



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 340**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07252131 .3**
96 Fecha de presentación : **24.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1860181**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Química de superficie de cultivos celulares.**

30 Prioridad: **25.05.2006 US 420267**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2010

73 Titular/es:
NALGE NUNC INTERNATIONAL CORPORATION
75 Panorama Creek Road
Rochester, New York 14625-2385, US

72 Inventor/es: **Cummins, Thomas y**
Grancelli, Joe

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 340 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

Un procedimiento y aparato para cultivar células y otros materiales biológicos.

La capacidad para desarrollar y estudiar diversos materiales biológicos, tales como células de mamíferos, es importante en el laboratorio y la industria. Sin embargo, muchas células y otros materiales biológicos se desarrollarán únicamente si pueden unirse a un sustrato apropiado (es decir, el material biológico muestra un fenotipo adherente). La capacidad de muchos materiales biológicos para unirse y desarrollar sobre un sustrato depende del sustrato que está siendo químicamente activado para hacerlo de alguna manera hidrófilo. La hidrofiliidad puede ser proporcionada por diversos grupos funcionales sobre el sustrato. Estos grupos funcionales incluyen, por ejemplo, grupos hidroxilo (OH), carboxilo (COOH), y amina (NH₂ y NH).

La preparación de un sustrato químicamente activado de este tipo implica, generalmente (1) la aplicación de energía en la forma de descarga de o bien corona o bien plasma al sustrato, o (2) la aplicación de un recubrimiento (tal como poli-D-lisina o colágeno) al sustrato. Estos procedimientos proporcionan grupos a los cuales pueden unirse materiales biológicos. Por ejemplo, en la descarga corona, el sustrato que está siendo tratado se expone a una descarga eléctrica, o corona. Las moléculas de oxígeno comprendidas dentro del área de descarga se rompen en su forma atómica y quedan libre para unirse a los extremos de las moléculas del sustrato que está siendo tratado, dando como resultado un sustrato químicamente activado deseado. La principal ventaja del tratamiento de descarga corona o de plasma de sustratos es la facilidad de fabricación; los sustratos poliméricos sometidos a dicha descarga energética pueden ser tratados fácilmente en línea y esterilizados.

Sin embargo, tanto los tratamientos de descarga corona como de plasma tienen inconvenientes. Por ejemplo, la descarga corona está limitada a la unión de oxígeno dentro de los primeros pocos nanómetros del sustrato, y puede ser anulada. En consecuencia, el sustrato puede degradarse rápidamente. Adicionalmente, el tratamiento de descarga corona puede generalmente proporcionar únicamente hasta aproximadamente 20%, en el mejor de los casos, de oxígeno de superficie sobre el sustrato. Ciertos materiales biológicos, tales como ciertas líneas de células, requieren más oxígeno. Mientras que la descarga de plasma puede producir niveles de plasma más altos que la descarga corona, requiere que el sustrato a tratar esté en un vacío.

El tratamiento de sustratos mediante la aplicación de diversos recubrimientos biológicos, tal como poli-D-lisina o colágeno, imitan el medio sobre el cual las células típicamente se desarrollarían. Sin embargo, estos recubrimientos frecuentemente no sobreviven a la esterilización mediante radiación gamma. Adicionalmente, el origen biológico de estos recubrimientos aumenta la posibilidad de transmisión de enfermedades.

Los tratamientos de descarga energética y de recubrimiento pueden proporcionar únicamente unos pocos sustratos activados convencionales para uso con todos los materiales biológicos, que producen pequeña variación en la química de superficie de sustratos usados para cultivar materiales biológicos. Esto es problemático dado que, en algún grado, cada línea de células u otro material biológico muestra una preferencia por un cierto tipo, mezcla, y/o proporción de grupos funcionales sobre un sustrato de cultivo. Por ejemplo, algunos muestran una preferencia por múltiples grupos funcionales diferentes, en tanto que algunos muestran una preferencia por únicamente un grupo funcional en un intervalo de concentración específico. Sin embargo, tal como se ha descrito anteriormente, las tecnologías actuales usan generalmente estrategias de “talla única” (por ejemplo, un sustrato con tratamiento corona usado para todos los tipos de líneas de células). En el mejor de los casos, los sustratos resultantes pueden controlarse para producir una gama de química de superficie, en lugar de ser capaces de producir cualquier química. Por ejemplo, el tratamiento corona, incluso a baja potencia, tiene una química de superficie característica que de alguna forma depende de las condiciones atmosféricas en el momento (humedad, temperatura, y productos orgánicos volátiles en el aire). Finalmente, generalmente produce un sustrato que tiene un intervalo de concentraciones de oxígeno de entre 10%-20%. Sin embargo, no puede producir sustratos que tengan altas concentraciones de oxígeno, ni tampoco puede producir sustratos que incluyan otros grupos o grupos funcionales adicionales, tales como grupos amina. Un sustrato de este tipo puede no ser adecuado para un material biológico particular que muestre una preferencia por altos niveles de oxígeno y/o grupos amina.

Además, muchos materiales biológicos se desarrollan en aparatos de cultivo que no solamente tienen sustratos tratados tal como se ha descrito anteriormente, sino que además incluyen suero para potenciar el desarrollo. Por ejemplo, la línea de células de riñón embrionario humano (HEK) 293 se usa de manera creciente dado que es fácil de desarrollar, es genéticamente estable, tiene un complemento normal de cromosomas humanos, e incorpora porciones del genoma de adenovirus que la hace adecuada para manipulación genética. Otras líneas de células que muestran características similares son PER C6, Vero, BHK-21, y MDCK.

