

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 481**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)
B29C 64/106 (2007.01)
B29C 64/321 (2007.01)
B29C 64/386 (2007.01)
B33Y 50/00 (2015.01)
C12N 5/00 (2006.01)
B33Y 10/00 (2015.01)
B33Y 70/00 (2010.01)
B33Y 80/00 (2015.01)
C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2020** **PCT/IB2020/000900**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2021** **WO21079192**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2020** **E 20829629 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025** **EP 4048331**

54 Título: **Procedimientos y sistemas para generar estructuras biológicas tridimensionales**

30 Prioridad:

21.10.2019 US 201962924111 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
04.06.2025

73 Titular/es:

FLUICELL AB (100.00%)
Flöjelbergsgatan 8C
431 37 Mölndal, SE

72 Inventor/es:

ORWAR, OWE;
JEFFRIES, GAVIN, D.M.;
XU, SHIJUN y
KIREJEV, VLADIMIR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 024 481 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

Procedimientos y sistemas para generar estructuras biológicas tridimensionales

Referencia cruzada a solicitud(es) relacionada(s)

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. de Serie 62/924,111, presentada el 21 de octubre de 2019.

Antecedentes de la invención

10 La fabricación aditiva (también conocida como "impresión 3D") se ha propuesto para diversas aplicaciones biológicas. Se presta una atención significativa a la mejora de los modelos preclínicos, donde los científicos en desarrollo farmacéutico e investigación clínica están buscando tecnologías de bioimpresión, para proporcionar nuevos modelos de tejidos in vitro con composiciones celulares fisiológicas relevantes, propiedades de materiales y microestructuras complejas. La tecnología de bioimpresión posee la capacidad de posicionar con precisión los biomateriales y las células vivas para reconstruir estructuras complejas, con el objetivo de generar modelos repetibles de tejido enfermo y sano. La bioimpresión ofrece oportunidades para integrar fuentes de células específicas del paciente en modelos de tejido, lo que mejora aún más la relevancia biológica del cribado in vitro.

15 El documento WO 2019/021061 A1 describe estructuras similares a tejidos que se ensamblan utilizando un cabezal de impresión microfluídico a través de la deposición de células sobre sustratos con patrones.

SANGJUN MON ET AL.: "Layer by Layer Three-dimensional Tissue Epitaxy by CellLaden Hydrogel Droplets", TISSUE ENGINEERING PART C: METHODS, vol. 16, n.º 1, 1 de febrero de 2010, páginas 157-166, describe una bioimpresora que se puede usar para imprimir estructuras de tejido de hidrogel cargadas de células en 3D de múltiples capas.

20 MICHIIYA MATSUSAKI ET AL.: "Tree-Dimensional Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing", ADVANCED HEALTHCARE MATERIALS, vol. 2, n.º 4, 2 de noviembre de 2012, páginas 534-539, describe el montaje capa por capa utilizando la impresión por inyección de tinta de células y proteínas individuales.

25 MICHIIYA MATSUSAKI ET AL.: "Fabrication of Cellular Multilayers with NanometerSized Extracellular Matrix Films", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 46, no. 25, 18 de junio de 2007, páginas 4689-4692 describe películas celulares multicapa en una superficie.

Compendio de la invención

30 Un aspecto de la invención proporciona un procedimiento para generar estructuras biológicas tridimensionales. El procedimiento incluye: (a) depositar una primera capa de una suspensión sobre un sustrato, la suspensión incluye un líquido y una pluralidad de células; (b) permitir que la pluralidad de células se una al sustrato y forme una primera capa de células unidas; (c) depositar un agente de unión celular sobre la primera capa de células unidas; y (d) depositar una segunda capa de la suspensión sobre el agente de unión celular.

35 Este aspecto de la invención puede tener una variedad de realizaciones. El procedimiento puede incluir además (b') cultivar la pluralidad de células en la primera capa durante un período de tiempo para establecer o aumentar la cantidad de, una o más seleccionadas del grupo que consiste en: interacciones célula-célula, uniones célula-célula, interacciones célula-sustrato, uniones célula-sustrato, masa celular y cantidad celular. El periodo de tiempo puede incluir uno o más intervalos de tiempo seleccionados del grupo que consiste en: de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 día, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, y de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 8 semanas.

45 El procedimiento puede incluir además: (e) repetir las etapas (b)-(d) hasta que se genere una estructura biológica que tenga un espesor predefinido. El espesor predefinido se puede seleccionar del grupo que consiste en: aproximadamente 1 µm, entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 10 µm, entre aproximadamente 10 µm y aproximadamente 100 µm, entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 1 mm, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 1,5 mm, entre aproximadamente 1,5 mm y aproximadamente 5 mm, entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 2 cm, entre aproximadamente 2 cm y 10 cm, y entre aproximadamente 10 cm y 50 cm.

