

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 509**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)
B29K 67/00 (2006.01)
B29C 39/02 (2006.01)
B29C 39/42 (2006.01)
B29K 105/00 (2006.01)
G03F 7/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2012** **PCT/FR2012/052073**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013** **WO13041800**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2012** **E 12773047 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2758520**

54 Título: **Dispositivo de guiado de la migración celular y método de guiado que emplea dicho dispositivo**

30 Prioridad:

19.09.2011 FR 1158316

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

INSTITUT CURIE (33.3%)
26, rue d'Ulm
75005 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
URGO RECHERCHE INNOVATION ET
DEVELOPPEMENT (33.3%)

72 Inventor/es:

LE BERRE, MAËL;
PIEL, MATTHIEU;
CHEN, YONG y
LIU, YANJUN

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 656 509 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

Dispositivo de guiado de la migración celular y método de guiado que emplea dicho dispositivo

5 **Sector de la técnica**

La presente invención tiene por objeto un dispositivo de guiado de la migración celular que comprende un sustrato que presenta una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa concebida para ser puesta en contacto con células.

10

Estado de la técnica

La migración de células es esencial para numerosos procesos fisiológicos como la organogénesis o la cicatrización de heridas. En su entorno natural, la dirección y la velocidad de migración de células son guiadas mediante numerosas señales que pueden ser químicas (quimiocinas) o físicas (microentorno).

15

In vitro, estos fenómenos pueden reproducirse o distorsionarse para imponer una dirección de migración a las células utilizando, por ejemplo, quimioatrayentes, campos eléctricos o también modulando el entorno mecánico de la célula.

20

El documento EP-A-1199354 describe, por ejemplo, la formación de un patrón de células en una superficie mediante un control químico de la migración de células. En efecto, en el documento EP-A-1199354, la superficie se trata para que presente un patrón previo constituido por compuestos que favorecen el desarrollo de células y otros compuestos que no favorecen el desarrollo de células. El cultivo de las células se inicia entonces en este patrón previo. No obstante, la eficacia del control de la migración de células por este tipo de sistema depende principalmente de la elección de los compuestos químicos que favorecen o impiden el desarrollo celular en función la naturaleza de las células cultivadas.

25

El documento US 2007/0009572 describe, por su parte, un método de preparación de una película biodegradable micro- o nanotexturizada que comprende canales cuya anchura puede variar de 10 a 160 μm , en el que se depositan células musculares. Los ensayos realizados muestran que las células musculares se alinean unas con respecto a otras a lo largo de los canales, y que su morfología se modifica para asumir una forma alargada. Este método no tiene como finalidad hacer migrar las células en una dirección preferida, sino simplemente favorecer su alineamiento unas con respecto a otras para obtener un apilamiento celular regular.

30

35

El documento US 2009/02481445 describe también un método para guiar la orientación de las células siguiendo una estructura tridimensional utilizando una superficie que comprende un microcanal o una serie de microcanales paralelos unos a otros, cuya anchura es superior a la de las células, para que las células puedan introducirse en él y cuya sección es arbitraria. Como para el documento anterior, este método no tiene como finalidad hacer migrar las células en una dirección preferida, sino simplemente favorecer su alineamiento unas con respecto a otras.

40

Mahmud et al., (Nature Physics 2009, 4, págs. 606) proponen patrones adhesivos en forma de trinquetes ("ratchet") para guiar la migración celular. El efecto observado se basa en un contraste de adhesión entre las partes adhesivas de los canales y las partes no adhesivas de un sustrato de modo que, cuando la calidad del contraste entre las partes adhesivas y no adhesivas se degrada con el tiempo, el guiado de la migración celular ya no se observa. Además, la adhesión a los canales, lineales o que presentan una forma de trinquetes ("ratchet"), permite solamente mantener las células en estos patrones adhesivos, es decir en una sola dimensión en el espacio, y no permite, por ejemplo, la organización de un tejido sobre una superficie en dos dimensiones. Para terminar, los patrones descritos en Mahmud *et al.*, son siempre proyecciones perpendiculares al plano constituido por la superficie que transporta las células.

45

50

Estos métodos que permiten distorsionar los fenómenos naturales de migración celular también pueden encontrar aplicaciones in vivo.

55

El documento US2009/0093879 propone concretamente un implante que presenta, en superficie, patrones tridimensionales micro- o nanométricos. Estos patrones permiten concretamente controlar la adhesión de microorganismos o de fibroblastos a la superficie del implante cuando éste se coloca en un ser vivo, mejorando de este modo la cicatrización de las heridas.

60

Este documento US2009/0093879 sugiere que las micro- o nanoestructuras de superficie pueden guiar a las células que son responsables de la cicatrización, permitiéndoles de este modo organizarse de manera ordenada en la superficie del implante.

65

Ahora bien, dicho control de la migración celular según una dirección dada, también podría presentar aplicaciones en el sector médico diferentes de la organización forzada de las células alrededor de un implante, tales como la migración dirigida de las células a la superficie de una herida o la producción de órganos artificiales en ingeniería

tisular.

Existe, por lo tanto, una necesidad de nuevos dispositivos que permitan guiar a las células en su migración según una dirección seleccionada, cuya eficacia no depende del tipo de célula móvil considerada, simples de implementar, poco invasivos para los tejidos y robustos en el tiempo.

Por guiar la migración celular se entiende, en el sentido de la presente solicitud, que se impone a las células migrar preferentemente en una dirección con preferencia respecto a todas las demás. En otras palabras, el guiado de la migración quiebra la simetría de migración siguiendo la dirección considerada. El "guiado" de la migración difiere de "la orientación" de la migración celular en la que las células migran preferentemente en dos direcciones opuestas sin que una de estas direcciones sea favorecida con respecto a la otra.

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, proponer un dispositivo de guiado de la migración celular que comprende un sustrato que presenta una superficie texturizada concebida para ser puesta en contacto con células, teniendo dicha superficie texturizada una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa.

Contrariamente a los documentos de la técnica anterior que describe canales o microcanales que restringen el alineamiento de las células, la presente invención permite el guiado de las células según una dirección de anisotropía, formando de este modo una red en el plano compatible con la organización de un tejido según una superficie dada.

La invención también tiene por objeto, según un segundo aspecto, un método de guiado de la migración de células que comprende la puesta en contacto de las células con un sustrato que presenta una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa, estando dicha estructura constituida por una red de proyecciones inclinadas tal como se han descrito anteriormente.

Para terminar, la invención tiene por objeto, según otro aspecto, un kit de guiado de la migración celular, que comprende un sustrato que presenta una superficie texturizada tal como se ha descrito anteriormente, que tiene una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa, y una superficie de soporte sobre la que serán transportadas células.