Las células HEK pueden desarrollarse con éxito bajo condiciones recomendadas por la American Type Culture Collection (ATCC) (por ejemplo, en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) + 10% de suero bovino fetal (FBS)) sobre sustratos de cultivo de células convencionales (por ejemplo, los sometidos a tratamiento corona). El suero potencia el desarrollo de células HEK y como tal, se ha incluido en la mayoría de los procedimientos de cultivo de células. Sin embargo, recientemente, se han incrementando las normas de seguridad concernientes y este es el componente individual el más costoso de la mayoría de las formulaciones de

medios. Aunque es deseable reducir o eliminar la necesidad de suero completamente, la capacidad de casi la totalidad de las líneas de células, incluyendo las células HEK, para desarrollarse sobre sustratos tratados con corona disminuye conforme se reduce la concentración de suero.

5 Recientemente, el producto CellBIND® de Corning, está siendo ofrecido en todos los formatos de cultivo de células convencionales. El CellBIND® incluye un sustrato descrito como soporte del desarrollo de células adherentes sin suero. Se ha sugerido que la capacidad potenciada del CellBIND® para desarrollar células HEK es fundamentalmente un resultado de su cantidad superior de oxígeno, específicamente grupos hidroxilo, con relación a los sustratos tratados con corona (15% de oxígeno sobre CellBIND® frente a 8% de oxígeno sobre sustratos tratados con corona) y a un menor pero aún significativo grado por la cantidad de ácidos carboxílicos (7% de ácido carboxílico en CellBIND® frente a 2% de ácido carboxílico sobre sustratos tratados con corona). Sin embargo, el CellBIND® no incluye otros grupos funcionales tales como grupos amina, y no está fabricado a medida para diferentes preferencias que puedan ser mostradas por diferentes materiales biológicos.

15 Son deseables otros productos y procedimientos. Por ejemplo, sería deseable un aparato y procedimiento para controlar la química de un sustrato adherente sin tratamiento secundario (por ejemplo, descarga corona) y/o para mejorar la calidad de tratamientos secundarios existentes. Además, sería deseable un aparato que incluya grupos funcionales sobre un sustrato polimérico que no esté sujeto a degradación y pueda usarse con suero reducido o sin suero. Además, sería deseable un procedimiento de preparación de un aparato que tenga un sustrato que varíe en grupos funcionales, tanto en el tipo como en la concentración, con el fin de fabricar a medida el aparato para un material biológico particular.

25 El Documento WO2004 10440123, divulga polímeros cuyas superficies están modificadas mediante grupos finales que incluyen restos que modifican las superficies anfipáticas. La modificación se logra mediante la reordenación de manera espontánea de los grupos finales anfipáticos de sus posicionamientos en el cuerpo polímero para posicionar un resto sobre la superficie del cuerpo, dependiendo de la composición del medio con el cual está en contacto el cuerpo, cuando dicho re-posicionamiento ocasiona una reducción en la energía interfacial. Se muestra un ejemplo de un poli(óxido de etileno) hidrófilo terminado con un grupo hidroxilo hidrófilo que no es activo superficialmente en aire cuando el grupo final que modifica la superficie está unido a un polímero base más hidrófobo. Si el grupo hidroxilo sobre el poli(óxido de etileno) oligómero se reemplaza por una terminación metoxi éter hidrófoba, el poli(óxido de etileno) se transforma en activo superficialmente en aire, y permite que los grupos poli(óxido de etileno) cristalicen en la superficie enfrentada al aire. La inmersión en agua destruye la cristali-

nidad conforme el poli(óxido de etileno) absorbe agua y el grupo metoxi hidrófobo se retira por debajo de la superficie del polímero.

La presente invención proporciona un aparato para el cultivo de materiales biológicos, comprendiendo el aparato un sustrato no fibroso para la unión de materiales biológicos, preparado el sustrato a partir de una mezcla de resina plástica polímera y moléculas anfipáticas, en el que las moléculas anfipáticas comprenden un resto hidrófilo y una región hidrófoba, caracterizado porque las regiones hidrófobas están ancladas dentro del sustrato y los restos hidrófilos están expuestos sobre el sustrato.

Tal como es sabido por los expertos en la técnica, las moléculas anfipáticas incluyen regiones hidrófilas e hidrófobas. Los grupos funcionales de los restos hidrófilos pueden incluir, por ejemplo, grupos hidroxilo (OH), carboxilo (COOH), y/o amina (NH₂ o NH). La región hidrófoba está anclada dentro del sustrato plástico polímero, y los restos hidrófilos están expuestos sobre el sustrato plástico polímero. En realizaciones preferidas, el sustrato puede opcionalmente tratarse con otro procedimiento, por ejemplo, descarga corona o de plasma o recubrirse con sustancias tal como poli-D-lisina o colágeno.

La invención proporciona igualmente un procedimiento para la preparación de un aparato que tiene un sustrato para potenciar la unión de materiales biológicos, en el que el sustrato incluye moléculas con restos hidrófilos expuestos, y una región hidrófoba que está anclada dentro del sustrato.

El procedimiento implica la fabricación a medida del aparato para potenciar la unión y desarrollo de un material biológico particular, tal como una población de células particular. Tal como se ha descrito anteriormente, en algún grado, cada línea de células tiene una preferencia por un cierto tipo de o proporción de grupos funcionales, tales como OH, COOH, y NH₂ o NH. El procedimiento incluye la determinación de un tipo preferido de grupo o grupos funcionales hidrófilos para un material biológico particular que tiene un fenotipo adherente. Al menos se selecciona una molécula anfipática en la que la región(es) hidrófila incluye los grupos funcionales particulares preferidos por el material biológico seleccionado. La molécula o moléculas anfipáticas seleccionadas se mezcla con una resina plástica polímera para formar una resina mezclada, y la resina mezclada se usa para preparar un aparato de cultivo. Por ejemplo, a partir de la resina mezclada, se puede moldear un aparato, tal como una placa de Petri. Esto puede realizarse en la ausencia de cualquier tratamiento con descarga corona o descarga de plasma, o cualquier recubrimiento de la superficie plástica. Opcionalmente, puede realizarse la descarga corona o de plasma o recubrimiento de la superficie plástica.

A continuación, se describirá adicionalmente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La FIGURA 1 representa la estructura de etoxilato de alquilamina (Atmer 163), el cual es un ejemplo de una molécula anfipática que puede usarse de acuerdo con los principios de la presente invención.