El procedimiento incluye además: (e) repetir las etapas (a)-(c) en una nueva ubicación en el sustrato.

50 La suspensión se puede depositar utilizando un dispositivo de confinamiento de flujo. El agente de unión celular se puede aplicar globalmente o en un patrón. La suspensión se puede aplicar globalmente o en un patrón.

La suspensión puede incluir un único tipo de célula o una pluralidad de tipos de células.

El sustrato puede seleccionarse del grupo que consiste en: tejido y órgano.

El procedimiento puede incluir además: (f) depositar un agente bloqueador de células sobre la segunda capa de la suspensión. El agente de bloqueo celular puede seleccionarse del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), copolímeros de bloque, albúmina de suero bovino (BSA), tensioactivo, caseína, politetrafluoroetileno (PTFE), silanos, soluciones particuladas, nanopartículas, nanopartículas metálicas, nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de aluminio, nanopartículas de titanio y microesferas poliméricas.

El agente de unión celular puede seleccionarse del grupo que consiste en: proteínas de adhesión, proteínas de unión celular, biomoléculas de adhesión celular, moléculas de adhesión celular, polilisina, laminina, fibronectina, vitronectina, matriz extracelular (ECM), actina, integrina, perlecano, desmina, poliglicanos, fibulina, elastina, tropoelastina, cadherina, gelatina, concanavalina, colágeno, estructuras lipídicas, nanotubos lipídicos, vesículas lipídicas, gotas lipídicas, suero de crecimiento, suero fetal bovino, suero de ternera, suero de caballo, ácidos nucleicos, hebras de ADN, hebras de ARN, soluciones catiónicas, soluciones de calcio, soluciones de magnesio y soluciones de zinc.

El sustrato puede seleccionarse del grupo que consiste en: agente de unión celular, plástico, vidrio, silicio, papel, algodón, biomaterial, películas lipídicas, gel, aerogel, hidrogel, matriz polimérica, metales, óxidos metálicos, membranas semipermeables, membranas permeables, polisacáridos, almidón, colágeno, celulosa, gelatina, andamios biológicos, tejido biológico, tejido descelularizado, tejido no biológico y células biológicas.

El sustrato puede tener una topología plana, desigual, estructurada o con patrones.

El sustrato puede incluir secciones adyacentes de diferentes materiales de sustrato.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la naturaleza y los objetos deseados de la presente invención, se hace referencia a la siguiente descripción detallada, junto con las figuras adjuntas, en donde los caracteres de referencia similares denotan partes correspondientes en las diversas vistas.

Las FIGS. 1A-1J representan un enfoque de bioimpresión celular directa ejemplar, destacando componentes ejemplares. Las FIGS. 1A-1C ilustran células de impresión que utilizan un flujo de fluido de recirculación. Específicamente, la FIG. 1A proporciona una vista general esquemática de la configuración de bioimpresión que consiste en; un cabezal de impresión controlado por microposicionador, un posicionador de sustrato automatizado, una interfaz neumática controlada por ordenador y un sistema de formación de imágenes de microscopía. La FIG. 1B proporciona una imagen de microscopía fluorescente ejemplar de la punta del cabezal de impresión fluidica, que demuestra el flujo confinado hidrodinámicamente. La FIG. 1C proporciona una ilustración de la salida del cabezal de impresión fluidica, que presenta la trayectoria de flujo de las células dentro del fluido circulante confinado. Las FIGS. 1D-1E ilustran un procedimiento ejemplar de formación de patrones utilizando múltiples tipos de células. La FIG. 1D demuestra que el posicionamiento del cabezal de impresión en la proximidad de una superficie de sustrato dentro de una solución tampón, mientras se mantiene un flujo de fluido confinado, permite que las células interactúen y se unan al sustrato dentro de una región localizada en la punta del cabezal de impresión. La traslación de la superficie con respecto al cabezal de impresión permite que las células depositadas se modelen en dicha superficie, por ejemplo, para modular el flujo de fluido sobre el sustrato resultante. La FIG. 1E demuestra que las soluciones individuales que contienen, por ejemplo, diferentes células de pocillos de muestra individuales dentro del cabezal de impresión se pueden cambiar a voluntad, lo que permite que se impriman numerosos tipos de células cargadas sin la necesidad de reemplazar o recargar el cabezal de impresión. Las FIGS. 1F-1H representan imágenes experimentales que demuestran este enfoque, mediante la impresión de un patrón estructurado compuesto por franjas impresas alternas de células HaCaT y A431 en una superficie de placa de Petri sumergida en medio de crecimiento DMEM. La FIG. 1F representa las células A431 colocadas dentro del flujo confinado al comienzo de una impresión estructurada. La FIG. 1G representa la primera franja del patrón que se imprime al trasladar el sustrato. La FIG. 1H representa una imagen del patrón a mitad de la impresión de la segunda franja de células, después de cambiar el tipo de célula a HaCaT. La estructura impresa final se muestra en la FIG. 1I, compuesto por franjas impresas alternas de células HaCaT y A431, marcadas con verde citotóxico y rojo citotóxico, respectivamente. Esta estructura se tiñó con núcleos postimpresión con HOECHST® 33342 y se fijó con paraformaldehído. Una demostración de la precisión de impresión se muestra en la FIG. 1J, por lo que se construyó un conjunto de células individuales utilizando células SH-SY5Y. A través del control automatizado del posicionamiento del sustrato, la separación entre las células se puede fijar o ajustar en tiempo real. La barra de escala en las FIGS. 1F a 1J representa 100 µm.