El dispositivo o el método según la invención pueden encontrar, concretamente, aplicaciones en los campos de la dermatología, de la implantología o de la ingeniería tisular.

Por "estructura anisótropa" o "estructura con geometría anisótropa", se entiende, en el sentido de la presente solicitud, una estructura cuya geometría posee una dirección de anisotropía determinada según un eje dado.

La dirección de anisotropía de la estructura anisótropa es concretamente, en el marco de la presente invención, la dirección de la migración de células.

El dispositivo según la invención emplea un sustrato que presenta una superficie texturizada cuya estructura tridimensional está constituida por una red de proyecciones inclinadas.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra una superficie texturizada que comprende una red de proyecciones inclinadas de forma cilíndrica.

La figura 2 ilustra el confinamiento de las células entre la superficie texturizada y la superficie de soporte.

La figura 3 ilustra diferentes utilizaciones del dispositivo según la invención:

Figura 3A): estructuras adhesivas simples para guiar las células en una dirección.

Figura 3B): el confinamiento de las células entre la superficie texturizada y la superficie de soporte en un espacio de aproximadamente 5 μm .

Figura 3C): la aplicación de la superficie texturizada sobre un sustrato blando de tipo gel.

Figura 3D): la aplicación de la superficie texturizada sobre un tejido vivo.

La figura 4 ilustra las diferentes etapas del procedimiento de preparación de la superficie texturizada según la invención:

La figura 4A) ilustra una placa de vidrio sobre la que se deposita una capa de cromo recubierta con una capa de resina fotosensible.

Las figuras 4 (B) y (C) ilustran la formación de los patrones sobre la capa fotosensible mediante un procedimiento fotolitográfico y su transferencia a la capa de cromo mediante grabado.

La figura 4 (D) ilustra la aplicación de una capa de resina sobre los patrones formados.

La figura 4 (E) ilustra la irradiación UV de la capa de resina.

La figura 4 (F) ilustra las proyecciones inclinadas formadas tras la irradiación UV.

La figura 4 (G) ilustra el depósito consecutivo de una capa de silicona PDMS/

La figura 4 (H) ilustra el molde de PDMS en negativo formado de este modo.

La figura 4 (I) ilustra la aplicación de una capa del material que constituye la superficie texturizada según la invención sobre el molde de PDMS en negativo.

La figura 4 (J) ilustra la superficie tridimensional formada de este modo.

La figura 5 presenta una fotografía por microscopía óptica de una superficie texturizada según la invención.

La figura 6 representa un histograma de la dirección media de migración de células durante 24 h.

15 Descripción detallada de la invención

Sustrato

En el marco de la presente solicitud, el efecto técnico de guiado de la migración celular se obtiene por medio de la superficie texturizada particular tal como se ha descrito anteriormente, que tiene una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa, cuando esta superficie texturizada es puesta en contacto con células.

El sustrato que presenta una superficie texturizada, concretamente micro- o nanotexturizada, del dispositivo según la invención puede ser adhesivo o no adhesivo.

La elección de un sustrato adhesivo puede permitir, concretamente, mejorar más el efecto técnico de guiado de la migración celular ya obtenido gracias al dispositivo que emplea la superficie específica según la invención.

Los materiales adhesivos susceptibles de ser adecuados para el sustrato según la invención pueden ser concretamente hidrófilos o hidrófobos, siendo, llegado el caso, tratados con un promotor de la adhesión celular, y concretamente seleccionado entre:

- plásticos biocompatibles (por ejemplo, poliestireno (PS)), comúnmente utilizado en cultivos celulares, polímeros de silicona tales como polidimetilsiloxano (PDMS) concretamente utilizados en laboratorios en chip, geles de copolímeros de bloques como estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) utilizados para la fabricación de apósitos o poliácidos lácticos y glicólicos (PLGA, PLA: hidrófilo) que son biodegradables y pueden utilizarse para implantes o como soporte de tejidos artificiales). Algunos de estos plásticos pueden ser activados ventajosamente por plasma de oxígeno para aumentar su hidrofilia y promover la adhesión celular.
- cerámicas, generalmente hidrófilas, tales como óxidos o nitruros metálicos, como por ejemplo vidrio (SiO_2), nitruro de silicio (Si_3N_4), dióxido de titanio (TiO_2) u otros. Estos materiales se utilizan en cultivo celular, en laboratorios en chip o en implantología. Estos materiales pueden ser activados ventajosamente por plasma de oxígeno para aumentar su hidrofilia y promover la adhesión celular.
- Los metales inertes como el oro, el platino, el paladio o los metales cuya superficie oxidada o nitrurada es estable, como el cromo o el titanio, que se utilizan para implantes. Ventajosamente, los metales se pueden tratar con moléculas de la familia de los tioles para aumentar o disminuir su capacidad de adhesión celular.

Es posible promover la adhesión celular, tratando químicamente el material de soporte. Se puede utilizar entonces:

- polímeros cargados (polielectrolitos) que se adsorben fuertemente por interacción electrostática sobre superficies oxidadas (naturalmente como para óxidos o artificialmente activando superficies con ayuda de un plasma de oxígeno). Por ejemplo, Poli-L-lisina (PLL) o Poliornitina (PORN); o
- proteínas de adhesión celular (integrinas) o de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno) o péptidos que imitan estas proteínas, tales como el motivo RGD (ácido arginil glicil aspártico).

También es posible, en el marco de la presente invención, modular la adhesión del sustrato para optimizar la motilidad de las células. En efecto, el nivel de adhesión de las células sobre un sustrato puede modularse tratando este sustrato adhesivo con una mezcla ratiométrica de moléculas adhesivas y de moléculas no adhesivas. Por ejemplo, pueden utilizarse una mezcla de pLL-PEG y de pLL-PEG-RGD o una mezcla de pLL-PEG y de fibronectina.

Según una realización preferida, el sustrato que presenta una superficie texturizada es un sustrato no adhesivo, es decir sobre el que las células no se pueden adherir, para que pueda ser retirado sin deteriorar las células. Estos sustratos no adhesivos se denominan también sustratos antiensuciamiento (o "anti-fouling" según la terminología anglosajona).

El carácter no adhesivo del sustrato corresponde a una reducida capacidad de adsorción proteica de dicho sustrato así como una reducida capacidad de adhesión celular, lo que permite, generalmente, limitar las reacciones inflamatorias.

5 Los materiales no adhesivos que pueden ser adecuados para el sustrato que tiene una superficie texturizada según la invención pueden ser concretamente materiales superhidrófobos, como es el caso con polímeros fluorados (por ejemplo, politetrafluoroetileno (PTFE)) - o geles tales como poliacrilamida (PAM) o diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).

10 Como alternativa, el sustrato no adhesivo puede estar constituido por un material hecho no adhesivo mediante tratamiento químico.