La FIGURA 2 es un esquemático, que describe la “eflorescencia” de una molécula anfipática con relación a un sustrato plástico polímero.

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra el número de células adherentes en diferentes realizaciones del procedimiento.

Un aspecto de la invención comprende un aparato para el cultivo de materiales biológicos, que incluye un sustrato que facilita la unión de materiales biológicos que tiene un fenotipo adherente. El sustrato tiene restos hidrófilos expuestos sobre él para la potenciación de la unión de células. Cada resto hidrófilo es parte de una molécula que tiene igualmente una región hidrófoba (es decir, una molécula anfipática) que está anclada sobre o dentro del sustrato. La molécula está orientada de manera tal que los restos hidrófilos están expuestos sobre el sustrato.

Más específicamente, el aparato tiene un sustrato preparado a partir de una mezcla de resina plástica polímera y moléculas anfipáticas. Este sustrato puede ser no fibroso, o formado a partir de polímeros fibrosos. Tal como es sabido por los expertos en la técnica, las moléculas anfipáticas incluyen restos hidrófilos y una región hidrófoba. Los grupos funcionales de los restos hidrófilos pueden incluir, por ejemplo, grupos hidroxilo (OH), carboxilo (COOH), y/o amina (NH_2 o NH). En realizaciones específicas, las moléculas anfipáticas pueden elegirse entre etoxilato de alquilamina (por ejemplo, Atmer 163, Ciba Specialty Chemicals (Tarrytown NY), tal como se muestra en la Figura 1), polietilenoimina, octildecamina, o mezclas de los mismos. Además, las moléculas pueden incluir grupos o compuestos fluorados. La región hidrófoba está embebida dentro del sustrato plástico polímero, y los restos hidrófilos están expuestos sobre el sustrato plástico polímero. Opcionalmente, el sustrato puede tratarse con otro procedimiento, por ejemplo, descarga corona o de plasma, o recubrirse con sustancias tales como poli-D-lisina o colágeno. Opcionalmente, el aparato de cultivo puede o no usarse con suero.

Con las moléculas anfipáticas, se mezcla un poliestireno u otra resina, usada en el moldeo del aparato. Más específicamente, antes del moldeo de cualquier aparato de cultivo, tal como una placa Petri, las partículas de resina del polímero plástico pueden recubrirse con las moléculas anfipáticas para formar una mezcla, o bien puede formarse un compuesto con las moléculas anfipáticas para formar una mezcla.

En realizaciones en las cuales se recubre la resina, las moléculas anfipáticas se mezclan con la grana de resina en el punto de moldeo. Por ejemplo, las moléculas anfipáticas tal cual pueden disolverse en un disolvente (tal como etanol) y mezclarse manualmente con la

resina (por ejemplo, granza de poliestireno). Otros disolventes incluirían, por ejemplo, alcohol isopropílico. Como alternativa, puede usarse un mezclador. El mezclador puede incluir una bandeja de balanza para medir una cantidad predeterminada de granza, dispensar la cantidad correcta de aditivo líquido, agitar los materiales, y dispensarlos.

5 Como alternativa, en realizaciones en las cuales la resina forma un compuesto con las moléculas anfipáticas para dar como resultado moléculas anfipáticas incorporadas dentro de la resina, el compuesto anfipático (por ejemplo, Atmer 163) se mezcla dentro de una resina, tal como poliestireno fundido, y se extruye. Al enfriarse y endurecer el material, este se corta en granza, la cual posteriormente se usa para preparar un aparato de cultivo. En realizaciones
10 particulares, la resina puede elegirse, por ejemplo, entre poliestireno, polipropileno, tereftalato de polietileno modificado con glicol (PETG), tereftalato de polietileno (PET), policarbonato, o mezclas de los mismos.

 La resina mezclada (es decir, la resina plástica conteniendo moléculas anfipáticas o bien recubiertas sobre ella o formando un compuesto dentro de ella) se forma dentro del sub-
15 trato plástico. Esto se realiza calentando la resina plástica de manera tal que comience a fluir. A continuación, la resina plástica fundida se moldea en el aparato deseado, tal como una placa Petri, placa de microvaloración, placa multipocillos, o cualquier otro aparato deseado. Al fluir la resina, las moléculas anfipáticas quedan libres para moverse dentro de la matriz polímera. Con referencia a la FIGURA 1, el Atmer 163 es un ejemplo de una molécula anfipática que puede
20 usarse. El Atmer 163 es un hidrocarburo sintético de cadena larga con dos grupos funcionales hidroxilo (alcohol) por molécula. Diseñada originalmente para impartir propiedades antiestáticas en una diversidad de plásticos, la porción de cadena larga de la molécula sirve como un anclaje para los grupos hidroxilo. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la resina y los compuestos anfipáticos son incompatibles, y el compuesto anfipático es relativamente pequeño y, por tanto,
25 tendría alguna movilidad en la matriz de poliestireno. En consecuencia, parte del material anfipático afloraría sobre la superficie. Una eflorescencia es un recubrimiento fino de un ingrediente de una mezcla de caucho o plástica que migra a la superficie, usualmente dentro del intervalo de unas pocas horas después del curado o fraguado. La eflorescencia es un fenómeno químico que ocurre tanto en plásticos como en sistemas biológicos. La fuerza de impulsión
30 para la eflorescencia en ambos casos es termodinámica; es más favorable para moléculas de estructura similar para reaccionar entre sí de lo que es favorable para moléculas más diferentes para reaccionar. Igualmente, las moléculas tenderán a orientarse por sí mismas con el fin de permitir que reacciones regiones similares de moléculas adyacentes. En plásticos, la eflorescencia de agentes deslizantes (es decir, bis-estearamida y estearato de cinc) ayuda al desmol-
35 deo de las piezas de la superficie de un molde. Tal como es sabido por los expertos en la

técnica, los agentes deslizantes son materiales o bien recubiertos o bien que forman compuestos dentro de granzas de resinas que facilitan el desmoldeo de la pieza moldeada del molde o que previenen la carga estática durante la elaboración. Dicha carga estática puede incrementarse conforme la granza se suministra al punto de moldeo, por ejemplo, conforme la granza se vacía a través de un sistema situado en la parte superior de conductos que la suministra a una máquina de moldeo desde un silo grande usualmente en la parte exterior de una planta.

