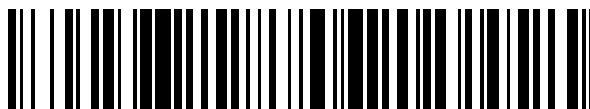


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 852**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2009** **PCT/US2009/058473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010** **WO10036957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009** **E 09816948 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2342338**

54 Título: **Sistemas y métodos para el guiado magnético y diseño (patterning) de células y materiales**

30 Prioridad:

25.09.2008 US 99966 P

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

05.04.2019

73 Titular/es:

THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)

201 West 7th Street

Austin, TX 78701, US y

WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

SOUZA, GLAUCO, R.;

PASQUALINI, RENATA;

ARAP, WADIH;

KILLIAN, THOMAS, CHARLES;

RAPHAEL, ROBERT, M. y

STARK, DANIEL, JOSHUA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 707 852 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

Sistemas y métodos para el guiado magnético y diseño (*patterning*) de células y materiales

5 Definiciones

“Patrón”, como se usa en el presente documento, se refiere a una forma predefinida, posición, localización y/u orientación, en o bien dos o tres dimensiones.

10 “Manipular”, como se usa en el presente documento, se refiere a variar un patrón con el tiempo.

“Nanopartículas”, como se usa en el presente documento, se refiere a partículas con rangos de tamaño de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 nm.

15 “Agregación”, como se usa en el presente documento, se refiere a una agrupación de una o más células y cualquier matriz extracelular u otra sustancia que tenga tendencia a permanecer en proximidad cercana a la agrupación.

“Nanopartículas magnéticas”, como se usa en el presente documento, se refiere a nanopartículas en las que la magnetización de saturación es al menos aproximadamente 0,001 emu/g; en algunas realizaciones, la magnetización de saturación puede ser entre aproximadamente 10 a 200 emu/g.

25 “Hidrogel”, como se usa en el presente documento, se refiere a un material formado incorporando cualquier tipo de bacteriófago (también referido como “fago”) con nanopartículas. Se pueden indicar diferentes variedades de hidrogeles con diferentes niveles de especificidad. Au-fago puede ser la forma más general, en referencia a cualquier tipo de fago y cualquier combinación de nanopartículas, al menos un tipo de las cuales es de Au. Au-X-fago especifica que la nanopartícula descrita por X también está presente. También se pueden especificar variedades de fago específicas.

30 “Au-MIO-fago”, como se usa en el presente documento, se refiere a un material formado incorporando cualquier tipo de bacteriófago con nanopartículas, de las cuales al menos un tipo es de Au y de las cuales un tipo es magnética.

“Cultivo celular”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente al crecimiento de células en un ambiente controlado. En muchos ejemplos, el ambiente controlado es un ambiente de laboratorio artificial, algunas veces referido como ambiente *in vitro*.

35 Como se usa en el presente documento, el término “alterado en respuesta al campo magnético” y sus derivados incluyen cualquier respuesta de los sistemas de la presente descripción al campo magnético, incluyendo, pero no limitado a, cambios en forma, tamaño, posición, ambiente químico, orientación de moléculas y/o células, así como sucesos celulares (en sistemas y métodos de la presente descripción en la que los sistemas y los métodos comprenden una o más células) tales como, pero no limitados a, expresión génica, transducción de señal, cambios en la forma, posición, orientación, y/o ambiente químico local de las células. Otras respuestas de los sistemas de la presente descripción a campos magnéticos pueden ser reconocidas por un experto en la técnica. Tales respuestas se consideran que están dentro del espíritu de la presente descripción.

45 Si hay algún conflicto en la utilización de una palabra o término en esta memoria y una o más patentes u otros documentos las definiciones que son coherentes con esta memoria se deberían adoptar con fines de entendimiento de esta descripción.

Antecedentes

50 La presente descripción se refiere generalmente a sistemas y métodos útiles en la medicina, biología celular, nanotecnología, y cultivo celular. En particular, la presente descripción se refiere a sistemas y métodos para el guiado magnético y el diseño de células y materiales. Algunas aplicaciones específicas de estos sistemas y métodos son cultivo de células por levitación lejos de una superficie, produciendo y manipulando patrones de células levitadas, y cultivo de células modelado sobre una superficie.

60 Puesto que ha crecido el interés en la nanotecnología, materiales, y biología celular, ha llegado a ser evidente que una limitación es la capacidad de controlar y manipular el patrón de células y materiales que son útiles para la biología celular y la medicina (tal como el cultivo celular, la modificación por ingeniería de tejido, investigación de célula madre, administración de fármaco y nanopartícula, biosensores y administración génica), componentes moleculares y bioelectrónicos, y la construcción de materiales complejos.

65 Durante el desarrollo de los organismos vivos, la estructura y el orden en la forma de los patrones emergen naturalmente a través de mecanismos que aún no están completamente entendidos. Si uno quiere estudiar o replicar el tejido vivo en un ambiente artificial, es crítico ser capaz de reproducir patrones naturales. La capacidad de modificar por ingeniería y controlar manualmente los patrones de células vivas, especialmente en tres dimensiones y

sobre superficies, posibilitará muchas aplicaciones por bioingeniería y médicas.

El cultivo celular es una herramienta esencial en muchas áreas de la biotecnología, tal como la investigación de la célula madre, modificación por ingeniería de tejido, y descubrimiento de fármaco. El cultivo celular tradicional en placas Petri produce crecimiento celular bidimensional (2D) con expresión génica, señalización, y morfología que pueden diferir de las condiciones en los organismos vivos, y por tanto comprender relevancia clínica. Ciertas limitaciones del cultivo celular tradicional en la recapitulación de los atributos de los tejidos en organismos vivos pueden resultar de su naturaleza 2D. Lin y Chang, 2008, *Biotechnol. J.*, 3:1.172-1.184 revisaron el entendimiento de los mecanismos de formación de esferoide multicelular, sus aplicaciones biomédicas y las ventajas en técnicas de cultivo de esferoide, manipulación y análisis. Aunque se han desarrollado los ambientes de gel basado en proteína o biorreactores rotativos en intentos de permitir el cultivo celular tridimensional (3D), la amplia aplicación de tales métodos se ha dificultado gravemente por el alto coste o la complejidad. Por tanto, una tecnología de plataforma para permitir el cultivo celular 3D es aún una necesidad insatisfecha.

En muchos casos, un ambiente de cultivo celular ideal es uno que promueve rápido y fuerte crecimiento de células sanas, en el que la morfología celular y la función están dominadas por interacciones célula-célula, señalización específica a célula, y/o variables de control experimental, distintas de las propiedades del medio de cultivo artificial. Con frecuencia, es deseable cultivar células que se parezcan en básicamente todos los sentidos a las células crecidas en organismos vivos, incluyendo expresión génica, características funcionales de células diferenciadas, y la formación de una matriz extracelular. El coste y la escalabilidad de la producción son también consideraciones críticas en cuanto a la aplicación de tales tecnologías.

Además, ya que el uso de materiales de nano tamaño y células cultivadas continúa desarrollándose, es cada vez más difícil desarrollar sistemas para manipular de forma segura y manejar estas entidades. Por ejemplo, las agencias reguladoras y las buenas prácticas de laboratorio con frecuencia intentan minimizar la cantidad de la exposición de materiales a objetos externos, para minimizar la contaminación. A parte de tales prácticas, la integridad de tales materiales puede estar comprometida por tal exposición. Por tanto, pueden ser deseables dispositivos que puedan manipular materiales de nano tamaño y células y tejido sin exposición a objetos externos.

Ito y col., 2004, *Tissue Engineering*, 10(5/6):873-879 publicaron una técnica que usa fuerzas magnéticas para construir y recoger una lámina de queratinocito multicapaada. Se sembraron queratinocitos magnéticamente marcados en pocillos, sobre una capa de hidrogel de una placa de unión ultrabaja, y un imán colocado bajo los pocillos. Se formaron láminas epidérmicas de 10 capas, y cuando el imán se eliminó, las láminas se separaron del fondo de la placa y se pudieron recoger con un imán.

Lin y col., 2008, *Tissue Engineering*, 14(3):197-205 D1 describe la levitación de esferoides marcados magnéticamente. Los esferoides se forman o bien con el método de gota colgante o en matraces de agitación. Las características y ventajas de la presente descripción serán fácilmente aparentes a los expertos en la técnica tras una lectura de la descripción que sigue.

Compendio

La presente invención proporciona un método que comprende: proporcionar un campo magnético; proporcionar una primera pluralidad de células que comprende una o más nanopartículas magnéticas dentro de dichas células; y levitación de al menos algunas de la primera pluralidad de células en el campo magnético durante un tiempo suficiente para permitir que al menos algunas de la primera pluralidad de células formen una agregación celular 3D.

La presente invención también proporciona un método de cultivo celular 3D que comprende: mezclar células con un hidrogel que comprende nanopartículas magnéticas; incubar la mezcla hasta que las células capten las nanopartículas magnéticas; levitación de las células en un campo magnético y cultivar las células levitadas para obtener una levitación del cultivo celular 3D.

La presente descripción se refiere generalmente a sistemas y métodos útiles en medicina, biología celular, nanotecnología, y cultivo celular. En particular, la presente descripción se refiere a sistemas y métodos para el guiado magnético y el diseño de células y materiales. Algunas aplicaciones específicas de estos sistemas y métodos pueden ser cultivo por levitación de células lejos de una superficie, realización y manipulación de patrones de células levitadas, y diseño de cultivo de células sobre una superficie.

La presente descripción proporciona un método para levitación de una pluralidad de células. El método puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender levitación de al menos algunas de la pluralidad de células en el campo magnético, en el que la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas.

La presente descripción también proporciona un método de cultivo de células. El método puede comprender proporcionar una pluralidad de células. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender levitación de al menos algunas de la pluralidad de células en el campo

magnético, en el que la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender mantener la levitación durante un tiempo suficiente para permitir el crecimiento celular para formar una agregación.

5 La presente descripción también proporciona un método de manipulación de células. El método puede comprender proporcionar una primera pluralidad de células. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender levitación de al menos algunas de la primera pluralidad de células en el campo magnético, en el que la primera pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender variar el campo magnético con el tiempo para manipular al menos una primera porción de la primera pluralidad de células.

10 La presente descripción también proporciona un método de preparación de nanopartículas. El método puede comprender proporcionar un hidrogel que comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender someter el hidrogel al campo magnético.

15 La presente descripción también proporciona un sistema para levitación de una pluralidad de células. El sistema puede comprender un campo magnético. El sistema también puede comprender la pluralidad de células, en el que la pluralidad de células se dispone en el campo magnético, y la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas.

Los rasgos y ventajas de la presente descripción serán aparentes a los expertos en la técnica. Aunque los expertos en la técnica puedan realizar numerosos cambios, tales cambios están dentro del espíritu de la descripción.

25 Dibujos

Algunos ejemplos específicos de la descripción se pueden entender haciendo referencia, en parte, a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos.

30 La Figura 1 ilustra un ejemplo de hidrogel de Au-MIO-fago, según la descripción.
 La Figura 2 ilustra el desplazamiento magnético de Au-MIO-fago, según la descripción.
 La Figura 3 ilustra el cultivo celular por levitación basada en magnetismo con unión celular inicial, según la descripción.
 La Figura 4 ilustra el cultivo celular por levitación basada en magnetismo en ausencia de unión celular, según la descripción.
 35 La Figura 5 ilustra una agregación magnéticamente levitada, según la descripción.
 La Figura 6 ilustra células madre neurales (NSC) murinas diferenciadas magnéticamente levitadas, según la descripción.
 La Figura 7 ilustra astrocitos humanos magnéticamente levitados, según la descripción.
 40 La Figura 8 ilustra agregaciones de glioblastoma magnéticamente levitadas, según la descripción.
 La Figura 9 ilustra células de melanoma magnéticamente levitadas, según la descripción.
 La Figura 10 ilustra imágenes por microscopio electrónico de transmisión (MET) de células de glioblastoma humano cultivadas con levitación magnética, según la descripción.
 La Figura 11 ilustra imágenes por un microscopio electrónico de barrido (MEB) que muestran cultivo levitado de estructuras 3D, según la descripción.
 45 La Figura 12 ilustra una comparación de agregaciones de células creadas con levitación magnética con una agregación 2D y un xenoinjerto de ratón, según la descripción.
 La Figura 13 ilustra la manipulación de células durante el cultivo celular, incluyendo control de forma y posición, co-cultivo, y ensayo de confrontación, según la descripción.
 50 La Figura 14 ilustra un ejemplo de diseño celular sobre una superficie, según la descripción.
 La Figura 15 ilustra un ejemplo de diseño celular sobre una superficie, según la descripción.
 La Figura 16 ilustra patrones litográficos muestra para realizar patrones superficiales de células, según la descripción.
 La Figura 17 ilustra cálculos de fuerza magnética de muestra, aplicables a la descripción.
 55 La Figura 18 ilustra construcción de microdispositivo prototipo para alambres litográficamente modelados, según la descripción.
 La Figura 19 ilustra una instalación de microscopio y dispositivo de microchip útiles en la descripción.
 La Figura 20 ilustra la manipulación y el diseño de superficie de células madre neurales con microdispositivo de diseño, según la descripción.
 60 La Figura 21 ilustra la manipulación y el diseño de material Au-MIO-fago sin células, según la descripción.
 La Figura 22 ilustra un gradiente de Au-MIO-fago, según la descripción.
 La Figura 23 ilustra el diseño celular dirigido a receptor que usa diseño por campo magnético de hidrogeles, según la descripción.
 La Figura 24 ilustra la transducción génica guiada por magnetismo usando Au-MIO-AAVP, según la descripción.

65

El fichero de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color se proporcionarán por la Oficina tras el requerimiento y el pago de las tasas necesarias.

- 5 Aunque la presente descripción es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, se han mostrado ejemplos específicos en las figuras y están descritos en el presente documento a más detalle.

Descripción

- 10 La presente invención proporciona un método que comprende: proporcionar un campo magnético; proporcionar una primera pluralidad de células que comprende una o más nanopartículas magnéticas dentro de dichas células; y levitación de al menos algunas de la primera pluralidad de células en el campo magnético durante un tiempo suficiente para permitir que al menos algunas de la primera pluralidad de células formen una agregación celular 3D.

- 15 La presente invención también proporciona un método de cultivo celular 3D que comprende: mezclar células con un hidrogel que comprende nanopartículas magnéticas; incubar la mezcla hasta que las células capten las nanopartículas magnéticas; levitación de las células en un campo magnético y cultivar las células levitadas para obtener un cultivo celular 3D por levitación.

- 20 La presente descripción se refiere generalmente a sistemas y métodos útiles en medicina, biología celular, nanotecnología, y cultivo celular. En particular, la presente descripción se refiere a sistemas y métodos para el guiado magnético y el diseño de células y materiales. Algunas aplicaciones específicas de estos sistemas y métodos pueden ser cultivo de células por levitación lejos de una superficie, realizando y manipulando patrones de células levitadas, y cultivo modelado de células en una superficie.

- 25 La presente descripción generalmente combina campos magnéticos y nanopartículas magnéticas para proporcionar una plataforma virtual o andamio para controlar el patrón de células y/o la forma de las agregaciones de células cultivadas en un ambiente artificial. La presente descripción también puede permitir la manipulación de células, el diseño de células, y/o conformación de las agregaciones por variaciones en un campo magnético. Los métodos de la presente descripción se pueden aplicar para crear un patrón de los propios materiales magnéticos para posibilitar muchas aplicaciones útiles que conciernen a la medicina, la biología celular, nanotecnología, y el cultivo celular. Una de las muchas ventajas potenciales de los dispositivos y métodos de la presente descripción, solamente algunas de las cuales están descritas en el presente documento, es que los aspectos de la descripción pueden permitir que las células y los materiales se manipulen y modelen con gran flexibilidad. Esto se puede hacer externamente (sin contacto directo con la solución a manipular), lo cual tiene convincente valor para la manipulación de sistemas biológicos y moleculares cuya integridad se puede comprometer fácilmente por la contaminación o el manejo.¹⁸⁻²⁴ Los sistemas inventivos pueden ser portátiles, relativamente económicos, y fáciles de fabricar. Algunos aspectos de la descripción se pueden acoplar con muchas modalidades diferentes de microscopía óptica y microscopía de fuerza.

- 40 Los sistemas y los métodos de la presente descripción proporcionan un número de otras ventajas sobre los sistemas y métodos tradicionales. Por ejemplo, los sistemas y métodos de la presente descripción pueden permitir la fabricación de un material sin contacto directo de objetos externos con el material. Tal fabricación libre de contacto se puede conseguir, en parte, por el uso de campos magnéticos y materiales que responden a tales campos magnéticos. Además, los sistemas y métodos de la presente descripción pueden permitir el control preciso de las fuerzas mecánicas colocadas sobre un material durante la fabricación. Tal control puede ser ventajoso, por ejemplo, cuando el material comprende una o más células que son sensibles a tales fuerzas mecánicas, es decir, células mecanosensibles. Tales células pueden incluir, pero no se limitan a, células madre. Además los sistemas y métodos de la presente descripción pueden permitir la manipulación precisa de los campos magnéticos usados en los sistemas y métodos de la presente descripción, tales como la capacidad de generar o eliminar dicho campo magnético, incrementar o disminuir la fuerza de dicho campo magnético, o modular dicho campo magnético.

- La presente descripción ventajosamente puede proporcionar crecimiento celular 3D con manipulación sin andamio ("andamio virtual") flexible de la forma de agregación y/o tejido en tiempo real. Ciertos aspectos pueden eliminar la influencia preocupante de una superficie, partícula núcleo, o matriz, y concentrar rápidamente las células para promover las interacciones célula-célula. Tales aspectos pueden no requerir control de medios específicos o temperatura y/o procesamiento antes de su utilización, y tales pueden ser compatibles con las técnicas de cultivo y diagnóstico estándares.

- 60 Las células se pueden cultivar, según la descripción, con múltiples tipos celulares. Las células se pueden aproximar de una manera controlada para facilitar la señalización celular y otras interacciones célula-célula, las cuales pueden ser físicas o químicas, lo cual puede afectar a las propiedades o comportamientos de las células. Un ejemplo de esto sería un ensayo de confrontación de co-cultivo con seguimiento *in situ*. La levitación magnética puede no requerir medios específicos, andamios modificados por ingeniería, geles moldeados, y/o biorreactores. La descripción puede proporcionar métodos simples, flexibles y eficaces que pueden ser adecuados para un rango de aplicaciones en biotecnología, descubrimiento de fármacos, investigación de célula madre, o medicina regenerativa.

La levitación magnética, según la descripción, puede proporcionar métodos para el cultivo celular 3D con gran potencial para la investigación y la aplicación. Puede tener ventajas significativas sobre los métodos de crecimiento 2D tradicionales y las metodologías de cultivo 3D actualmente disponibles. En relación con el cultivo 2D, las células pueden crecer más rápidamente sin la necesidad de pasos celulares, que son importantes para cultivar células sensibles donde el tiempo es un obstáculo crítico. A diferencia de los métodos de crecimiento 3D establecidos, la levitación magnética puede no requerir medios específicos, o la fabricación de materiales específicamente diseñados, andamios modificados por ingeniería, geles moldeados, y/o biorreactores. También puede ofrecer control espacial y temporal de la forma de la agregación, comienzo más rápido y controlable de las interacciones célula-célula, integración más fácil con diagnósticos por imagen, velocidad de crecimiento mejorada, y escalabilidad.

La descripción puede abordar los retos existentes para el desarrollo de muchas aplicaciones basadas en célula. Algunos aspectos pueden proporcionar nuevos métodos para ensayos de tejido. Algunos aspectos pueden resultar valiosos en el descubrimiento de fármaco de alta producción debido a la rápida tasa de crecimiento, nivel disponible de control, aumento de las interacciones célula-célula, y la compatibilidad con las técnicas de formación de imagen. Los métodos pueden evitar el contacto superficial con las células. Tales métodos pueden mantener la promesa de uso en la investigación de célula madre, debido al contacto con superficies poliméricas o de vidrio, con frecuencia usados en cultivo celular 2D, pueden alterar la biología de las células madre. La capacidad de crear un patrón espacialmente y temporalmente de agregaciones multicelulares puede proporcionar beneficios para la modificación por ingeniería de tejido. A partir de un punto de vista práctico, las técnicas según la descripción pueden ser rápidas, fáciles, económicas y requieren de muy poca modificación a partir de los procedimientos de cultivo celular estándares.