Los tratamientos químicos que permite hacer al sustrato no adhesivo pueden ser concretamente el injerto sobre el sustrato de una capa de gel monomolecular, por ejemplo de tipo polietilenglicol (PEG), por ejemplo un PEG
15 silanizado sobre los óxidos o tiolado sobre los metales o conjugado con un polielectrolito para conferirle la capacidad de adsorberse de forma duradera mediante interacción electrostática sobre el sustrato, como es el caso para el injerto de Polilisina-PEG (PLL-PEG).

Preferentemente, el material no adhesivo es un polímero fluorado o un material hecho no adhesivo mediante
20 tratamiento químico tal como el injerto de moléculas, por ejemplo de polietilenglicol (PEG).

Superficie texturizada

La superficie texturizada del dispositivo según la invención presenta una estructura tridimensional anisótropa
25 constituida por una red de proyecciones inclinadas.

Por "red" de proyecciones inclinadas, se entiende, en el sentido de la presente solicitud que las proyecciones
inclinadas están dispuestas de manera periódica sobre la superficie texturizada para producir un patrón de repetición
regular.

La dirección de inclinación de las proyecciones permite concretamente imponer una dirección de menor fricción, que
determina de este modo la dirección de desplazamiento preferente de las células. Según una realización particular,
para mejorar la fricción, la red de proyecciones presenta un periodo, definido como la distancia entre dos
proyecciones, inferior al tamaño de las células, de manera que la célula esté siempre en contacto con al menos dos
35 proyecciones, preferentemente inferior a 20 μm , para evitar que las células circulen de manera mejorada entre las
proyecciones.

En el marco de la invención, la superficie texturizada presenta una dimensión superior al tamaño de las células.

40 Preferentemente, el periodo de la red de proyecciones está comprendido entre 0,1 y 15 μm , preferentemente aún
comprendido entre 5 y 10 μm y más preferentemente del orden de 5 μm .

En el marco de la invención, las proyecciones de la red de la estructura tridimensional anisótropa que constituye la
superficie texturizada están inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada
45 en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa.

En particular, estas proyecciones presentan preferentemente un ángulo de inclinación inferior o igual a 45° con
respecto a la normal al plano constituido por la superficie texturizada, y preferentemente aún entre 10° y 45°.

50 Las proyecciones son, preferentemente, de tamaño nanométrico, es decir que su altura, medida a partir del sustrato
de la superficie texturizada, es del orden del nanómetro, en particular entre 100 nm y 20 μm , para limitar la
escotadura y evitar la perforación de la célula bajo la presión de las proyecciones.

En particular, las proyecciones presentan, preferentemente, una relación de aspecto, que corresponde a la relación
55 de la altura respecto al diámetro de las proyecciones, comprendida entre 0,5 y 20, preferentemente entre 2 y 10.

Ventajosamente, esta relación de aspecto puede utilizarse para ajustar la rigidez del sustrato percibido por las
células utilizando el hecho de que cuanto más pilares presentan una relación de aspecto elevada, menos rígidas son
las proyecciones y, por lo tanto, más fácilmente se deformarán bajo el efecto de las fuerzas aplicadas por las células.

60 Por ejemplo, micro- o nanopilares moldeados en un sustrato de tipo PDMS estándar, de rigidez 2 MPa permitirán
obtener rigideces que van de 1,7 kPa para una relación de aspecto de 6,25 a 61 kPa para una relación de aspecto
de 1,9 (Tesis de S. Ghassemi, Columbia University, 2011, pág. 38,
(<http://academiccommons.columbia.edu/catalog/ac:131397>)).

65 Ahora bien, la rigidez de las proyecciones permite inducir cierto fenotipo, una cierta diferenciación o la proliferación

de células en contacto con el sustrato, al tiempo que se conserva la propiedad de guiado de las células buscada según la presente solicitud. En efecto, se ha mostrado que ciertas células, cuando evolucionan sobre sustratos más rígidos, tienen tendencia a diferenciarse en células óseas, mientras que estas mismas células, cuando evolucionan en sustratos más flexibles, tienen tendencia a diferenciarse en células neuronales.

5 Por consiguiente, puede ser interesante, en el marco de la presente solicitud, ajustar la relación de aspecto de las proyecciones de la superficie texturizada según la invención (concretamente cuando las células son transportadas sobre esta superficie) para modificar el fenotipo, la diferenciación o la proliferación de dichas células.

10 Las proyecciones inclinadas pueden presentarse en cualquier forma geométrica, y concretamente en forma de cilindros, de conos, de pirámides, de láminas o de escamas de forma sustancialmente triangular, semielíptica o semicircular.

15 Cuando las proyecciones se presentan en forma de láminas, su sección puede ser rectangular o en forma de un paralelogramo, estando la sección definida por un plano normal al eje de dicha lámina.

Según una realización preferida, las proyecciones inclinadas se presentan en forma de cilindros que pueden presentar concretamente una sección esférica u ovoide, estando la sección definida por un plano normal al eje de dicho cilindro.

20 En el sentido de la presente solicitud, la sección de las proyecciones, sea cual sea su forma, se inscribe en un círculo de diámetro determinado, definido como siendo el diámetro de dichas proyecciones.

25 Cuando el diámetro de las proyecciones no es constante (por ejemplo cuando las proyecciones son cónicas), el diámetro se mide para una sección situada a media altura de las proyecciones.

Las proyecciones inclinadas presentan, preferentemente, un diámetro comprendido entre 10 nm y 10 μ m, preferentemente entre 0,5 y 3 μ m.

30 Según una realización particular, la superficie ocupada por las proyecciones inclinadas, dispuestas de manera periódica sobre la superficie texturizada, representa del 5 al 50 % de la superficie texturizada, y preferentemente del orden del 5 % de la superficie texturizada.

35 Dichas estructuras anisótropas constituidas por una red de proyecciones inclinadas pueden obtenerse, por ejemplo, mediante fotolitografía o mediante nanolitografía ("nanoimprint" en terminología anglosajona), opcionalmente seguida por una etapa de grabado seco anisótropo tal como un grabado iónico reactivo (GIR o RIE para "Reactive-Ion Etching") que incluye los sistemas de antorcha de plasma ("Inductively Coupled Plasma", ICP) o DRIE ("Deep Reactive-Ion Etching") inclinando la muestra durante la fotolitografía o durante el grabado para obtener la inclinación de las estructuras.

40 Fabricación de la superficie texturizada

45 La superficie texturizada del dispositivo según la invención, que presenta una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas, puede prepararse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia.

Sin embargo, es mérito de la solicitante haber desarrollado un nuevo método de preparación de este tipo de superficies.

50 Las proyecciones inclinadas pueden realizarse, en efecto, mediante vertido de un polímero siliconado (PDMS) o mediante moldeo de un copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) sobre un molde de silicona (PDMS).