En particular, y con referencia a la FIGURA 2, las moléculas anfipáticas 10 se mueven a través de la matriz polímera hidrófoba 12 para orientar los restos hidrófilos 14 sobre la superficie exterior de la matriz polímera hidrófoba 12 que forma el sustrato. Dado que la matriz polímera 12 es hidrófoba, las regiones hidrófilas 14 pasan a orientarse con respecto a la superficie exterior de la matriz polímera hidrófoba, en tanto que las regiones hidrófobas 16 permanecen asociadas con la matriz polímera hidrófoba 12. En consecuencia, el sustrato puede calentarse para incrementar la movilidad de las moléculas anfipáticas dentro de la matriz polímera. Además, el control del tiempo puede ser una solución en la preparación de un aparato, dado que la extensión de la duración durante la cual las moléculas anfipáticas pueden moverse, proporciona más regiones hidrófilas expuestas a la superficie exterior del aparato. En consecuencia, la concentración de grupos hidrófilos en la superficie exterior del sustrato puede incrementarse mediante el incremento de la duración del flujo de la resina plástica.

La migración de moléculas anfipáticas, tal como Atmer 163, dentro del sustrato está afectada, al igual que otros mecanismos de difusión, por: (1) la polaridad de la molécula en relación con su matriz polímera (incompatibilidad); cuanto más diferente, más rápida la velocidad de eflorescencia; (2) la cristalinidad del polímero; cuanto más cristalino más lenta la velocidad de eflorescencia (el poliestireno es cristalino); (3) la presencia de otros aditivos distintos del secuestrante o de unión del compuesto anfipático; (4) la concentración; cuanto mayor concentración, mayor velocidad de eflorescencia; y (5) la temperatura (movilidad); cuanto mayor temperatura, más rápida la velocidad de eflorescencia.

Pueden elegirse moléculas anfipáticas que tengan regiones hidrófobas de longitudes variables. La región hidrófoba proporciona una región de anclaje para ser embebida en el sustrato plástico de cultivo de células, una vez que está moldeado. En consecuencia, la región hidrófoba puede ser una cadena de átomos de carbono unidos con una longitud, por ejemplo, de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen ácido esteárico y palmítico.

Tal como se ha descrito anteriormente, los restos hidrófilos de las moléculas anfipáticas pueden elegirse entre hidroxilos, carboxilos, aminas, o mezclas de los mismos. Los restos hidrófilos exactos pueden determinarse en base al material biológico particular para el cual se

desea preparar un aparato de cultivo. Tal como anteriormente se ha divulgado, ciertas poblaciones de células pueden requerir un tipo, proporción y/o concentración particular de un cierto grupo o grupos funcionales sobre el sustrato para la óptima adherencia y desarrollo. En consecuencia, como ejemplos no limitativos, se puede preparar un sustrato que únicamente está saturado con grupos funcionales hidroxilo para un material biológico particular, o puede prepararse un sustrato que muestre un 70% de cobertura de una proporción 50/50 de grupos funcionales hidroxilo y carboxilo. Estos grupos funcionales, y su concentración, son únicamente a modo de ejemplo, y los expertos en la técnica reconocerán que el aparato puede incluir cualquier grupo funcional en cualquier cantidad.

La inclusión de moléculas anfipáticas en el sustrato mejora los inconvenientes de formas previas de aparatos de cultivo para materiales biológicos de fenotipos adherentes: es decir, puede eliminarse la descarga corona o de plasma, o recubrimientos tal como poli-D-lisina, que no sobreviven a la esterilización. Sin embargo, el aparato de cultivo de la invención puede igualmente estar provisto de un tratamiento secundario. Así, el aparato de la invención puede incluir un sustrato que está tratado adicionalmente con un procedimiento de descarga de energía, tal como descarga corona o descarga de plasma. Como alternativa, el aparato de la invención puede incluir un sustrato que está recubierto adicionalmente con una sustancia tal como poli-D-lisina o colágeno.

El aparato puede usarse para materiales biológicos que tienen fenotipos adherentes. Los materiales biológicos pueden ser células, orgánulos, estructuras subcelulares, virus, bacterias, otras biomoléculas, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, y/o carbohidratos.

Igualmente, se proporciona un procedimiento para la preparación de un aparato que tiene un sustrato para potenciar la unión de materiales biológicos, en el que el aparato incluye un sustrato que tiene moléculas con restos hidrófilos expuestos y una región hidrófoba que está anclada dentro del sustrato.

Más específicamente, el procedimiento está fabricado a medida para potenciar la unión y desarrollo de un material biológico particular, tal como una población de células particular. Tal como se ha descrito anteriormente, hasta cierto grado, cada línea de células tiene una preferencia por un cierto tipo o proporción de grupos funcionales, tales como OH, COOH, y NH₂ o NH. De acuerdo con ello, el procedimiento incluye la determinación de un grupo o grupos funcionales hidrófilos óptimos en el que el grupo o grupos particulares facilita la asociación con un material biológico predeterminado que tiene un fenotipo adherente. Se selecciona una molécula o moléculas anfipáticas que incluyen los grupos funcionales preferidos por el material biológico y se mezcla con una resina plástica polímera para formar una resina mezclada, tal como se describe posteriormente. La resina mezclada se moldea dentro en una placa Petri, una placa

de microvaloración, una placa multipocillos, u otro aparato de cultivo. Esto puede realizarse en la ausencia de cualquier tratamiento con descarga corona o descarga de plasma, o cualquier recubrimiento del sustrato plástico. Opcionalmente, puede realizarse secundariamente descarga corona o de plasma o recubrimiento del sustrato plástico.

