

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 242**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00	(2006.01)
B03C 1/015	(2006.01)
B03C 1/30	(2006.01)
B82Y 25/00	(2011.01)
H01F 1/00	(2006.01)
H01F 1/44	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2010 PCT/US2010/050445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11038370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2010 E 10819626 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2480343**

54 Título: **Materiales para magnetizar células y manipulación magnética**

30 Prioridad:

25.09.2009 US 245846 P

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

02.03.2018

73 Titular/es:

**N3D BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
6611 Morningside Drive
Houston, TX 77030, US**

72 Inventor/es:

SOUZA, GLAUCO R.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 242 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Materiales para magnetizar células y manipulación magnética

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a los campos de la nanotecnología, materiales, biosíntesis, medicina, biología celular e ingeniería de tejidos. Más particularmente, las composiciones y métodos de la presente invención se refieren a métodos de magnetización de células y cultivo de células 3D, manipulación de células y modelación de células usando campos magnéticos.

Antecedentes de la invención

La manipulación de células, controlando su entorno y el favorecimiento de condiciones que emulan o provocan respuestas celulares o de tejidos *in vivo* son un sector de intensa investigación. En el sector de las células madre y la medicina regenerativa hay una necesidad particular de métodos y materiales que repliquen las condiciones nativas en las que las células crecen *in vivo*. Las condiciones que las células experimentan cuando son retiradas de su entorno nativo favorecen la homeostasis, en la que las células cambian para adaptarse a su nuevo entorno, induciendo así cambios celulares. Muchos de estos procedimientos no son elásticos o reversibles, por lo tanto, las células no pueden volver a su estado nativo. Hay una fuerte necesidad de materiales y métodos que favorezcan entornos celulares naturales y minimicen o regulen los cambios celulares adversos antes de que la ingeniería celular y de tejidos pueda alcanzar su plena capacidad potencial.

Actualmente, están siendo desarrollados los materiales que pueden soportar condiciones de cultivo de células tridimensionales (3D). La mayor parte del trabajo en las técnicas de cultivo de células 3D implica la rotulación de los frascos, el uso de un armazón exterior al que se pueden adherir las células, el uso de campos magnéticos para poner en suspensión las células y alguna combinación de estas propuestas.

Por ejemplo, Felder en los documentos US 2005054101 y WO 2005010162 describe un sustrato de hidrogel que forma un armazón exterior en el que las células pueden crecer y ser soportadas en un entorno 3D. Esto introduce un sustrato artificial con el que interaccionan las células en lugar de favorecer rápidamente interacciones de célula-célula y, aunque es una mejora sobre el cultivo 2D, el armazón es propenso a perturbar las células y permanece en el producto acabado. Además, las células pueden seguir creciendo por encima o en el interior de los microportadores, pero las células no pueden levitar de una manera en la que sea posible todo contacto/ interacción de célula-célula alrededor.

Hay un nivel significativo de complejidad implicado en la fabricación de microportadores de Felder, que incluye una química laboriosa y la necesidad de una instalación compleja. Además, el algimatrix, uno de los principales reactivos en la preparación de microportadores, puede ser una fuente de endotoxinas. El control de la flotación parece que es también relevante para facilitar la levitación y es controlado mediante la infusión de burbujas de vidrio en los microportadores, contribuyendo nuevamente a la complejidad y la dificultad. Finalmente, es necesario un equipo informático especializado para la agitación, que es necesario para conseguir el intercambio gaseoso y para evitar la aglomeración de los microportadores, y a menudo se usan propulsores para agitar las células. Sin embargo, las tensiones de cizallamiento que resultan de la agitación se sabe que provocan un deterioro de las células. Además, la agitación impide cualquier control de la forma del campo magnético de los cultivos 3D.

Becker en los documentos US 2009137018 y WO 2005003332 usa un revestimiento de partículas de núcleos magnetizados bioatractores, iniciando así la adherencia de las células biológicas a las partículas de núcleos magnetizados y permitiendo su suspensión en un campo magnético. El revestimiento permanece con las células durante el cultivo, introduciendo así un elemento no natural en el cultivo y perturbando probablemente las células. Los inventores contemplan el uso de un revestimiento biodegradable que podría ser finalmente eliminado, pero no se describe ninguno, por lo que no se conoce si esta propuesta sería satisfactoria. Además, como las células se hacen crecer en el núcleo de los microportadores, es improbable que tenga lugar la levitación de células individuales en la que puedan ser llevadas conjuntamente por la levitación magnética con el fin de favorecer la interacción de célula-célula. Por lo tanto, no es obvio que se pueda demostrar la estructuración rápida (horas) de estructuras multicelulares 3D debido a un contacto de célula-célula cuando se usan microportadores. También, al hacer crecer las células en los microportadores, no está demostrado el cocultivo de diferentes tipos de células, especialmente mediante levitación de células individuales para llevarlas a continuación de forma conjunta magnéticamente. Finalmente, este sistema es engorroso y no es adecuado para aplicaciones a gran escala y de producción elevada.

Una propuesta mejor puede ser magnetizar temporalmente las células, permitiendo su cultivo 3D. Por ejemplo, Akira en los documentos US 2006063252, WO 2004083412 y WO 2004083416 usa liposomas catiónicos magnéticos (MCL) para magnetizar células mediante la absorción de los liposomas. Las células magnetizadas se hacen crecer seguidamente en una lámina en el fondo de una placa usando la atracción magnética y seguidamente son liberadas para su uso. Sin embargo, aunque son capaces de producir láminas de células, las células han crecido todavía en el fondo de una placa y, por tanto, esto no es un cultivo 3D verdadero mediante levitación magnética. Además, Shimizu

y Akira et al. en una reciente publicación titulada "Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering" usan una guía magnética para sembrar células en un vaso sanguíneo descelulado¹. Su estudio muestra resultados alentadores, pero no usan las células magnetizadas como una fuente de tejido que va a ser descelulado. Las células magnetizadas son usadas solamente para recelular los vasos sanguíneos descelulados.

En la solicitud de patente WO 2010036957 de Souza, las células se hacen levitar en un campo magnético poniendo en contacto las células con un "hidrogel" que comprende un bacteriófago con nanopartículas que son sensibles a un campo magnético. En particular, se usa un fago filamentoso como un bacteriófago fd, fl o M13. El modo en que funciona el método no está completamente claro, pero se teoriza que el fago proporciona una estructura o ensamblaje de tipo gel que reviste las células, y ayuda en alguna medida a que las células se absorban o adsorban a las nanopartículas magnéticamente sensibles. Por tanto, incluso aunque el hidrogel sea escurrido, las células siguen siendo magnéticamente sensibles y se pueden hacer levitar en un campo magnético apropiado. Sin embargo, aunque el hidrogel es mayoritariamente escurrido, permanece la capacidad potencial para una infección de fagos o transferencia de material genético y, por tanto, se desea proporcionar un material que permita la absorción o adsorción celular sin el uso de fagos. El documento WO 2007/029980 A1 y la publicación de Xiaoliang *et al.*, IEEE Transactions on Nanotechnology, Vol. 8, nº 2, marzo de 2009, págs. 142-147, describen una composición con nanopartículas de carga negativa y positiva unidas mediante moléculas de soporte fibroso.

La presente descripción supera los inconvenientes existentes en la técnica proporcionando materiales y métodos que favorecen entornos celulares nativos. Estos incluyen la utilización de composiciones y métodos para generar materiales basados en nanopartículas y preparar células para hacer posible un cultivo de células 3D, modelación de células y formación de imágenes de células.

Sumario de la invención

Como se usa en la presente memoria descriptiva, una "nanopartícula de carga positiva" o "nanopartícula positiva" se define como cualquier partícula de menos de 200 nm, preferentemente 100 nm o menos, que tiene una carga global positiva. Preferentemente, la partícula es no tóxica, pero esto no es esencial ya que las partículas no permanecen con las células.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, una "nanopartícula con carga negativa" o "nanopartícula negativa" se define como cualquier partícula de menos de 200 nm, preferentemente 100 nm o menos y, lo más preferentemente, de aproximadamente 2-25 nm, que tiene una carga global negativa. Preferentemente, la partícula es no tóxica, pero esto no es esencial ya que las partículas no permanecen con las células durante un periodo de tiempo prolongado.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, un "elemento magnéticamente sensible" puede ser cualquier elemento o molécula que responda a un campo magnético. Como se detalla con posterioridad, una de las nanopartículas debe contener o debe ser un elemento magnéticamente sensible.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, una "molécula de soporte" se refiere a cualquier molécula larga que interaccione con las nanopartículas para crear una estructura o gel fibroso de tipo entrelazado y, por tanto, que mantiene la nanopartícula magnética en estrecha proximidad con la célula para la absorción.

En la siguiente memoria descriptiva se usan las siguientes abreviaturas:

Abreviatura	
+NP	nanopartícula de carga positiva
COL	colágeno
Fluor G	IgG anti-ratón AlexaFluor 555
Fluor R	IgG anti-conejo de asno AlexaFluor 488
FN	Fibronectina
HYA	ácido hialurónico
IgG	inmunoglobulina G
IgG-FR	IgG de ratón e inmunoglobulina anti-ratón de asno AlexaFluor 555
LM	laminina
MG	matriquel

Abreviatura	
-NP	nanopartícula de carga negativa
NT	Oligonucleótidos
PL	Polilisina
SER	suero bovino fetal
SM	molécula de soporte

Hablando de forma general, la invención es un nuevo material que permite que las células absorban o adsorban elementos magnéticamente sensibles y, por tanto, que sean levitables en un cultivo celular cuando se aplica un campo magnético. Los materiales incluyen nanopartículas de carga positiva y negativa, una de las cuales debe contener uno o más elementos magnéticamente sensibles, como óxido de hierro. Estas nanopartículas se combinan
5 adicionalmente con un polímero, preferentemente un polímero natural o derivado de células u otra molécula larga que actúe como un soporte (denominado en la presente memoria descriptiva "molécula de soporte") para las nanopartículas cargadas y las células, manteniendo las nanopartículas en su sitio para su absorción o adsorción por las células. La inclusión de nanopartículas tanto positivas como negativas permite una mezcla íntima de las nanopartículas y conduce al ensamblaje de los tres componentes, asegurando así una distribución uniforme y una
10 buena absorción. La molécula de soporte combina íntimamente la totalidad de los tres componentes con las células en una estructura de tipo entrelazada fibrosa que permite que las células absorban el elemento magnéticamente sensible.