55 En el marco de la invención, las proyecciones inclinadas, cuando se utilizan para el guiado de las células por confinamiento, pueden realizarse preferentemente en un polímero siliconado (PDMS), cuya superficie se hace no adhesiva.

Según otro aspecto particular de la invención, las proyecciones inclinadas, cuando se utilizan para el guiado de las células sin confinamiento, pueden realizarse preferentemente mediante moldeo de un copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) en un molde de silicona (PDMS) como se ilustra en la figura 4.

60 De este modo, la invención tiene por objeto, según un aspecto particular, un procedimiento de preparación de una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa, que comprende:

65 i. la preparación de moldes de silicona que constituyen copias en negativo de dicha estructura tridimensional,

concretamente mediante litografía óptica autoalineada,
 ii. el moldeo del material que constituye dicha estructura tridimensional,
 iii. el desprendimiento del molde de silicona.

5 En particular, pueden prepararse moldes de silicona (PDMS) mediante litografía óptica autoalineada, que comprende concretamente las etapas siguientes:

- i. el depósito, de una capa de resina fotosensible sobre una máscara óptica,
- 10 ii. la irradiación de dicha capa de resina a través de la máscara óptica mediante una fuente de luz, con un ángulo incidente (que corresponde al ángulo formado por el rayo incidente y la normal al plano constituido por la máscara), condicionando dicho ángulo incidente el ángulo de inclinación de los pilares de la estructura tridimensional anisótropa,
- 15 iii. opcionalmente, el recubrimiento de dicha superficie tridimensional de resina con un material antiadherente,
- iv. el vertido de una capa de PDMS sobre dicha superficie tridimensional de resina para obtener dichos moldes de silicona (PDMS),
- v. después de la polimerización, desprendimiento del molde de PDMS obtenido de este modo (figura 4 (H))

La máscara óptica utilizada en la etapa i. puede ser un sustrato transparente utilizado habitualmente para las máscaras ópticas, como por ejemplo una placa de vidrio, en el que se realizan patrones que constituyen la máscara de un material metálico que absorbe la luz, por ejemplo cromo. Estas máscaras son clásicas para la fotolitografía y están disponibles en el mercado o pueden producirse mediante métodos conocidos por el experto en la materia.

El experto en la materia puede, por ejemplo, producir una máscara óptica depositando una capa metálica que absorbe la luz (concretamente cromo) sobre un sustrato transparente tal como una placa de vidrio y formando patrones (por ejemplo una matriz de agujeros) en dicha capa metálica, por ejemplo mediante grabado con una solución que graba el cromo como ChromeEtch, comercializada por MicroChem.

Para ello, se forman patrones mediante barrido de un haz láser enfocado sobre una capa de resina fotosensible depositada sobre el sustrato transparente (placa de vidrio) recubierto previamente por una capa de cromo. Después de la revelación de la resina, se transfieren estos motivos sobre la capa de cromo sumergiendo el sustrato de vidrio en un baño de ChromeEtch. Para acabar, los patrones de resina que han servido de máscara se eliminan con ayuda de un disolvente adaptado. Un máscara virgen de tipo PR-AZ1518 Cr (placa de vidrio cubierta de una capa fina de cromo y de una capa de resina), comercializada por Micro Chem, puede utilizarse, por ejemplo, para la producción de máscaras ópticas.

En la etapa i, el espesor de la capa de resina aplicada se selecciona concretamente según la altura de los pilares deseada. La resina es, por ejemplo, una resina epoxi SU-8 3000 comercializada por la compañía Micro-Chem.

Una vez reticulada la resina en la etapa ii, se puede eliminar preferentemente, con ayuda de un disolvente apropiado, la parte de la resina que no ha sido irradiada.

El ángulo seleccionado para la irradiación en la etapa ii define el ángulo de inclinación de las proyecciones con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada (figura 4 (E)). Estando la luz refractada en el sustrato transparente utilizado, el ángulo de los pilares no es siempre exactamente el ángulo de la luz; esto depende de la naturaleza del material que constituye el sustrato. El experto en la materia ajustará, por lo tanto, el ángulo incidente en función del sustrato utilizado para obtener la inclinación de los pilares deseada.

El ángulo seleccionado para la irradiación en la etapa ii puede ser concretamente inferior a 90°, preferentemente inferior a 45°, y más preferentemente comprendido entre 10° y 45°.

El material antiadherente opcionalmente añadido en la etapa iii puede ser, por ejemplo, trimetilclorosilano (TMCS).

Para terminar, sobre la base de los moldes de PDMS obtenidos de este modo, la superficie tridimensional anisótropa según la invención se realiza mediante moldeo de un material (PDMS o PLGA) que constituye dicha estructura tridimensional según la invención, por ejemplo mediante vertido de un polímero siliconado sobre el molde de silicona previamente puesto al vacío, o mediante moldeo térmico en el caso de un copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

Después del endurecimiento del material que constituye la superficie tridimensional, el molde de PDMS se separa de la muestra de superficie tridimensional que presenta, de este modo, una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa (figura 4 (J)).

Cuando la superficie tridimensional anisótropa según la invención se realiza mediante moldeo térmico de un copolímero de PLGA, dicho moldeo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 80 y 100 °C (preferentemente de 60 a 90 °C, y más preferentemente aproximadamente 90 °C), y a una presión comprendida

entre 60 y 120 bares (preferentemente entre 100 y 120 bares, y más preferentemente aproximadamente 120 bares), durante aproximadamente 10 minutos (figura 4 (I)). Después de la refrigeración y la reducción de la presión hasta alcanzar la presión atmosférica, el molde de PDMS se separa de la muestra de superficie tridimensional.

- 5 La altura, el diámetro, el ángulo de inclinación de las proyecciones puede ser modulado de este modo por el experto en la materia ajustando diferentes parámetros del procedimiento.

Superficie de soporte

- 10 En el marco del dispositivo según la invención, las células cuya migración está controlada son transportadas sobre un sustrato denominado "superficie de soporte".

La superficie de soporte sobre la que descansan las células puede ser la superficie texturizada descrita anteriormente, o una superficie artificial tal como una superficie de cultivo celular (por ejemplo un gel), una lámina de vidrio, el interior de un canal microfluidico, o una superficie del entorno natural de dichas células tal como la superficie de un tejido vivo o la superficie de una herida.

Según una realización particular de la invención, las células pueden ser guiadas confinándolas entre su superficie de soporte y dicha superficie texturizada.

20 En efecto, el confinamiento de las células permite reforzar el guiado de las células, en particular cuando el sustrato sobre el que las células son transportadas es no adhesivo.