El material Au-MIO-fago se puede modelar sin o antes de la introducción de células, según la descripción. El diseño de hidrogel de fago puede ser útil, *inter alia*, debido a que el fago puede tener muchas propiedades, tales como la capacidad de servir como andamio para el crecimiento celular, el almacenamiento para los nutrientes celulares, y el vector para la administración de nanopartícula, ADN, o ARN que puede ser específica a célula.

Para ciertos aspectos de la descripción que implican células, las células pueden contener nanopartículas magnéticas, tener nanopartículas magnéticas pegadas a ellas, o tener nanopartículas magnéticas incrustadas en la agregación de células. Cualquier método para la disposición de nanopartículas magnéticas dentro o sobre las células o dentro de una agregación está dentro del alcance de esta descripción. Los hidrogeles se pueden usar para unir, infundir, incorporar partículas magnéticas dentro y sobre las células y las agregaciones.¹³ Por ejemplo, los hidrogeles se pueden usar para introducir nanopartículas magnéticas dentro de las células, y, ya que las células crecen con el tiempo, las nanopartículas magnéticas se pueden expulsar de las células y atrapar en la matriz extracelular de la agregación. Los hidrogeles adecuados pueden estar compuestos de nanopartículas, tales como oro (Au) y/u óxido de hierro magnético (MIO, magnetita, Fe₃O₄), con bacteriófago (Au-MIO-fago). Los hidrogeles adecuados deberían contener al menos una nanopartícula magnética, tanto si es superparamagnética, paramagnética, ferromagnética y/o ferrimagnética. Un ejemplo se ilustra en la Figura 1. Además, la descripción proporciona otros métodos para producir que las nanopartículas magnéticas entren dentro de las células, se unan sobre las células, o se incorporen dentro de una agregación de células. Otros medios conocidos en la técnica incluyen perlas magnéticas revestidas con una entidad dirigida a célula (por ejemplo, un receptor específico a célula o proteína), o liposomas que contienen nanopartículas magnéticas, y campos magnéticos aplicados para construir y administrar láminas celulares *in vitro*.¹⁴⁻¹⁷ Diferentes métodos pueden tener diferentes ventajas, y un experto en la técnica con el beneficio de esta descripción sabrá qué método(s) es más ventajoso. Por ejemplo, los liposomas pueden ser capaces de administrar grandes cantidades de nanopartículas. Los hidrogeles y las perlas magnéticas revestidas se pueden diseñar para dirigir células específicas. Por ejemplo, los hidrogeles hechos de bacteriófago y uno o más tipos de nanopartículas pueden servir como andamio para el crecimiento celular, almacenamiento para los nutrientes celulares, o vector para administración de nanopartícula, ADN o ARN que puede ser específica a célula. Los hidrogeles hechos de bacteriófago y uno o más tipos de nanopartículas pueden tener la capacidad de unir nanopartículas sobre las células e infundir nanopartículas dentro de las células, lo cual puede ser de gran valor para permitir la modificación y control de células sobre el nivel químico y mecánico.¹³

El fago (también referido como bacteriófago) útil en los sistemas y métodos de la presente descripción se refiere a uno cualquiera de un número de virus capaces de infectar la bacteria. Generalmente, un bacteriófago comprende una vaina proteica exterior y un espacio interior que comprende material genético, que puede ser ADN o ARN. El fago puede ser un fago filamentoso, tal como, pero no limitado a, bacteriófago fd, f1 o M13. El fago puede ser un bacteriófago fd. Ejemplos de fago adecuado, así como composiciones que comprenden fago y nanopartículas y métodos de formación de tales composiciones, se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N.º WO2006/060171 ¹³.

Los sistemas de la presente descripción además pueden comprender un resto dirigido, tal como, pero no limitado a, un péptido o proteína presentada sobre el bacteriófago o acoplada de manera operativa al bacteriófago. El resto dirigido puede estar acoplado de manera operativa (lo cual incluye estar presentado sobre la superficie de un bacteriófago) a un bacteriófago, una agregación conductiva, o una agregación de bacteriófago. El resto dirigido puede ser un péptido, y el péptido puede ser un péptido cíclico. Tales péptidos cíclicos pueden incluir, pero no se limitan a, péptidos cíclicos de la forma CX7C, en la que C es cisteína y X es un aminoácido aleatorio. Los dominios

proteicos mayores tales como anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla también se pueden presentar sobre o acoplar de manera operativa al fago, es decir, un resto dirigido⁶⁹. La agregación también puede comprender un resto dirigido acoplado de manera operativa, en particular covalentemente acoplado, a un componente del sistema, por ejemplo, fago o nanopartícula. El resto dirigido puede ser un péptido. Restos dirigidos de péptido dirigidos adecuados se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N.º WO2006/060171¹³. El resto dirigido puede estar comprendido en una proteína pHI o pVIII del bacteriófago. Los restos dirigidos se pueden identificar por cribado de péptidos presentados o incluidos en la proteína pIII y/o pVIII, en aspectos preferidos la proteína pVIII.

Los sistemas de la presente descripción pueden comprender además un agente de organización que promueve el empaquetamiento organizado de las nanopartículas conductivas. Un agente de organización puede incluir, pero no se limita a, péptido, un pirrol, un imidazol, histidina, cisteína o triptófano. Además, los sistemas de la presente descripción pueden comprender un agente terapéutico, tal como una molécula o ácido nucleico terapéutico. Un agente de organización puede inducir la agregación, o acoplar dos o más partículas para formar agregaciones y no se limita a agentes que inducen una disposición de manera ordenada de las moléculas, tal como una estructura reticular. El agente terapéutico puede ser un agente de organización. Los sistemas de la presente descripción pueden estar comprendidos en una composición farmacéuticamente aceptable. La descripción incluye sistemas que comprenden además una célula que comprende o está acoplada de manera operativa al bacteriófago.

Un Au-MIO-fago puede estar agregado a partir de Au, nanopartículas magnéticas de magnetita, y el fago usando un método de autoensamblaje ascendente.^{39,40} El color y la microestructura se puede ver con microscopio de campo oscuro, y pueden ser cualitativamente similares a observaciones previamente publicadas de agregaciones de Au-fago (carente de MIO).⁴⁰ Generalmente, el sistema Au-MIO-fago puede emular el comportamiento de hidrogeles Au-MIO, que se pueden establecer predominantemente por interacciones electrostáticas,^{39,40} como se ilustra en la Figura 1. Tanto las partículas de Au como MIO pueden adquirir carga negativa bajo las condiciones de solución acuosa (pH 6,0)³⁹⁻⁴¹ y pueden ser atraídas al fago positivamente cargado. Sin embargo, el fago y MIO no pueden formar un hidrogel sin Au, sugiriendo que el MIO puede ser menos eficaz en el establecimiento de entrecruzamiento entre el fago. En algunos ejemplos, el tamaño ligeramente más pequeño de las partículas de MIO o la distribución de tamaño polidispersa puede reducir la eficacia en el establecimiento de un entrecruzamiento. Las nanopartículas de MIO pueden ser un potenciador de contraste de la formación de imagen por resonancia magnética (IRM),²⁵ como se ilustra en la Figura 1, imágenes por RM T2*ponderada de Au-MIO-fago y un hidrogel de Au-fago control (IRM).

Las nanopartículas útiles en los sistemas y métodos de la presente descripción generalmente pueden comprender una o más nanopartículas conductivas metálicas. Frecuentemente, las nanopartículas conductivas metálicas pueden ser capaces de ser magnetizadas, o magnéticas. La nanopartícula conductiva metálica puede comprender Au, Ag, Pt, Ti, Al, Si, Ge, Cu, Cr, W, Fe, o un óxido correspondiente. La nanopartícula conductiva puede ser un conjunto de Au, tal como, pero no limitado a, un conjunto de Au-magnetita. Las nanopartículas conductivas pueden ser de aproximadamente 2 nm, a aproximadamente 100 µm de diámetro. Las nanopartículas múltiples pueden estar incrustadas en otros materiales que pueden ser conductivos o no conductivos. Las nanopartículas pueden estar revestidas con materiales conductivos o no conductivos. Un ejemplo de los sistemas de la presente descripción que contienen nanopartículas de conjunto de Au-magnetita se muestra en la Figura 1.

Las nanopartículas magnéticas generalmente pueden ser de cualquier tipo de material magnético. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas adecuadas pueden estar hechas de magnetita. Las nanopartículas magnéticas de magnetita pueden tener tamaños por debajo de 30 nm, puesto que las partículas de magnetita pueden ser superparamagnéticas en ese intervalo de tamaño.

Las nanopartículas magnéticas de magnetita pueden tener tamaños mayores y pueden manifestar magnetización remanente característica de ferrimagnetismo en grandes cantidades. Nanopartículas magnéticas adecuadas pueden ser de tamaño de partícula polidisperso <50 nm, y pueden estar estabilizadas con un tensioactivo de PVP (polivinil pirrolidona). Tales nanopartículas magnéticas adecuadas pueden estar comercialmente disponibles de Sigma-Aldrich. Una lista parcial de ejemplos de otras opciones para nanopartículas magnéticas adecuadas incluyen hierro puro, níquel, cobalto, CoFe₂O₄, y NdFeB. Las nanopartículas magnéticas adecuadas pueden estar revestidas o no revestidas. Un experto en la técnica con el beneficio de esta descripción sabrá qué material y opción de revestimiento es mejor para cualquier situación particular dada.

Las nanopartículas magnéticas se han usado ampliamente en aplicaciones biológicas tales como para la formación de imagen por IRM,²⁵ clasificación celular,²⁵ diseño de superficie,²⁶⁻³⁰ mecanocondicionamiento de células,²⁸ y estudios de propiedades de membrana mecanosensibles.²⁸ La magnetita es una elección común de nanopartícula magnética, puesto que las nanopartículas de magnetita con tamaños por debajo de 30 nm pueden ser superparamagnéticas, y las nanopartículas de magnetita de mayor tamaño pueden manifestar magnetización remanente característica de ferrimagnetismo en grandes cantidades. En algunos casos, las partículas pueden ser atraídas al máximo de un campo magnético aplicado.³¹ Las nanopartículas magnéticas de muchos tipos pueden estar modificadas para dirigir proteínas específicas y se ha mostrado que son biocompatibles.²⁸ Está dentro del espíritu de esta descripción el uso de nanopartículas magnéticas de cualquier tipo de material. Un experto en la técnica con el beneficio de esta descripción sabrá qué tipo de material es mejor para una situación particular. Por ejemplo, la magnetita puede ser buena elección debido a que tiene una magnetización de saturación grande, así

fuerzas relativamente grandes se pueden generar con relativamente menos partículas. También fácilmente se obtiene comercialmente y de algún modo estándar debido a que se ha hecho mucho trabajo con la misma. Además, las nanopartículas magnéticas pueden estar revestidas o no revestidas. Una lista parcial de ejemplos de otras opciones adecuadas incluye hierro puro, níquel, cobalto, CoFe_2O_4 y NdFeB .

Los microportadores³⁴ o partículas núcleo,³⁵ que pueden contener material magnético, también se han usado para proporcionar una superficie para anclaje de células dependientes y permitir los beneficios del cultivo por suspensión. Los microportadores, también referidos como partículas núcleo, perlas, perlas de cultivo celular, microperlas, o microportadores, son partículas sólidas, generalmente mayores que el nano tamaño, que pueden soportar el anclaje y crecimiento de células vivas.^{34,35} En algunas implementaciones, los microportadores son mayores que las células. Las partículas magnetizadas preferiblemente están revestidas con un material adhesivo celular, tal como colágeno, para facilitar la adherencia celular.³⁵ Las células generalmente proliferan durante algún tiempo antes de que las interfaces célula-célula sean mayores que las interfaces células-perla. También, las perlas que permanecen en la agregación pueden influir en las propiedades mecánicas del tejido, lo cual es importante para las aplicaciones de modificación por ingeniería de tejido. También puede ser difícil modelar pequeñas estructuras o pequeños números de células con perlas microportadoras, debido a que las perlas son demasiado grandes.

La Figura 1 ilustra un ejemplo de hidrogel Au-MIO-fago usado para administrar nanopartículas dentro y sobre células y dentro de agregaciones según la descripción. La Figura 1A ilustra un vial ilustrativo de un hidrogel que contiene MIO (indicado por flecha) en agua. La Figura 1B ilustra un esquema ilustrativo de la interacción electrostática de nanopartículas (esferas) con fago (estructuras alargadas). Las nanopartículas amarillas (oro) y marrón (MIO) están representadas (no dibujadas a escala). La Figura 1C ilustra una imagen por MIR ilustrativa (T2 ponderada) de hidrogel purificado en solución, el hidrogel que contiene MIO (panel superior), T2* promedio=76 ms y control de hidrogel libre de MIO (panel inferior), T2* promedio=253 ms. El contraste de imagen entre el hidrogel que contiene MIO y el control negativo resulta de la reducción en la constante de relajación T2* en presencia de nanopartículas de MIO (barra de escala=2 mm).

Los campos magnéticos, creados o bien con imanes permanentes o alambres que llevan corriente, pueden aplicar fuerzas a las nanopartículas magnéticas, y por tanto a las células y/o agregaciones. Tales fuerzas pueden mover las células y/o agregaciones hacia, o sostenerlas en la región de, máxima amplitud de campo magnético. Debido a la flexibilidad de la conformación y el cambio de los campos magnéticos, la forma de las células y las muestras de tejido resultantes que forman pueden ser formadas y cambiadas, como se ilustra en la Figura 2. Un experto en la técnica con el beneficio de esta descripción sabrá si es más ventajoso usar imanes permanentes, imanes que portan corriente, o alguna combinación. Por ejemplo, los imanes permanentes pueden producir mayores campos y fuerzas y recoger más células. Los alambres pueden ser más fácilmente modelados para formar patrones de campo magnético, pueden producir estructuras más pequeñas, y pueden ser más flexibles para la manipulación.

La Figura 2 ilustra el desplazamiento magnético de Au-MIO-fago, según la descripción. En esta ilustración, el fago Au-MIO-fago puede estar preparado con diferentes tamaños de nanopartículas de Au (18 nm, panel superior; 30 nm, medio; y 45 nm, inferior) bajo la misma concentración de fago y nanopartícula de MIO. Aquí, el hidrogel específicamente usado es Au-MIO AAVP-RGD-4C (AAVP, fago de virus adeno-asociado),³⁸ pero el tipo particular de fago no es crítico para el éxito de la invención. Los hidrogeles preparados con los diferentes tamaños pueden mostrar diferente respuesta al campo magnético, pero, en general, pueden estar todos atraídos donde el campo magnético es el más fuerte. Para este dato, el imán permanente puede estar colocado justo en la parte exterior de la pared, como se indica por la flecha que apunta hacia el imán.

Las células pueden estar magnéticamente levitadas. Como se ilustra en la figura 3, las células pueden cultivarse en tres dimensiones lejos de una superficie, algunas veces referido como cultivo celular levitado. Por ejemplo, las células madre neurales (NSC) C17.2 murinas se pueden cultivar así.²⁵ Las células se pueden cultivar en la interfaz de líquido-aire. Las células madre neurales se pueden unir a la superficie inferior de la placa de cultivo, y una preparación de hidrogel que contiene MIO se puede dispersar por pipeteo. Con frecuencia, la distribución de tamaño de los fragmentos de hidrogel puede ser no críticos. Como se ilustra en la Figura 3A, la mezcla se puede incubar bajo condiciones de cultivo de tejido estándar. La incubación durante la noche puede proporcionar resultados similares a los estudios previos que usan microscopía confocal para mostrar las partículas de fago dirigidas y las nanopartículas de oro se adhieren a membranas celulares mamíferas exteriores y se someten a internalización mediada por receptor.^{39,40} Como se ilustra en la Figura 3B, las células madre neurales se pueden enjuagar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y los remanentes de hidrogel se pueden eliminar. Las células madre neurales se pueden separar de la superficie con un tratamiento con tripsina:EDTA estándar.^{39,40} Un imán puede colocarse por encima de la placa de cultivo de tejido, como se ilustra en la Figura 3C. La mezcla de las células madre neurales y el hidrogel que contiene MIO pueden subir conjuntamente a la interfaz aire-líquido debido a la atracción de las nanopartículas a regiones de alto campo magnético.³¹ El campo magnético puede concentrar agregaciones de células levitadas juntas (cercanas, de proximidad cercana, y/o en contacto físico), permitiendo las interacciones célula-célula, por ejemplo, señalización celular por rutas químicas o mecánicas. Las células no pueden ser capaces de dejar el líquido debido a la tensión superficial. Como se ilustra en la Figura 3D, puede haber evidencia de rasgos de agregación multicelular 3D a escala grande y pequeña con morfogénesis de ramificado característica y producible.^{42,43}

Las células pueden estar magnéticamente levitadas lejos de una superficie, que puede posibilitar el cultivo de las agregaciones 3D, incluyendo la creación y la manipulación de los patrones levitados y formas de agregaciones. La forma de una agregación puede estar influida para formar un patrón o distribución 2D o 3D particular. Cuando más de un tipo de célula está presente, la influencia de la forma de una agregación también puede incluir el cambio de la disposición relativa de diferentes poblaciones de células dentro de la agregación. Por ejemplo, se pueden formar capas de diferentes tipos de células. Las capas pueden estar formadas como láminas, o las capas pueden variar radialmente, como cuando un tipo de célula se cultiva alrededor de una agregación central de otro tipo de célula. Las ilustraciones de tal descripción se muestran en las Figuras 3-13.

Los campos magnéticos utilizados en los sistemas y métodos de la presente descripción se pueden proporcionar mediante cualquier fuente adecuada. Tales fuentes incluyen, pero no se limitan a, campos magnéticos generados por imanes, campos magnéticos generados por el flujo de la corriente eléctrica, o una combinación de los mismos. Los campos magnéticos adecuados generados por el flujo de corriente eléctrica se pueden proporcionar por el flujo de corriente eléctrica a través de uno o más alambres conductivos. Algunas descripciones específicamente utilizan imanes anillo. Las nanopartículas magnéticas se pueden dibujar preferentemente a los ejes de simetría de un imán anillo, mientras que la luz se puede dejar que pase a través de la abertura central de un imán anillo. Estos dos efectos, tomados en conjunto, pueden permitir mejor visualización de las agregaciones y el cultivo celular cuando las células se someten a levitación con imanes anillo. Los imanes anillo tradicionalmente son imanes circulares permanentes, aunque cualquier tipo de imán de cualquier geometría que proporciona una abertura central estaría dentro del espíritu de la descripción. Un ejemplo de imán anillo se ilustra en la Figura 3C y D.

Campos magnéticos extremadamente grandes (>4 T), tales como en las sondas de los imanes de IRM superconductores, se han usado para levitación de células por el diamagnetismo natural del material biológico,³² y se pueden usar imanes más pequeños para atrapar células inmersas en un medio con una concentración alta de sales paramagnéticas.³³

Otros esquemas para controlar la forma 3D de las agregaciones pueden requerir la fabricación de materiales especialmente diseñados, andamios modificados por ingeniería,³⁶ geles moldeados, y/o biorreactores basados en rotación o agitación. Con frecuencia, tales materiales e instrumentos pueden ser costosos, específicos a célula, y no biocompatibles, lo cual limita su aplicabilidad. Los andamios porosos biodegradables y las matrices proteicas que promueven la adhesión celular e imitan o promueven la formación de matriz extracelular se usan rutinariamente para la producción de muestras de tejido *ex vivo* 3D,³⁷ pero pueden padecer de propagación lenta de células dentro de las construcciones y el establecimiento de interacciones célula-célula,¹⁴⁻¹⁷ y retos en el diseño de un andamio biocompatible que no perturba las propiedades celulares.^{7,11}

La presente descripción puede proporcionar crecimiento celular 3D con manipulación sin andamio ("andamio virtual") flexible de la forma del tejido a tiempo real. Ciertos aspectos eliminan la influencia preocupante de una superficie, partícula núcleo, o matriz, y rápidamente concentra células para promover las interacciones célula-célula. Tales aspectos pueden no requerir control de medios específicos o temperatura y/o procesamiento antes de su utilización, y pueden ser compatibles con las técnicas de cultivo y diagnóstico estándares.