Después de un periodo de incubación, el material puede ser escurrido, permitiendo que las células sean manipuladas en un campo magnético. Una etapa alternativa es optimizar o ajustar la absorción de material magnético aumentando la relación entre el número de células y la cantidad de nanopartículas magnéticas. Si está presente un gran número de células, absorberán la mayor parte de las nanopartículas magnéticas, y la etapa de escurrir cualquier material restante puede que no sea necesaria, particularmente si las moléculas de soporte restantes y/o nanopartículas son no tóxicas y/o beneficiosas para la célula. Esto es particularmente cierto cuando las
15 moléculas de soporte comprenden una o más proteínas de las matrices extracelulares, glicoproteína o polisacárido. Las partículas magnéticas se pierden uniformemente a partir de las células, dejándolas en un estado completamente natural.

Además de un cultivo 3D simple, el campo magnético puede ser usado para manipular la forma, modelos y movimiento de las células. Por ejemplo, el uso de un imán toroidal (en forma de arandela) puede favorecer que las células se ensamblen en una forma similar o un campo descendente puede hacer que el cultivo de células 3D sea más grueso en un lado. Se han creado también láminas densas firmes de células colocando un imán fuerte en la parte inferior de un plato de cultivo durante un periodo de crecimiento. La inversión simple del campo permite que la lámina seguidamente se haga levitar y se puede continuar el crecimiento de la lámina en un cultivo 3D. Es posible
20 también combinar diversas formas y continuar el cultivo 3D y, por tanto, crear formas más complejas en un cultivo 3D.

El elemento magnéticamente sensible puede ser cualquier elemento o molécula que responda a un campo magnético, por ejemplo imanes de tierras raras (por ejemplo, samario-cobalto (SmCo) y neodimio-hierro-boro (NdFeB)), materiales de imanes cerámicos (por ejemplo, ferrita de estroncio), los elementos magnéticos (por ejemplo, hierro, cobalto y níquel y sus aleaciones y óxidos). Son particularmente preferidos materiales paramagnéticos que reaccionan a un campo magnético, pero que no son imanes por sí mismos, ya que esto permite un ensamblaje más fácil de los materiales.
35

Preferentemente, el campo magnético usado para levitar estas células es de aproximadamente 0,03-0,1 T (300-1.000 G). Sin embargo, la resistencia del campo varía con la distancia desde la célula y con la cantidad y el tipo de elemento magnético sensible absorbido o adsorbido por las células. Por tanto, la resistencia del campo óptima variará, pero es fácilmente determinada empíricamente.
40

La nanopartícula con carga negativa es oro, un metal de carga estabilizada.
45

Las nanopartículas de carga positiva incluyen un tensioactivo o polímero estabilizado o aleaciones y/u óxidos revestidos (por ejemplo, hierro elemental, hierro-cobalto, óxido de níquel) y, preferentemente, es una nanopartícula de óxido de hierro.
50

Las nanopartículas deben tener un tamaño de escala nanométrica y, por tanto, son de aproximadamente 100 nm. El tamaño puede variar, sin embargo, es entre aproximadamente 5-250 nm, 50-200 nm, 75-150 nm, pero pueden ser más pequeñas o más grandes, con la condición de que el tamaño sea apropiado para permitir la entrada o adsorción al tipo de célula en uso. Se ha mostrado en la presente invención que hay un límite superior sobre el tamaño eficaz de la nanopartícula magnética, y el tamaño micrométrico es demasiado grande para la eficacia, aunque se observó
55 todavía alguna funcionalidad.

La “molécula de soporte” es generalmente un polímero u otra molécula larga que sirva para mantener las nanopartículas y células conjuntamente en una mezcla íntima. La molécula de soporte puede tener carga positiva, carga negativa o carga mixta, o ser neutra y puede ser combinaciones de más de una molécula de soporte.

5 Ejemplos de estas moléculas de soporte incluyen polímeros naturales como péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y similares, pero pueden ser empleados también polímeros sintéticos. Las moléculas de soporte particularmente preferidas incluyen polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano no sulfatado aniónico, gelatina, ácido nucleico, mezclas de proteínas de la matriz extracelular, matrigel, anticuerpos y mezclas y derivados de los mismos.

15 Hablando de forma general, la concentración de la molécula de soporte es sustancialmente mayor que la concentración de nanopartículas de carga negativa y positiva, variando en el intervalo de 1-1000 veces mayor, 10-500 o 20-200 veces mayor. Sin embargo, son posibles cantidades mayores o menores, dependiendo del tipo de célula que se esté usando y de la molécula de soporte y nanopartículas que estén siendo usadas. Cuanto más largo sea el polímero, menos puede ser necesario formar una estructura suficiente para mantener las nanopartículas en su sitio para absorción.

20 Generalmente, las nanopartículas son usadas en concentraciones muy bajas. Las concentraciones pueden variar en el intervalo entre 10^{-12} - 10^{-6} molar, pero preferentemente están en el intervalo nanomolar y la(s) molécula(s) de soporte 10^{-9} - 10^{-3} molar y están preferentemente en el intervalo micromolar.

25 Los tres componentes se ensamblan mediante interacción electrostática y, por tanto, se prefieren moléculas de soporte con una carga o mixta como polilisina. Sin embargo, cualquiera de los tres componentes puede ser funcionalizado, derivado o revestido con el fin de favorecer adicionalmente la interacción de los componentes y/o las células. Por tanto, uno o más miembros pueden ser funcionalizados, derivados o revestidos con un anticuerpo que se una, por ejemplo, a un antígeno de la superficie celular. Así, se favorecerían adicionalmente las interacciones entre los componentes y/o las células. Otros pares de unión incluyeron receptores-ligandos, biotina-estreptavidina, ácidos nucleicos complementarios, aglutinina de germen de trigo (WGA), moléculas que contienen ácido siálico y similares.

35 Los revestimientos pueden incluir también revestimientos protectores o pasivantes, particularmente para las nanopartículas, como PVP, dextrano, BSA, PEG y similares. Las nanopartículas, especialmente las nanopartículas que comprenden el elemento magnéticamente sensible, pueden ser marcadas para una visualización, por ejemplo, con un fluoróforo, radiomarcador o similar, particularmente durante el desarrollo y el ensayo *in vitro* de células y tejidos magnetizados. Sin embargo, para usos terapéuticos, puede ser preferido omitir estos marcadores.

40 En otras realizaciones, las composiciones incluyen las células que serán levitadas o manipuladas en un campo magnético que incluyen, pero sin limitación, células madre, células cancerígenas, células primarias, células de mamíferos, células humanas, células extraídas directamente del tejido fresco, bacterias, levaduras, células vegetales o sus mezclas.

45 La presente descripción proporciona también métodos de cultivo de células, modelación de células y formación de imágenes de células en tres dimensiones, que comprenden mezclar las células con una o más de las composiciones presentemente descritas y cultivar, modelar o manipular la mezcla en presencia de un campo magnético. El campo magnético puede estar por encima o por debajo del recipiente de cultivo, más cerca o más lejos (por ejemplo, más fuerte o más débil), ser descendente o lateral, o la forma del campo se puede variar, o se pueden aplicar combinaciones de uno o más de los mismos. De esta forma, las células pueden modeladas o trasladadas para conseguir objetivos particulares.

50 Los ensayos intensivos del sistema anteriormente descrito han mostrado que hay un gran número de mejoras que están actualmente disponibles con respecto a los métodos de la técnica anterior. En primer lugar, la química de fabricación autoestructurante hace que el método sea sencillo y reproducible y no es necesaria una instalación especializada para la fabricación del ensamblaje de nanopartículas magnéticas o para la posterior magnetización, manipulación o cultivo 3D de las células. Los únicos requisitos fueron un campo magnético, pipetas, recipientes y una placa caliente. Por tanto, el método es compatible con una producción a gran escala y elevada.

60 Si se desea, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas se puede preparar exento de moléculas biológicas, como productos de fagos o células, porque las moléculas del soporte, como polilisina, se pueden preparar fácilmente por vía sintética. Aunque la totalidad de los componentes generalmente son no tóxicos, económicos y fáciles de preparar. Además, las estructuras de tipo entrelazadas fibrosas permiten la incorporación de moléculas de soporte de células adicionales (como componentes de las matrices extracelulares) para ser incluidas en los ensamblajes magnéticos de nanopartículas.

65 La magnetización de células con ensamblajes de nanopartículas magnéticas consiste solamente en añadir el ensamblaje a células en un medio de cultivo celular. Las células pueden ser magnetizadas en minutos a partir de un

tratamiento de nanopartículas magnéticas (5 minutos) y las células unidas o en suspensión pueden ser tratadas con ensamblajes de nanopartículas magnéticas. Las células pueden ser criopreservadas antes o después del tratamiento con nanopartículas magnéticas y el método sigue funcionando. Si se desea, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas puede ser escurrido de las células magnetizadas antes de su uso y las células restantes seguirán levitando.

La levitación y cultivo de células en 3D mediante levitación magnética no requiere una instalación o métodos especializados o costosos (como para agitar o mantener la flotación) más allá de los requisitos de cultivos de células 2D estándar, y el control de la forma del cultivo de células 3D magnéticamente levitadas se puede conseguir variando la forma del campo magnético. Finalmente, y quizás lo más importante, la invención favorece una rápida interacción de célula-célula (escala de segundos y minutos) con levitación de células y ensamblaje en agrupaciones multicelulares 3D en minutos, y esas estructuras de cultivos complejos se pueden preparar manipulando el campo magnético y/o poniendo en contacto magnéticamente diferentes tipos de células.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Una vista esquemática de un método de ensamblaje directo para generar ensamblajes de nanopartículas. En este diagrama, 1 es la nanopartícula con carga negativa, 3 es la nanopartícula con carga positiva y 5 es la molécula de soporte y el ensamblaje de nanopartículas magnéticas completado es 7. Los tres componentes se pueden combinar en cualquier orden, pero en este caso se muestra las nanopartículas combinadas en primer lugar y seguidamente añadidas a la molécula de soporte.