Las FIGS. 2A-2H representan el desarrollo ejemplar del modelo de tejido y colonia celular posterior a la impresión, así como el crecimiento celular. Los modelos complejos de tejidos y colonias celulares que utilizan, por ejemplo, muestras pequeñas que contienen pocas células se pueden construir incubando las muestras impresas, permitiendo que las células crezcan y formen interacciones célula a célula, lo que da como resultado un tejido o una tela continua de células. Una representación pictográfica del desarrollo del modelo se muestra en la FIG. 2A a medida que las células recién depositadas crecen y proliferan para establecer una estructura similar a un tejido. Las FIGS. 2B-2E presentan ejemplos experimentales, destacando antes y después de una incubación de 20 horas después de la impresión. Un parche encapsulado simple de células (A431) de cáncer de piel rodeado por, y en contacto con, una capa de células epiteliales (HaCaT) se muestra en las FIGS. 2B-2C mediante el cual las células HaCaT y A431 se marcaron con verde citotrazador (límite discontinuo verde) y rojo citotrazador (límite discontinuo rojo) respectivamente. Una imagen de

campo claro del patrón directamente después de la impresión se muestra en la FIG. 2B, donde las líneas discontinuas indican los límites de los tipos de células impresas. La imagen fluorescente correspondiente se muestra en el panel izquierdo de la FIG. 2C, por lo que el modelo crecido se presenta en el panel derecho de la FIG. 2C. Una versión más compleja de este modelo de encapsulación se presenta en las FIGS. 2D y 2E, mediante las cuales se imprimen cuatro parches de células (A431) de cáncer de piel y están rodeados por una capa de células epiteliales (HaCaT). Los dos tipos de células se imprimieron para que no estuvieran en contacto, para permitir que cada tipo de célula se adhiriera a la superficie y creciera antes de interactuar entre sí. Las FIGS. 2D y 2E se realizaron usando el mismo tiempo y condiciones que para las FIGS. 2B y 2C. Se logró una aplicación simple de este enfoque mediante el establecimiento de un modelo de piel impreso similar a la psoriasis. El modelo de piel respondió al ácido retinoico, un fármaco utilizado en la terapia de la psoriasis. Este modelo está compuesto por una estructura de dos franjas impresas, de células HaCaT diferenciadas y no diferenciadas. Las franjas de células se imprimieron y se dejaron proliferar durante 24 horas antes de ser probadas. Las muestras de control se expusieron a medios de crecimiento frescos y las muestras tratadas se expusieron a medios suplementados con ácido retinoico durante 20 horas. Después del tratamiento, todas las muestras se fijaron con acetona y se marcaron con HOECHST® 33342 (azul) para identificar los núcleos y una tinción de doble anticuerpo, primero con citoqueratina 10 antihumana de conejo, seguido de IgG de cabra anti-conejo AFEXA FFLUOR® 488 (verde) para identificar el nivel de expresión de CK10. Las imágenes de ejemplo de muestras tratadas fijas se muestran en las FIGS. 2F y 2G, donde las bandas verdes y blancas en la parte superior de los paneles indican el ancho aproximado de la franja impresa de las células diferenciadas y no diferenciadas, respectivamente. Un gráfico de resumen del tratamiento con ácido retinoico se muestra en la FIG. 2H, lo que indica una disminución de aproximadamente el 20% en la expresión de CK10 para las muestras tratadas. La barra de escala en las FIGS. 2B-2G representa 200 µm.