La Figura 3 ilustra una agregación celular levitada según la descripción. El panel superior de cada fotograma ilustra un esquema, y el correspondiente panel inferior puede ser una microfotografía representativa de células madre neurales (NSC) en la misma fase del proceso. La Figura 3A ilustra un hidrogel de Au-MIO-fago dispersado sobre las células, en el que la mezcla se puede incubar para administrar nanopartículas sobre y dentro de las células. Las manchas oscuras ilustran fragmentos macroscópicos de hidrogel. La Figura 3B ilustra fragmentos de hidrogel no interactivos en exceso que se pueden eliminar durante los lavados. La Figura 3C ilustra la mezcla magnetizada que sube a la interfaz aire-medio cuando se coloca el imán. Esta imagen ilustra la mezcla después de 15 min de levitación. La Figura 3D ilustra estructuras multicelulares características y reproducibles formadas después de 12 h de levitación. Las regiones más oscuras pueden resultar del grosor óptico creciente de la masa celular. Las barras de escala en cada figura son de 30 μm .

La Figura 4 ilustra la levitación magnética de una célula en ausencia de unión celular, según la descripción. La Figura 4A ilustra un Au-MIO-fago incubado con células suspendidas durante 15 min. Después de la incubación, el Au-MIO-fago más la mezcla celular se puede transferir a una placa de cultivo celular. Un imán se puede añadir para levitación de las células magnetizadas. La Figura 4B ilustra el contraste de fase (izquierda) y las fotomicrografías de fluorescencia (derecha) de astrocitos humanos normales que expresan mCherry levitados 15 min después del comienzo de la levitación y 48 h después del comienzo de la levitación, en donde la barra de escala es de 200 μm . A las 48 h, se pueden observar esferoides multicelulares. El panel más a la derecha en la Figura 4C muestra una imagen aumentada de un esferoide (fluorescencia mCherry, barra de escala 50 μm).

Algunos aspectos proporcionan un procedimiento para cultivo levitado por levitación magnética sin unión superficial. Las células suspendidas se pueden incubar con el Au-MIO-fago. La incubación puede durar aproximadamente 15 min, después de dicho tiempo las células suspendidas pueden ser que estén levitadas magnéticamente, como se ilustra en la Figura 4. Sin limitar la descripción a una teoría particular o mecanismo de acción, sin embargo actualmente se cree que el rendimiento de células levitadas frente a no levitadas está influido por la cantidad de Au-

MIO-fago, tiempo de incubación, fuerza y gradiente del campo magnético, y la distancia desde el imán a la superficie inferior. Como se ilustra en las Figuras 4B y C, los astrocitos humanos normales sometidos a transfección con mCherry se pueden cultivar durante 15 min y 48 h. Tales procedimientos pueden proporcionar una técnica más simple y rápida, aunque el rendimiento de las células puede ser menor. Tal procedimiento puede obviar la necesidad de unión superficial, de manera que se puede usar con reservas celulares directamente descongeladas del almacenamiento congelado. Esta técnica se puede aplicar a diversos tipos celulares. Por ejemplo, células de glioblastoma humano (Figura 5), células madre neurales diferenciadas (Figura 6), astrocitos humanos (Figura 7), agregaciones de glioblastoma (Figura 8), y melanoma (Figura 9).

La Figura 5 ilustra una agregación celular magnéticamente levitada, de acuerdo con la descripción. Las células de glioblastoma humano (flecha inferior) se pueden tratar con hidrogel que contiene óxido de hierro magnético (MIO) y sostener en la interfaz aire-medio mediante un campo magnético creado por el imán unido a la parte superior de la placa de cultivo de tejido (flecha superior). Esta ilustra que la barra de escala de 5 mm y la imagen tomada a las 48 h de cultivo.

La Figura 6 ilustra células madre neurales murinas (NSC) diferenciadas magnéticamente levitadas, según la descripción. Las NSC unidas a superficie se trataron con mitomicina (1 µg/ml para la diferenciación) durante 8 h antes de la suspensión de las células. Esta ilustra 24 h después del comienzo de la levitación.

La Figura 7 ilustra astrocitos humanos magnéticamente levitados, según la descripción.

La Figura 8 ilustra agregaciones de glioblastoma magnéticamente levitadas, según la descripción.

La Figura 9 ilustra células de melanoma (B16) magnéticamente suspendidas, según la descripción, que pueden crecer como una lámina. El melanoma, un tipo raro pero mortal de cáncer de piel, generalmente es un tumor maligno que se manifiesta a partir del crecimiento no controlado de las células pigmento, denominadas melanocitos.

Aunque las células mamíferas pueden procesar finalmente material biológico tal como fago,³⁸ el destino celular de las nanopartículas de metal no está bien entendido. La descripción puede demostrar la presencia a largo plazo de las nanopartículas de MIO en agregaciones levitadas. Por ejemplo, después de meses de cultivo levitado, las agregaciones multicelulares viables pueden caer cuando se elimina el campo del imán, y se pueden someter a levitación de nuevo cuando el campo del imán se vuelve a aplicar. Las dinámicas a largo plazo de las nanopartículas de MIO en células no se entienden completamente.⁴⁴⁻⁴⁶ Sin embargo, como se ilustra en la Figura 10, el análisis por microscopio electrónico de transmisión (MET) puede mostrar que, después de aproximadamente una semana de cultivo levitado, las células de glioblastoma humano levitadas pueden liberar predominantemente nanopartículas en los medios y/o matriz extracelular. Sin determinar un mecanismo(s) molecular(es) para estas observaciones (tal como secreción, muerte celular apoptótica, o una combinación), la "incorporación" aparente de las nanopartículas de metal en la agregación puede explicar la capacidad del sistema para levitación de agregaciones durante periodos de tiempo relativamente prolongados.

MET de secciones transversales de esferoides de células de glioblastoma humano cultivadas por levitación magnética, según la descripción, muestra la localización de nanopartículas en diferentes fases, como se ilustra en la Figura 10. Por ejemplo, después de 24 h de levitación, la masa de nanopartículas puede estar contenida en el citoplasma celular, coherentemente con informes previos.^{39,47,48} Las células pueden haber procesado las nanopartículas después de 8 días de cultivo, y pueden aparecer en la matriz extracelular (MEC). Puede ser el caso de que la división celular y el crecimiento del esferoide presumiblemente conduce a una distribución diferencial de las nanopartículas (preferentemente presentes en el centro del esferoide más que en la región exterior).

La Figura 10 ilustra imágenes por microscopio electrónico de transmisión (MET) de células de glioblastoma humano cultivadas con levitación magnética, según la descripción. Hacia la izquierda de la Figura 10, las nanopartículas (negras) se pueden ver dentro de las células después de 24 h de cultivo. En la mitad de la Figura 10, las nanopartículas se pueden ver en la región central del esferoide de tejido pero en gran medida en la matriz extracelular después de 8 d de cultivo. Hacia la derecha de la Figura 10, se puede ver que las regiones exteriores del esferoide (después de 8 días de cultivo) no contienen nanopartículas detectables. En esta ilustración, la barra de escala es de 5 µm. La cohesión de la agregación y la retención de las nanopartículas en la agregación puede permitir que la agregación sea sometida a levitación como se describe en el texto.

El cultivo por levitación magnética puede producir agregaciones 3D. Como se ilustra en la Figura 11, las imágenes por microscopía electrónica de barrido (MEB) pueden mostrar la naturaleza 3D de las células de glioblastoma humano cultivadas bajo levitación magnética, según la descripción. Por ejemplo, las imágenes por MEB se pueden capturar con el microscopio electrónico de barrido JSM 5900, comercialmente disponible de JEOL USA, Inc., de Peabody, MA, equipado con detector electrónico de retrodispersión y cámara digital. Además, las estructuras multicelulares de las células de glioblastoma humano pueden estar fijadas, secadas a punto crítico, y revestidas con Au/Pd.⁴⁹

La Figura 11 ilustra imágenes por un microscopio electrónico de barrido (MEB) que muestran cultivo levitado de estructuras 3D, según la descripción. MEB de las células de glioblastoma humano cultivadas bajo levitación magnética durante 24 h se pueden ver hacia la izquierda, mientras que durante y 8 d se pueden ver hacia la derecha, en la que la barra de escala es de 100 μm .

Algunos aspectos pueden proporcionar resultados que se comparan favorablemente con los métodos tradicionales. Por ejemplo, el cultivo por levitación magnética puede proporcionar resultados favorables cuando se compara con el cultivo 2D tradicional. El crecimiento celular se puede valorar por seguimiento visual y cuantitativo de la tasa de formación, el tamaño, y la viabilidad de las células de glioblastoma humano genéticamente modificadas durante un periodo de 8 d haciendo un seguimiento de la fluorescencia a partir de la expresión proteica estable de mCherry, como se ilustra en la Figura 12A. Las células pueden juntarse en 30 min de levitación. Además, una agregación multicelular cohesiva puede surgir a las 24 h, y una forma esferoide puede formarse entre 3 a 8 d. Se puede observar la fluorescencia roja intensa de la expresión de la proteína mCherry, lo cual puede confirmar la viabilidad celular dentro de la agregación 3D. Las agregaciones se pueden mantener durante al menos tan largo como 12 semanas o más. La tasa de crecimiento de las células magnéticamente levitadas en comparación con la de las células cultivadas en placas de cultivo 2D estándar se ilustra en la Figura 12B. A diferencia de la tendencia exponencial indicada para el crecimiento de las células levitadas, las células cultivadas en 2D muestran un patrón de crecimiento lineal, un rasgo típico de agregaciones unidas a superficie.⁵⁰ En parte debido al volumen accesible durante el crecimiento 3D de las células levitadas, una agregación grande se puede atender sin los ciclos de despegar/cultivar en placa de nuevo ("paso") generalmente requeridos en el cultivo de tejido 2D estándar.

Las células cultivadas por levitación magnética, según la descripción, pueden mostrar similitud a los tejidos *in vivo*. Tales similitudes pueden tener ventajas para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, la expresión de proteína en las células de glioblastoma humano puede presentar similitudes. La Figura 12C ilustra una comparación de la expresión del marcador N-cadherina en células levitadas, células cultivadas sobre una superficie 2D de una placa Petri, y células en xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeficientes. Sin limitar la descripción a una teoría particular o mecanismo de acción, sin embargo actualmente se cree que N-cadherina, una proteína de membrana que media las interacciones célula-célula a través de las interacciones de adhesión celular homotípica,⁵¹ puede proporcionar un patrón de expresión que actualmente recapitula al menos algunos rasgos tipo *in vivo* de células cultivadas en 3D. En realidad, las agregaciones 2D pueden mostrar N-cadherina dispersada en el citoplasma y el núcleo pero ausente de la membrana mientras que las células levitadas expresan N-cadherina en la membrana, citoplasma, y uniones celulares (parecido al patrón de expresión de proteína observado en xenoinjertos tumorales). Esta observación es cualitativamente coherente con los resultados recientemente publicados por Ofek y col.,⁵¹ en los que el cartílago cultivado *in vitro* también produjo patrón de expresión de N-cadherina diferencial en, cultivo relativo a 2D por levitación. Levitación ausente, puede haber no alteración detectable en la expresión de N-cadherina en células de glioblastoma unidas con alguna combinación de hidrogeles que contienen MIO y/o campos magnéticos. Por tanto, la levitación magnéticamente inducida de células *in vitro* puede proporcionar un subrogado más barato complementario que la generación de labor y coste intenso y el mantenimiento de xenoinjertos tumorales de cerebro humano en ratones inmunodeficientes.⁵² En general, las indicaciones son que la levitación magnética puede producir células que son más similares a las células en organismo vivos que las obtenida con técnicas de cultivo artificial tradicional.

La Figura 12 ilustra una comparación de agregación celular levitada con agregación 2D y xenoinjerto de ratón, según la descripción. La Figura 12A ilustra fotomicrografías de contraste de fase (superior) y fluorescencia (inferior; células que expresan mCherry por transfección estable) de células de glioblastoma humano levitadas de las que se hace un seguimiento durante un intervalo de 8 d. En unas pocas horas, las células pueden juntarse. A las 24 h, puede haber una agregación multicelular definida de células de glioblastoma humano que finalmente formaron un esferoide. En esta ilustración, la barra de escala es de 200 μm . En la Figura 12B, se ilustra el número de células en función del tiempo para la agregación celular levitada en 12A (cuadrados, la línea azul indica tendencia de crecimiento exponencial). También se ilustra una agregación 2D representativa (triángulos, la línea roja muestra tendencia lineal). La Figura 12C ilustra la inmunofluorescencia de N-cadherina (rojo, Alexafluor 555) y la tinción nuclear (azul, DAPI) de cerebro de ratón que contiene xenoinjerto de glioblastoma humano, células de glioblastoma humano cultivadas por levitación magnética 3D durante 48 h, y agregación 2D estándar de célula de glioblastoma humano unida a un cubreobjetos de un portaobjetos de vidrio, en la que la barra de escala es 10 μm .

Los métodos según la descripción pueden proporcionar diseño celular, control de forma, y manipulación de forma dependiente del tiempo. Como se discutió previamente, la levitación magnética puede resultar de la atracción de las nanopartículas de MIO a regiones de alto campo magnético. El campo magnético puede estar formado por imanes apropiadamente formados o variados temporalmente con electroimanes o moviendo los imanes permanentes. Hay gran potencial para modelar espacialmente células y manipular las estructuras en el tiempo. El campo magnético generalmente puede funcionar como un andamio invisible ajustable sobre el que se moldea agregaciones multicelulares magnetizadas, como se ilustra en la Figura 13. De este modo, las formas celulares complejas sobre todas las escalas de longitud se pueden realizar, por ejemplo, por el uso de los electroimanes y técnicas de microfabricación.

Las estructuras de agregación de glioblastoma multicelular con imanes permanentes en forma de anillo de diferentes diámetros y tensiones de fuerza magnética variantes se pueden someter a levitación, como se ilustra en la Figura

13. Las estructuras resultantes pueden reflejar directamente las propiedades del campo magnético usado. El imán más grande y fuerte puede generar la estructura más grande, como se ilustra en la Figura 13B. Además, debido al patrón de campo en el menisco puede tener un mínimo local sobre el eje (bajo el agujero de formación de imagen), las células pueden crecer en un patrón de anillo que traza el máximo del campo. Para los imanes pequeños, también

La levitación magnética, según la descripción, puede proporcionar control temporal y/o espacial preciso del patrón de las células. Aproximar las células puede facilitar las interacciones entre las poblaciones de las células que son originalmente distintas. Esto se puede hacer en un ambiente propicio a visualización o formación de imagen molecular *in situ*. Por ejemplo, tales atributos de sistema se ilustran (i) con tipos de célula única en las Figuras 3 a 9 y (ii) con diferentes tipos de célula (o poblaciones) en ensayos de confrontación en las Figuras 13 C-D entre las células de glioblastoma humano cultivadas en conjunto (sometidas a transfección con GFP; células verdes) y astrocitos humanos normales (sometidas a transfección con mCherry; células rojas). Las agregaciones que se cultivaron originalmente por separado se pueden confrontar magnéticamente, como se ilustra en la Figura 13C (tiempo cero estimado), y se puede hacer un seguimiento de su interacción durante 14 d, como se ilustra en la Figura 13D). Aunque un interfaz claro que separa las estructuras celulares puede ser inicialmente evidente, a las 12 h, las poblaciones pueden comenzar a fusionarse y perder sus formas esféricas individuales. Después de 3 d, el ensayo de confrontación puede incorporarse dentro de un esferoide único con las células de glioblastoma humana invadiendo la estructura compuesta de astrocitos humanos normales. Estos aspectos pueden tener aplicaciones prácticas en relación con el glioblastoma multiforme, el tipo más común, invasivo y letal de tumor cerebral astrocítico.^{53,57} Los astrocitos humanos normales generalmente están entre el tipo celular principal que forma el cerebro y la médula espinal y se sabe que soportan la invasión de glioma maligno en el tejido cerebral *in vivo*.⁵⁸ El cultivo levitado se puede usar para el análisis de la capacidad de invasión de las células cerebrales normales en ensayos de cultivo de confrontación, los cuales han sido correlacionados mucho con los resultados clínicos⁵⁸.

Más de dos tipos celulares y/o poblaciones de células se pueden cultivar conjuntamente. Las células levitadas se pueden cultivar en presencia de una capa de alimentación. La fuerza para aplicar a las células y los receptores se puede variar cambiando el campo magnético, por ejemplo, usando electroimanes o moviendo los imanes permanentes. Estos métodos pueden tener aplicación práctica en la investigación de mecanismos mecanosensibles en las células, tal como en la investigación de célula madre.

Junto con la figura 12, la cual ilustra las células levitadas que muestran notable parecido a tejido en organismos vivos, la Figura 13 ilustra el potencial para levitación magnética, según la descripción, para formar la base para los ensayos de la eficacia de fármaco y cribado de fármaco. Diversos compuestos se pueden introducir para ver si alguno de ellos retrasa la invasión del cáncer. Los resultados positivos pueden indicar fármacos que combaten el cáncer prometedores. Los resultados pueden ser indicativos de la eficacia de fármaco sobre tumores en organismos vivos, debido al hecho de que las células levitadas se parecen a los tejidos vivos.

La Figura 13 ilustra un control de la forma y posición de las células durante el cultivo celular; co-cultivo, y ensayo de confrontación, también conocido como ensayo de invasión, según la descripción. La Figura 13A ilustra los patrones del campo magnético calculados de imanes anillo para la agregación celular 3D en 13B. La altura y el radio se puso en escala por el radio interno del imán (R). Los imanes en 13B i, ii, y iii tienen valores R de 2,8, 2,3 y 1,7 mm respectivamente. Para cada imán, el radio exterior es aproximadamente 4R y el espesor es aproximadamente igual a R. Una gráfica universal da una aproximación del perfil de campo en función de las coordenadas normalizadas. La escala de color es lineal y B_{max} aproximadamente 3.000, 2.000 y 1.500 G para los fotogramas B i, ii y iii. El centro del imán se toma como $z=0$. Las líneas negras indican las alturas de las agregaciones celulares en los fotogramas B i, ii, y iii. El hidrogel magnetizado y las células pueden ser atraídas a regiones de máximo campo pero no pueden dejar el medio debido a la tensión superficial. La Figura 13B ilustra los esferoides de glioblastoma humano resultantes agregados a partir de los campos magnéticos descritos en la Figura 13A. Para el imán de radio mayor (i), en la altura de la agregación el campo alcanza su punto más alto lejos del eje de simetría, conduciendo a un patrón celular en forma de anillo. Las células presentan esta distribución espacial inmediatamente en el comienzo de la levitación, en la que la barra de escala es de 400 μm . Estas estructuras multicelulares 3D se cultivaron en placas de cultivo de tejido con recubiertas modificadas al unir un imán en forma de anillo por encima de cada pocillo. La Figura 13C ilustra fotomicrografía de campo claro y fluorescencia de células de glioblastoma humano (verde; células que expresan GFP) y astrocitos humanos normales (rojo; marcado con mCherry) separadamente cultivados y, a continuación, guiados juntos magnéticamente (tiempo=0). La Figura 13D ilustra la confrontación entre células de glioblastoma humano y astrocitos normales en la Figura 13C, seguida durante 10,5 d. La invasión del esferoide compuesto de astrocitos humanos normales por células de glioblastoma humano sirve como ensayo estándar de la capacidad de invasión del glioma maligno.³⁴ En esta figura, la barra de escala es de 200 μm .

La descripción puede proporcionar impresión celular o diseño sobre una superficie. Por ejemplo, esto se puede hacer guiando magnéticamente una agregación de células a una superficie, dejando que algunas células se unan a la superficie, y moviendo la bola de células sobre la superficie para formar un patrón de células, como se ilustra en las Figuras 14 y 15. Alternativamente, se puede conseguir usando o bien alambres que llevan corriente o imanes

permanentes, que pueden crear un perfil de campo en la forma deseada para las células, permitiendo de ese modo que las células inicialmente libres se muevan en el campo para pegarse en el patrón deseado, como se ilustra en las Figuras 16 a 20.