Figura 2. Una vista esquemática que muestra un ensamblaje de nanopartículas magnéticas variante 19. La nanopartícula positiva es 15, la nanopartícula negativa es 17 y 21 y 23 hacen referencia dos moléculas de soporte diferentes, por ejemplo, polilisina (carga +) y un péptido con elevado contenido de glutamato y/o aspartato (carga -) o, como otro ejemplo, laminina y fibronectina.

La figura 3 es los espectros de absorbancia de ensamblajes de nanopartículas reales compuestos por óxido de hierro magnético y nanopartículas de oro y diversa(s) molécula(s) de soporte como se recoge a la derecha.

La figura 4 muestra la formación de imágenes en campo oscuro (a) y los hiperespectros (b) de un ejemplo de nanoensamblaje FeO₂-Au-PI.

La figura 5a-d muestra imágenes de campo brillante y fluorescente bajo un aumento de 10x. a es una imagen de campo brillante con moléculas de soporte de IgG-AlexaFluor 488. b es una imagen de fluorescencia verde del mismo campo. c es la foto en campo brillante con la IgG de ratón y moléculas de soporte AlexaFluor 555 de IgG anti-ratón y d es la imagen de fluorescencia roja del mismo campo.

Figura 6a-d. Fotografías de células HEK293 levitando después de un tratamiento con ensamblajes de nanopartículas magnéticas y diferentes composiciones, que incluyen a= PI, b= COL, c= LAM y d= NT.

La figura 7 es una vista esquemática que indica el uso de células o fluido de un animal en el método de la invención

La figura 8 es una vista esquemática que muestra el uso cíclico de células o extractos de la invención que son añadidos a muestras que ya están en crecimiento.

La figura 9 muestra fotografías de varios ejemplos de manipulación de la densidad y la forma de las células usando los métodos de la invención.

La figura 10 que muestra el cambio de grosor de cultivos 3D distorsionando el campo magnético.

La figura 11 es una fotografía que muestra un ejemplo del método de la figura 10.

La figura 12 es una vista esquemática que ilustra el uso de una película magnética para células magnetizadas, en que las células no están íntimamente mezcladas con el ensamblaje de nanopartículas magnéticas si no que solamente se sitúan en su superficie.

Descripción de realizaciones de la invención

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden nanopartículas con carga negativa, nanopartículas con carga positiva y una molécula de soporte que comprende un polímero o molécula larga, o polímero o molécula con unión a un metal. Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos y no están concebidos para limitar indebidamente la invención.

65 Ejemplo 1: Ensamblajes de nanopartículas magnéticas

La figura 1 muestra un esquema general para preparar ensamblajes de nanopartículas magnéticas (7) combinando nanopartículas negativas (1) y nanopartículas positivas (3) (siendo al menos una nanopartícula de naturaleza magnética) y moléculas de soporte (5).

5 Se preparan soluciones de nanopartículas mezclando separadamente las nanopartículas en agua con un tampón de baja resistencia iónica (concentración de sales <10 mM) a un pH deseado. La carga superficial de las partículas puede ser ajustada escogiendo el pH apropiado, en que un tampón de pH bajo (como un tampón de citrato o carbonato) puede aumentar generalmente la carga global sobre las nanopartículas. Por el contrario, un tampón de pH elevado (como un tampón de borato) puede disminuir generalmente la carga global sobre las partículas. De forma ideal, el pH de elección para cada solución debe dar lugar a cargas opuestas entre las dos partículas. Esto se puede conseguir porque las nanopartículas de composición diferente tienen habitualmente puntos isoeléctricos distintos.

15 Por ejemplo, las nanopartículas de Au tienen carga negativa a la mayoría de los valores del pH, debido a menudo a la presencia de iones adsorbidos de citrato o cloruro, en contraste con las nanopartículas de óxido de hierro, que pueden variar de $\text{pH} = 3,3\text{-}8^2$, dependiendo del tipo de óxido de hierro. Por lo tanto, a pH 4, las nanopartículas de Au se espera que tengan carga negativa y las nanopartículas de óxido de hierro deben tener carga positiva. Las nanopartículas pueden ser revestidas también con moléculas, como dextrano, polietilenglicol, tioles, que pueden establecer la carga global de las nanopartículas también. Es deseable una coincidencia de carga para asegurar que el ensamblaje tiene lugar con moléculas de soporte que tengan carga positiva, negativa, mixta o neutra.

25 Las soluciones de moléculas de soporte (5) se preparan generalmente solubilizándolas o mezclándolas con agua o soluciones tamponadas (como citrato, fosfato o borato) de un pH deseado y, preferentemente, una baja resistencia iónica (preferentemente, una concentración de sales <10 mM, pero la concentración de sales debe ser superior si es necesario para asegurar la estabilización de las moléculas). Una baja resistencia iónica generalmente es deseable para reducir la selección de carga y, por lo tanto, favorecer la interacción de cargas entre nanopartículas y polímeros de cargas opuestas. Las concentraciones de moléculas de soporte (5) debe estar generalmente en exceso de la concentración de nanopartículas (intervalo de 10 nM a 1 mM, pero se pueden usar otras concentraciones), habitualmente en un exceso de 10x con relación a las concentraciones molares de nanopartículas (1) y (3).

30 Más en detalle, la molécula de soporte puede proporcionar también funcionalidad al ensamblaje, como: mejorar la adhesión de nanopartículas magnéticas a células (como polilisina); mejorar el entorno de cultivo celular (como mediante el uso de proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y laminina); hacer posible el suministro de una molécula específica (como ADN, fármacos, ligandos, marcadores, etc.) a células; proporcionar una función como reporteros de señales (como un marcador de fluorescencia) y/o mejorar la biocompatibilidad de célula/ tejido de los ensamblajes de nanopartículas magnéticas (por ejemplo, proporcionando un soporte nutritivo, o una inmunosuperficie compatible y similares).

40 La figura 2 muestra un ensamblaje de nanopartículas magnéticas (19) en el que la nanopartícula con carga negativa (17) y la nanopartícula con carga positiva (15) son mantenidas por dos moléculas de soporte (21, 23). Un ejemplo de emparejamiento de moléculas de soporte podría ser laminina y fibronectina, otro puede ser de anticuerpo y antígeno.

Se ha preparado una amplia diversidad de ensamblajes de nanopartículas magnéticas y se ha ensayado su funcionalidad con diversas células en diversos medios. La tabla 3 muestra la gama de componentes ensayados:

45

+ NP	- NP	SM	Célula
Au de 74 nm (1 pmol a 1 nmol)	Fe ₂ O ₃ de <50 nm (0,01 a 10 mg/ml)	PL 0,01-0,00001%	HEK293
Au de 50 nm (1 pmol a 10 nmol)	Ferridex (0,01 a 10 mg/ml)	FN 0,05% a 0,0001%	Células cancerígenas H4IIE (hepatocarcinoma de rata)
Au de 2 nm (1 pmol a 100 nmol)	Fe ₃ O ₄ de <5 μm (0,001 a 1 mg/ml)	LM 10 μg/ml-1 mg/ml	fibroblastos 3T3 (Pre-adipocitos)
		COL 0,1% a 0,005% y/o 0,30 μg/ml a 0,05 μg/ml	Astrocitos humanos
		SER 50% a 0,5%	Células endoteliales de válvula del corazón

Tabla 3: Materiales ensayados			
+ NP	- NP	SM	Célula
		HYA 10 mg/ml a 0,1 mg/ml	Células de músculos lisos traqueales primarias humanas
		IgG 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml	Fibroblastos pulmonares primarios humanos
		Flúor R 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml	Células epiteliales aéreas pequeñas primarias humanas
		Flúor G 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml	Células endoteliales microvasculares pulmonares primarias humanas (HPMEC)
		MG 50% a 0,5%	Epitelial mamaria humana (MCF10)
		FuGENE más DNA	Glioblastoma (LN229)
		DNA 10 /ml a 1 µg/ml	Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC)
		IgG de ratón- IgG anti-ratón-FR 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml	Células madres embrionarias de rata
			Condrocitos de múridos
			Células endoteliales de médula ósea humana (HBMEC)
			Células madre mesenquimales humanas (HMSC)
			Células extraídas de pulpa dental humana (incluidas células madre)
			Zigoto o embrión de ratón