Además de la determinación del tipo de grupo funcional para la preparación del aparato, el procedimiento puede incluir igualmente la determinación de una concentración particular del grupo funcional hidrófilo que facilite la asociación óptima con el material biológico. De acuerdo con ello, cuando se mezclan las moléculas anfipáticas con la resina plástica polímera, las moléculas puedan mezclarse en una concentración, con respecto a la resina plástica polímera, que sea substancialmente similar a la concentración determinada para facilitar la asociación óptima con el material biológico.

Tal como se ha descrito anteriormente, el mezclado de la molécula anfipática con la resina plástica polímera puede incluir el recubrimiento de la resina plástica polímera con la molécula anfipática. Como alternativa, el mezclado de la molécula anfipática con la resina plástica polímera puede incluir la formación de un compuesto de la resina plástica polímera con la molécula anfipática.

Los principios de la presente invención resultarán más obvios con referencia a los Ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Preparación de resina recubierta: Se llenó una bombona de 20 litros con granza de poliestireno y se pesó. A continuación, se restó el peso de la propia bombona del resultado con el fin de obtener el peso de la granza. A continuación, se agregó Atmer 163 (líquido) en una cantidad como para obtener una mezcla al 1,0%, y se agregó a la granza aproximadamente un tercio de una vez. Se preparó un segundo lote para obtener una mezcla al 0,1%. El por ciento de Atmer 163 se calculó como peso de Atmer 163/peso de la granza por 100 veces. De esta forma, para la mezcla de 1,0%, se agregaron 10 g de Atmer 163 a 1 kg de granza de poliestireno. Para la mezcla de 0,1%, se agregó 1 g de Atmer 163 a 1 kg de granza de poliestireno. Después de cada adición de un tercio de Atmer 163, la granza se hizo girar dentro de la bombona o se mezcló con un agitador y amasador hasta que toda la granza se recubrió visualmente por igual.

Ejemplo 2

Preparación de la formación de compuesto de resina: Las resinas en forma de compuestos se mezclaron en línea conforme el polímero se fundió en una extrusora. El peso apropiado de granza y de aditivo se controló dentro del tambor de la extrusora en la que se habían fundido.

Como en el Ejemplo 1, se prepararon mezclas al 1,0% y 0,1%. De acuerdo con ello, para la mezcla de 1,0%, se agregaron 10 g de Atmer 163 a 1 kg de granza de poliestireno. Para la mezcla de 0,1%, se agregó 1 g de Atmer 163 a 1 kg de granza de poliestireno. El tambor de la extrusora tiene un tornillo que forzó a avanzar al material fundido (poliestireno y Atmer 163) hacia un extremo y simultáneamente mezcló los materiales. La mezcla polímera solidificó conforme salía por un pequeño orificio en el extremo alejado de la extrusora y se cortó en forma de granza.

Ejemplo 3

Se ensayaron mezclas estériles de Atmer 163 y poliestireno (resina recubierta) para determinar si pudo observarse algún efecto sobre el rendimiento de células. Se prepararon dos mezclas mediante mezclado manual de Atmer 163 en poliestireno hasta las proporciones finales de 1% (p/p) y 0,1% (p/p), tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. En estas mezclas, la resina se recubrió con Atmer 163. Las resinas mezcladas se moldearon en placas Petri y, a continuación, se esterilizaron. Después de la esterilización, las placas se evaluaron mediante el cultivo de células HEK 293 al 1% y 0% v/v en suero, y los resultados se compararon con placas con tratamiento de superficie corona convencional o el aparato CellBIND® de Corning. La comparación se realizó usando el rendimiento de células (número bruto de células recuperadas por cm²) o el rendimiento de células relativo (rendimiento de células relativo con respecto al CellBIND®). En el caso en que se evaluaron placas con tratamiento corona, la descarga corona se aplicó sobre una cinta transportadora en movimiento que se movía a 10 cm/seg con electrodos rotatorios a 700 vatios a una distancia de 23 mm de la cinta.

Las células HEK obtenidas de la ATCC (Número de Registro Crl-1573) se separaron del recipiente de almacenamiento en nitrógeno líquido, se trataron mediante descongelación instantánea a 37°C, y se dejaron recuperar durante una noche en DMEM + FBS al 10% en una incubadora de CO₂ con camisa de agua a 37°C y CO₂ al 5%. Después de 24 horas, se cambió el medio. Las células se pasaron cuatro veces antes de usarlas en este experimento, y las células congeladas habían sido pasadas 41 veces en la ATCC. De acuerdo con ello, el número total de pasadas de las células fue de 45 en el momento del ensayo. Las células se sembraron a una concentración de aproximadamente 20.000 células/cm² en suero al 1% o bien al 0%. Las células desarrolladas en suero al 0% en medio CD 293 (GIBCO, división de sistemas de cultivo de células de Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) se incubaron a 37°C y CO₂ al 8%, según las instrucciones de GIBCO. Las células desarrolladas en suero al 1% se incubaron en condiciones convencionales de 37°C y CO₂ al 5%.

Después de cuatro días, las placas se lavaron con PBS estéril (sin calcio o magnesio)

tal como sigue: se agregó 1 ml de PBS al borde de la placa, se hizo oscilar cuatro veces y, a continuación, se aspiró. Después del lavado, se agregó 1 ml de tripsina y se dejó reposar durante aproximadamente dos minutos. Después de los dos minutos, las placas se agitaron a 1000 rpm sobre un mezclador de plataforma de batido durante 5-10 segundos hasta que las células se desprendieron completamente de fondo tal como se determinó mediante examen visual. Se agregó 1 ml de DMEM con FBS al 10% para interrumpir la tripsinización. A continuación, se separó 1 ml de esta solución, se agregaron a 4 ml de azul tripano y, a continuación, se contaron las células en las cámaras superior e inferior de un hematocitómetro.

