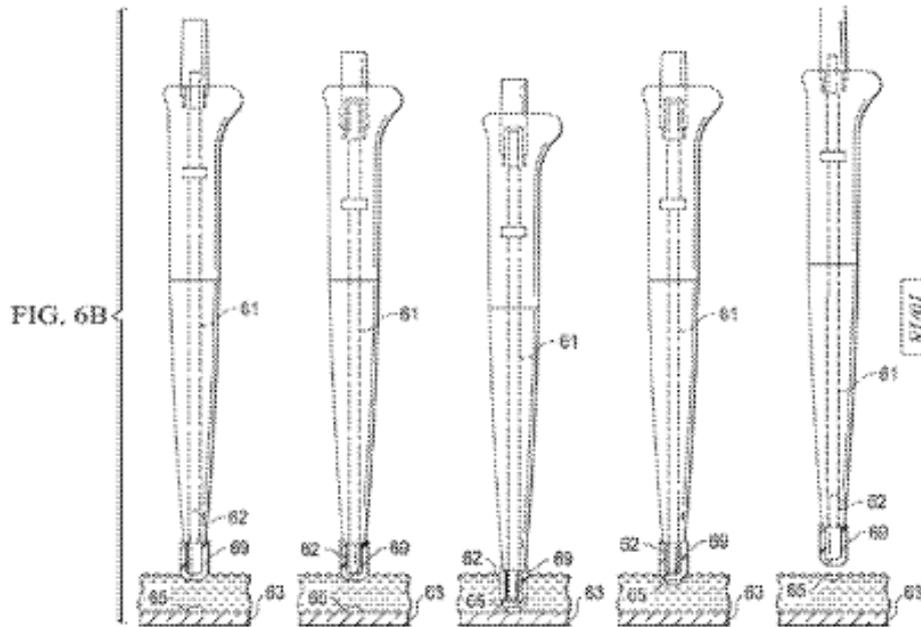


FIG. 6B

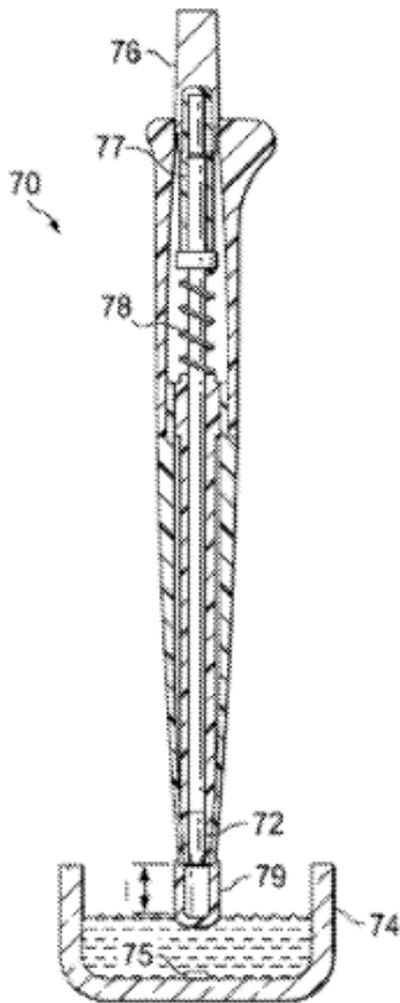


FIG. 7A

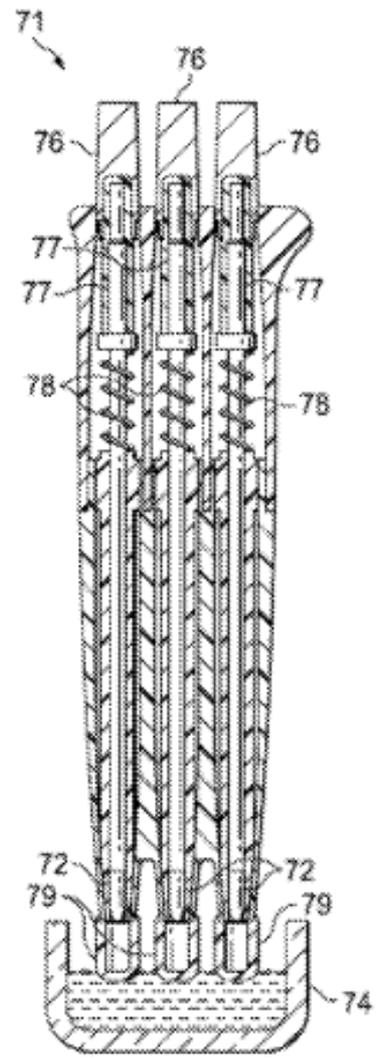
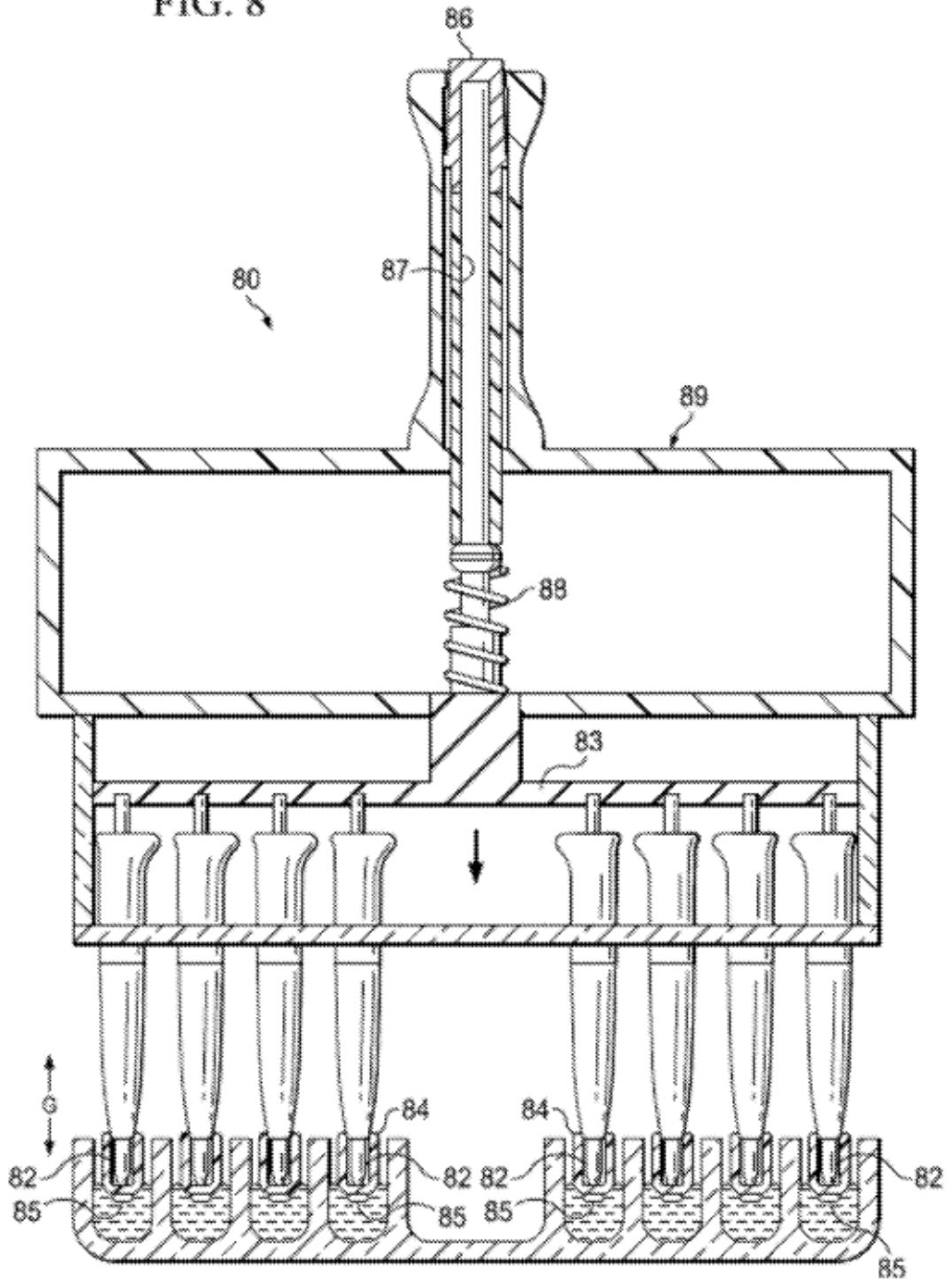


FIG. 7B

FIG. 8