- La figura 3 muestra los espectros de absorción de diversos ensamblajes. Las variaciones en los espectros de extinción entre soluciones diferentes son una consecuencia de niveles variables de reticulación electrostática entre las nanopartículas y las diversas moléculas de soporte. Con la excepción de los espectros para laminina (5), colágeno (7) y FuGENE-GFP (21), presentan todos un punto de inflexión amplio centrado aproximadamente a 560 nm, que resulta de la absorción característica de nanopartículas de Au. La naturaleza de los espectros planos relativos al espectro de nanopartículas de Au es el resultado de la presencia un espectro de extinción amplio de las nanopartículas de óxido de hierro polidispersadas (generalmente más pequeñas que 100 nm). Los espectros para laminina (5) y colágeno (7) son los ensamblajes de nanopartículas preparados con componentes de la matriz extracelular. Los espectros indicados como FuGENE-GFP (21) son de ensamblajes de nanopartículas preparadas con FuGENE (un liposoma) con contenido de plásmido de DNA que codifica una molécula reportera GDP. La presencia del plásmido de DNA está indicada por la presencia del punto de inflexión de UV a 260 nm (el DNA se absorbe a 260 nm) en la representación gráfica para (21).
- La figura 4 muestra la formación de imágenes de campo oscuro (a) y los hiperespectros (b) de un ejemplo de nanoensamblaje de FeO₂-Au-PI. La formación de imágenes hiperespectrales es una tecnología óptica que combina microscopía basada en campo oscuro con espectros resueltos de longitud de onda de luz dispersada (400-1.000 nm) a partir de muestra reflejada en imagen. Esta tecnología hace posible la identificación de nanomateriales basada en sus características de dispersión óptica. Se esperaría un pico de nanopartículas monodispersadas, pero en este caso, el ensanchamiento previsto de los espectros es debido a la presencia de nanopartículas de óxido de hierro y su ensamblaje. Aunque hay un ensanchamiento de los espectros, proporciona todavía suficiente resolución espectral para identificar estas muestras en un tejido. Por tanto, es un método para verificar el ensamblaje *in vitro* o *in vivo*.
- Haciendo referencia a la figura 5, una señal de fluorescencia a partir de nanoensamblajes magnéticos (a, c) preparados con conjugados de proteínas fluorescentes como la molécula de soporte (b, d). El ensamblaje de nanopartículas mostrado en las imágenes a y c fue generado usando el esquema de la figura 1A, usando nanopartículas de oro y óxido de hierro y IgG anti-ratón de asno AlexaFluor 555 e IgG de ratón de proteínas como moléculas de soporte dual. En primer lugar se mezclaron el oro y el óxido de hierro, seguidamente se añadió la proteína IgG de ratón para formar un ensamblaje de nanopartículas magnéticas. Seguidamente, en una segunda etapa separada, el ensamblaje se incubó con anticuerpo reportero de fluorescencia IgG anti-ratón de asno AlexaFluor 555. Por tanto, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas puede ser marcado y verificado en uso.

La figura 6a-d muestra fotografías de células en levitación después de un tratamiento con un ensamblaje de nanopartículas magnéticas de diferentes composiciones generadas mediante el método descrito en la figura 1. El procedimiento usado fue como sigue: se generó un ensamblaje de óxido de hierro-Au mezclando en primer lugar 6 ml de una solución de X mg/ml de una solución de nanopartículas de Au de aproximadamente de 74 nm de diámetro (generada mediante reducción de citrato, con extinción 4.1 a la longitud de onda de 548 nm) con 3 ml de una solución de nanopartículas de óxido de hierro polidispersada de 1,0 mg/ml en agua picopura. Seguidamente se añadió de forma inmediata 1,0 ml de una mezcla de óxido de hierro-Au para separar soluciones de 1,0 ml de polilisina (a 0,0001%), colágeno (30 µg/ml), laminina (a 10 µg/ml) u oligonucleótido (a 1 mg/ml), todos disueltos en agua picopura.

Después de mezclar con moléculas de soporte, las soluciones se dejaron incubar durante una noche. La fracción sobrenadante se separó usando separación magnética, impulsando el ensamblaje de nanopartículas magnéticas hacia el fondo usando un imán y la materia sobrenadante se desechó. Para separar los reactivos sin reaccionar en exceso, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas se lavó dos veces con 5 ml de agua picopura cada vez. Seguidamente, se almacenó en 5 ml de agua picopura a 4 °C.

Finalmente se pipetearon cuidadosamente 5 ml de células HEK293 (50.000 células/ml) en un tubo cónico de 15 ml con 0,5 ml del ensamblaje de nanopartículas. Esta mezcla se mezcló suavemente mediante actuación de la pipeta y se dejó incubar y sedimentar durante 5 minutos. Las células seguidamente se dejaron sedimentar durante 5 minutos en el tubo cónico y seguidamente la materia sobrenadante se separó (colocada en un tubo cónico) y se substituyó con medios de cultivo. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces más.

Como las células acopladas a los ensamblajes de nanopartículas sedimentan mucho más rápido que las nanopartículas no unidas, las nanopartículas no unidas se separaron con materia sobrenadante. Las nanopartículas no unidas pueden ser visualmente detectadas en la materia sobrenadante colocando un imán en la parte inferior del tubo cónico con la materia sobrenadante y las nanopartículas se visualizan debido a la sedimentación magnética. Después del tercer lavado, la materia sobrenadante pareció agotarse de los ensamblajes de nanopartículas magnéticas libres. Seguidamente las células fueron transferidas a platos de Petri de 3,5 cm y se hicieron levitar con un imán de neodimio de forma anular (20 x (8,5 x 4,5) x 7 mm; resistencia al desprendimiento: 58 Newtons). Todas las células se sometieron a levitación y coalescencia en un cultivo 3D con minutos de aplicación de un campo magnético, independientemente de que molécula(s) de soporte se usaron. Muchos otros materiales de soporte han sido ensayados en la presente invención y todos funcionaron, pero solo se muestran unos pocos resultados de ejemplos.

Ejemplo: Moléculas componentes

Se ha demostrado también la importancia de los diversos componentes del ensamblaje de nanopartículas magnéticas de la presente invención, ensayando nanopartículas de Fe₂O₃ solas (tamaño de partículas <50 nm), nanopartículas de Au-(Fe₂O₃) y ensamblajes de nanopartículas magnéticas completos de PI-Au-(Fe₂O₃).

Las células fueron tratadas con muestras que portaban la misma cantidad de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro o aproximadamente 1,0 µl por 5.000 células y seguidamente se tomaron microfotografías directamente después del comienzo de la levitación con un imán de 0,05 T (500 G), y también las células posteriormente fueron cultivadas mediante levitación magnética durante 7 días con un imán de 0,03 T (300 G) o un imán de 0,05 T (500 G) (datos no mostrados).

Todas las células fueron capaces de levitar en un día, sin embargo, las muestras tratadas con el PI-Au-(Fe₂O₃) mostraron estructuras 3D más grandes y más cohesivas, especialmente cuando se cultivaron con el imán de 0,05 T (500 G). Por lo tanto, la totalidad de los tres componentes son necesarios para una levitación celular eficaz y coalescencia en una estructura 3D. Aunque las nanopartículas solas mostraron un rendimiento inferior, hay todavía una utilidad en la capacidad de levitar y cultivar células que son tratadas con nanopartículas que requieren menos manipulación que las realizaciones de la figura 1.

Ejemplo: Suministro de material a células

Se ha demostrado también la capacidad de los ensamblajes de nanopartículas magnéticas para portar y suministrar materiales a células. Como un principio de prueba, fueron tratadas células HEK293 y se hicieron levitar con los ensamblajes magnéticos que portan GFP DNA y seguidamente se detectó la señal de fluorescencia de GFP dentro de las células del cultivo de células 3D levitadas.

En un detalle adicional, el procedimiento de preparación de los nanoensamblajes magnéticos que portan DNA fue el siguiente: en primer lugar, se prepararon soluciones de FuGENE según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, FuGENE HD Transfection Reagent) en las que se disolvieron 2 µg de DNA de plásmido GFP (DNA) en 200 µl de medio DMEM exento de suero.

Seguidamente se añadieron directamente 6 μ l de solución de FuGENE directamente en la solución de 200 μ l del DNA diluido (FuGENE-DNA). La mezcla se dejó sedimentar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon otras dos muestras: una con 6 μ l de FuGENE añadido directamente en 200 μ l de medio DMEM exento de suero (sin DNA, testigo negativo, denominado en la presente memoria descriptiva FuGENE) y otra con 4 μ l de DNA en 200 μ l de medio DMEM exento de suero (denominado en la presente memoria descriptiva DNA). Seguidamente se combinaron 3 ml de una relación 2:1 (v/v) de la solución de nanopartículas de Au y de óxido de hierro (1 mg/ml de óxido de hierro antes de mezclar con Au) y se mezcló a fondo y seguidamente se añadieron directamente a 100 μ l de FuGENE-DNA, 100 μ l de FuGENE y 100 μ l de DNA.

La solución se mezcló bien y se dejó incubar durante una noche a 4 $^{\circ}$ C. Después de un periodo de incubación durante una noche, las nanopartículas se sedimentaron. Se tomaron espectros de extinción de los ensamblajes de nanopartículas compuestos por nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y oro y su materia sobrenadante exenta de nanopartículas (recogida después de que sedimentaron las nanopartículas), que indicaron la incorporación del DNA y/o FuGENE a partir de la absorción UV alta. Los espectros de la materia sobrenadante mostraron una absorbancia inferior a las muestras mezcladas, indicando la incorporación de DNA y FuGENE en el ensamblaje de nanopartículas.

Los ensamblajes de nanopartículas magnéticas se añadieron a las células y las células se hicieron levitar como anteriormente y seguidamente se fotografiaron las células en levitación. La presencia de señal de fluorescencia GFP en las células de los dos sistemas que portan DNA (no mostrados) muestra la capacidad de estos ensamblajes de nanopartículas magnéticas para portar y suministrar DNA a las células mientras estaban magnetizadas y cultivar estas células en 3D mediante levitación magnética. Este resultado demuestra que el ensamblaje de nanopartículas magnéticas puede ser usado para magnetizar células y para suministrar materiales funcionales a las células, como DNA o fármacos.

Ejemplo: Levitación de células primarias

Las células primarias a menudo son difíciles de cultivar *in vitro*, pero se han demostrado células primarias satisfactoriamente cultivadas en 3D mediante levitación magnética después de que fueron magnetizadas con óxido de hierro-Au-PI.

Se prepararon diversos ensamblajes de nanopartículas magnéticas, que incluían nanopartículas de Au, PI y nanopartículas de óxido de hierro diferentes. Los diversos óxidos de hierro fueron Ferridex-PI, óxido de hierro-Au-PI (<50 nm), óxido de hierro-Au-PI (Au ~5 nm) y óxido de hierro-Au-PI (<5 μ m, un ejemplo de micropartícula). Ferridex está compuesto nanopartículas de óxido de hierro supermagnéticas revestidas con dextrano (SPIONs). El punto isoelectrónico (pI) o el pH al que una molécula o superficie particular no porta carga eléctrica para lo que sigue es: SPION, 7³⁻⁵; magnetita (γ -Fe₂O₃), 3,3-6,7² y magnetita (Fe₃O₄), 6,5-6,8².