Los tratamientos del substrato (esterilización, corona y calor) se compararon con y sin dos concentraciones diferentes de Atmer (1% ó 0,1%, p/p) (gramos de Atmer/100 de granza de resina). 1% es una alta concentración y 0,1% es una baja concentración. Las concentraciones se eligieron en base a proporciones recomendadas por Uniquema (New Castle DE), con relación a aplicaciones antiestáticas. Se produjo discriminación potenciada entre grupos cuando las células se desarrollaron en medio libre de suero. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2. En las Tablas, "Nunclon Delta" designa las placas que tienen tratamiento de superficie corona convencional. Nunclon® Delta (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) es el certificado que se ha concedido si el producto pasa una cierta serie de ensayos de cultivo de células tal como ha sido definido por el documento del sistema de calidad convencional de Nalge Nuc STP-3004.

Tabla 1. Células HEK desarrolladas en medio libre de suero

	No estéril	Estéril
1% de Atmer	-	318
0,1% de Atmer	-	6.887
0% de Atmer	-	1.218
Nunclon Delta	-	9.571
CellBIND	-	35.357
- ensayo no realizado		

Tabla 2. Células HEK desarrolladas en medio con 1% de suero

	No estéril	Estéril
1% de Atmer	6.696	114.583
0,1% de Atmer	49.107	161.990
0% de Atmer	0	61.862
Nunclon Delta	-	116.848
CellBIND	-	105.377

(Cont.)

*células/cm cuadrado

- ensayo no realizado debido a que no están disponibles muestras no estériles

Se evaluó el efecto de la esterilización sobre el rendimiento de células en diferentes mezclas de poliestireno. La esterilización se llevó a cabo vía radiación gamma a un nivel de entre 18 y 30 kiloGrays. La esterilización dio como resultado un incremento de rendimientos de células absoluto y de rendimiento de células relativo con respecto a CellBIND® (rendimiento de células de la muestra/rendimiento de células de CellBIND®; "RCY") para ambas materias primas de poliestireno, y para poliestireno mezclado con Atmer. Mezclado significa que el material se incorporó dentro del polímero o bien en el molde, o bien anteriormente. Bajo condiciones libre de suero, el rendimiento de células medio fue de 1218 ± 264 células/cm² para poliestireno nativo esterilizado (es decir, no alterado). Cuando el poliestireno se mezcló con Atmer a alta concentración (es decir, 1% de Atmer), el rendimiento de células sobre el poliestireno esterilizada fue de 318 ± 142 células/cm² y a baja concentración (es decir, 0,1% de Atmer), de 6887 ± 536 células/cm², bajo condiciones libre de suero.

Existen dos concentraciones con referencia a este Ejemplo: suero y Atmer. Se usaron dos concentraciones de Atmer en el cultivo de las células en dos concentraciones de suero. El rendimiento de células para la mezcla de Atmer de baja concentración (0,1% p/p) fue mayor que la corresponde para la esterilización sola. La diferencia de rendimiento entre poliestireno nativo y la mezcla de Atmer de alta concentración (1,0% p/p) no fue estadísticamente significativa, sin embargo, la diferencia entre poliestireno nativo y la mezcla de Atmer del grupo de baja concentración fue significativa ($p < 0,05$). El Atmer mezclado a una concentración de 0,1% p/p de poliestireno tenía un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de células HEK sobre poliestireno al cual no se administró ningún otro tratamiento sino de esterilización cuando las células se desarrollaron sin suero. Estos datos se muestran en las Tablas 1 y 2, anteriores.

Las células HEK desarrolladas con suero bovino fetal (1% v/v) en poliestireno nativo, esterilizado, tenían un rendimiento de células de 61.862 células/cm², en tanto que las células HEK desarrolladas con FBS (1%) en poliestireno esterilizado mezclado con Atmer al 1% fue de 6.696 células/cm² y a 0,1% fue de 49.107 células/cm². Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los rendimientos de células fueron aproximadamente 50X mayores que los rendimientos de células libres de suero para poliestireno nativo, 20X mayores para la mezcla de alta concentración, y aproximadamente 7X mayor para la mezcla de baja concentra-

ción. La presencia de suero tuvo un efecto mucho mayor sobre el rendimiento de células para el desarrollo de células HEK sobre poliestireno nativo que para el desarrollo de células HEK sobre poliestireno mezclado con Atmer, lo cual sugiere que existe más de un mecanismo para la unión de células. Las células HEK desarrolladas sobre CellBIND®, en comparación, proporcionaron una media de 35.357 ± 1929 células/cm² cuando se desarrollaron bajo condiciones libres de suero y de 105.377 ± 10.000 células/cm² cuando se desarrollaron con suero.

Igualmente, se evaluaron los efectos del tratamiento corona sobre el rendimiento en diferentes mezclas de poliestireno (véanse Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Células HEK desarrolladas con 1% de suero sobre mezclas tratadas con corona

	No estéril	Estéril
1% de Atmer	76.212	181.973
0,1% de Atmer	77.487	162.415
0% de Atmer	0	103.104

Tabla 4. Células HEK desarrolladas libres de suero sobre mezclas tratadas con corona

	No estéril	Estéril
1% de Atmer	-	9.566
0,1% de Atmer	-	30.676
0% de Atmer	-	9.571

El tratamiento corona se suministró mediante un equipo de tratamiento de cabeza rotatoria a una distancia de 23 mm a partir del fondo de la placa a 700 vatios para un tiempo de tratamiento de aproximadamente 8 segundos. El tratamiento corona dio como resultado un rendimiento incrementado (es decir, desarrollo de células) tanto para poliestireno nativo como para poliestireno mezclado con Atmer. Bajo condiciones libres de suero, el rendimiento de células sobre poliestireno nativo, estéril, tratado con corona, fue de 9.571 ± 854 células/cm² comparado con 1.218 ± 264 células/cm² sin tratamiento corona, lo cual representa un incremento absoluto de aproximadamente 8300 células/cm² y un incremento relativo de cerca de 8X. Cuando el poliestireno se mezcló con Atmer a alta concentración (1%), el rendimiento fue de 9.566 ± 2182 células/cm² comparado con 318 ± 142 células/cm² sin tratamiento corona, lo cual representa un incremento absoluto de aproximadamente 9.200 células/cm² y un incremento relativo de aproximadamente 30X. Cuando se mezcló Atmer con poliestireno a baja concentración (0,1%) y se trató con corona, el rendimiento fue de 30.676 ± 1846 células/cm² comparado con 6.887 ± 536 células/cm² sin tratamiento corona, lo cual representa un incremento absoluto de

aproximadamente 24.00 células/cm² y un incremento relativo de aproximadamente 4,5X.