En esta realización, la distancia entre dicha superficie de soporte y dicha superficie texturizada está comprendida entre 0 y 10 μm , preferentemente entre 3 y 6 μm , de modo que el espesor de las células después del confinamiento está al menos comprendido entre 3 y 6 μm para permitir su migración.

30 Cuando el soporte sobre el que son transportadas las células es "blando", es decir presenta una rigidez inferior a aproximadamente 20 kPa, concretamente comprendida entre 100 Pa y 20kPa, preferentemente entre 500 Pa y 10 kPa, no es necesario que posea prominencias suplementarias en la medida en que la superficie es suficientemente "blanda" para permitir a las células no ser aplastadas por el sustrato nanotexturizado, definiendo las células su espacio de confinamiento deformando la superficie de soporte.

35 Estos soportes "blandos" son de tipo gel de rigidez reducida o alfombra celular. Los geles utilizados pueden ser geles de origen artificial tales como poliacrilamida (PAM) o diacrilato de polietilenglicol (PEGDA) o incluso geles de origen natural como colágeno, matrigel o ácido hialurónico (HA). La rigidez de estos geles se puede ajustar por su composición y las condiciones de su reticulación.

40 Por el contrario, cuando el soporte sobre el que son transportadas las células presenta una rigidez superior a aproximadamente 20 kPa, es deseable, en el marco de la presente invención, que dicho soporte posea prominencias para no alterar las células.

La superficie de soporte y/o dicha superficie texturizada puede comprender una o más prominencias suplementarias que permiten controlar la distancia entre las dos dichas superficies.

45 La altura de estas prominencias se mide con respecto a la superficie sobre la que están dispuestas.

50 Las prominencias suplementarias pueden presentarse, concretamente, en forma de pilares de diámetro comprendido entre 100 y 500 μm , y de altura comprendida entre 1 y 10 μm , preferentemente entre 3 y 6 μm , y en cualquier caso, de altura tal que el espesor de la célula después del confinamiento está comprendido al menos entre 3 y 6 μm cuando el soporte presenta una rigidez superior a aproximadamente 20 kPa.

Método de guiado de la migración de células

55 La invención también tiene por objeto un método de guiado de la migración de células que comprende la puesta en contacto de las células con un sustrato que presenta una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa, estando dicha estructura constituida por proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa.

60 En este método, la superficie texturizada es tal como se ha descrito anteriormente.

Las células también son transportadas sobre una superficie de soporte tal como se ha descrito anteriormente de modo que las células puedan estar confinadas entre dicha superficie texturizada y dicha superficie de soporte.

65 La invención también tiene por objeto un dispositivo que comprende un sustrato que presenta una superficie texturizada concebida para ser puesta en contacto con células, teniendo dicha superficie texturizada una estructura

tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa, para su utilización en un método de guiado de la migración celular.

5 Aplicaciones

El dispositivo según la invención puede encontrar concretamente numerosas aplicaciones de guiado de la migración de células in vivo o in vitro.

10 Se entiende por guiado in vitro, el guiado de la migración de células en cultivo en un medio completamente artificial.

Las células pueden cultivarse, por ejemplo, sobre una superficie de soporte artificial tal como una superficie de cultivo celular (por ejemplo un gel), aplicándose entonces la superficie texturizada sobre la superficie de soporte para confinar las células.

15 En otra realización, la superficie texturizada puede estar integrada en una de las caras de un canal microfluídico para guiar la migración de células en dicho canal microfluídico.

20 Las superficies texturizadas del dispositivo según la invención pueden utilizarse, bien para el estudio de los mecanismos biológicos y físicos de migración y de proliferación de las células en cultivo, o bien para realizar la clasificación celular separando las células según sus características de migración.

25 Como alternativa, el dispositivo según la invención puede permitir guiar células sobre soportes bidimensionales o tridimensionales cubiertos al menos parcialmente por una superficie de guiado texturizada para la producción de órganos artificiales (ingeniería tisular).

El dispositivo según la invención puede encontrar aplicación en cualquier dominio que necesita guiar las células artificialmente e independientemente de su comportamiento quimiotáctico.

30 Se entiende por guiado in vivo el guiado de la proliferación y de la migración de células en un ser vivo, por ejemplo en el ser humano.

En este caso, la superficie de soporte está constituida por el soporte fisiológico natural de las células sobre el que se aplica la superficie texturizada.

35 Según una realización preferida de guiado in vivo, la superficie texturizada puede utilizarse para guiar las células presentes en la superficie de una herida para favorecer la distribución de las células en la herida. El dispositivo es, entonces, un apósito que presenta microestructuras o nanoestructuras en su superficie.

40 Según otra realización de guiado in vivo, la superficie texturizada puede utilizarse para guiar las células alrededor de una prótesis para favorecer la distribución de las células alrededor de la prótesis.

45 Según aún otra realización de guiado in vivo, la superficie texturizada puede utilizarse para guiar las células alrededor de una película o de un apósito interno colocado en el interior del cuerpo de un ser vivo para favorecer la distribución de las células en o alrededor de un órgano.

El dispositivo según la invención puede presentarse, concretamente, en forma de un apósito, de un implante, de una prótesis, de un soporte de tejidos artificiales, de un canal microfluídico, de un laboratorio en chip que integra canales y, preferentemente, dicho dispositivo es un apósito.

50 **Ejemplo**

El efecto de guiado de la migración celular del dispositivo según la invención se ha establecido en cultivos celulares de fibroblastos normales de piel humanos (NHDF) en laboratorio.

55 Se cubrieron cultivos celulares de NHDF con una superficie de silicona (polidimetilsiloxano PDMS) tapizada con una red cuadrada de cilindros inclinados. La red de cilindros inclinados presenta las siguientes propiedades: 4 μm de periodo, 1,5 μm de diámetro, 5 μm de altura y presentando una inclinación de 40° con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie (véase la figura 2).

60 La red de cilindros inclinados se preparó mediante vertido de un polímero de silicona PDMS sobre un molde de silicona (PDMS), como se ilustra en la figura 4.

Los moldes de silicona (PDMS) se prepararon a partir de un molde realizado mediante litografía óptica autoalineada.

65 Para ello, una máscara óptica constituida por una placa de vidrio recubierta por una capa fina de cromo y por una

capa de resina AZ1518, comercializada por MicroChem, con la referencia PR-AZ1518 Cr) se utiliza como sustrato de base.

Se realizaron patrones, en el presente caso una matriz de agujeros, en dicha capa de resina fotosensible mediante barrido de un haz láser enfocado sobre dicha capa fotosensible (figura 4 (B)) seguido de una etapa de relevado de la resina.

A continuación, se transfieren estos patrones a la capa de cromo, que absorbe la luz mediante grabado húmedo (ChromeEtch) y se eliminan los patrones de resina con isopropanol (figura 4 (C)).