Para los ensamblajes de nanopartículas diferentes se usaron los siguientes: 11,2 mg/ml de Ferridex I.V. (Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, MA), óxido de hierro (III) (Sigma Aldrich, 544884), tamaño de partículas <50 nm, Fe₂O₃. Este producto consiste principalmente en la forma gamma, magnetita, pero tanto la forma alfa como la forma gamma están presentes en la forma mineral de forma natural. Se usó también óxido de hierro (II, III) (Sigma Aldrich, 310069, <5 μ m, Fe₃O₄, magnetita). La totalidad de las tres muestras de hierro se diluyeron hasta soluciones de trabajo de 1 mg/ml en agua. El coloide de Au de ~5 nm se preparó según Duff *et al*⁶.

La preparación de óxido de hierro-Au-PI consistió en seis diluciones en serie de poli-L-lisina acuosa (PL con concentraciones que variaban en el intervalo de 1,00x10⁻³-3,12x10⁻⁵%, que se prepararon de forma separada. Se añadió una parte igual de una relación 1:1 (v/v) de la solución de nanopartículas de Au y óxido de hierro para cada dilución. Después de un periodo de incubación de una noche, las nanopartículas habían sedimentado en la parte inferior de cada vial y se retiró la mitad de la materia sobrenadante. Partiendo con la dilución más baja, las mezclas de diluciones en serie se combinaron y se mezclaron con la siguiente dilución más baja de una manera en serie hasta que la solución permaneció en un vial. La concentración de PL global fue de 1,24 x 10⁻³%.

La mezcla de los reactivos como muestras diluidas en serie permite que los reactivos no acoplados de las diluciones superiores tengan ocasión de ser incorporados en el ensamblaje. También, las diferentes diluciones presentan a menudo características ópticas, estructurales, adhesivas y otras físicas que son distintas; mezclando las diferentes diluciones pueden ser integradas estas propiedades. A menudo la interacción de estas propiedades puede ser deseable. Por otra parte, este procedimiento puede ser un buen diagnóstico visual para determinar y escoger las condiciones óptimas dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, una o un cierto número de diluciones podrían ser adherentes al plástico o pipetas.

Se trataron cuatro tipos de células pulmonares primarias humanas (SCIENCECELL RESEARCH LABORATORIES®, Carlsbad, CA) con ensamblajes de óxido de hierro-Au-PI y seguidamente se cultivaron en 3D. Este procedimiento consistió en cultivar estas células como monocapas hasta una confluencia de ~80% en un frasco de cultivo celular 2D. Seguidamente se añadió la solución de óxido de hierro-Au-PI al frasco de células (con concentraciones que variaban en el intervalo de 1,56-13,00 μ l/cm²) y se dejaron incubar con las células. El tiempo de incubación fue de

aproximadamente una noche (~12 horas). Las células primarias se lavaron seguidamente con PBS (con separación de óxido de hierro-Au-PI no unidos). Finalmente, las células fueron desprendidas mediante digestión con tripsina, transferidas a platos de Petri de 3,5 cm y finalmente se hicieron levitar con un imán de neodimio de forma anular 20 x (8,5 x 4,5) x 7 mm); resistencia al desprendimiento: 58 N).

5 La totalidad de los cuatro tipos de nanoensamblajes preparados con formas y tamaños diferentes de óxido de hierro se adhirieron y fueron capaces de hacer levitar fácilmente células (datos no mostrados), incluso cuando el contacto de células originales empleó células adheridas. Sin embargo, los ensamblajes preparados con óxido de hierro de mayor tamaño (<5 μm , Fe_3O_4 , magnetita) no formaron estructuras celulares tan grandes y cohesivas como las otras, indicando que hay un límite superior para el tamaño del elemento magnéticamente sensible que puede ser absorbido por las células. En este caso, es probable que las agrupaciones celulares más pequeñas den lugar a la presencia de partículas de óxido de hierro más grandes que no entran fácilmente en las células, por lo tanto, las células están menos magnetizadas y este tamaño de partículas mayor puede revestir también la superficie celular y obstaculizar o impedir la interacción de célula-célula.

15 Ejemplo: Levitación de células *ex vivo*

Haciendo referencia a la figura 7, cualesquiera células tomadas de animales o seres humanos (41) que incluyen, pero sin limitación, células de sangre, suero, plasma o tejidos disgregados (43), se mezclan con nanopartículas (45) y seguidamente se incuban conjuntamente durante 30 segundos a 48 horas. Durante la incubación, la muestra (43) y las nanopartículas (43) interactúan electrostáticamente de forma conjunta con cualesquiera proteínas, DNA o polisacáridos que puedan estar contenidos en la misma para formar el ensamblaje de nanopartículas (47). Seguidamente, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas (47) se separa mediante una fuerza magnética, centrifugación y/o sedimentación, con lo que la materia sobrenadante se separa de la mezcla y se usa un imán para manipular las células magnetizadas restantes.

Haciendo referencia todavía a la fig 7, el ensamblaje de nanopartículas es generado a partir de la interacción entre las proteínas, DNA o polisacárido presentes en la sangre u otra muestra (43). Los tipos de interacciones pueden incluir, pero sin limitación, interacciones de naturaleza electrostática, covalente (grupos funcionales tiol y/o otros reticuladores), de corto alcance y/o hidrófobas (habitualmente a través de una molécula conectora) de naturaleza específica y no específica. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas se pueden hacer posible y/o controlar mediante la manipulación del pH, cuando las proteínas de puntos isoelectrónicos diferentes interactúan con sus cargas de superficies de nanopartículas correspondientes.

35 Además, se pueden añadir moléculas de soporte adicionales al ensamblaje para soportar el crecimiento celular o conectar adicionalmente los diversos componentes del ensamblaje. Este tipo de conexión se puede conseguir modificando la muestra original (43) o el ensamblaje de nanopartículas magnéticas (47) con anticuerpos u otras moléculas (por ejemplo, etiquetas de péptidos o proteínas), de forma que las moléculas son enriquecidas/capturadas en el ensamblaje.

40 La realización descrita en la presente memoria descriptiva puede ser de utilidad para preparar ensamblajes de nanopartículas con proteínas nativas para reducir cualquier respuesta inmune cuando las células finales van a ser usadas terapéuticamente. Esto podría ser significativo cuando se maneja el cultivo de células para procedimientos celulares autólogos, ya que el suero, sangre u otros tejidos o fluidos corporales podrían ser usados para preparar los ensamblajes de nanopartículas para enmascarar corporales extraños.

45 Ejemplo: Células magnetizadas congeladas

Se ha mostrado en la presente memoria descriptiva que las células pueden ser congeladas cuando están magnetizadas y ser posteriormente descongeladas y usadas para cultivos 3D. Las células se mezclan con el ensamblaje de nanopartículas magnéticas para los procedimientos anteriores. El ensamblaje de nanopartículas magnéticas en exceso es seguidamente separado y las células son lavadas y criopreservadas según técnicas estándares. Posteriormente son descongeladas y cultivadas en un sistema de cultivo 3D. Esto es muy conveniente, ya que permite preparar y comercializar células magnetizadas para ser usadas en investigación y aplicaciones terapéuticas.

Se usó el siguiente procedimiento. En un matraz se hicieron crecer de células de riñón embrionarias humanas T-25 (HEK293) (ATCC CRL-1573) hasta una confluencia de 80% y se trataron con 200 μl de óxido de hierro-Au-PI. Después de un periodo de incubación de ~12 horas, las células se lavaron con PBS (separación de óxido de hierro-Au-PI no unido), se tripsinizaron, si dividieron en dos viales, se colocaron en medio que contenía DMSO y seguidamente se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Al siguiente día fueron transferidas a un termo de nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

65 Ochenta y un días después, se descongeló un vial en un baño de agua a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos. Después de volver a poner en suspensión en vial en 7,5 ml de medio, las células se dividieron entre tres platos de Petri de 35 mm de diámetro y se colocaron imanes de 0,1 T (1.000 G) en la parte superior de cada plato. Las células se

recuperaron de la crioconservación y se cultivaron durante días en 3D mediante levitación magnética. Fue posible hacer crecer satisfactoriamente cultivos 3D levitando estas células. Este procedimiento se realizó también satisfactoriamente con células de músculos lisos primarias, células de fibroblastos primarias, células glioblastoma (LN299) y hepatoma (células cancerígenas H4IIE, hepatocarcinoma). Por tanto, las células magnetizadas se pueden preparar por adelantado para un uso posterior.

Ejemplo: Tratamiento cíclico

Se pueden realizar también múltiples tandas de levitaciones celulares, añadiendo células o extractos celulares a cultivos 3D existentes. De esta forma, los cultivos pueden ser enriquecidos en diversas células o productos celulares a medida que se hace crecer el cultivo 3D.

En la figura 8, se añadieron células (51) a un ensamblaje de nanopartículas magnéticas (53) y las células y el ensamblaje de nanopartículas magnéticas se incubaron conjuntamente (55) para permitir que las células se magnetizaran. Seguidamente, las células magnetizadas se hicieron levitar (59) usando un imán (61). Posteriormente, las células se hacen levitar durante 4 horas, por la noche, o días (dependiendo del tipo de célula), las células se retiran de la levitación, se repone medio con agua picopura (73) y las células son lisadas mediante una acción de congelación-descongelación (75) (las células se colocaron en nitrógeno líquido durante al menos 10 minutos). Alternativamente, las células pueden ser impulsadas al fondo del plato de cultivo (65) usando un imán (61) y esta etapa puede ser repetida 1 a 4 veces. Seguidamente las células (67) o el extracto celular (69) de células diferentes (71) puede ser nuevamente alimentado a otra muestra y continuar con el procedimiento de cultivo 3D. Las fotografías no se muestran, pero estos procedimientos han demostrado ser satisfactorios.