- 5 Las células se pueden modelar sobre una superficie a través de las técnicas de impresión. La impresión de células sobre una superficie puede ser beneficioso para un amplio rango de aplicaciones médicas, tal como sustitución de tejido/órgano y cura de herida.⁶⁰⁻⁶⁸ Las Figuras 14 y 15 demuestran el potencial de esta descripción para la impresión/representación gráfica celular. Este procedimiento se puede conseguir después de tratar células con Au-MIO-fago. En esto, las células se pueden someter a levitación durante un periodo de tiempo deseado, que puede
10 variar de minutos a días, y las células se pueden guiar magnéticamente a la superficie para para crear patrones. Después de que las células empiecen a unirse a la superficie, a continuación, las células pueden desplazar la estructura 3D a una nueva posición donde las células unidas a superficie se quedarán unidas. Las células pueden ser células magnéticamente guiadas directamente para imprimir el patrón magnético, evitando la levitación celular. Con cualquiera de estos procedimientos, las células se pueden unir a la superficie y permanecer viables. Estos
15 procedimientos pueden producir un patrón de células sobre la superficie. Por ejemplo, la Figura 15 ilustra una letra N escrita sobre una superficie de este modo.

La Figura 14 ilustra un ejemplo de diseño celular sobre una superficie usando una técnica de impresión celular, según la descripción. Una agregación que inicialmente se sometió a levitación se guio a una superficie de plástico.
20 Después de 12 horas, algunas células habían migrado fuera de la agregación y se habían unido al plástico.

Ciertos aspectos pueden combinar la creación de patrón de manera litográfica con imanes permanentes. Por ejemplo, cuando se usa pequeños patrones de campo magnético, se puede aplicar un campo de fondo uniforme con un gran imán permanente o electromagnético. La superficie se puede orientar en cualquier dirección con respecto a
25 la gravedad y no tiene que ser plana. Esto puede incrementar la magnetización de las partículas magnéticas e incrementar las fuerzas sobre las nanopartículas, células y materiales.

La Figura 15 ilustra un ejemplo de diseño celular sobre una superficie usando una técnica de impresión celular, según la descripción. La imagen de fluorescencia de HGBM que expresa GFP magnéticamente modelado usando técnica de impresión celular. Hacia la izquierda, se puede ver que la letra N se generó sobre el plástico del cultivo de
30 tejido guiando magnéticamente células HGBM tratadas con Au-fago-MIO a puntos específicos en la superficie de una placa de cultivo de tejido. Hacia la derecha, una fotomicrografía de células HGBM que se pueden ver unidas a la punta del patrón de N (acusado por líneas de puntos).

La descripción puede proporcionar el diseño celular sobre una superficie usando alambres que llevan corriente o campos magnéticos permanentes que atraen células a un patrón sobre la superficie. Los alambres que llevan corriente se pueden crear en o sobre una superficie o pegar en o sobre una superficie o sostener en la proximidad por encima o por debajo de una superficie mediante diversas técnicas. El diseño litográfico de material conductor
40 sobre una superficie se puede usar para producir los alambres. En la Figura 16 se ilustran patrones de muestra. Un ejemplo de un perfil de fuerza generado por tales alambres se ilustra en la Figura 17. Un prototipo de alambres sobre un sustrato de zafiro, con pocillos de cultivo de tejido (también conocido como muestra biológica) por encima se ilustra en la Figura 18. Las fotografías del prototipo, junto con el equipo para generar corrientes y la incorporación en un sistema de microscopio, se ilustran en la Figura 19. La Figura 20 ilustra corrientes que pasan a través de los
45 alambres para crear un campo magnético que atrae células e hidrogel que contiene nanopartículas de MIO. Los patrones de campos magnéticos que pueden producir efectos similares también se pueden producir con patrones de material magnético permanente, tal como imanes permanentes en grandes cantidades, patrones sobre cinta de grabación magnética, o patrones de materiales tales como los usados en los discos duros informáticos de almacenamiento de datos magnético.

La Figura 16 ilustra un primer plano de los patrones litográficos de muestra para alambres que llevan corriente para producir patrones de superficie de células, según la descripción. La barra de escala de 50 μm solamente se aplica a las 3 formas de la parte superior.

La Figura 17 ilustra cálculos de fuerza magnética de muestra, aplicables a la descripción. El perfil de fuerza se puede normalizar al momento dipolo del imán y cuadrado de la corriente para una sección transversal a través de dos alambres que llevan corriente paralelos 1 micra por encima de los alambres. El hidrogel que contiene MIO y las células pueden ser atraídos a posiciones donde la fuerza cruza el cero.

La Figura 18 ilustra la construcción de microdispositivo prototipo para alambres litográficamente modelado, según la descripción. Los alambres que llevan corriente se pueden modelar usando técnicas estándar de litografía, seguido por el electrochapado de oro. Se puede usar o bien un fotorresistente negativo o positivo, cuando el patrón resultante es el inverso de la máscara usada. Mostrado en el lado derecho de la figura están los ejemplos de la máscara de litografía. En el lado derecho es un portaobjetos de microscopio de zafiro con los alambres de oro
60 litográficamente modelado. En la parte superior del portaobjetos está una matriz de pocillos de muestra de plástico. El zafiro puede ser una buena elección de sustrato debido a que es ópticamente transparente, eléctricamente

aislado, térmicamente conductivo, ópticamente se puede pulir, y no es susceptible a fractura tras calentamiento local.

La Figura 19 ilustra una instalación de microscopio y dispositivo de microchip útil en la descripción. El lado izquierdo muestra el microscopio con un microchip. El lado derecho muestra un primer plano del chip, mostrando las conexiones eléctricas y los pocillos de muestra de plástico.

La Figura 20 ilustra la manipulación y el diseño de superficie de células madre neurales con microdispositivo de diseño, según la descripción. Las células madre neurales de murina C17.2 se pueden cultivar en hidrogel durante 48 h. La Figura 20A ilustra no corriente a aplicar. La Figura 20B ilustra agregaciones celulares desplazadas hacia el patrón de alambre de Au cuando se aplica una corriente 4A. Aquí, los alambres están por debajo del plástico que forma el recipiente para las células y los medios, así las células no están en contacto con los alambres. Las células en los pocillos eran aún viables 48 h después de que se realizara el experimento.

La descripción puede utilizar los mismos sistemas y métodos para modelar sobre un Au-MIO-fago superficial sin células, como se ilustra en las Figuras 21 a 24.

La Figura 21 ilustra la formación de patrones de Au-MIO-fago usando alambres que llevan corriente para generar un campo magnético modelado. Se pueden generar patrones similares con imanes permanentes, tales como sobre la cinta de grabación magnética, o con material magnético sólido, tal como se usa en los discos duros informáticos. También se pueden formar y manipular patrones levitados. Un gradiente de Au-MIO-fago también se pueden formar mediante la creación de un gradiente en el campo magnético, como se ilustra en la Figura 22.

La Figura 21 ilustra la manipulación y el diseño de material Au-MIO-fago sin células, demostrado con microdispositivo de diseño, según la descripción. El diseño de hidrogel se puede generar aplicando corriente a los alambres de Au litográficamente modelado. Esto puede mover el hidrogel hacia los máximos del campo magnético que se localizan entre los alambres o en el centro de los bucles. Tanto las Figuras 21A y 21B ilustran las secuencias de no corriente a aplicar en el primer fotograma, y la corriente incrementada hasta 4,0 A durante un intervalo de 45 s, lo cual produce patrones del hidrogel mostrados en el patrón más a la derecha.

Según la descripción, el campo puede tener una fuerza y gradiente de fuerza suficiente para levantar la célula de la superficie del fondo del recipiente de cultivo, o recoger las células en suspensión, o empujar las células a la superficie, dependiendo del efecto deseado. Las células se pueden levitar en la masa de los medios o se pueden traer a la interfaz aire líquido donde la tensión superficial evitará que las células dejen el medio líquido. Para controlar la posición de las células, la cantidad de material magnético por célula y la fuerza y el gradiente del campo magnético puede ser suficiente para superar otras fuerzas sobre las células que alterarían el diseño. Esto se puede conseguir durante un gran intervalo de parámetros previstos por fórmulas estándar, pero los parámetros pueden depender del aspecto específico de la descripción. Por ejemplo, para la superficie o el diseño levitado y la manipulación de células, al menos se necesita 0,01 pg/célula de magnetita. Se puede usar más material magnético, hasta 100 µg/célula, que puede producir más fuerza. Material con mayor o menor magnetización necesitaría mayor o menor concentraciones respectivamente. Campos magnéticos típicos en el orden de 1G a 10^5 G y gradientes de campo de 0,01 G/cm a 10^5 G se puede usar dependiendo de la aplicación. Se puede hacer experimentación simple para encontrar las condiciones óptimas.

La Figura 22 ilustra una generación de gradiente de Au-MIO-fago usando un gradiente de campo magnético, según la descripción, mostrado con fotomicrografía de campo claro (luz transmitida) (barra de escala, 20 µm). Esta imagen muestra un cambio en la luz transmitida resultante del gradiente de hidrogel (mayor densidad en la región oscura, indicado por una flecha por debajo de la figura) generado a partir de la colocación de un imán permanente próximo al micropocillo en que la solución de nanopartículas Au-FeO se añadió a la solución de fago como parte de la síntesis de hidrogel.

Las células pueden concentrarse espontáneamente en regiones de alta concentración de hidrogel, así el diseño del hidrogel primero puede proporcionar otro modo de modelar las células, como se ilustra en la Figura 23. El hidrogel se puede formar con diferentes tipos de fago sin alterar significativamente la capacidad de formar un hidrogel o incorporar nanopartículas magnéticas. El fago se puede diseñar con receptores específicos a célula que preferentemente se unen a las células, tal como el fago que expresa el péptido RGD-4C. Un patrón de hidrogel Au-MIO-RGD-4C, formado en un aspecto con dos imanes permanentes por debajo del pocillo de cultivo, puede conducir a un diseño de células de Melanoma (B16) incubadas durante 16 horas (parte superior, mediado por receptor). El fago que expresa el péptido fd-tet no se puede unir a las células tan fuertemente, así el hidrogel Au-MIO-fd-tet puede servir como control (parte inferior, control). Se pueden colocar dos imanes permanentes bajo cada pocillo, con campos magnéticos apuntados a direcciones opuestas, de manera que así los imanes se repelen uno a otro. El hidrogel y las nanopartículas se pueden captar y/o unir a las células a través del motivo peptídico de unión a integrina, el cual media la adhesión celular, presentado sobre el fago. Esto puede conducir a más de una concentración de células en áreas de fuerte campo cerca de cada imán (indicado por el hueco de células entre los imanes). Por el contrario, las células de hidrogel control (parte inferior) pueden cubrir el micropocillo entero.

La Figura 23 ilustra el diseño de célula dirigido a receptor usando el diseño por campo magnético de hidrogeles, según la descripción. Un hidrogel se puede formar con diferentes tipos de fago sin alterar significativamente la capacidad de formar un hidrogel o incorporar nanopartículas magnéticas. El fago se puede diseñar con receptores específicos a célula que preferentemente se unen a células, tales como el fago que expresa el péptido RGD-4C. Un patrón de hidrogel Au-MIO-RGD-4C formado en este caso con dos imanes permanentes por debajo del pocillo de cultivo pueden conducir a un diseño de células de Melanoma (B16) incubadas durante 16 horas (parte superior, mediado por receptor). El fago que expresa el péptido fd-tet no se puede unir a células tan fuertemente, así el hidrogel Au-MIO-fd-tet puede servir como control (parte inferior, control). Se colocaron dos imanes permanentes bajo cada pocillo, con campos magnéticos apuntados a direcciones opuestas (imanes repelidos uno a otro). El sistema en el que el hidrogel y las nanopartículas se captan y/o unen a células a través del motivo peptídico de unión a integrina, el cual medía la adhesión celular, presentado sobre el fago conduce a más de una concentración de células en áreas de fuerte campo cerca de cada imán (indicado por el hueco de células entre los imanes). Por el contrario, las células de hidrogel control (parte inferior) cubrían el micropocillo entero.

Debido a que el fago se puede modificar para servir como un vector de administración génica, el diseño del hidrogel puede conducir a transfección modelada de material genético, como se ilustra en la Figura 24. Se puede usar el fago de virus adeno-asociado (AAVP)³⁸ para formar Au-MIO-AAVP para herramientas de administración génica superiores. La combinación de AAVP con hidrogel de fago puede ser una herramienta poderosa para permitir el destino de las nanopartículas. Además, la combinación puede proporcionar indicaciones de donde tiene lugar la traducción génica y, para la combinación de formación de imagen multimodal, guiado magnético y administración de gen/ARN. Las células en la región con mayor concentración de hidrogel pueden mostrar un mayor nivel de transfección, produciendo una expresión modelada del gen. Este planteamiento también se puede trasladar a la administración de ARN pequeño guiado hacia herramientas de silenciamiento génico. Esta capacidad de administración génica también se puede incorporar en cualquiera de los métodos de diseño celular ya discutido.

La Figura 24 ilustra transfección génica guiada por magnetismo usando Au-MIO-AAVP, según la descripción. Aquí, las células KS1767 se incuban con Au-MIO AAVP-RGD-4C. El Au-MIO AAVP-RGD-4C (AAVP, fago de virus adeno-asociado;)³⁸ puede integrar propiedades dirigidas, y transducción génica eficiente de vectores basados en fago con guiado magnético de hidrogeles como una herramienta de administración génica superior. El panel izquierdo es una imagen de campo claro mientras que el derecho es imagen de fluorescencia de células que expresan GFP. Dentro del mismo micropocillo, la línea indica el límite que divide una región en la que un imán ha concentrado la nanopartícula magnética que lleva Au-MIO AAVP-RGD-4C (imán permanente colocado bajo el pocillo), y la región en la que hay campo magnético inferior y no concentración. Las células en la región con mayor concentración de hidrogel pueden mostrar niveles de transfección que son significativamente mayores (aproximadamente 6x).

Algunos aspectos pueden proporcionar resultados que se comparan favorablemente con los métodos tradicionales. Por ejemplo, cultivar por levitación magnética puede proporcionar resultados favorables cuando se compara con métodos de cultivo celular 3D establecidos. Un producto matriz de cultivo 3D común es Matrigel®, comercialmente disponible de BD, Inc. Matrigel generalmente consiste en matriz de membrana base purificada, está derivada de ratón, y se considera el "patrón dorado" para la agregación celular 3D⁷. Las células dispersadas en Matrigel solamente pueden formar estructuras multicelular mayores con interacciones célula-célula significativas después de que haya pasado el tiempo para la suficiente migración y división celular. La matriz Matrigel también puede producir altos niveles de difracción, dispersión, opacidad, y autofluorescencia, que son dificultades reconocidas en muchos modelos de cultivo celular 3D establecidos basados en matrices extracelulares y geles/andamios poliméricos.^{2,59} Matrigel puede presentar limitaciones adicionales, incluyendo la necesidad de condiciones libre de suero, que no son deseables para cultivar la mayoría de las células, y complementos de factor de crecimiento caros. El tejido cultivado en Matrigel no se puede introducir en seres humanos debido a que las proteínas de ratón pueden suscitar una respuesta inmune. Finalmente, no hay potencial para manipulación espacial o temporal de células usando Matrigel, mientras, como se muestra más adelante, esto es sencillo con levitación magnética.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende células, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro o unidas sobre o incorporadas en las células, de las cuales al menos un tipo es magnética, y un campo magnético creado por alambres que llevan corriente y/o imanes permanentes que aplican una fuerza a al menos una de la pluralidad de nanopartículas.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende células, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro o unidas sobre o incorporadas en las células, de las cuales al menos un tipo es magnética, y un campo magnético creado por alambres que llevan corriente o imanes permanentes que aplican una fuerza a al menos una de la pluralidad de nanopartículas y aleja las células de la superficie para crecer en suspensión en medios líquidos o en una interfaz gas-líquido. A continuación, las células se dejaron crecer mientras estaban en suspensión.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende células, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro o unidas sobre o incorporadas en las células, de las cuales al menos un tipo es magnética, y un campo magnético creado por alambres que llevan corriente o imanes permanentes que aplican una fuerza a al menos una de la pluralidad de nanopartículas y aleja las células de la superficie para crecer en suspensión en medio

líquido o en una interfaz gas-líquido. A continuación, las células se dejan crecer mientras están en suspensión, y el campo magnético se altera para traer las células a un lugar específico sobre una superficie, de manera que algunas células se unirán allí. A continuación, el campo se altera para permitir que las células se unan en otro sitio para formar un patrón.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende células, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro o unidas sobre o incorporadas en las células, de las cuales al menos un tipo es magnética, y un campo magnético creado por alambres que llevan corriente o imanes permanentes que aplican una fuerza a al menos una de la pluralidad de nanopartículas y traen las células hacia una superficie para crecer en un patrón especificado.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende fago, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro del fago, y un campo magnético creado por alambres que llevan corriente o imanes permanentes que aplican una fuerza a al menos una de la pluralidad de nanopartículas.

La presente descripción proporciona un sistema que comprende fago, una pluralidad de nanopartículas dispuestas dentro del fago, y uno o más alambres conductivos, en los que al menos una parte de los uno o más alambres está en contacto con el fago.

La presente descripción proporciona un método de fabricación de un material, comprendiendo el método: proporcionar un material que comprende fago, una pluralidad de nanopartículas, y uno o más alambres conductivos, en los que al menos una parte de los uno o más alambres está en contacto con el fago, fluyendo una corriente eléctrica a través de uno o más de los uno o más alambres conductivos para generar un campo magnético, y dejar que el material se altere en respuesta al campo magnético.

La presente descripción proporciona un método para levitación de una pluralidad de células. El método puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender levitación de al menos algunas de la pluralidad de células en el campo magnético, en el que la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas.

La presente descripción también proporciona un método de cultivo de células. El método puede comprender proporcionar una pluralidad de células. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender levitación de al menos algunas de la pluralidad de células en el campo magnético, en el que la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender mantener la levitación durante un tiempo suficiente para permitir el crecimiento celular para formar una agregación.

La presente descripción también proporciona un método de manipulación de células. El método puede comprender proporcionar una primera pluralidad de células. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender la levitación de al menos algunas de la primera pluralidad de células en el campo magnético, en el que la primera pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender variar el campo magnético con el tiempo para manipular al menos una primera porción de la primera pluralidad de células.

La presente descripción también proporciona un método de preparación de nanopartículas. El método puede comprender proporcionar un hidrogel que comprende nanopartículas magnéticas. El método también puede comprender proporcionar un campo magnético. El método también puede comprender someter el hidrogel al campo magnético.

La presente descripción también proporciona un sistema para levitación de una pluralidad de células. El sistema puede comprender un campo magnético. El sistema también puede comprender la pluralidad de células, en el que la pluralidad de células está dispuesta en el campo magnético, y la pluralidad de células comprende nanopartículas magnéticas.

Para facilitar un mejor entendimiento de la presente descripción, se dan los siguientes ejemplos de aspectos específicos. De ninguna manera los siguientes ejemplos se deberían leer para limitar o definir el alcance entero de la descripción.

Ejemplos

Se formó una agregación de hidrogel que contenía nanopartículas magnéticas como sigue. Los hidrogeles se generaron por procedimientos de nanofabricación descritos^{39,40} excepto para la inclusión de nanopartículas de MIO. Una solución de nanopartícula de oro (50±8 nm de diámetro) se preparó después del procedimiento de reducción de citrato común⁷⁰ (relación molar de 0,8:1,0 de citrato de sodio:cloruro de Au(III); Sigma-Aldrich). Se prepararon hidrogeles que contenían MIO mezclando la solución de nanopartícula de oro (Absorbancia óptica_{530 nm}=1,2 a 1,5 unidades) con nanopulvo de MIO (especificado como magnetita, tamaño de partícula polidispersa <50 nm;

estabilizado con un tensioactivo de PVP (polivinil pirrolidona); Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,3 mg/ml. Se preparó una dilución de fago con 10^9 unidades de transducción (UT)/ μ l en agua picopura (H_2O). Finalmente, la solución de fago y la nanopartícula de oro más solución de óxido de hierro se mezclaron con volúmenes iguales y se dejaron reposar durante la noche a 4 °C para la formación de hidrogel. Antes del uso experimental, se demostró que cada sobrenadante estaba libre de nanopartícula como se evidenciaba por las mediciones de extinción de luz en la región visible, los datos indicativos de que todas las nanopartículas de metal se incorporaron dentro del hidrogel resultante.