A continuación se depositó, sobre la placa de vidrio que comprende los patrones definidos anteriormente, una capa de resina espesa epoxi SU-8 3005 comercializada por la compañía MicroChem, de espesor del orden de 5 μm (figura 4 (D)).

La placa de vidrio que comprende dicha capa de resina se volteó a continuación para ser irradiada con UV en el lado de la placa de vidrio, con un ángulo incidente de aproximadamente 70° de modo que el ángulo de inclinación de los cilindros con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada sea de 40° (figura 4 (E)).

Después de la revelación de los cilindros inclinados en la superficie de la resina, dicha superficie tridimensional de resina formada de este modo se recubrió con un material antiadherente (trimetilclorosilano o TMCS).

La superficie tridimensional formada de este modo se utilizó entonces para realizar un “contra-molde” de silicona (PDMS) para crear copias de los moldes en negativo. Para ello, una capa de una mezcla de PDMS/reticulante (RTV615A, General electric, reticulación a 70 °C durante 1 h) es vertido sobre la superficie de resina tratada antiadherente (figura 4 (G)). Una vez reticulada, la capa de PDMS se desprende de la superficie tridimensional, formando de este modo un molde en negativo de dicha superficie (figura 4 (H)).

Para terminar, la red de cilindros inclinados según la invención se obtiene mediante vertido de una mezcla de PDMS/reticulante (RTV615A, General electric, reticulación a 70 °C durante 1 h) sobre el molde después de colocar el molde al vacío durante 1 h (figura 5).

La superficie de silicona es sostenida, por otro lado, por pilares anchos de 5 μm de altura y de 400 μm de diámetro situados cada milímetro y moldeados en PDMS.

Las células en cultivo se encuentran, por lo tanto, en contacto con los cilindros inclinados, sin ser totalmente aplastadas por estos, que tienen un espacio de 5 μm entre las 2 superficies para migrar de manera confinada (figura 2).

La superficie en silicona tapizada por la red de cilindros inclinados se hace no adherente mediante un tratamiento químico de injerto de un copolímero de poli(L- lisina) y de polietilenglicol (PLL-g-PEG).

El sustrato de cultivo de las células (NHDF) está, por su parte, también constituido por PDMS tratado con fibronectina (50 $\mu\text{g/ml}$).

De manera sorprendente, se ha observado que las NHDF migraban bajo la superficie tapizada de cilindros inclinados preferentemente en la dirección de inclinación de los cilindros. La figura 6 representa un histograma de la dirección media de migración de células durante 24 h. Cada elemento del conjunto representado indica la dirección media de una célula en un lapso de tiempo de 24 h después del confinamiento. En este caso se representan 75 células.

Este efecto también se ha observado, para diferentes redes de proyecciones que tienen un diámetro de 1,5 μm , las alturas h , distancias d entre las proyecciones, y ángulos de inclinación α con respecto a la normal, siguientes:

$$(h,d,a) = (7 \mu\text{m}, 4 \mu\text{m}, 80^\circ),$$

$$(h,d,a) = (7,5 \mu\text{m}, 7 \mu\text{m}, 60^\circ),$$

$$(h,d,a) = (5 \mu\text{m}, 5 \mu\text{m}, 45^\circ),$$

$$(h,d,a) = (7 \mu\text{m}, 4 \mu\text{m}, 80^\circ),$$

$$(h,d,a) = (4 \mu\text{m}, 4 \mu\text{m}, 60^\circ),$$

$$(h,d,a) = (4 \mu\text{m}, 6,5 \mu\text{m}, 60^\circ),$$

$$(h,d,a) = (4 \mu\text{m}, 9 \mu\text{m}, 60^\circ)$$

y

5

$$(h,d,a) = (4 \mu\text{m}, 11,5 \mu\text{m}, 60^\circ)$$

estando las proyecciones realizadas en diferentes materiales (PDMS, ácido poli(láctico-co-glicólico) PLGA).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de guiado de la migración celular que comprende un sustrato que presenta una superficie texturizada concebida para ser puesta en contacto con células, teniendo dicha superficie texturizada una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa.
2. Dispositivo de guiado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha red de proyecciones presenta un periodo inferior al tamaño de las células, preferentemente inferior a 20 μm , preferentemente aún comprendido entre 0,1 y 15 μm , más preferentemente entre 5 y 10 μm y aún más preferentemente del orden de 5 μm .
3. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** las proyecciones inclinadas presentan un ángulo de inclinación inferior o igual a 45° con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, preferentemente entre 10° y 45°.
4. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** las proyecciones inclinadas presentan una relación de aspecto, que corresponde a la relación de la altura respecto al diámetro de las proyecciones, comprendida entre 0,5 y 20, preferentemente entre 2 y 10.
5. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** las proyecciones inclinadas se presentan en forma de cilindro que presenta, concretamente, una sección esférica u ovoide, de conos, de pirámides, de láminas que presentan concretamente una sección rectangular o de forma de un paralelogramo, o de escamas de forma sustancialmente triangular, semiéptica, semicircular.
6. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** las proyecciones inclinadas se presentan en forma de cilindros de diámetro comprendido entre 10 nm y 10 μm , preferentemente entre 0,5 y 3 μm .
7. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el sustrato que presenta una superficie texturizada es adhesivo.
8. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el sustrato que presenta una superficie texturizada es no adhesivo.
9. Dispositivo de guiado según la reivindicación 8, **caracterizado por que** el sustrato no adhesivo está constituido por un material no adhesivo tal como un polímero fluorado o por un material hecho no adhesivo mediante tratamiento químico tal como el injerto de moléculas de polietilenglicol (PEG).
10. Dispositivo de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** se presenta en forma de un apósito, de un implante, de una prótesis, de un soporte de tejidos artificiales, de un canal microfluídico, de un laboratorio en chip que integra canales y, preferentemente, dicho dispositivo es un apósito.
11. Método de guiado in vitro de la migración de células que comprende la puesta en contacto de las células con un sustrato que presenta una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa, estando dicha estructura constituida por una red de proyecciones inclinadas tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 9.
12. Método de guiado según la reivindicación 11, **caracterizado por que** las células son transportadas sobre una superficie de soporte.
13. Método de guiado según la reivindicación 12, **caracterizado por que** la superficie de soporte es una superficie artificial tal como una superficie de cultivo celular (por ejemplo un gel), una lámina de vidrio, el interior de un canal microfluídico, o una superficie del entorno natural de dichas células tal como la superficie de un tejido vivo o la superficie de una herida.
14. Método de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado por que** las células están confinadas entre dicha superficie de soporte y dicha superficie texturizada.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado por que** la distancia entre dicha superficie de soporte y dicha superficie texturizada está comprendida entre 0 y 10 μm , preferentemente entre 3 y 6 μm .
16. Método de guiado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado por que** dicha superficie de soporte y/o dicha superficie texturizada comprende una o más prominencias suplementarias que permiten controlar la distancia entre las dos dichas superficies.
17. Método de guiado según la reivindicación 16, **caracterizado por que** las prominencias suplementarias se

presentan en forma de pilares de diámetro comprendido entre 100 y 500 μm , y de altura inferior a 10 μm , preferentemente entre 3 y 6 μm .