Las FIGS. 3A-3J demuestran la bioimpresión celular 3D mediante la aplicación de un enfoque de bioimpresión celular directa para establecer una estructura multicelular multicapa y multicelular 3D. Se presenta una visión general del esquema de impresión en las FIGS. 3A a 3D, en donde una superficie de sustrato se precultiva con una capa de células confluentes, sobre la cual se puede depositar una capa de un agente de unión celular (Cell Attachment Agent, CAA) aplicado con el cabezal de bioimpresora, como se muestra en la FIG. 3A. Directamente después de la deposición de CAA, se puede imprimir una segunda capa de células, como se muestra en la FIG. 3B. A continuación, esta estructura de múltiples capas se incubaba y se deja crecer durante 24 horas. Este proceso de depósito de CAA, seguido de la impresión de células y la incubación, se puede ciclar o repetir varias veces para establecer capas adicionales, como se muestra en las FIGS. 3C y 3D, lo que resulta en una estructura de células con patrones 3D, que se muestra en la FIG. 3E. Un ejemplo experimental de este enfoque de estratificación 3D se muestra en las FIGS. 3F a 3H y se demuestra que construye una estructura modelada de células A431, seguida de células HaCaT, seguida de células A431. El sustrato de impresión era una placa de Petri cuadrículada recubierta de 500 µm, para ayudar a la identificación e impresión de cada capa posterior. Una imagen de campo claro de la estructura impresa en 3D final, directamente después de imprimir la tercera capa, se muestra en la FIG. 3F. La capa de células base está compuesta por células A431 marcadas con verde citotóxico (verde), la capa media son células HaCaT marcadas con rojo citotóxico (rojo) y la capa superior son células A431 preimpresas teñidas con Hoechst 33342 (azul). Una superposición de fluorescencia de los tres canales de color se muestra en la FIG. 3G. Como ayuda de visualización, cada canal se normalizó a una imagen en escala de grises de 8 bits y luego se sumó como una imagen de 32 bits, para establecer fácilmente dónde se colocan las células una encima de la otra, como se muestra en la FIG. 3H. Se tomó un perfil de línea a través del campo que se muestra en la FIG. 3H, correspondiente a la línea naranja. Se generó una gráfica que se muestra en la FIG. 3I, que indica las alturas de intensidad de fluorescencia después de la reconstrucción de la imagen. Una representación alternativa de esta visualización en capas se muestra en la FIG. 3J, destacando el diseño final de impresión multicapa. La barra de escala en las FIGS. 3F a 3J representa 100 µm.

La FIG. 4 representa un procedimiento ejemplar para generar estructuras biológicas tridimensionales.

Definiciones

La presente invención se entiende más claramente con referencia a las siguientes definiciones.

Como se usa en esta invención, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, el término “aproximadamente” se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. “Aproximadamente” puede entenderse como dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del valor establecido. A menos que se desprenda lo contrario del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en esta invención se modifican mediante el término aproximadamente.

Como se usa en esta invención, el término “unión” puede referirse a interacciones físicas, químicas, biológicas iónicas y electrostáticas, tales como enlaces estéricos, covalentes, iónicos y de hidrógeno, entre células y un sustrato, superficie u otras células. La unión se puede formar en el orden de un minuto para algunas células. Otras células (por ejemplo, neuronas) pueden unirse durante semanas. Los intervalos de tiempo ejemplares para permitir la fijación pueden incluir: de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 segundos, de aproximadamente 10 segundos

a aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 segundos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 día, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, y de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 8 semanas, de aproximadamente 8 semanas a aproximadamente 12 semanas, y así sucesivamente.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "comprende", "comprendiendo", "que contiene", "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, el término "o", como se usa en esta invención, se entiende que es inclusivo.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, el término "recirculación" puede tener el significado de una ruta de flujo de fluido que sale del dispositivo y regresa al mismo dispositivo.

Se entiende que los intervalos proporcionados en esta invención son abreviaturas para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 (así como fracciones de los mismos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario).

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la invención proporcionan sistemas y procedimientos para la deposición controlada de células biológicas o constituyentes celulares sobre superficies, que incluyen, entre otros, la fabricación aditiva de redes celulares, tejidos, órganos y otras estructuras biológicas de pequeñas a grandes. En particular, las realizaciones de la invención se pueden usar para crear estructuras celulares histológicamente complejas en 2D y 3D.