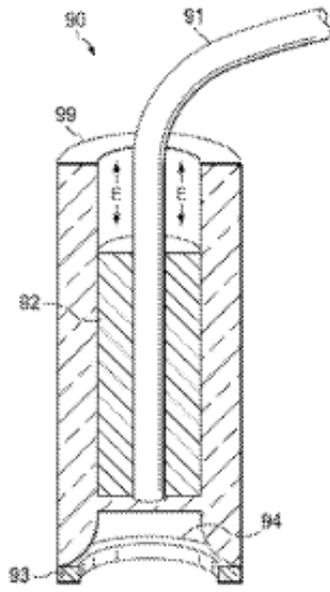


FIG. 9A

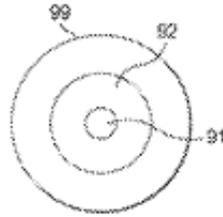


FIG. 9B

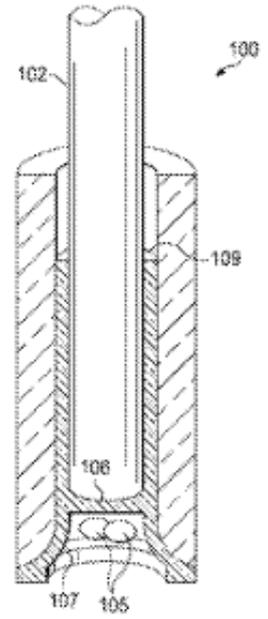


FIG. 10

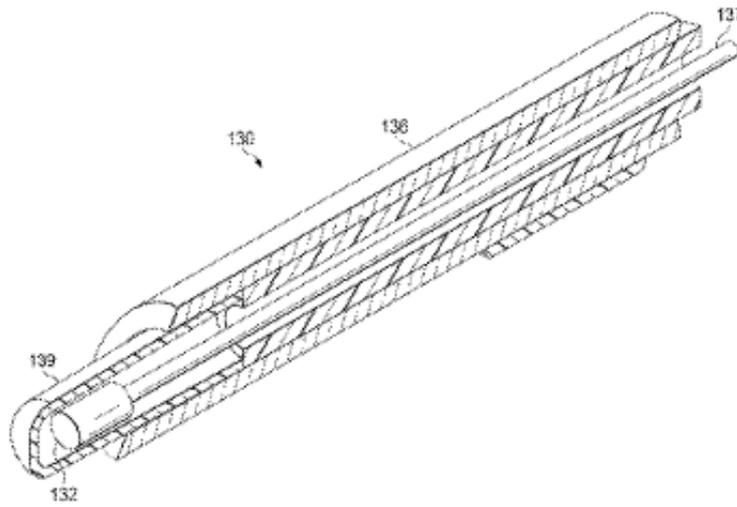


FIG. 11