Las células cultivadas en hidrogeles que contenían MIO se sometieron a levitación magnéticamente como sigue. Las células unidas a superficie (crecidas a aproximadamente 80 % de confluencia) se trataron con 1 μ l de hidrogel por 1 cm^2 de área superficial disponible para cultivar células (tamaño de matraz de cultivo) y se incubaron durante la noche. Las células tratadas se despegaron por tripsina y EDTA. La tripsina se separó por centrifugación. Las células se colocaron en una placa Petri de cultivo tisular.^{39,40} Una tapa superior con un imán de neodimio unido se puso inmediatamente en el sitio. Las líneas celulares y los correspondientes medios de cultivo usados eran células LN-229 o U-251MG derivadas de glioblastoma humano (sometidas a transfección con GFP y mCherry) y astrocitos humanos normales (sometidos a transfección con mCherry) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10 % y en DMEM alta glucosa con FBS al 10 % complementado con piruvato de sodio 2 mM, glutamina, penicilina, y estreptomicina. Las células madre neurales murinas C17.2 se cultivaron en DMEM alta glucosa que contenía FBS al 10 % y complementado con piruvato de sodio 2 mM, glutamina, penicilina, y estreptomicina.⁷¹

Como se ilustra en la figura 12, la viabilidad celular y el número de células a usar se aseguraron después de que las células se despegaran. Las células se examinaron para viabilidad con exclusión de azul de tripano y se recomptaron con un hemocitómetro estándar. En este mismo experimento, la mitad de la población celular (aproximadamente 3×10^4) se transfirió para sembrar una muestra unida a superficie 2D, y la otra mitad se sembró para formar una agregación levitada 3D. Finalmente, el número de células en la estructura multicelular levitada se estimó dividiendo el volumen estimado de la estructura (a partir de su forma y tamaño) por el volumen promedio de una célula única (aproximadamente 1,0 nl).

La Figura 1 ilustra las Imágenes por Resonancia Magnética, las cuales se adquirieron con un instrumento de IRM Bruker Biospec de 40 cm, 4,7 T. Los hidrogeles se colocaron en un tubo cónico de plástico de 12 ml para realizar la imagen.

Como se ilustra en las Figuras 4, 7, 8, 12, 13, 14, 15, Bosc, NHA (astrocitos humanos normales) y las siguientes líneas celulares HGBM humanas: LN229 y U521 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal de ternera al 10 % (FCS). Se describieron las transfecciones y las infecciones retrovíricas. La m-cherry y eGFP en los vectores retrovíricos pCXb y pCXp, respectivamente, se introdujeron por transfección en células Bosc para producir retrovirus que contenían sobrenadantes que se recogieron 48 h después de la transfección y se usaron para la infección de las células NHA, NSC y GBM como se describió previamente. Las células se trataron y mantuvieron en medios de selección 48 h después de la infección: blasticidina (mCherry) o puomicina (eGFP) y expresaron la proteína fluorescente de una manera estable.

Las agregaciones multicelulares de células de glioblastoma humano se fijaron en PBS 10 mM que contenía glutaraldehído al 1 % después de 24 h y 8 d de levitación magnética. Estas estructuras, a continuación, se colocaron en una rejilla de malla de níquel previamente revestidas con Formvar y evaporado con carbono se hicieron flotar sobre gotas de poli-L-lisina al 0,1 % (Sigma Diagnostics) sobre parafilm durante 5 min. La solución en exceso se eliminó de la rejilla tocando con cuidado el borde de la rejilla sobre el papel de filtro. Las rejillas no se dejaron secar completamente en ninguna de las etapas. Las rejillas se hicieron flotar sobre gotas de muestra sobre parafilm durante 1 h. El fluido en exceso se eliminó y las rejillas, a continuación, se hicieron flotar sobre gotas de BSA al 0,02 % que contenía molibdato de amonio al 1 % en agua destilada (pH 7,0) durante 1 min. El fluido en exceso se eliminó, y las rejillas se dejaron secar durante la noche. Las imágenes por microscopía electrónica de transmisión se capturaron por un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, JEOL) fijado con un sistema de cámara dispositivo de carga acoplada digital AMT Advantage (Deben UK limited, Suffolk, UK).

Referencias

- Polak, J. M.; Mantalaris, S., "Stem Cells Bioprocessing: An Important Milestone to Move Regenerative Medicine Research Into the Clinical Arena". *Pediatr. Res.* 2008, 63, (5), 461-466.
- Cukierman, E.; Pankov, R.; Stevens, D. R.; Yamada, K. M., "Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension". *Science* 2001, 294, (5547), 1.708-1.712.
- Atala, A., "Advances in Tissue and Organ Replacement". *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2008, 3, (1), 21-31.
- Abbott, A., "Biology's new dimension". *Nature* 2003, 424, 870-872.
- Kim, J. B.; Stein, R.; O'Hare, M. J., "Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer - a review". *Breast Cancer Res. Treat.* 2004, 85, (3), 281-291.
- Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K., "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, (10), 839-845.

7. Prestwich, G. D., "Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: A pragmatic approach". *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, (6), 1.370-1.383.
8. Wang, R.; Xu, J.; Juliette, L.; Castilleja, A.; Love, J.; Sung, S. Y.; Zhau, H. E.; Goodwin, T. J.; Chung, L. W., "Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone". *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, (5), 353-364.
9. Boudreau, N.; Weaver, V., "Forcing the Third Dimension". *Cell* 2006, 125, (3), 429-431.
10. Atala, A., "Engineering tissues, organs and cells". *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007, 1, (2), 83-96.
11. Griffith, L. G.; Swartz, M. A., "Capturing complex 3D tissue physiology in vitro". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, (3), 211-224.
12. Friedrich, M. J., "Studying Cancer in 3 Dimensions: 3-D Models Foster New Insights Into Tumorigenesis". *JAMA* 2003, 290, (15), 1.977-1.979.
13. Souza, G.; Arap, W.; Pasqualini, R. "Method and Compositions Related to Phage-Nanoparticle Assemblies". 2006.
14. Ito, A.; Takizawa, Y.; Honda, H.; Hata, K.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T., "Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells". *Tissue Eng.* 2004, 10, (5-6), 833-40.
15. Ito, A.; Ino, K.; Hayashida, M.; Kobayashi, T.; Matsunuma, H.; Kagami, H.; Ueda, M.; Honda, H., "Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force". *Tissue Eng.* 2005, 11, (9-10), 1.553-61.
16. Ito, A.; Hayashida, M.; Honda, H.; Hata, K.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T., "Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force". *Tissue Eng.* 2004, 10, (5-6), 873-80.
17. Ito, A.; Hibino, E.; Kobayashi, C.; Terasaki, H.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T.; Honda, H., "Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force". *Tissue Eng.* 2005, 11, (3-4), 489-96.
18. Srouji, S.; Kizhner, T.; Livne, E., "3D scaffolds for bone marrow stem cell support in bone repair". *Regen. Med.* 2006, 1, (4), 519-28.
19. Even-Ram, S.; Yamada, K. M., "Cell migration in 3D matrix". *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17, (5), 524-32.
20. Ng, C. P.; Pun, S. H., "A perfusable 3D cell-matrix tissue culture chamber for in situ evaluation of nanoparticle vehicle penetration and transport". *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 99, (6), 1.490-501.
21. Lin, A. Y.; Ai, Z.; Lee, S.-C.; Bajcsy, P.; Pe'er, J.; Leach, L.; Maniotis, A. J.; Folberg, R., "Comparing Vasculogenic Mimicry With Endothelial Cell-lined Vessels: Techniques for 3D Reconstruction and Quantitative Analysis of Tissue Components from Archival Paraffin Blocks". *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2007, 15, (1), 113-9.
22. Zhang, S.; Gelain, F.; Zhao, X., "Designer selfassembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures". *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, (5), 413-20.
23. Decaestecker, C.; Debeir, O.; Van Ham, P.; Kiss, R., "Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration". *Med. Res. Rev.* 2007, 27, (2), 149-76.
24. Schindler, M.; Nur-E-Kamal, A.; Ahmed, I.; Kamal, J.; Liu, H.-Y.; Amor, N.; Ponery, A. S.; Crockett, D. P.; Grafe, T. H.; Chung, H. Y.; Weik, T.; Jones, E.; Meiners, S., "Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine". *Cell Biochem. Biophys.* 2006, 45, (2), 215-227.
25. Pankhurst, Q.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J., "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine". *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003, 36, R167-R181.
26. Ino, K.; Ito, A.; Honda, H., "Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force". *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97, (5), 1309-1317.
27. Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T., "Medical application of functionalized magnetic nanoparticles". *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100, (1), 1-11.
28. Dobson, J., "Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles". *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, (3), 139-143.
29. Au, C.; Mutkus, L.; Dobson, A.; Riffle, J.; Lalli, J.; Aschner, M., "Effects of Nanoparticles on the Adhesion and Cell Viability on Astrocytes". *Biol. Trace Elem. Res.* 2007, 120, (1-3), 248-256.
30. Dobson, J.; Cartmell, S. H.; Keramane, A.; El Haj, A. J., "Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening". *IEEE Trans. Nanobioscience* 2006, 5, (3), 173-7.
31. Hautot, D.; Pankhurst, Q. A.; Morris, C. M.; Curtis, A.; Burn, J.; Dobson, J., "Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients". *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1772, (1), 21-25.
32. Coleman, C. B.; Gonzalez-Villalobos, R. A.; Allen, P. L.; Johanson, K.; Guevorkian, K.; Valles, J. M.; Hammond, T. G., "Diamagnetic levitation changes growth, cell cycle, and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98, (4), 854-863.
33. Winkleman, A.; Gudiksen, K. L.; Ryan, D.; Whitesides, G. M.; Greenfield, D.; Prentiss, M., "A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer". *Appl. Phys. Lett.* 2004, 85, (12), 2.411-2.413.
34. Felder, R. A.; Gildea, J. J. "Automated Cell Culture System and Process". 2003.
35. Becker, J. L.; Coffin, S. B. "Magnetic Three-Dimensional Cell Culture Apparatus and Method". 2003.
36. Gillette, B. M.; Jensen, J. A.; Tang, B.; Yang, G. J.; Bazargan-Lari, A.; Zhong, M.; Sia, S. K., "In situ collagen assembly for integrating microfabricated three-dimensional cell-seeded matrices". *Nat. Mater.* 2008, 7, (8), 636-

40.

37. Lee, J.; Cuddihy, M. J.; Kotov, N. A., "Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art". *Tissue Eng. Part B* 2008, 14, (1), 61-86.

38. Hajitou, A.; Trepel, M.; Lilley, C. E.; Soghomonyan, S.; Alauddin, M. M.; Marini III, F. C.; Restel, B. H.; Ozawa, M. G.; Moya, C. A.; Rangel, R.; Sun, Y.; Zaoui, K.; Schmidt, M.; von Kalle, C.; Weitzman, M. D.; Gelovani, J. G.; Pasqualini, R.; Arap, W., "A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging". *Cell* 2006, 125, (2), 385-98.

39. Souza, G. R.; Christianson, D. R.; Staquicini, F. I.; Ozawa, M. G.; Snyder, E. Y.; Sidman, R. L.; Miller, J. H.; Arap, W.; Pasqualini, R., "Networks of Gold Nanoparticles and Bacteriophage as Biological Sensors and Cell-Targeting Agents". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103, (5), 1.215-1.220.

40. Souza, G. R.; Yonel-Gumruk, E.; Fan, D.; Easley, J.; Rangel, R.; Guzman-Rojas, L.; Miller, J. H.; Arap, W.; Pasqualini, R., "Bottom-Up Assembly of Hydrogels from Bacteriophage and Au Nanoparticles: The Effect of Cis- and Trans-Acting Factors". *PLoS ONE* 2008, 3, (5), e2242.

41. Illés, E.; Tombácz, E., "The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles". *J. Colloid Interface Sci.* 2006, 295, (1), 115-123.

42. Wan, X.; Li, Z.; Lubkin, S. R., "Mechanics of mesenchymal contribution to clefting force in branching morphogenesis". *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2008, 7, (5), 417-426.

43. Rosines, E.; Schmidt, H. J.; Nigam, S. K., "The Effect of Hyaluronic Acid Size and Concentration on Branching Morphogenesis and Tubule Differentiation in Developing Kidney Culture Systems: Potential Applications to Engineering of Renal Tissues". *Biomaterials* 2007, 28, (32), 4806-4817.

44. Warheit, D. B.; Sayes, C. M.; Reed, K. L.; Swain, K. A., "Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks". *Pharmacol. Ther.* 2008, 120, (1), 35-42.

45. Teeguarden, J. G.; Hinderliter, P. M.; Orr, G.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G., "Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments". *Toxicol. Sci.* 2007, 95, (2), 300-312.

46. Groneberg, D. A.; Giersig, M.; Welte, T.; Pison, U., "Nanoparticle-Based Diagnosis and Therapy". *Curr. Drug Targets* 2006, 7, (6), 643-648.

47. Kolonin, M. G.; Saha, P. K.; Chan, L.; Pasqualini, R.; Arap, W., "Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue". *Nat. Med.* 2004, 10, (6), 625-632.

48. Barbas III, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J., "Phage Display, A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York, 2001.

49. Wang, X.-B.; Huang, Y.; Gascoyne, P. R. C.; Becker, F. F.; Hölzel, R.; Pethig, R., "Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation". *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1994, 1193, (2), 330-344.

50. Csikász-Nagy, A.; Battogtokh, D.; Chen, K. C.; Novák, B.; Tyson, J. J., "Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation". *Biophys. J.* 2006, 90, (12), 4.361-79.

51. Ofek, G.; Revell, C. M.; Hu, J. C.; Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J.; Athanasiou, K. A., "Matrix development in self-assembly of articular cartilage". *PLoS ONE* 2008, 3, (7), e2795.

52. Marx, U.; Sandig, V., "Drug Testing In Vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology". Wiley-VCH: Weinheim, Alemania, 2007.

53. Chuang, Y.-Y.; Tran, N. L.; Rusk, N.; Nakada, M.; Berens, M. E.; Symons, M., "Role of synaptotagmin 2 in glioma cell migration and invasion". *Cancer Res.* 2004, 64, (22), 8.271-8.275.

54. Kenny, P. A.; Lee, G. Y.; Myers, C. A.; Neve, R. M.; Semeiks, J. R.; Spellman, P. T.; Lorenz, K.; Lee, E. H.; Barcellos-Hoff, M. H.; Petersen, O. W.; Gray, J. W.; Bissell, M. J., "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression". *Mol. Oncol.* 2007, 1, (1), 84-96.

55. Bhowmick, D. A.; Zhuang, Z.; Wait, S. D.; Weil, R. J., "A Functional Polymorphism in the EGF Gene Is Found with Increased Frequency in Glioblastoma Multiforme Patients and Is Associated with More Aggressive Disease". *Cancer Res.* 2004, 64, (4), 1-220-1.223.

56. Nieder, C.; Astner, S. T.; Molls, M.; Grosu, A. L., "Analysis of long-term survivors of glioblastoma multiforme in a single institution with aggressive local retreatment protocol". *Anticancer Res.* 2007, 27, (4C), 2.993-2.996.

57. Balakrishnan, A.; Bleeker, F. E.; Lamba, S.; Rodolfo, M.; Daniotti, M.; Scarpa, A.; van Tilborg, A. A.; Leenstra, S.; Zanon, C.; Bardelli, A., "Novel Somatic and Germline Mutations in Cancer Candidate Genes in Glioblastoma, Melanoma, and Pancreatic Carcinoma". *Cancer Res.* 2007, 67, (8), 3.545-3.550.

58. Sanson, M.; Marcaud, V.; Robin, E.; Valéry, C.; Sturtz, F.; Zalc, B., "Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models". *Cancer Gene Ther.* 2002, 9, (2), 149-155.

59. Yamada, K. M.; Cukierman, E., "Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D". *Cell* 2007, 130, (4), 601-10.

60. Heyneman, A.; Beele, H.; Vanderwee, K.; Defloor, T., "A systematic review of the use of hydrocolloids in the treatment of pressure ulcers". *J. Clin. Nurs.* 2008, 17, (9), 1.164-73.

61. Cui, F. Z.; Tian, W. M.; Hou, S. P.; Xu, Q. Y.; Lee, I. S., "Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006, 17, (12), 1.393-401.

62. Burd, A., "Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care". *Ostomy Wound Manage* 2007, 53, (3), 52-62.

63. Park, H.; Temenoff, J. S.; Tabata, Y.; Caplan, A. I.; Mikos, A. G., "Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering". *Biomaterials* 2007, 28, (21), 3217-27.

64. Mikos, A. G.; Herring, S. W.; Ochareon, P.; Elisseeff, J.; Lu, H. H.; Kandel, R.; Schoen, F. J.; Toner, M.; Mooney, D.; Atala, A.; Van Dyke, M. E.; Kaplan, D.; Vunjak-Novakovic, G., "Engineering Complex Tissues". *Tissue Eng.* 2006, 12, (12), 3.307-3.339.
- 5 65. Ferreira, L. S.; Gerecht, S.; Fuller, J.; Shieh, H. F.; Vunjak-Novakovic, G.; Langer, R., "Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells". *Biomaterials* 2007, 28, (17), 2.706-17.
66. Calvert, P., Materials science. "Printing cells". *Science* 2007, 318, (5848), 208-9.
67. Prieve, D. C.; Alexander, B. M., "Hydrodynamic Measurement of Double-Layer Repulsion Between Colloidal Particle and Flat Plate". *Science* 1986, 231, (4743), 1.269-1.270.
- 10 68. Ramachandran, N.; Hainsworth, E.; Bhullar, B.; Eisenstein, S.; Rosen, B.; Lau, A. Y.; Walter, J. C.; LaBaer, J., "Self-assembling protein microarrays". *Science* 2004, 305, (5680), 86-90.
69. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., "Chemotherapy targeted to tumor vasculature". *Curr. Opin. Oncol.* 1998, 10, (6), 560-5.
- 15 70. Handley, D. A., "Methods for synthesis of colloidal gold. In Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications", Hayat, M. A., Ed. Academic Press: San Diego, 1989; Vol. 1, pp 23-27.
71. Snyder, E. Y.; Deitcher, D. L.; Walsh, C.; ArnoldAldea, S.; Hartweig, E. A.; Cepko, C. L., "Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum". *Cell* 1992, 68, (1), 33-51.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

5 proporcionar un campo magnético;
proporcionar una primera pluralidad de células que comprenden una o más nanopartículas magnéticas dentro de
dichas células; y
levitación de al menos algunas de la primera pluralidad de células en el campo magnético durante un tiempo
suficiente para permitir que al menos algunas de la primera pluralidad de células formen una agregación celular
10 3D.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el campo magnético está al menos parcialmente formado por uno o
más imanes anillo.

15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la agregación celular 3D se forma por crecimiento celular.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el campo magnético está al menos parcialmente formado por uno o
más electroimanes, imanes permanentes, o ambos.

20 5. El método de la reivindicación 1, en el que la primera pluralidad de células comprende más de un tipo celular.

6. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar una capa de alimentación, en el que las al
menos algunas de la primera pluralidad de células se someten a levitación próxima a la capa de alimentación.

25 7. El método de la reivindicación 1, que comprende además introducir las nanopartículas magnéticas a la primera
pluralidad de células.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende además variar el campo magnético con el tiempo para manipular
al menos una primera porción de la primera pluralidad de células.

30 9. El método de la reivindicación 8, que comprende además aproximar la primera porción de la primera pluralidad de
células a una superficie, y, opcionalmente, mantener la primera pluralidad de células en proximidad a la superficie
durante un tiempo suficiente para permitir la adherencia de al menos una segunda porción de la primera pluralidad
de células a la superficie, y, opcionalmente además, en el que la segunda porción de la primera pluralidad de células
35 adheridas a la superficie forman un patrón celular sobre la superficie.

10. El método de la reivindicación 9, que comprende además proporcionar una segunda pluralidad de células que
comprenden una o más nanopartículas magnéticas.