El rendimiento absoluto y la magnitud del incremento en rendimiento proporcionado por el tratamiento corona fueron mayores tanto para la mezcla con Atmer como para poliestireno bruto. El incremento relativo más grande se observó con la concentración más alta de Atmer; 30 veces de incremento para las mezclas de 1% y 4,5 veces de incremento para las mezclas de 0,1%.

Se evaluó el efecto del calentamiento de los polímeros mezclados. Dado que la eflorescencia es un proceso limitado por la difusión, la temperatura tiene un gran efecto sobre la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio. Bajo condiciones libres de suero, las superficies que se calentaron a 60°C durante 24 horas tuvieron rendimientos de células mayores que las superficies no calentadas. Los resultados se muestran en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5. Células HEK desarrolladas en medio de 0% de suero sobre resina mezclada

	1%	0,10%	0,00%
Resina bruta	0	0	0
Esterilización	319±451	6888±1695	1218±877
*Calentamiento únicamente	8992±2337	13074±1681	0
*Corona únicamente	9566±6902	30676±5841	9571±1979
*Calentamiento después de corona	24617±4688	29656±5754	-
*Corona después de calentamiento	15625±2792	31888±7914	-
CellBIND	35357±4315		
*Las partes se ensayaron estériles bajo radiación gamma			

Quando se preparó un sustrato a partir de Atmer mezclado a alta concentración (1%), el rendimiento se incrementó desde 318 ± 142 células/cm² hasta 8992 ± 2337 células/cm², lo cual fue un incremento absoluto de 8.674 células/cm² y un incremento relativo de aproximadamente 28X. A baja concentración (0,1%), el rendimiento de desarrollo de células sobre superficies que habían sido calentadas fue de 13.073 ± 1681 células/cm², en tanto que el rendimiento de células sobre superficies que no habían sido calentadas fue de 6.887 ± 1695 células/cm², lo cual fue un incremento absoluto de 6.113 células/cm² y un incremento relativo de casi 2X. Los incrementos fueron estadísticamente significativos (p<0,05).

Igualmente, el calor afectó el rendimiento de partes tratadas con corona bajo condiciones libres de suero. Además, el orden del calentamiento (antes o después del tratamiento co-

rona) tuvo un efecto. Con mezclas con altas concentraciones (1% de Atmer), el rendimiento sobre sustratos tratados con corona fue de 9.566 ± 6902 células/cm², cuando se calentaron antes del tratamiento, el rendimiento fue de 24.617 ± 4688 células/cm², y cuando se calentaron después del tratamiento, el rendimiento fue de 15.625 ± 2792 células/cm². El rendimiento se incrementó en aproximadamente 15.000 células/cm² si el calor se aplicó antes del tratamiento y en aproximadamente 6.000 células/cm² si el calor se aplicó después del tratamiento para células desarrolladas sobre superficies como mezclas con alta concentración. Para células desarrolladas como mezclas de baja concentración, el rendimiento para sustratos tratados con corona fue de 30.676 ± 5841 células/cm², cuando se calentaron antes del tratamiento, el rendimiento fue de 29656 ± 5754 células/cm², y cuando se calentaron posteriormente, el rendimiento fue de 31888 ± 7914 células/cm².

No existe virtualmente efecto alguno del calentamiento sobre las células desarrolladas sobre sustratos de baja concentración (0,1% de Atmer) y un efecto significativo sobre los sustratos de alta concentración (1% de Atmer). La diferencia entre las secuencias de calentamiento fue igualmente significativa ($p < 0,05$). Las mezclas de baja concentración fueron significativamente mejores que las altas independientemente del orden. El rendimiento absoluto para los sustratos de baja concentración, aunque no se afectaron por el calentamiento, fue aún más alto incluso considerando los efectos del calentamiento sobre los sustratos de alta concentración.

En consecuencia, la mejora en el rendimiento de células se observó especialmente a la baja concentración de 0,1% de Atmer (sobre Nunclon® Delta), tanto en la condición de suero reducido como libre de suero. El rendimiento en medio libre de suero fue comparable para algunos grupos a la superficie CellBIND® de Corning. Los datos sugieren que el mezclado fue capaz de mejorar los rendimientos de líneas de células adherentes tales como células HEK 293.

Ejemplo 4

Se ensayaron mezclas estériles de Atmer 163 y poliestireno (resina compuesta) para determinar si pudiera observarse un efecto sobre el rendimiento de células. La resina de poliestireno se compuso con Atmer 163 a una concentración final de 10% de Atmer mediante Polyvel Inc. (Hammon, NJ). A continuación, las granzas compuestas dosificaron en granzas de poliestireno normal (p/p) hasta concentraciones finales de 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, y 0,01% de Atmer 163. A continuación, se moldearon placas Petri de sesenta mm a partir de estas mezclas de resinas, y se observó el desarrollo de células HEK-293 en medio libre de suero (GIBCO CD-293A) sobre partes no estériles. El desarrollo de células HEK-293 se llevó a cabo

tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Se usaron tanto mezclas no tratadas como mezclas tratadas con corona para preparar placas Petri. La unión de las células se estimó mediante el uso de extracción con teñido de violeta cristal y examen microscópico. Más específicamente, el teñido de violeta cristal se aplicó a las células durante cinco minutos y, a continuación, se aclaró con agua corriente. El teñido retenido se extrajo en una solución de 1% de Triton X-100 en dH₂O. La intensidad del teñido se midió espectrofotométricamente a 562 nm. Cuanto mayor fue el teñido retenido, mayor fue el número de células adherentes, con los resultados mostrados en la FIGURA 3. Tal como puede observarse, muchas de las mezclas Atmer tratadas con corona superaron a los productos actuales, tal como CellBIND® en el desarrollo de células HEK-293.