Ejemplo: Cultivos conformados

Se ha demostrado también que la forma del cultivo celular 3D se puede variar modificando el campo magnético. El uso de un imán potente que impulse las células al fondo del plato crea una lámina bien formada, bastante densa, de células (no mostradas). Esto se puede hacer seguidamente levitar invirtiendo el campo magnético. Se han creado también cultivos 3D que son más gruesos por un lado haciendo oscilar el imán. Se crearon cultivos en forma de rosco mediante el uso de imanes toroidales.

La figura 9a-e, por ejemplo, muestra unos pocos ejemplos de cultivos celulares en los que las células pueden ser comprimidas más o menos variando la resistencia del campo magnético o la distancia del imán desde el plato y en los que la forma toroidal se consigue usando un imán anular. Las figuras 10 y 11 muestran un cultivo 3D hecho más grueso en un lado haciendo oscilar el campo magnético.

Se ha previsto también que se pueden apilar estos cultivos celulares en forma de rosco o laminares, creando ocasionalmente estructuras más complejas. Por ejemplo, se puede crear una estructura de tipo tubular apilando discos. Se puede crear un compartimento apilando discos y seguidamente disponer en capas láminas en uno o los extremos y el compartimento se podría rellenar con el mismo tipo de célula o diferente. De este modo, se puede realizar una ingeniería de tejidos más compleja.

También se pueden desplazar las células usando el campo magnético y ese movimiento puede afectar a las propiedades y la composición del cultivo 3D. Cuando las células son sembradas con el hidrogel (ensamblaje de nanopartículas magnéticas aka), el movimiento vertical y/o horizontal de los campos magnéticos, mediante el movimiento de imanes permanentes o variando los campos magnéticos generados a partir de electroimanes, evita que las células se unan directamente a la placa de cultivo celular. La frecuencia de este movimiento puede variar, por ejemplo, de 1 Hz (60 veces por minuto) hasta 0,001 Hz. Además, los diferentes tipos de células podrían interaccionar de forma muy diferente con un gel en movimiento. Combinando movimientos verticales y/o horizontales, la rigidez del material en movimiento podría establecer adicionalmente el tipo de células que se adherirían de forma diferencial al gel en movimiento. Una variación de esta propuesta se podría conseguir también aplicando un movimiento oscilante al imán. Este método es una alternativa útil para preparar, separar y clasificar células para una manipulación magnética que incluye, pero sin limitación, un cultivo celular 3D mediante levitación magnética.

Ejemplo: Contacto superficial

En las realizaciones anteriores se mezcló un ensamblaje de nanopartículas magnéticas con las células, proporcionando así una mezcla íntima de los componentes. Sin embargo, se ha mostrado también que esto no es necesario y que tan solo con que el ensamblaje de nanopartículas magnéticas y las células sean adyacentes, las células absorberán las nanopartículas magnéticas. Esto es ventajoso cuando sea necesario que las células estén exentas de materiales del ensamblado de nanopartículas magnéticas.

La figura 12 ilustra el método en el que el ensamblaje de nanopartículas magnéticas (200) es expuesto a un campo magnético. Esto tiene el efecto de concentrar o comprimir el ensamblaje de nanopartículas magnéticas en forma de una película magnética más densa. Se pueden añadir células (400) por encima de la película y sedimentarán de

forma natural por gravedad sobre la película y su proximidad a la película permitirá que las células se magneticen. Seguidamente las células fácilmente se pueden hacer levitar y ser separadas de la película, nuevamente levitadas y sometidas a crecimiento en un cultivo 3D. Se ha ensayado este concepto con una amplia diversidad de moléculas de soporte y se demostró que funciona.

- 5 Se citan las siguientes referencias:
- (1) Shimizu, K.; Ito, A.; Arinobe, M.; Murase, Y.; Iwata, Y.; Narita, Y.; Kagami, H.; Ueda, M.; Honda, H. J. Biosci. Bioeng. 2007, 103, 472-8.
- 10 (2) Kosmulski, M.; Marcel Dekker: Chemical Properties of Material Surfaces: New York, 2001.
- (3) Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M. J. Iran. Chem. Soc. 2010, 7, S1-S27.
- 15 (4) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. J. Magn. Magn. Mater. 1990, 85, 27-32.
- (5) Douziech-Eyrolles, L.; Marchais, H.; Herve, K.; Munnier, E.; Souce, M.; Linassier, C.; Dubois, P.; Chourpa, I. Int. J. Nanomed. 2007, 2, 541-550.
- 20 (6) Duff, D. G.; Baiker, A.; Edwards, P. P. Langmuir 1993, 9, 2301-2309.
- US 2005054101, WO 2005010162
- US 2009137018, WO 2005003332
- 25 US 2006063252, WO 2004083412, WO 2004083416
- WO 2010036957

REIVINDICACIONES

1. Una composición (7) para magnetizar células, comprendiendo dicha composición:
- 5 a) una nanopartícula de carga negativa (1);
- b) una nanopartícula de carga positiva (3); y
- 10 c) una molécula de soporte (5), en la que la nanopartícula de carga positiva (3) es un elemento magnéticamente sensible y en que dicha molécula de soporte (5) mantiene dicha nanopartícula de carga negativa (1) y dicha nanopartícula de carga positiva (3) en una mezcla íntima que forma una estructura de tipo entrelazada fibrosa, caracterizada porque la nanopartícula de carga negativa (1) es una nanopartícula de oro.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha nanopartícula de carga positiva (3) es una nanopartícula de óxido de hierro.
- 20 3. La composición de la reivindicación 1, en la que la molécula de soporte (5) comprende péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros o sus combinaciones; y/o en la que la molécula de soporte (5) comprende polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano no sulfatado aniónico, gelatina, ácido nucleico, proteínas de la matriz extracelular, extracto celular, anticuerpos o mezclas o derivados de los mismos.
- 25 4. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas células se obtienen a partir de tejido o fluidos de animales y dicha molécula de soporte (5) es proporcionada mediante dichos tejidos o fluidos.
- 30 5. La composición de la reivindicación 1,
- a) en la que la molécula de soporte (5) comprende péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros, polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano no sulfatado aniónico, gelatina, ácido nucleico, mezclas de proteínas de la matriz extracelular, anticuerpos o mezclas o derivados de los mismos, y
- 35 b) en la que dicha nanopartícula de carga positiva (3) es una nanopartícula de óxido de hierro.
6. Una composición que comprende células magnetizadas que se preparan mediante incubación con la composición de la reivindicación 1, en la que dichas células están congeladas.
- 40 7. Un método para desplazar células, que comprende poner en contacto las células con la composición de la reivindicación 1 e incubar durante 1-12 horas hasta que las células resulten magnetizadas y someter dichas células magnetizadas a un campo magnético suficiente para desplazar dichas células.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho campo magnético es asimétrico y/o en el que dichas células están en suspensión o adheridas.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente lavar dichas células para separar dicha composición antes de someter dichas células magnetizadas a un campo magnético suficiente para desplazar dichas células.