40 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además variar el campo magnético con el tiempo para
manipular la primera pluralidad de células y la segunda pluralidad de células para proporcionar una interacción entre
al menos una segunda porción de la primera pluralidad de células y al menos una tercera porción de la segunda
pluralidad de células.

45 12. El método de la reivindicación 10, que comprende además:

variar el campo magnético con el tiempo para manipular la primera pluralidad de células y la segunda pluralidad
de células para traer al menos una segunda porción de la primera pluralidad de células y al menos una tercera
porción de la segunda pluralidad de células en proximidad y/o contacto físico.

50 13. El método de las reivindicaciones 1 u 8, en el que al menos una de las nanopartículas magnéticas se une a una
célula de la primera pluralidad de células.

14. El método de las reivindicaciones 1 u 8, que comprende además introducir las nanopartículas magnéticas en la
primera pluralidad de células usando un hidrogel.

55 15. El método de las reivindicaciones 1 u 8, que comprende además introducir las nanopartículas magnéticas en la
primera pluralidad de células usando un Au-MIO-fago.

60 16. El método de las reivindicaciones 1 u 8, en el que al menos algunas de la primera pluralidad de células se
someten a levitación en el volumen en grandes cantidades de un líquido.

17. El método de las reivindicaciones 1 u 8, en el que al menos algunas de la primera pluralidad de células se
someten a levitación en una interfaz gas-líquido.

65

18. Un método de cultivo celular 3D que comprende:

- mezclar células con un hidrogel que comprende nanopartículas magnéticas;
- incubar la mezcla hasta que las células absorben las nanopartículas magnéticas;
- 5 levitación de las células en un campo magnético y cultivar las células levitadas para obtener un cultivo celular 3D por levitación.

Figura 1

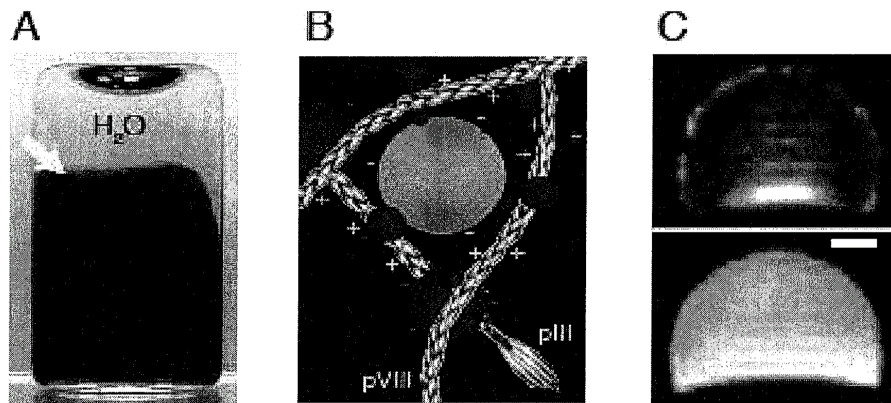


Figura 2

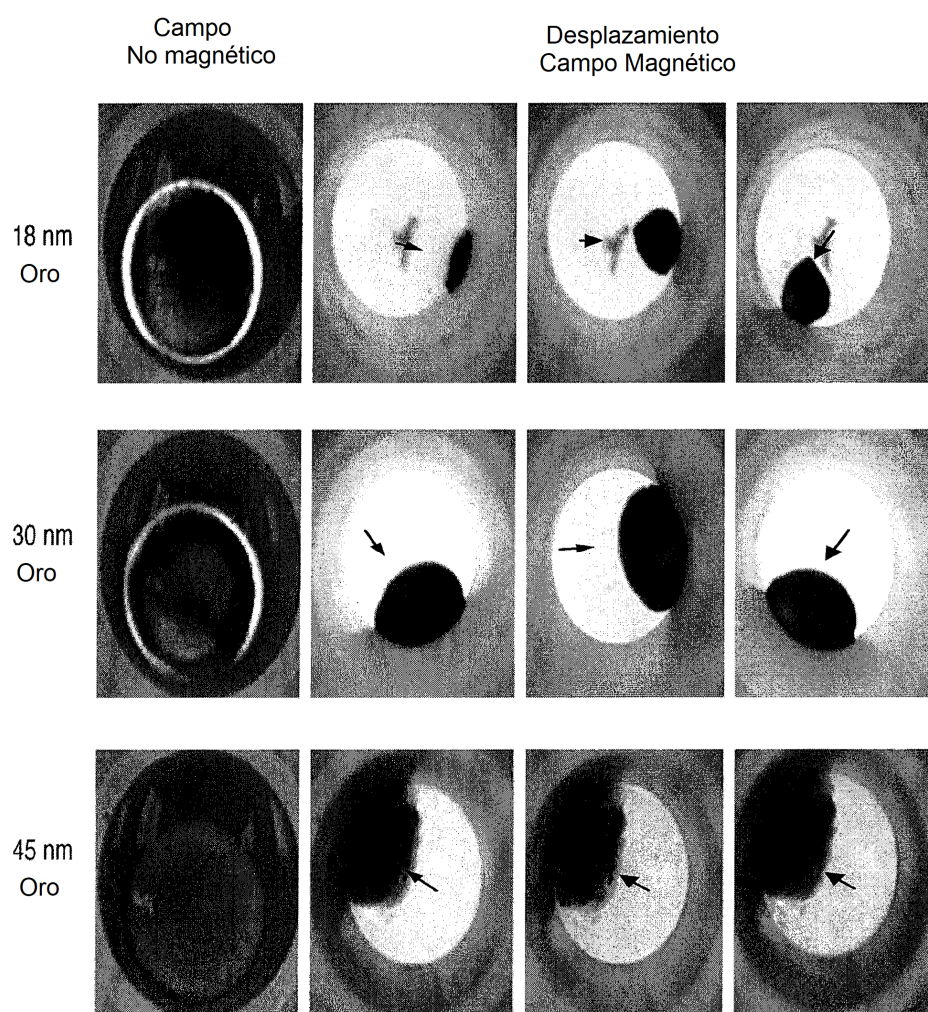


Figura 3

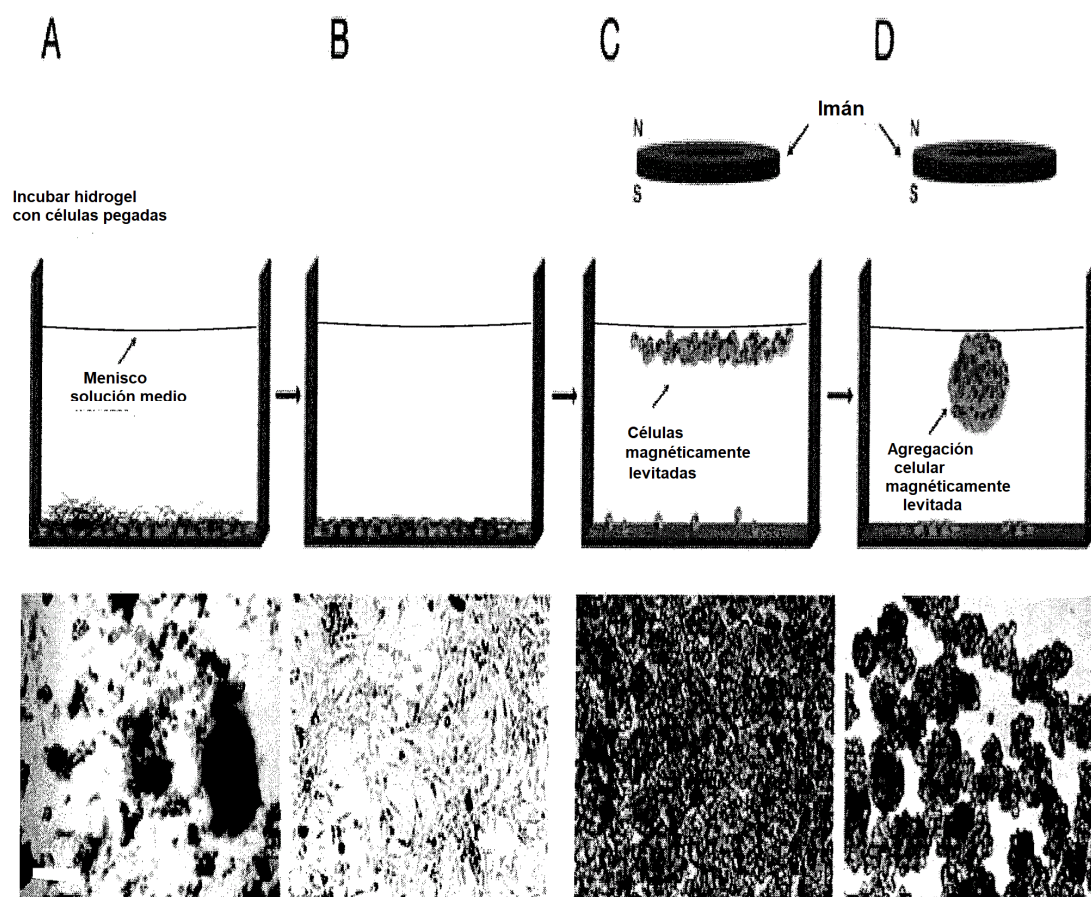


Figura 4

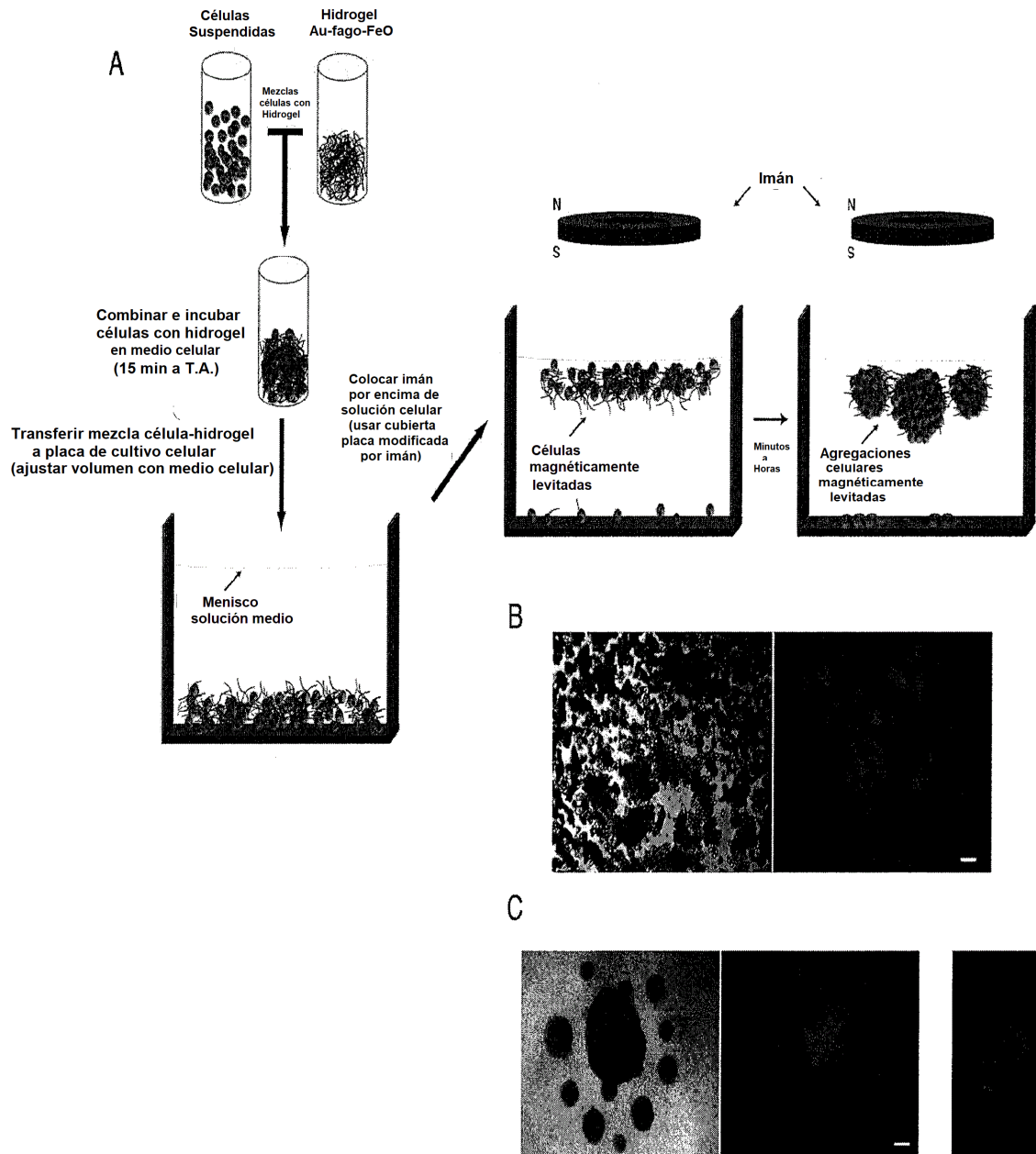


Figura 5

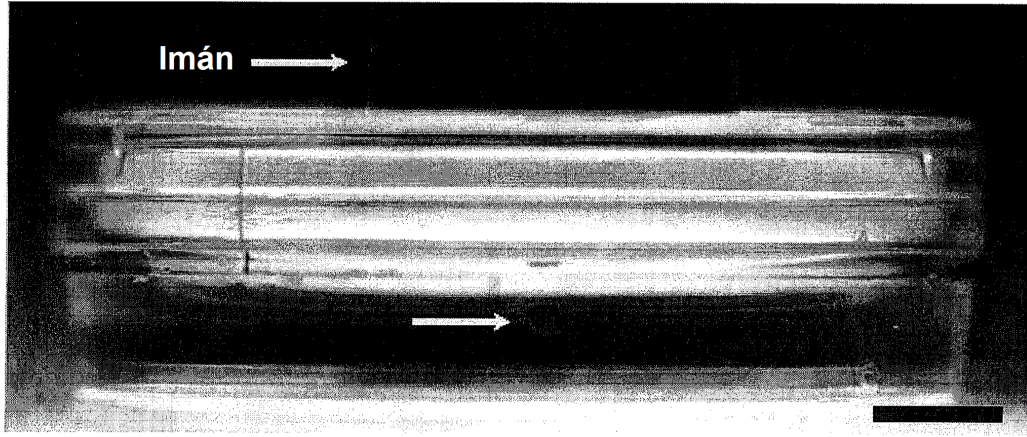


Figura 6

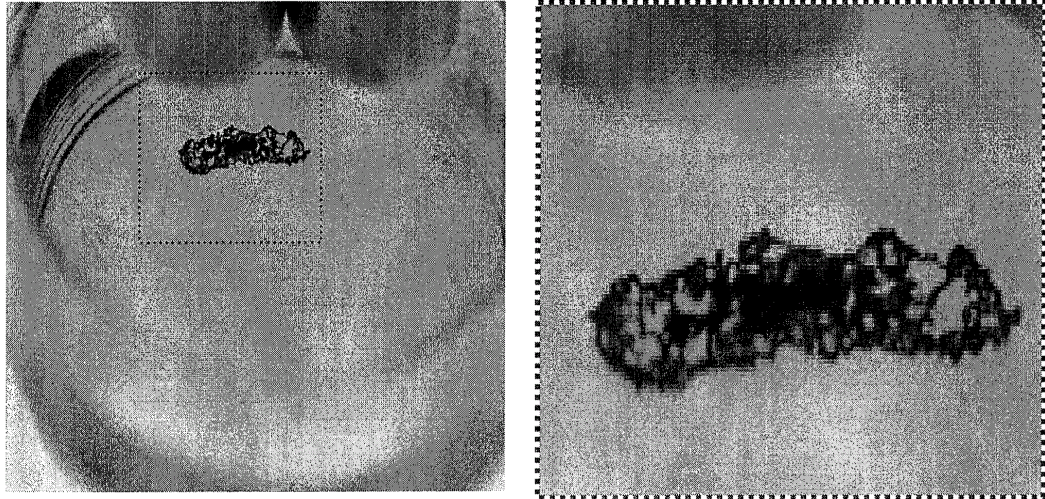
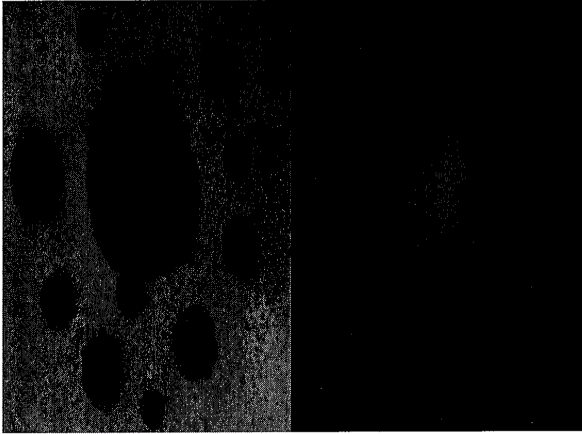


Figura 7

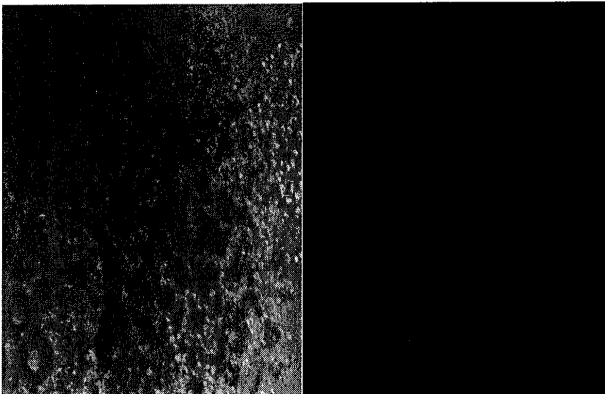
Esferoides de Astrocito humano, $t=36$ horas
Esferoides que levitan magnéticamente



Esferoide de Astrocitos Humanos



Astrocitos Humanos, $t=0$
Células magnéticamente levitadas (NO en el fondo)