Dispensadores de fluido

En algunas realizaciones de la invención, el dispensador de fluido incluye una boquilla u otro dispositivo que expulsa un fluido. Por ejemplo, las realizaciones de la invención pueden aplicarse a dispositivos de fabricación aditiva existentes (también conocidos como "impresión 3D"), por ejemplo, incorporando los sistemas y procedimientos descritos en esta invención junto con cabezales de impresión de fabricación aditiva existentes que aplican materiales tales como polímeros, por ejemplo, polímeros biocompatibles, para la producción de órganos en un chip.

Con referencia ahora a las FIGS. 1A-1H, en algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos de impresión utilizan un dispositivo 102 de confinamiento de flujo y un controlador 104 configurado para generar un volumen de líquido confinado fuera del dispositivo 102 de confinamiento de flujo donde el volumen de líquido confinado puede ser modulado por dicho controlador 104 para incluir modos de flujo modulados y no confinados, así como modos de flujo cero, y donde el controlador 104 puede usarse para cambiar entre cualquier modo de flujo en secuencia arbitraria, durante períodos de tiempo arbitrarios.

Algunas realizaciones de la invención utilizan flujos de fluido o flujos de fluido de recirculación, generados en la punta de un dispositivo 102 de confinamiento de flujo, para lograr una impresión de alta resolución (por ejemplo, con respecto a la posición lateral y axial de las células, el tamaño del punto de deposición para agrupaciones de células, espesores de capa, cantidades de células depositadas, tipos de células depositadas y similares). Aunque las realizaciones de la invención proporcionan capacidades de deposición de una sola célula, las realizaciones de la invención también pueden depositar múltiples células a la vez. Por ejemplo, y sin limitarse a la teoría, el Solicitante cree que las realizaciones de la invención pueden depositar de manera fiable capas que tienen un espesor de menos de dos células (por ejemplo, menos de aproximadamente 500 μm , menos de aproximadamente 300 μm , menos de aproximadamente 200 μm , menos de aproximadamente 150 μm , menos de aproximadamente 100 μm , menos de aproximadamente 75 μm , menos de aproximadamente 50 μm , menos de aproximadamente 20 μm , menos de aproximadamente 10 μm , menos de aproximadamente 5 μm , y similares).

Como se representa más claramente en la FIG. 1C, el dispositivo 102 de confinamiento de flujo puede incluir uno o más canales de los cuales algunos canales están configurados como canales de salida, a través de los cuales el líquido sale del dispositivo 102 en un volumen abierto y algunos canales son canales de entrada, a través de los cuales el líquido se retira del volumen abierto en el dispositivo. En algunas realizaciones, los canales de salida y los canales de entrada son canales diferentes. En algunas realizaciones, el mismo canal se puede cambiar intermitentemente para que sea un canal de salida y un canal de entrada, por ejemplo, como se describe adicionalmente en la patente de EE. UU. No. 9,126,197.

El controlador 104 se puede configurar para controlar el flujo de líquido de modo que todo el líquido que sale del dispositivo regrese eventualmente al dispositivo cuando está en modo recirculatorio.

El flujo de salida puede alcanzar una distancia máxima limitada desde el canal de salida antes de regresar al canal de entrada. Esta distancia define el tamaño del volumen de líquido confinado. Por lo tanto, el flujo de salida de líquido puede alcanzar un sustrato (por ejemplo, placa de células en la FIG. 1A) o una superficie, si se coloca más cerca que la dimensión crítica del volumen de líquido confinado. En algunas realizaciones, el flujo de salida puede alcanzar el sustrato, de modo que el dispositivo 102 de confinamiento de flujo no tenga un contacto directo con el sustrato. La punta del dispositivo 102 de confinamiento de flujo puede, en algunas aplicaciones no limitantes, estar en contacto con el sustrato.

En diversas realizaciones, el dispositivo puede depositar de forma fiable células individuales, y/o grupos de células, con una resolución lateral del orden de una célula individual (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 μm , menos de aproximadamente 100 μm , menos de aproximadamente 75 μm , menos de aproximadamente 50 μm , menos de aproximadamente 30 μm , menos de aproximadamente 20 μm , y similares).

Los dispositivos y procedimientos de ejemplo para generar flujos de fluidos confinados se describen en las patentes de EE. UU. Nos. 9,126,197; 9,658,240; y 9,671,366.

Sistemas de control ejemplares

Siguiendo con referencia a la FIG. 1A, el dispositivo 102 de confinamiento de flujo de fluido de recirculación puede colocarse fácilmente con respecto a un objeto de interés utilizando un sistema de posicionamiento manual o mediante la implementación de un dispositivo 106 de posicionamiento controlado electrónicamente. El sistema de posicionamiento puede incluir micromanipuladores hidráulicos, mecánicos o eléctricos (por ejemplo, motor paso a paso o servomotor). Estos actuadores se pueden disponer en una, dos, tres, cuatro o más direcciones.