18. Procedimiento de preparación de una superficie texturizada que tiene una estructura tridimensional anisótropa constituida por una red de proyecciones inclinadas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:

- i. la preparación de moldes de silicona que constituyen copias en negativo de dicha estructura tridimensional, concretamente mediante litografía óptica autoalineada,
- ii. el moldeo del material que constituye dicha estructura tridimensional,
- iii. el desprendimiento del molde de silicona.

19. Procedimiento de preparación según la reivindicación anterior, **caracterizado por que** la etapa i de preparación de los moldes de silicona (PDMS) se realiza mediante litografía óptica autoalineada, que comprende concretamente las etapas siguientes:

- i. el depósito, de una capa de resina fotosensible sobre una máscara óptica,
- ii. la irradiación de dicha capa de resina a través de la máscara óptica mediante una fuente de luz, con un ángulo incidente (que corresponde al ángulo formado por el rayo incidente y la normal al plano constituido por la máscara), condicionando dicho ángulo incidente el ángulo de inclinación de los pilares de la estructura tridimensional anisótropa,
- iii. opcionalmente, el recubrimiento de dicha superficie tridimensional de resina con un material antiadherente,
- iv. el vertido de una capa de PDMS sobre dicha superficie tridimensional de resina para obtener dichos moldes de silicona (PDMS),
- v. después de la polimerización, desprendimiento del molde de PDMS obtenido de este modo.

20. Procedimiento de preparación según la reivindicación anterior, **caracterizado por que**, después de la reticulación de la resina en la etapa ii, se elimina, con ayuda de un disolvente apropiado, la parte de la resina que no ha sido irradiada.

21. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, **caracterizado por que** el material antiadherente opcionalmente añadido en la etapa iii es trimetilclorosilano (TMCS).

22. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, **caracterizado por que** la superficie tridimensional anisótropa se realiza mediante moldeo de un material (PDMS o PLGA) que constituye dicha estructura tridimensional según la invención, por ejemplo mediante vertido de un polímero siliconado sobre el molde de silicona previamente puesto al vacío, o mediante moldeo térmico en el caso de un copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

23. Procedimiento de preparación según la reivindicación anterior, **caracterizado por que** la superficie tridimensional anisótropa se realiza mediante moldeo térmico de un copolímero de PLGA, llevado a cabo a una temperatura comprendida entre 80 y 100 $^{\circ}\text{C}$ (preferentemente de 60 a 90 $^{\circ}\text{C}$, y más preferentemente de aproximadamente 90 $^{\circ}\text{C}$), y a una presión comprendida entre 60 y 120 bares (preferentemente entre 100 y 120 bares, y más preferentemente de aproximadamente 120 bares), durante aproximadamente 10 minutos.

24. Procedimiento de preparación según la reivindicación anterior, **caracterizado por que** el molde de PDMS se separa de la muestra de superficie tridimensional después de la refrigeración y la reducción de la presión hasta alcanzar la presión atmosférica, presentando dicha superficie tridimensional de este modo una red de proyecciones inclinadas con respecto a la normal al plano constituido por dicha superficie texturizada, en la dirección conferida por dicha estructura anisótropa.