Figura 1

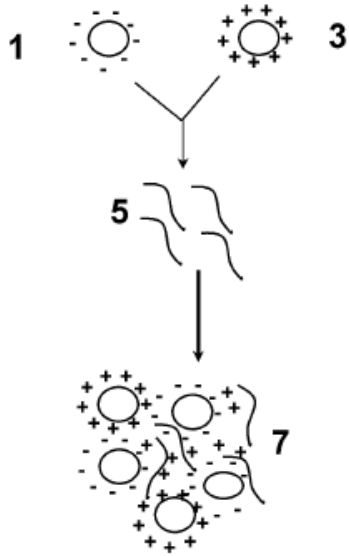


Figura 2

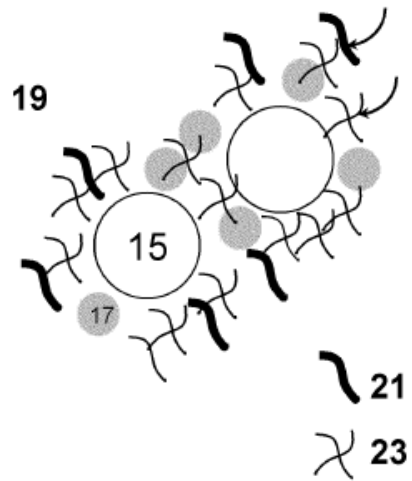


Figura 3

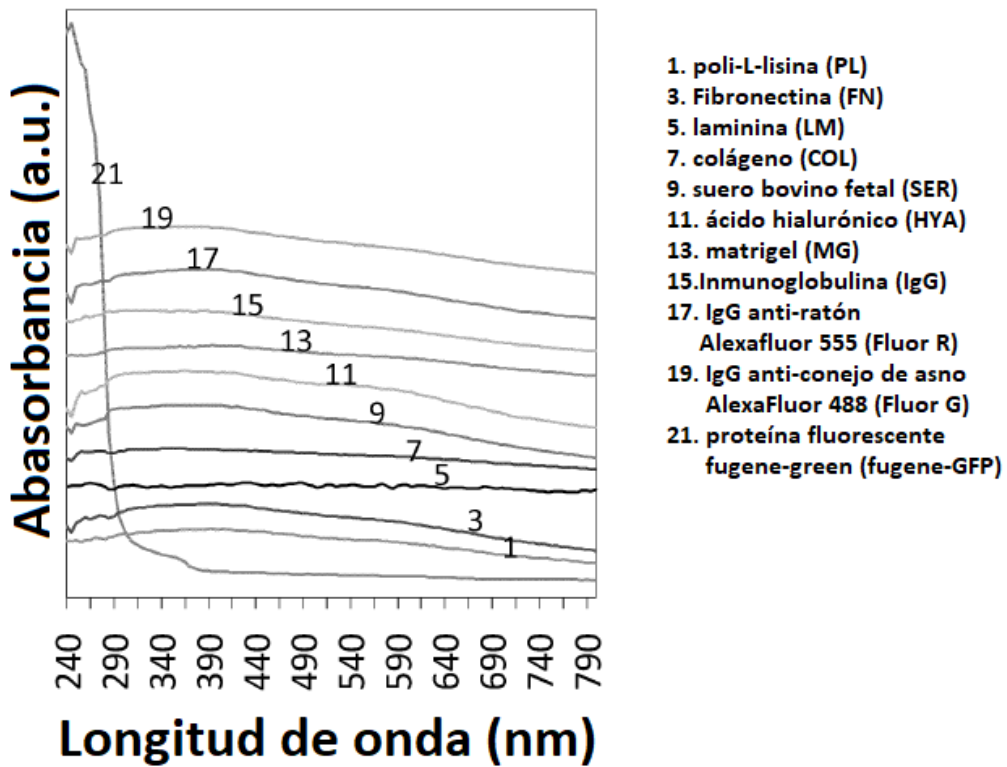


Figura 4a-b

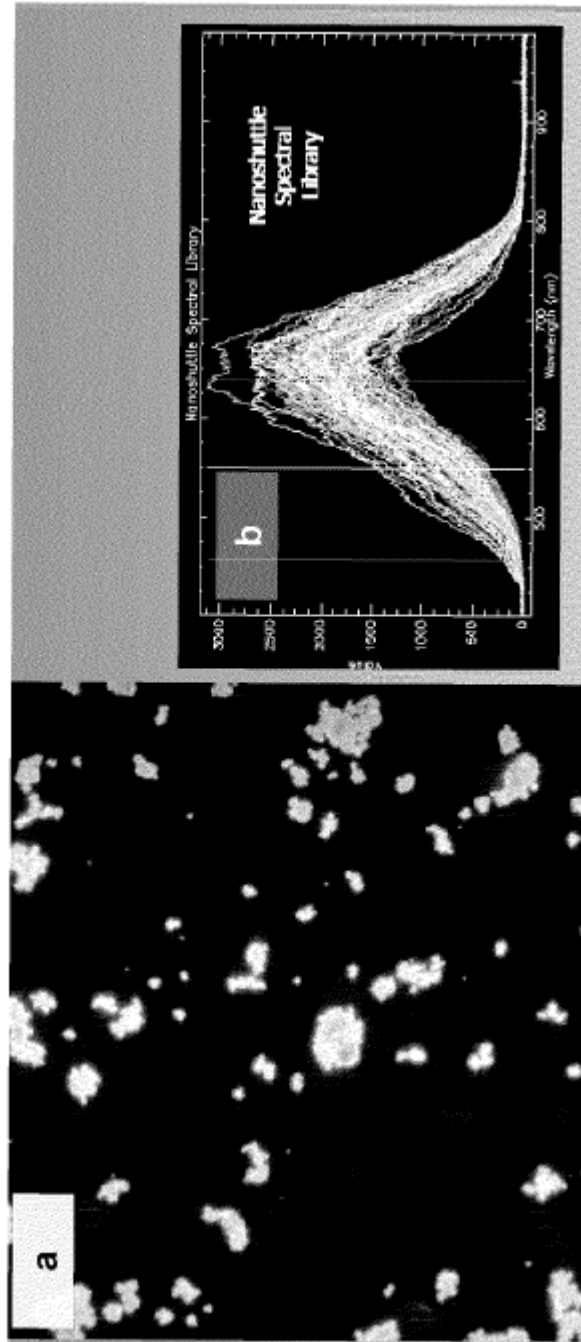


Figura 5a-d

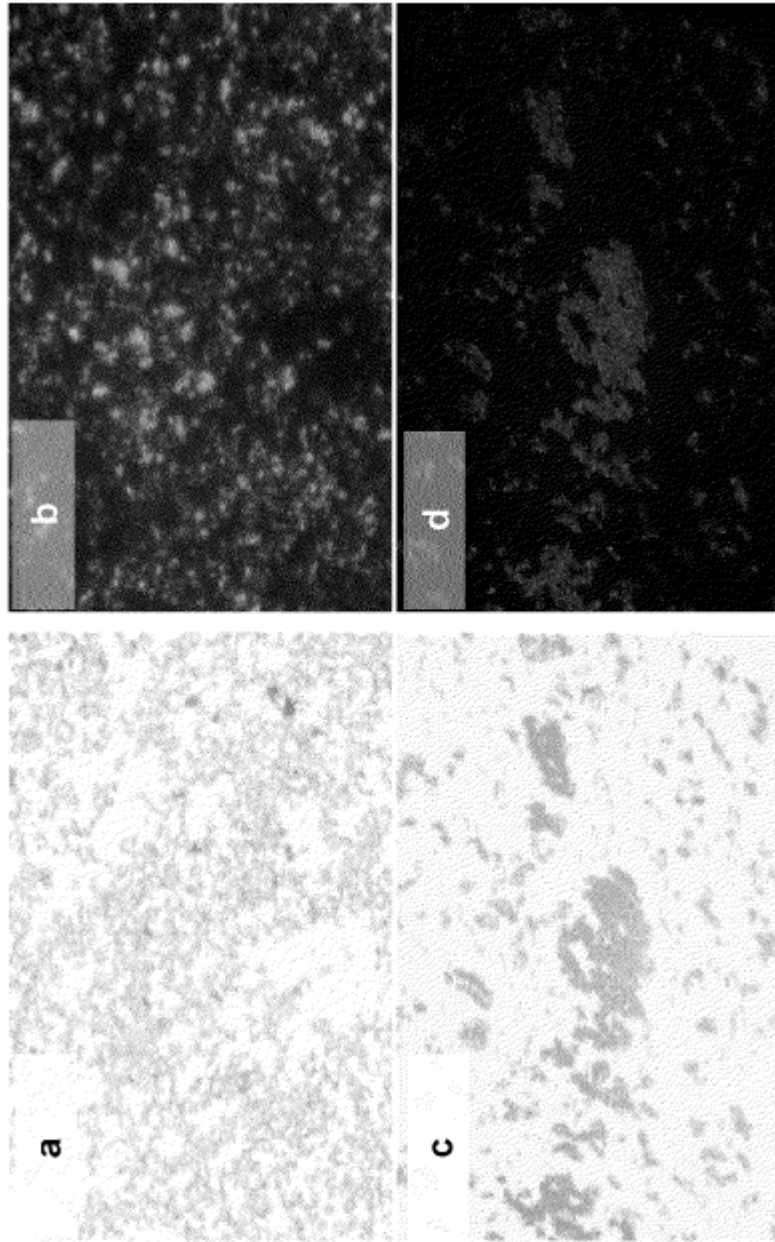


Figura 6a-d

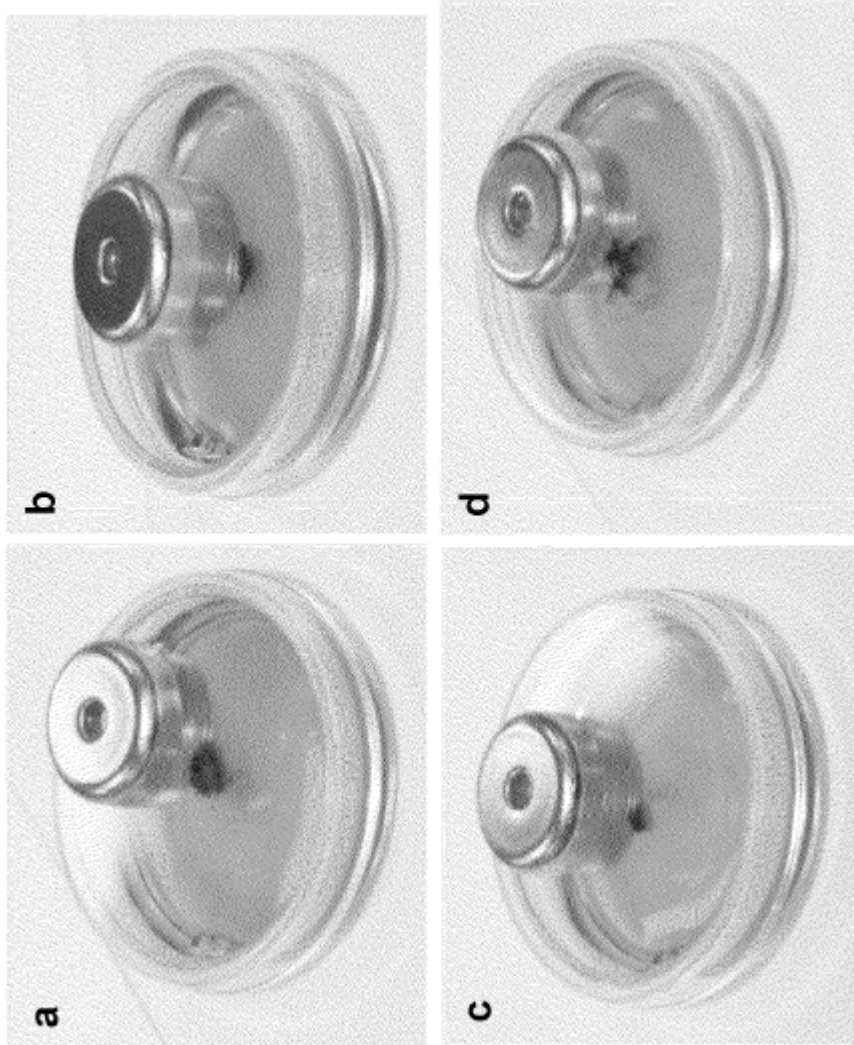


Figura 7

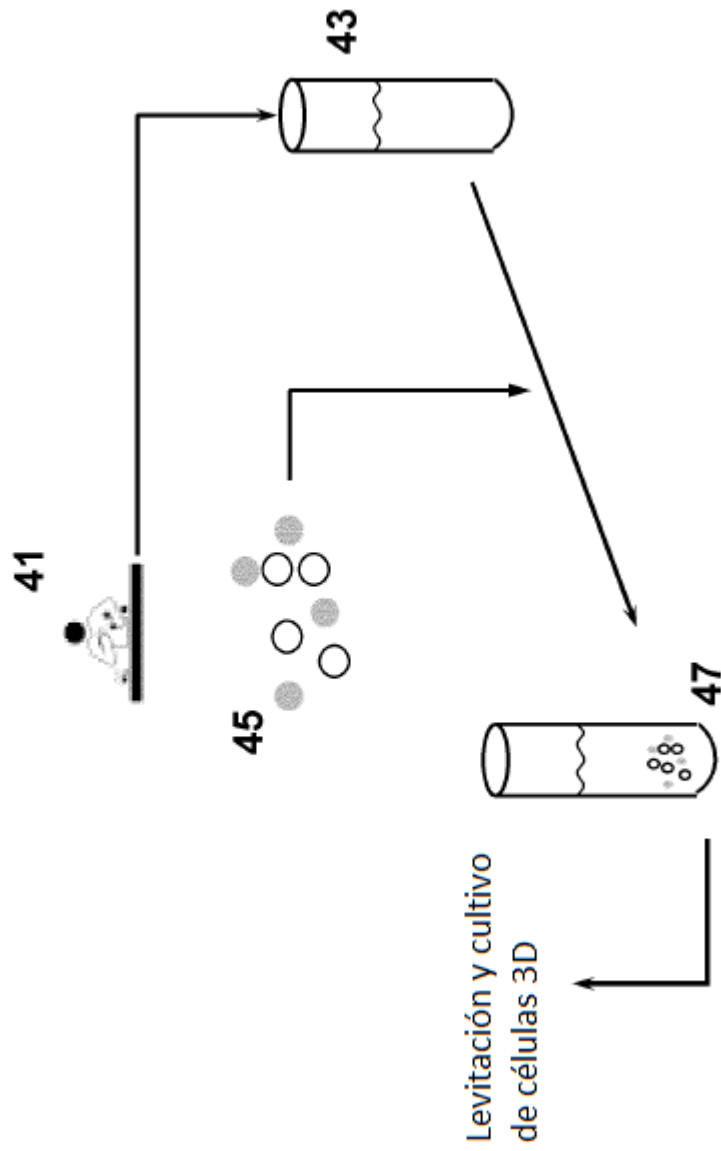


Figura 8

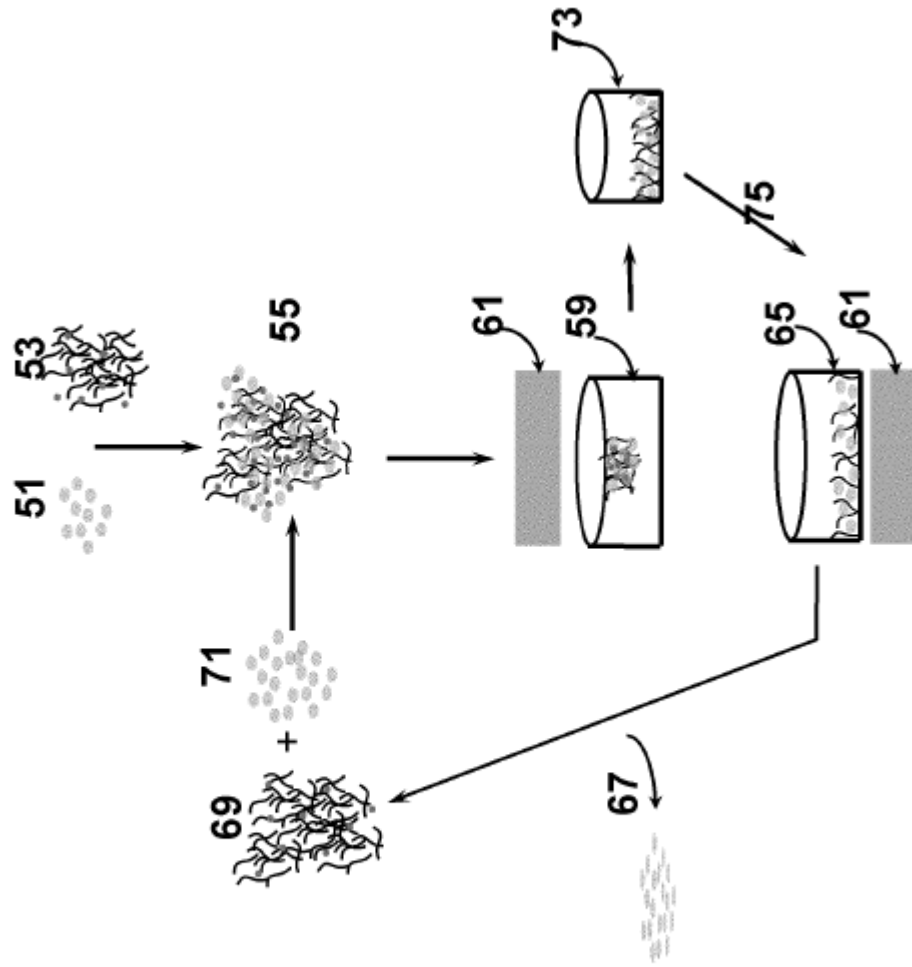