La posición controlada electrónicamente tanto del cabezal de impresión como del sustrato se puede lograr mediante el control bajo demanda, por ejemplo, mediante el uso de un joystick, un controlador de gamepad, una rueda de desplazamiento, una pantalla táctil y combinaciones de los mismos, y/o mediante el uso de una ruta determinada computacionalmente. Estas rutas pueden, por ejemplo, derivarse de un sistema de coordenadas simple, un archivo de diseño, tal como archivos CAD .stl (STereoFithography), y/o a través de una respuesta de retroalimentación relativa, por ejemplo, adaptándose a la posición cambiante de la propagación celular.

Retroalimentación

En algunas realizaciones, los procedimientos de deposición de células se pueden llevar a cabo bajo el control de un controlador de flujo preprogramado. En diversas realizaciones, el sistema puede comprender además un dispositivo de medición de concentración celular para medir la deposición celular. En diversas realizaciones, el controlador de flujo preprogramado puede programarse para evaluar si un número predefinido de células está correctamente ubicado en el sustrato. La característica de varias realizaciones mediante la cual los parámetros del procedimiento se ajustan en base a la información recopilada en el transcurso del procedimiento se denomina "retroalimentación".

En diversas realizaciones, el sistema puede comprender además un dispositivo o procedimiento para medir una propiedad celular, tal como un procedimiento para medir la expresión de proteínas, la expresión génica, los marcadores metabólicos, las interacciones célula-célula, los iones u otras propiedades biológicas, físicas o químicas de una o varias células en los diversos modos de flujo, incluido el flujo recirculatorio.

La concentración de partículas/células en el flujo se puede determinar a partir de la concentración inicial a medida que ingresa al dispositivo microfluídico y/o la monitorización dentro del dispensador o en el sustrato, por ejemplo, conductividad, impedancia, fluorescencia, retraso de fase y similares.

La cobertura se puede evaluar a través de una variedad de técnicas y dispositivos. A modo de ejemplo no taxativo, la cobertura puede evaluarse mediante evaluación óptica, seguimiento de partículas, midiendo la conductividad y/o la impedancia, mediante ultrasonido y/o mediante mediciones de retardo de fase óptica. Un experto en la materia apreciará que las diferentes técnicas para medir la cobertura son más o menos apropiadas en base a las circunstancias que incluyen, por ejemplo, el tipo de célula y el tipo de líquido o líquidos utilizados.

En una realización, la evaluación óptica se puede realizar usando una cámara digital (por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (Charge-Coupled Device, CCD) o un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS)), que opcionalmente se puede asociar con diversas ópticas tales como un microscopio, una fuente de luz y similares. Modalidades de formación de imágenes adecuadas tales como reflexión, absorción, retardo de fase, polarización, fluorescencia, fosforescencia y similares. El procesamiento de imágenes se puede realizar en la imagen capturada y examinarse para determinar si el estado de cobertura actual es aceptable (por ejemplo, en vista de un archivo fuente .stl). Varios patrones pueden colocar las mismas o similares células adyacentes entre sí, colocar diferentes células adyacentes entre sí, colocar células adyacentes a materiales no celulares tales como andamios poliméricos y similares.

En otra realización, las partículas suspendidas se rastrean, por ejemplo, después de salir del cabezal de impresión microfluídico. Por ejemplo, la tecnología de seguimiento de espermatozoides, tal como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2017/0109879, se puede aplicar para rastrear una pluralidad de partículas suspendidas en movimiento. El flujo de fluido se puede modificar o pausar para facilitar la colocación deseada de la(s) partícula(s) suspendida(s).

En otra realización, la conductividad y/o la impedancia se pueden utilizar para evaluar la cobertura. Por ejemplo, se pueden colocar dos o más electrodos en la cámara de deposición, al menos uno de los cuales debe ser adyacente al cabezal de impresión microfluídico, y se puede aplicar corriente entre los electrodos. Sin limitarse a la teoría, el Solicitante cree que la resistencia aumentará en las mediciones durante el flujo de fluido recirculante a medida que se depositan las células. Del mismo modo y sin limitarse a la teoría, el Solicitante cree que la presencia de células depositadas después del cese del flujo de fluido recirculante dará como resultado una disminución de la impedancia. Los valores de conductividad y/o impedancia indicativos de resultados se pueden determinar experimentalmente para realizaciones particulares, almacenar en medios legibles por ordenador y hacer referencia en una realización particular.