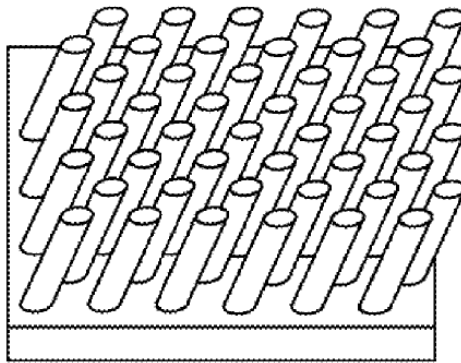


Figura 1

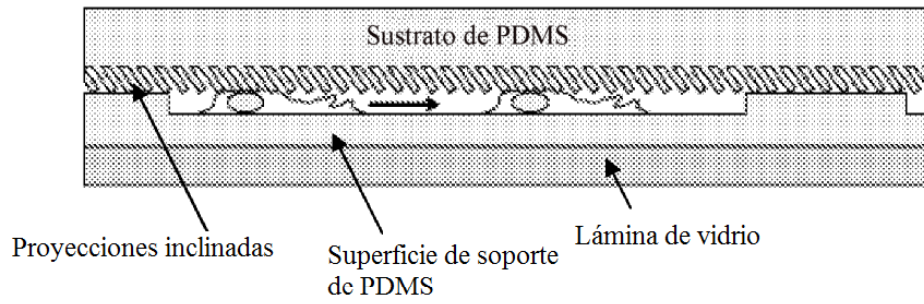


Figura 2

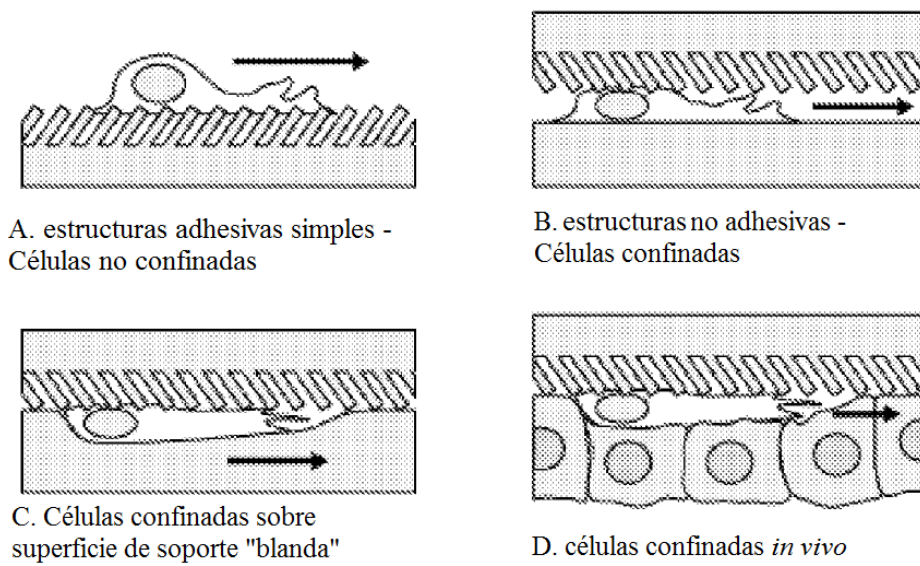


Figura 3

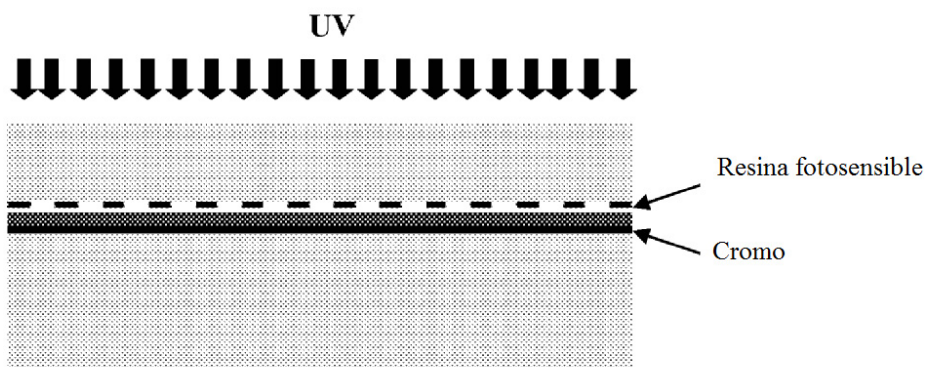


Figura 4 (A)



Figura 4 (B)

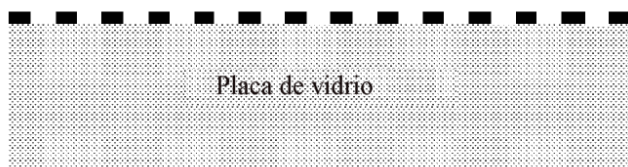


Figura 4 (C)

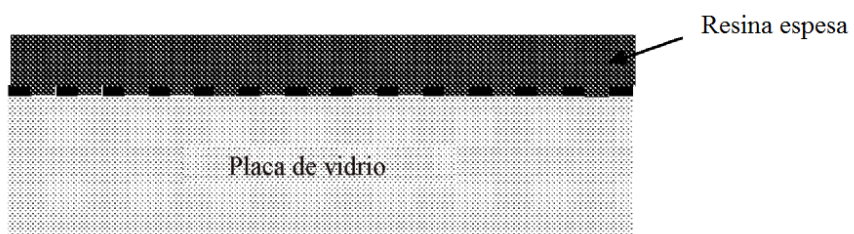


Figura 4 (D)

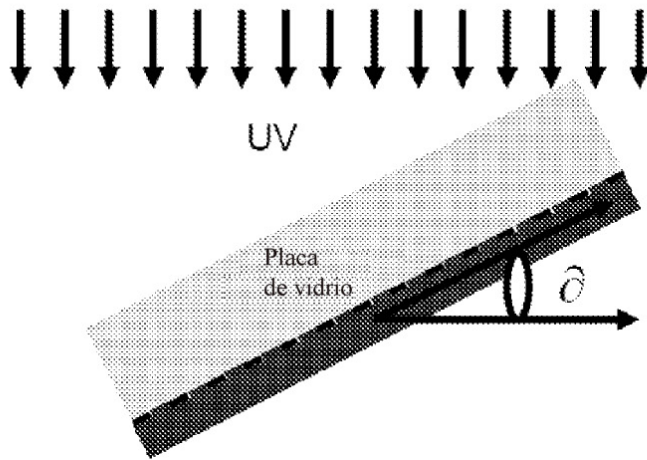


Figura 4 (E)

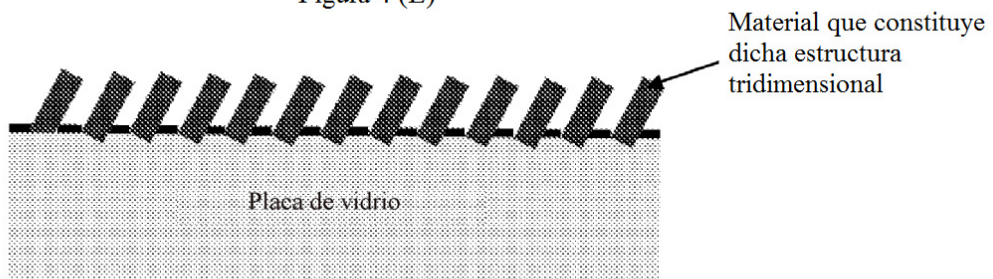


Figura 4 (F)

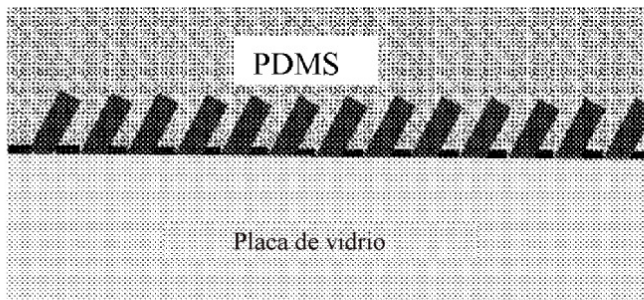


Figura 4 (G)



Figura 4 (H)



Figura 4 (I)

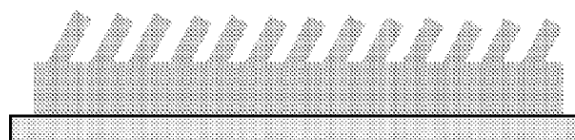


Figura 4 (J)

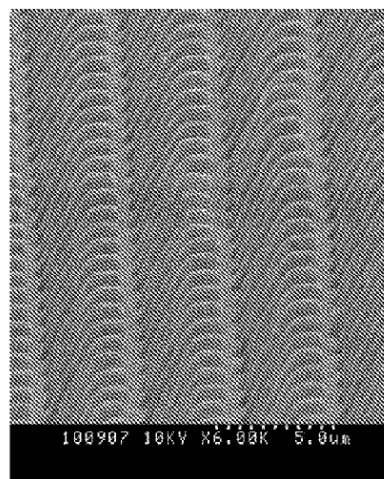


Figura 5

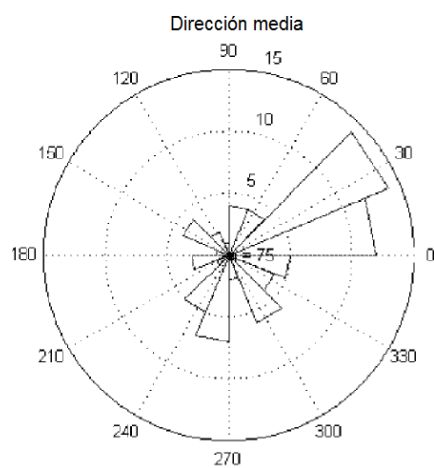


Figura 6