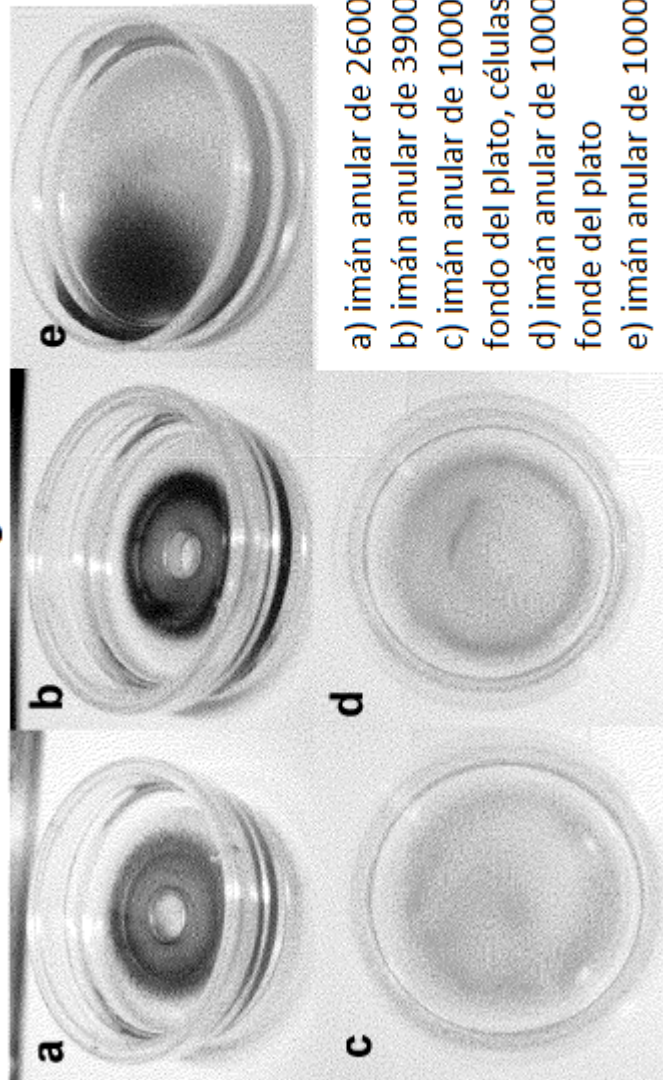


Figura 9a-e



- a) imán anular de 2600 G bajo el plato
- b) imán anular de 3900 G bajo el plato
- c) imán anular de 1000 G a 8 mm del fondo del plato, células más difusas
- d) imán anular de 1000 G a 5 mm del fonde del plato
- e) imán anular de 1000 G inclinado $\sim 30^\circ$ bajo el plato, células más gruesas en un lado

Figure 10

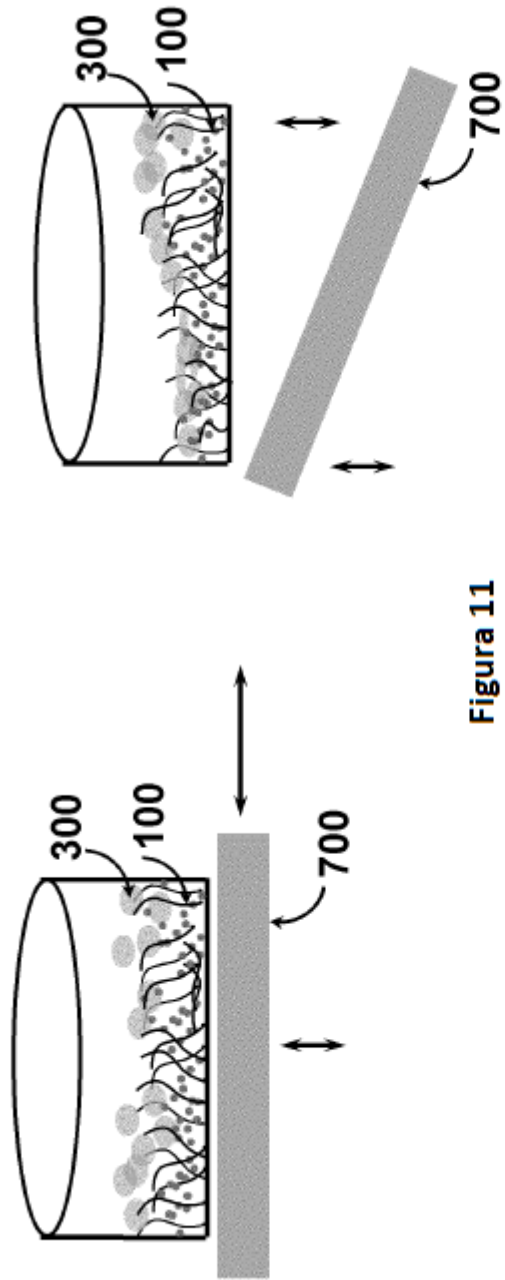


Figure 11



Figura 12