En incluso otra realización, se pueden utilizar ondas acústicas (por ejemplo, ondas de ultrasonido) para detectar la presencia y posición de un flujo de fluido recirculante y/o una partícula depositada.

En aún otra realización, la posición de las partículas depositadas y/o la cobertura de la superficie se pueden determinar mediante mediciones de retardo de fase óptico. Se puede emplear cualquier fuente de luz polarizada y también cualquier técnica para la detección de fase, tal como microscopía holográfica digital (Digital Holographic Microscopy, DHM).

Sustratos ejemplares

Como se usa en esta invención, el término "sustrato" se refiere al área o al objeto en o sobre el cual se depositan las células. El término "sustrato" debe interpretarse en términos generales, ya que los procedimientos de la invención pueden aplicarse a una amplia variedad de sustratos diferentes. A modo de ejemplo no taxativo, el sustrato puede ser una superficie, tal como vidrio o plástico, que puede o no estar funcionalizada. El sustrato puede ser un elemento de volumen, tal como un fluido contenido o un gel. El sustrato también puede ser células del mismo tipo o diferentes de las depositadas. En realizaciones en las que el sustrato es una célula o células, las células pueden suspenderse en una solución, unirse a una superficie u otro objeto, o parte de tejido, ya sea en cultivo o de un organismo vivo que incluye un ser humano.

El sustrato puede, entre otros materiales, estar compuesto por: un agente de unión celular, plástico, vidrio, silicio, papel, algodón, biomaterial, películas lipídicas, gel, aerogel, hidrogel, matriz polimérica, metales, óxidos metálicos, membranas semipermeables, membranas permeables, polisacáridos, almidón, celulosa, gelatina, andamios biológicos, tejido biológico, tejido no biológico, células biológicas o un material compuesto de cualquiera de la lista anterior.

Los tipos de plástico ejemplares incluyen, pero no se limitan a, policarbonato, poliestireno, tereftalato de polietileno, polietileno de alta densidad, polietileno de baja densidad, cloruro de polivinilo, polipropileno, poliestireno, polilactida, poliacetal, polidimetilsiloxano, acrílico, acrilonitrilo butadieno, nylon y similares.

Suspensiones ejemplares

Las suspensiones dispensadas por el cabezal de impresión pueden incluir una variedad de disolventes que incluyen disolventes acuosos. La viscosidad de la suspensión puede configurarse para que la suspensión permanezca en una ubicación deseada durante un tiempo suficiente para la unión y/o el crecimiento celular. En algunas realizaciones, el disolvente es un gel diluido.

Materiales biológicos ejemplares

Las suspensiones dispensadas pueden incluir una variedad de materiales biológicos tales como células, fragmentos de células, vesículas, orgánulos subcelulares, partículas y similares.

Las suspensiones celulares se pueden preparar usando técnicas estándar, como se entiende en la técnica.

Por ejemplo, las células de mamífero se pueden suspender en una solución de alrededor de 1×10^6 células/ml a alrededor de 10×10^6 células/ml. La solución de suspensión celular se puede combinar con un PEG (por ejemplo, peso molecular 6000). En algunas realizaciones, las soluciones de suspensión celular pueden tener una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml.

En algunas realizaciones, cada capa incluye un solo tipo de célula. En otras realizaciones, se proporciona una pluralidad de tipos de células en la misma suspensión. En aún otras realizaciones, se aplica una pluralidad de suspensiones, cada una de las cuales contiene un único tipo de célula, adyacentes entre sí dentro de una única capa. En otra realización más, los tipos de célula varían de una capa a otra.

Ejemplos de agentes de unión celular

El agente de unión celular (Cell Attachment Agent, CAA) puede administrarse globalmente (sobre toda la superficie de la muestra), localmente (dentro de una región definida de la muestra) y/o directamente modelado (sobre toda la muestra o localmente, donde la región está definida por la trayectoria del cabezal de impresión fluido).

- 5 Los tipos de CAA incluyen, pero no se limitan a proteínas de adhesión, proteínas de unión celular, biomoléculas de adhesión celular, moléculas de adhesión celular e incluyen además, pero no se limitan a: polilisina (por ejemplo, poli-L-lisina (PLL)), laminina, fibronectina, vitronectina, matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, disponible bajo la marca GELTREX® de Life Technologies Corporation de Carlsbad, California), actina, integrina, perlecan, desmina, poliglicanos, fibulina, elastina, tropoelastina, cadherina, gelatina, concanavalina, colágeno, geles orgánicos e inorgánicos, estructuras lipídicas (por ejemplo, nanotubos, vesículas, gotitas, y similares), suero de crecimiento (por ejemplo, suero bovino fetal, suero de ternera, suero de caballo, y similares), ácidos nucleicos (por ejemplo, cadenas de ADN y/o ARN), soluciones catiónicas (que contienen, por ejemplo, calcio, magnesio, zinc, y similares), o una solución compuesta por cualquiera de la lista anterior.