***Rojo = mCherry**

Figura 8

Campo claro

Fluorescencia GFP

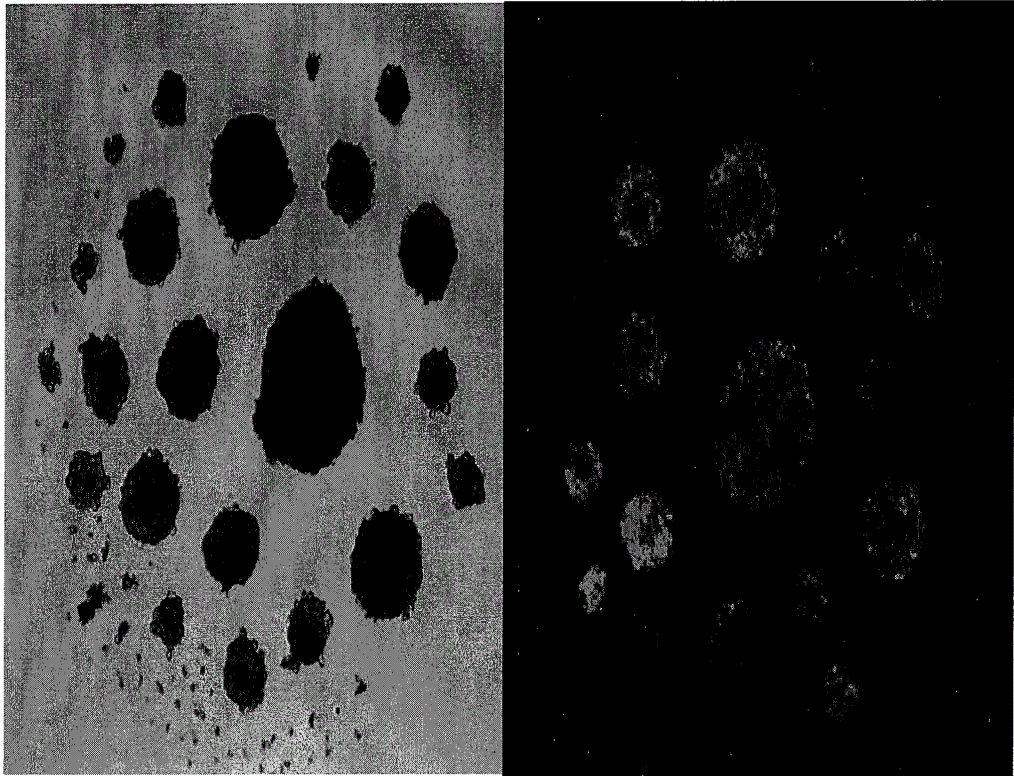


Figura 9

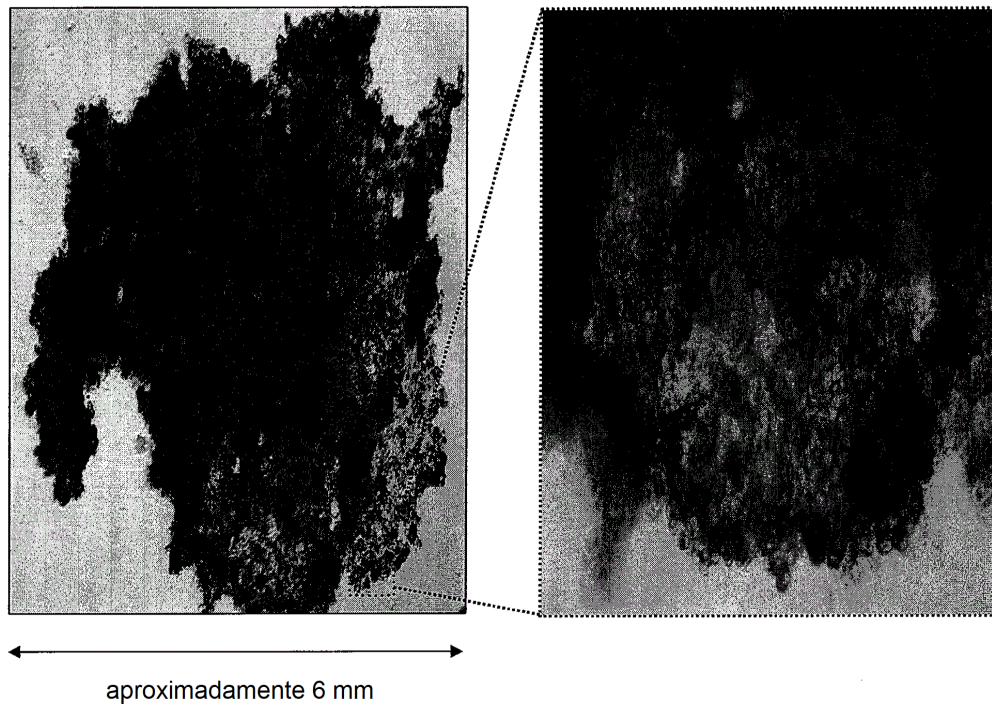


Figura 10

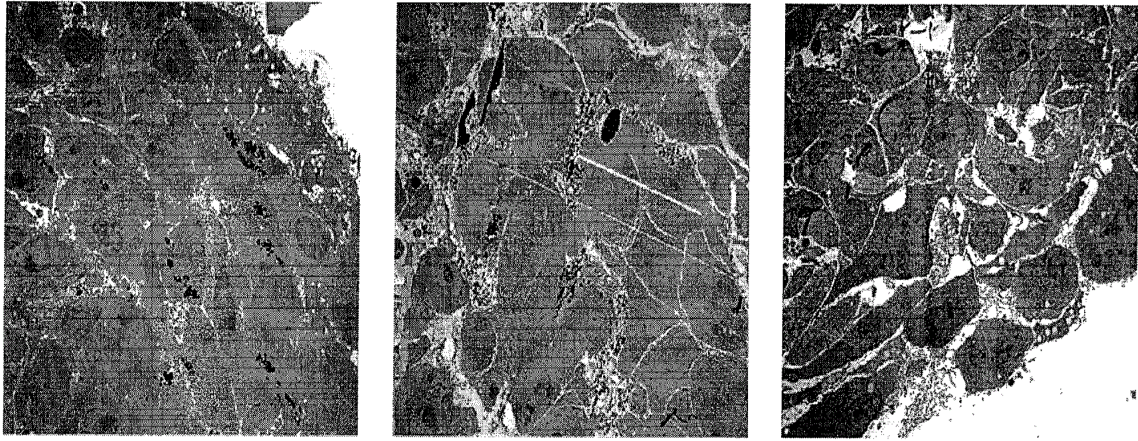


Figura 11

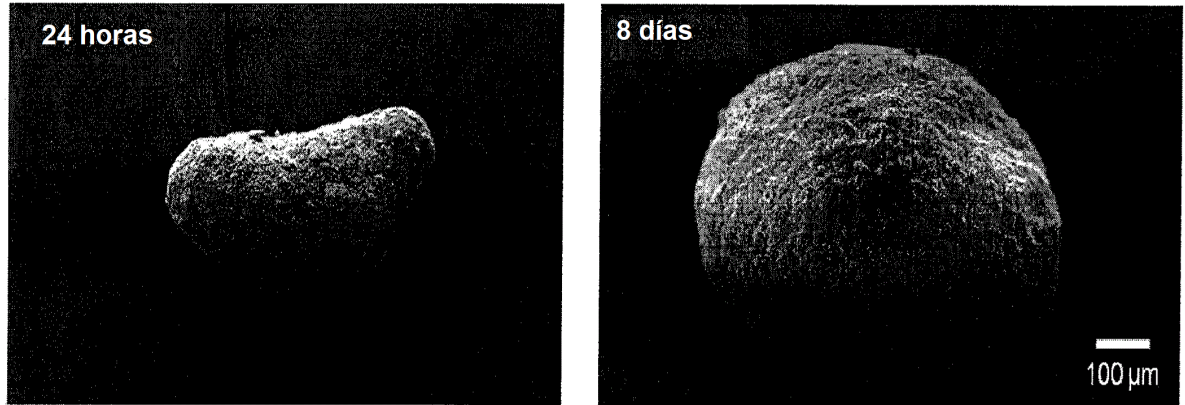


Figura 12

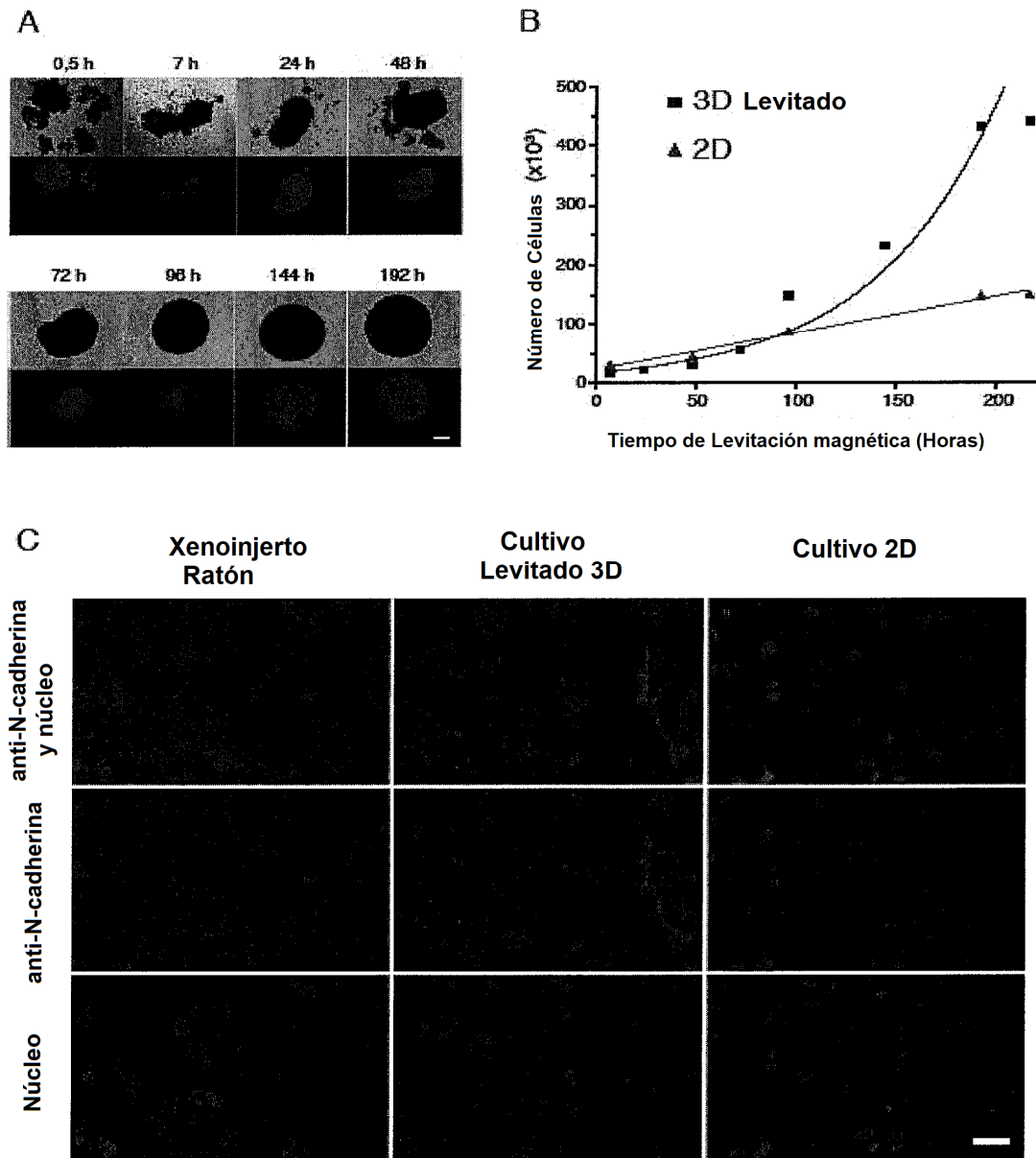


Figura 13

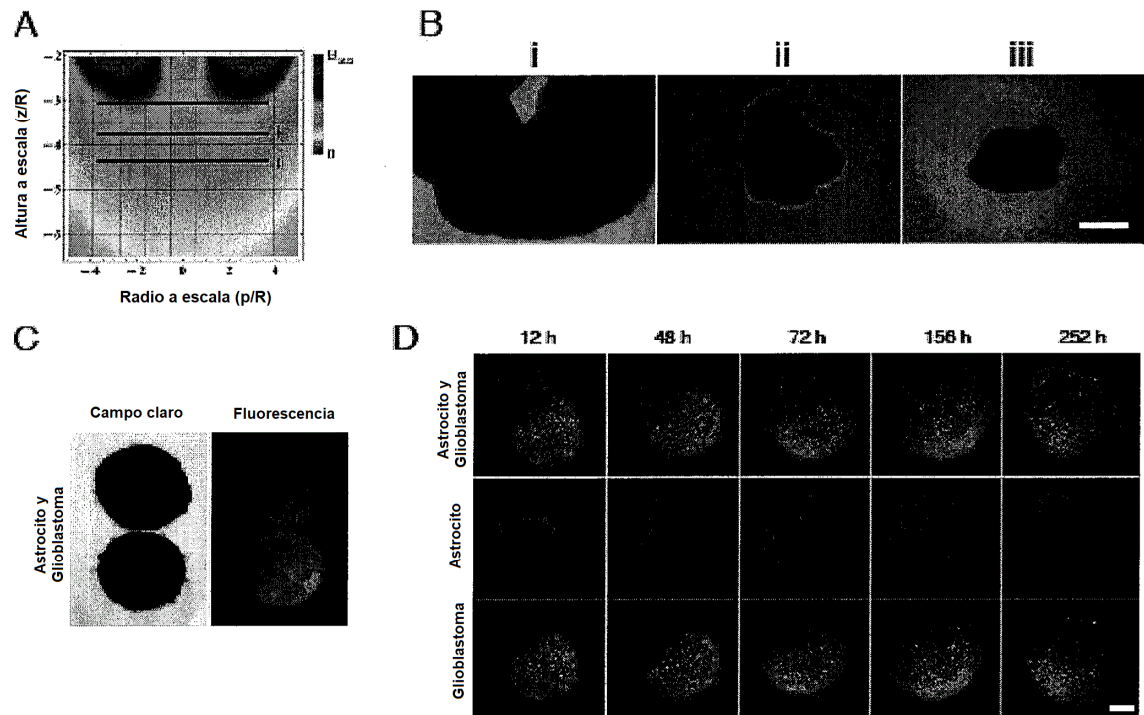


Figura 14

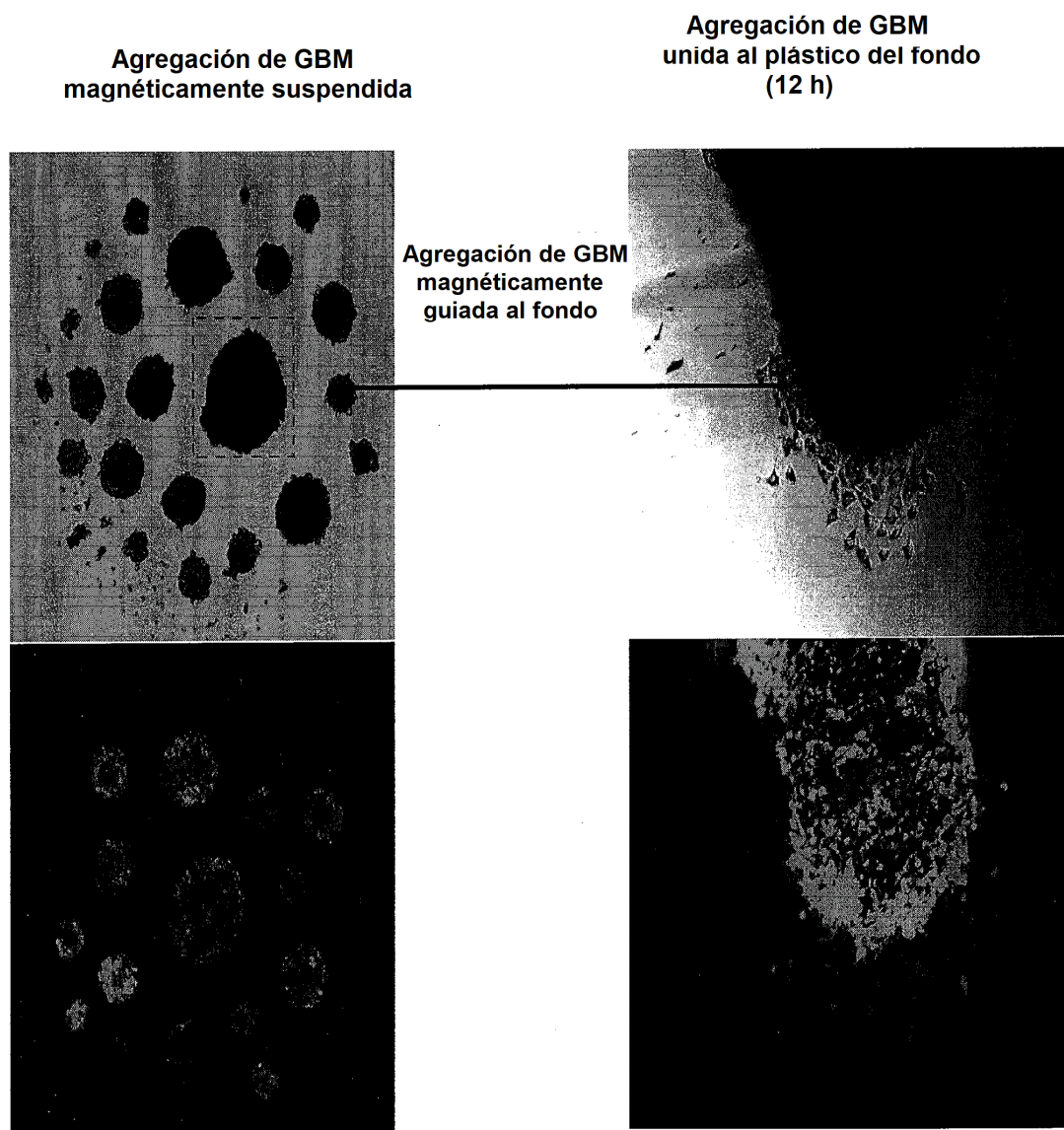


Figura 15

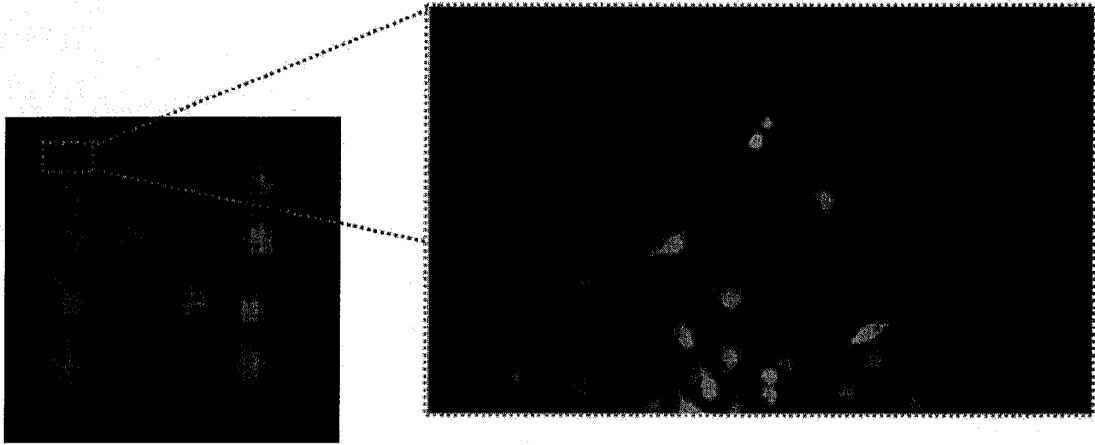


Figura 16

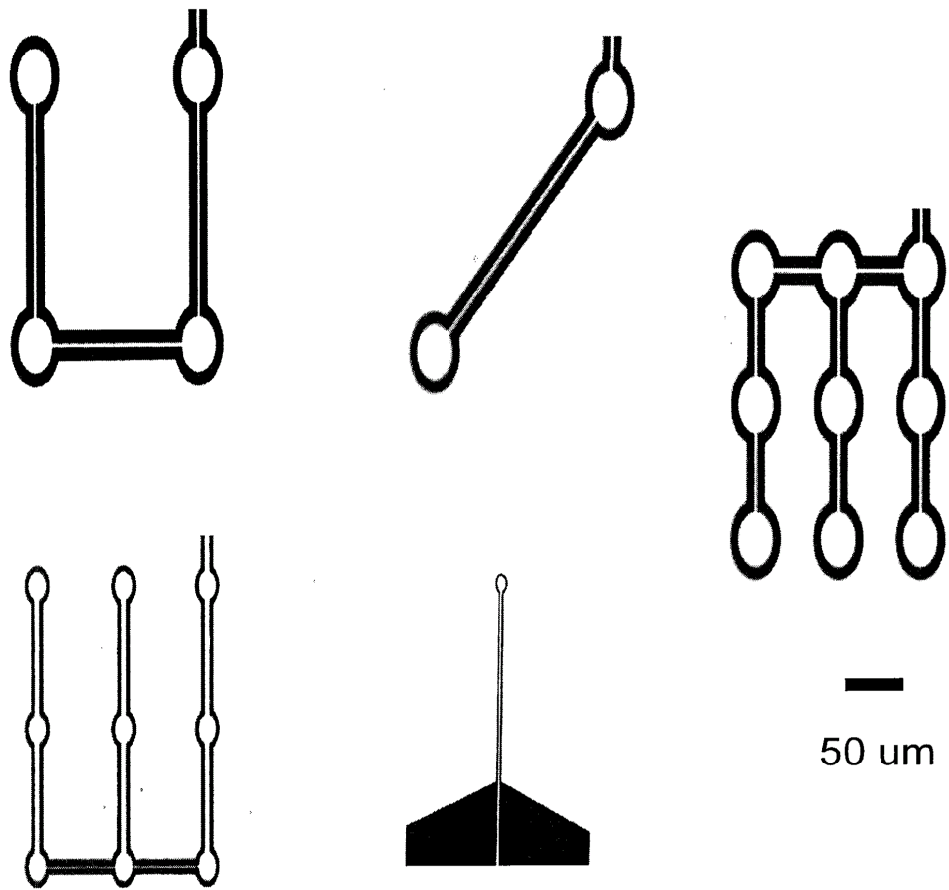