Aunque la presente invención se ha divulgado con referencia a los detalles de realizaciones preferidas, se entiende que la divulgación está destinada en un sentido ilustrativo más que limitativo, ya que se contempla que fácilmente pueden producirse modificaciones por los expertos en la técnica.

Reivindicaciones

1. Un aparato para el cultivo de materiales biológicos, comprendiendo el aparato un sustrato no fibroso para la unión de materiales biológicos, preparado el sustrato a partir de una mezcla de resina plástica polímera y moléculas anfipáticas (10), en el que las moléculas anfipáticas comprenden un resto hidrófilo (14) y una región hidrófoba (16), caracterizado por que las regiones hidrófobas (16) están ancladas dentro del sustrato y los restos hidrófilos (14) están expuestas sobre el sustrato.

2. El aparato de la reivindicación 1, en el que la resina de la mezcla está recubierta con las moléculas anfipáticas (10).

3. El aparato de la reivindicación 1, en el que la resina de la mezcla está compuesta con las moléculas anfipáticas (10).

4. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que los restos hidrófilos (14) están seleccionados entre hidroxilos, carboxilos, aminas, o mezclas de los mismos.

5. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que el polímero plástico está seleccionado entre poliestireno, polipropileno, tereftalato de polietileno modificado con glicol (PETG), tereftalato de polietileno (PET), policarbonato, o mezclas de los mismos.

6. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que las moléculas anfipáticas (10) están mezcladas con la resina plástica polímera en una proporción de aproximadamente 1% p/p.

7. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las moléculas anfipáticas (10) están mezcladas con la resina plástica polímera en una proporción de aproximadamente 0,1% p/p.

8. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la superficie está tratada además con descarga corona o descarga de plasma.

9. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la superficie está recubierta además con poli-D-lisina o colágeno.

10. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la región hidrófoba (16) es una cadena de átomos de carbono unidos que tiene una longitud de entre 10 hasta 30 átomos de carbono.

11. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que los materiales biológicos tienen un fenotipo adherente.

12. El aparato de la reivindicación 11, en el que los materiales biológicos están seleccionados entre el grupo constituido por células, orgánulos, estructuras subcelulares, virus, bacterias, biomoléculas, y combinaciones de los mismos.

13. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que las moléculas anfipáticas (10) están elegidas entre etoxilato de alquilamina, polietilenoimina, octildecamina, o mezclas de las mismas.

5 **14.** El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que las moléculas anfipáticas (10) no incluyen fluorocompuestos.

10 **15.** Un procedimiento de obtención de un aparato para el cultivo de materiales biológicos, comprendiendo el procedimiento la determinación de un tipo de grupo funcional hidrófilo que facilita la asociación con un material biológico de un fenotipo adherente, la selección de una molécula anfipática (10) que incluye regiones hidrófilas e hidrófobas (16), incluyendo la región hidrófila dicho grupo funcional hidrófilo (14), el mezclado de una pluralidad de dichas moléculas anfipáticas (10) con una resina plástica polímera para formar una resina mezclada, y la preparación de un aparato para el cultivo del material biológico a partir de dicha resina mezclada que comprende un substrato formado a partir de la resina mezclada, caracterizado por que las regiones hidrófobas (16) están ancladas dentro del substrato y los grupos de funciones hidrófilas (14) están expuestos sobre el substrato.

16. El procedimiento de la reivindicación 15 que comprende además la determinación de una concentración del grupo funcional hidrófilo (14) que facilita la asociación con el material biológico.

20 **17.** El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el mezclado de las moléculas anfipáticas (10) con la resina plástica polímera comprende además el mezclado de las moléculas anfipáticas (10) en una concentración, con relación a la resina polímera plástica, substancialmente similar a la concentración que facilita la asociación con el material biológico.

25 **18.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el mezclado de las moléculas anfipáticas (10) con la resina plástica polímera comprende además el recubrimiento de la resina plástica polímera con las moléculas anfipáticas (10).

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el mezclado de las moléculas anfipáticas (10) con la resina plástica polímera comprende la formación de un compuesto de la resina plástica polímera con las moléculas anfipáticas (10).

30 **20.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que comprende además el tratamiento de una superficie del aparato de cultivo de células con descarga corona o descarga de plasma.

21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, que comprende además el recubrimiento de una superficie del aparato de cultivo de células con poli-D-lisina o colágeno.

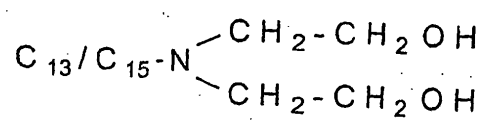


FIG. 1

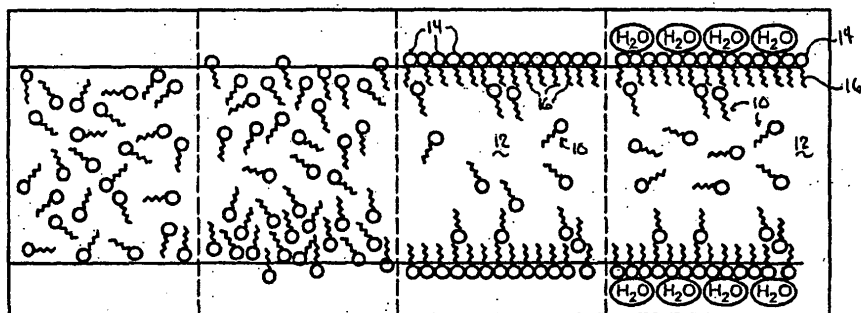


FIG. 2

FIGURA 3

Resina compuesta Lote 12102004C