Figura 17

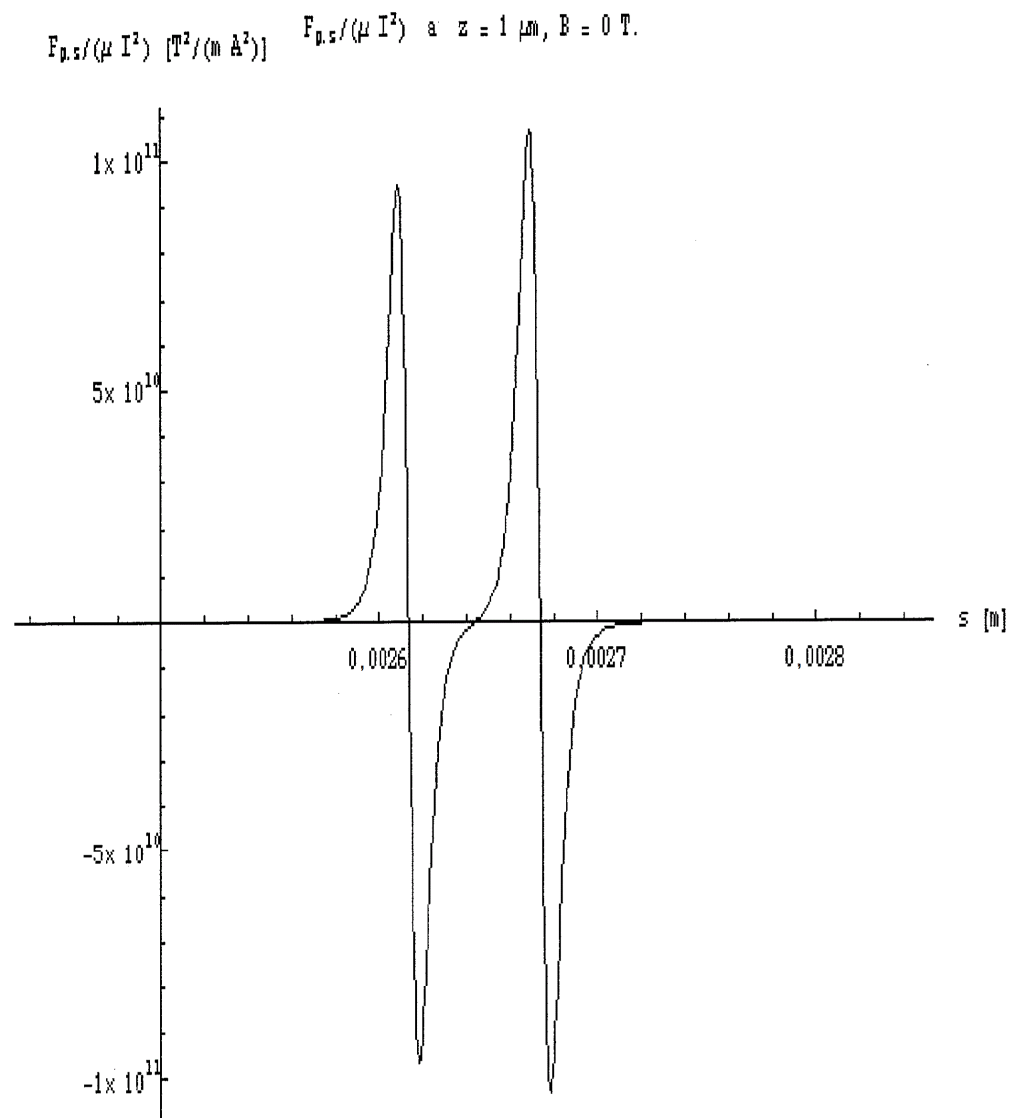


Figura 18

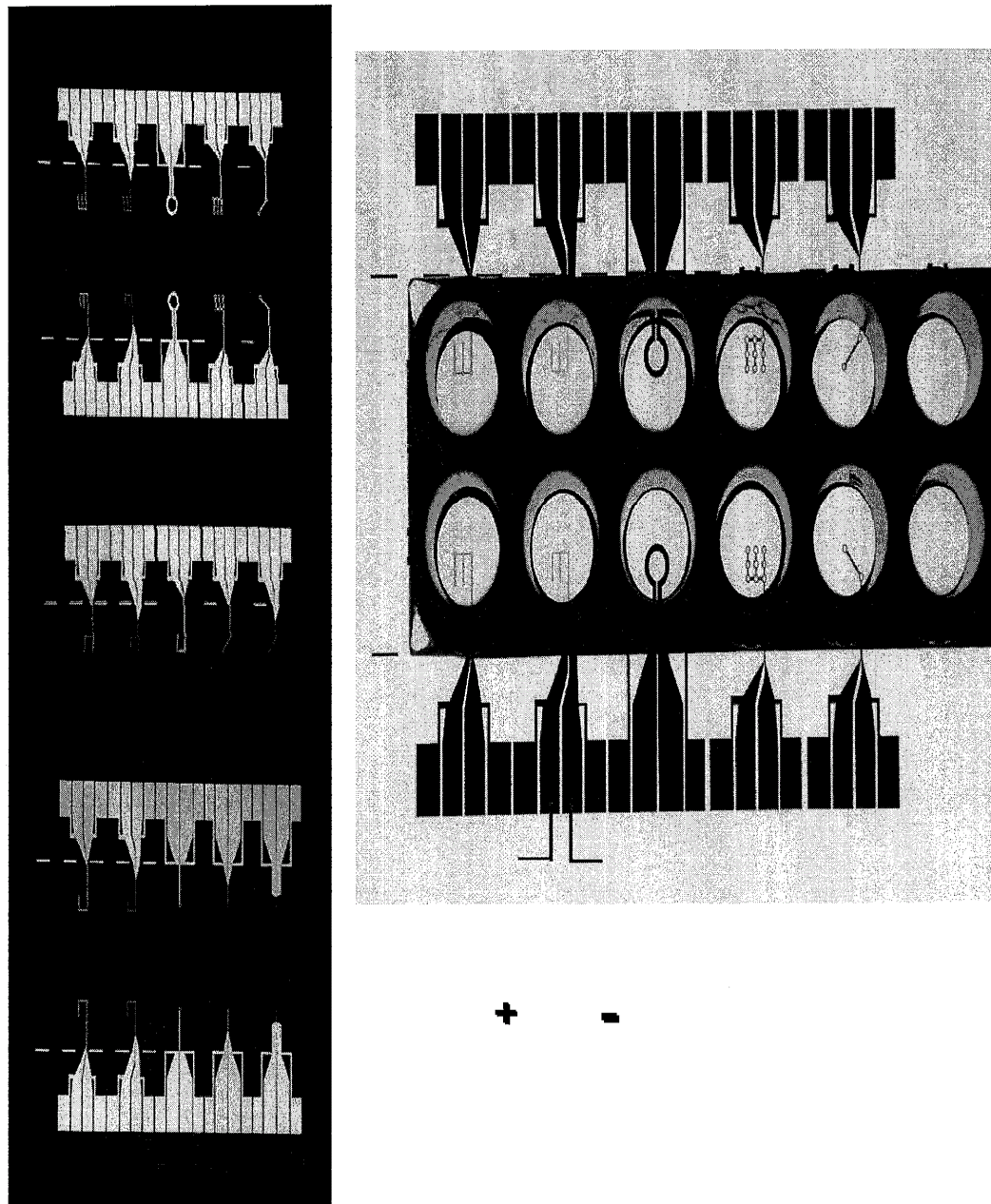


Figura 19



Figura 20

A

B

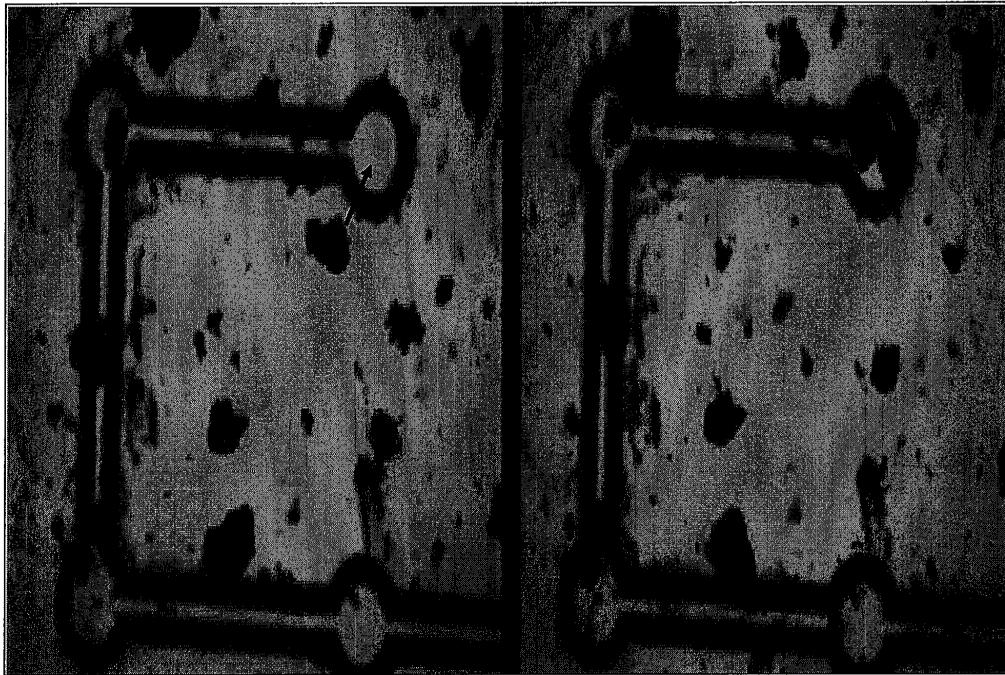


Figura 21

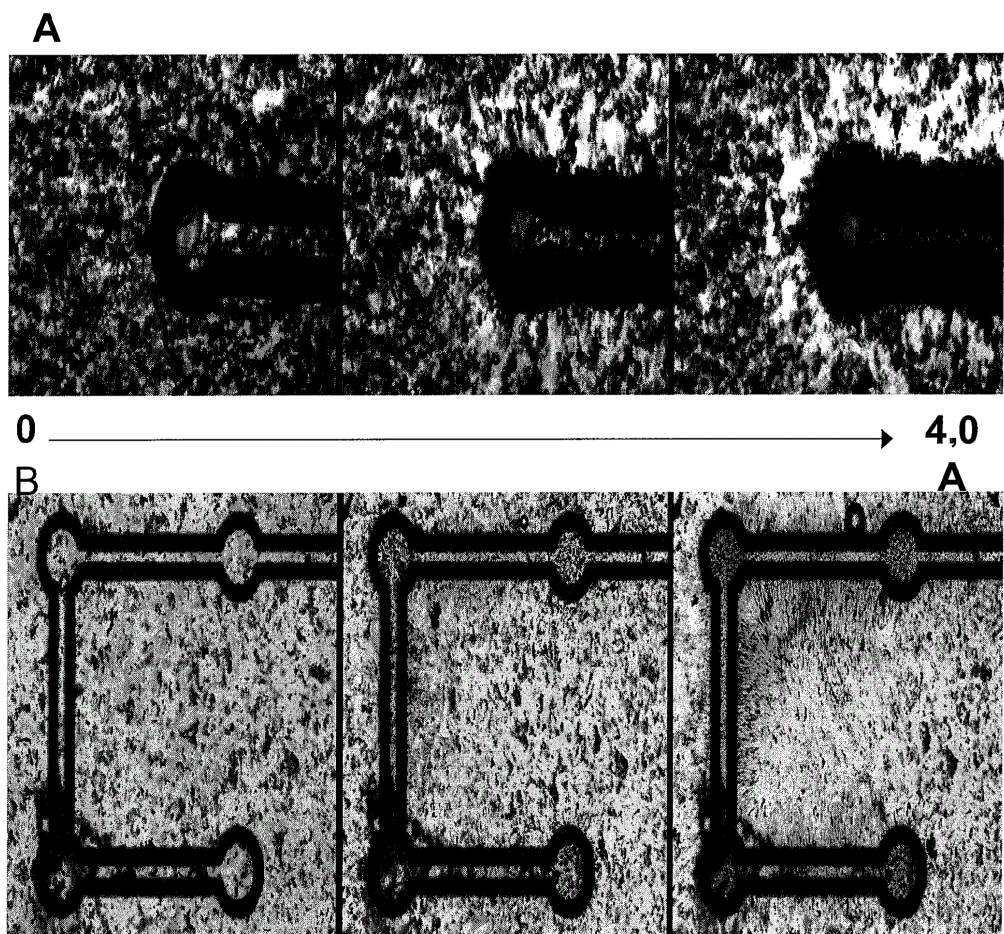


Figura 22

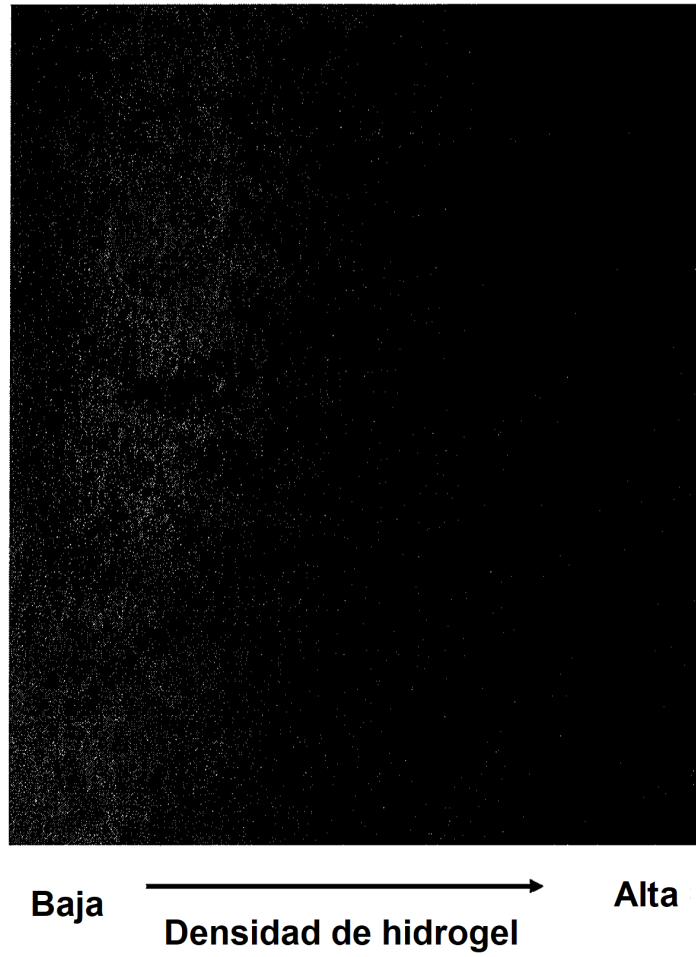
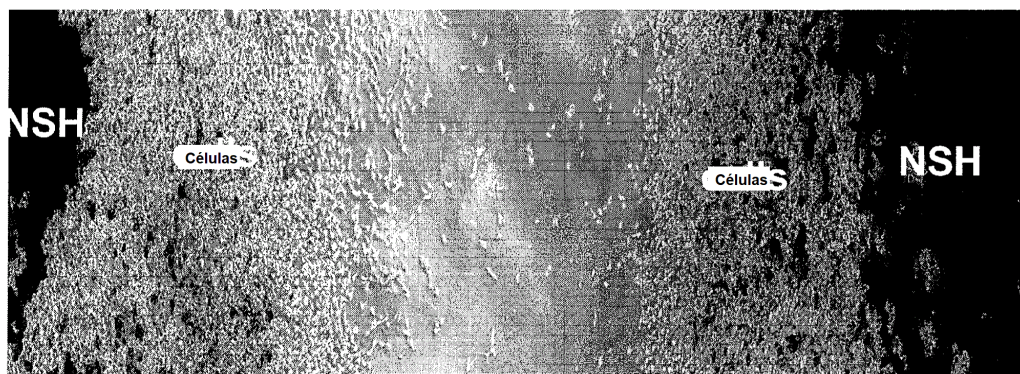


Figura 23

RGD-4C (dirigido)



fd-tet (no-dirigido)

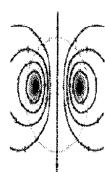
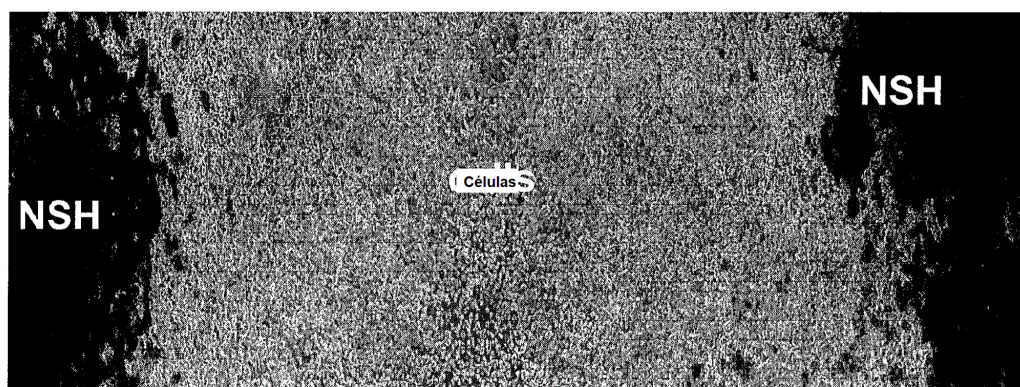
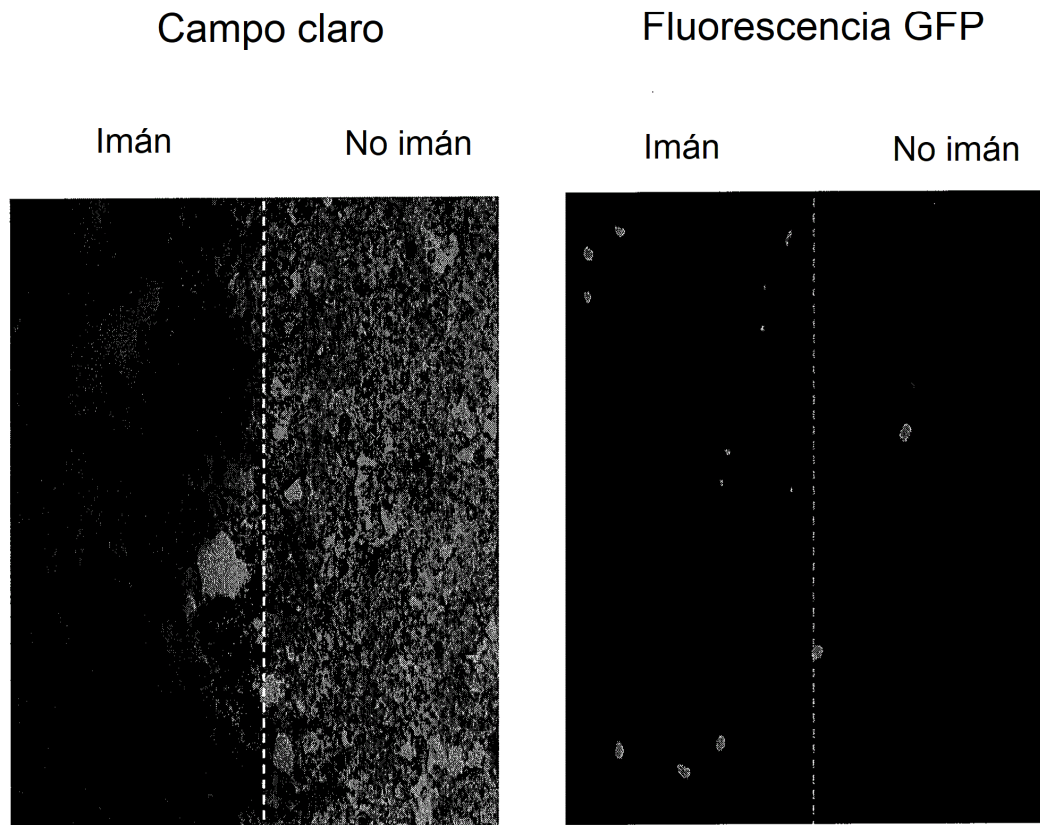


Figura 24



5x Aumento