- 15 El CAA se puede preparar como una solución de trabajo para pretratar uno o más sustratos. La solución de trabajo de CAA para el pretratamiento puede incluir uno o más de PLL, poli-D-lisina (PDL), ECM y un tampón que incluye, por ejemplo, tampón de borato de sodio. En ciertas realizaciones, la solución de trabajo para el pretratamiento incluye: 0,5 mg/mL de poli-L-lisina (PLL) y 75 µg/mL de matriz extracelular (concentración de proteína 120-180 µg/mL, GELTREX®, Gibco), preparada usando tampón de borato de sodio 0,1 M. La solución de trabajo para el pretratamiento se puede preparar un intervalo de tiempo antes de su uso, incluso inmediatamente antes de su uso.

- 20 El CAA se puede preparar como una solución de trabajo para impresión directa, también conocida como CAA-dp. El CAA-dp puede ser de la misma composición que el CAA o ser de una composición que incluye uno o más de PLL, PDL, suero (por ejemplo, suero bovino fetal) y tampón (por ejemplo, tampón salino tamponado con fosfato). En ciertas realizaciones, la solución de trabajo para impresión directa incluye: 0,1 mg/ml de poli-L-lisina (PLL) y FBS al 10%, preparado en un tampón 1x de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución de trabajo para impresión directa se puede preparar un intervalo de tiempo antes de su uso, incluso inmediatamente antes de su uso.

CAA puede incluir adicionalmente compuestos que responden al medio ambiente, tales como Poli(N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) para la capacidad de respuesta térmica o Rosa de Bengala o riboflavina para enlazadores fotoactivos.

Agentes de bloqueo celular ilustrativos

- 30 De manera similar a CAA, el agente de bloqueo celular (Cell-Blocking Agent, CBA) se puede aplicar globalmente sobre un sustrato, localmente o con patrón usando el cabezal de impresión fluido. El CBA puede evitar la unión entre células adyacentes y/o actuar como marcador de posición. En algunas realizaciones, el CBA es una sustancia soluble. Por ejemplo, un CBA tal como PEG se puede depositar como un andamio para establecer una luz mientras que las células se depositan alrededor de la luz para formar un vaso.
- 35 Los tipos de CBA incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de bloque, albúmina de suero bovino (BSA), tensioactivos (por ejemplo, tensioactivos PLUORONIC™ disponibles en ThermoFisher Scientific de Waltham, Massachusetts), caseína, politetrafluoroetileno (PTFE) (por ejemplo, TEFLON® disponible en The Chemours Company de Wilmington, Delaware), silanos, soluciones particuladas (por ejemplo, que incluyen nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas metálicas tales como oro, plata, aluminio, titanio y similares), microesferas poliméricas y similares), o una solución compuesta que comprende cualquiera de la lista anterior.

Adiciones a organismos vivos

Las realizaciones de la invención se pueden aplicar para añadir material a los organismos vivos. En tales realizaciones, el organismo puede considerarse el sustrato. Dichas realizaciones se pueden usar para una variedad de aplicaciones terapéuticas y/o cosméticas que incluyen medicina regenerativa, injerto de tejido, cirugía plástica, ortopedia y similares.

- 45 Las realizaciones de la invención que utilizan un cabezal de impresión blando son particularmente ventajosas en dichas realizaciones, especialmente cuando se aplican a tejidos delicados como el ojo y el oído.

Dicho injerto generado *in situ* puede unirse al organismo a través de diversas técnicas que incluyen el uso de reticulación como se describe en esta invención.

- 50 Los injertos generados *in situ* también se pueden utilizar con fines de investigación. Por ejemplo, las células cancerosas pueden imprimirse dentro de un organismo (por ejemplo, en un patrón predefinido y consistente a través de múltiples organismos) para la investigación con animales de experimentación.

Las referencias a los procedimientos de tratamiento anteriores, bajo el título "Adiciones a los organismos vivos", deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o diagnóstico).

5 Ejemplos experimentales

La invención se describe más detalladamente haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe interpretarse como que abarca todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en este documento.

Ejemplo 1: Preparación de un modelo de piel impreso

Con el fin de preparar un modelo de piel tridimensional ejemplar, se prepararon los siguientes materiales y se utilizaron según los siguientes procedimientos.

Materiales y procedimientos

15 Cultivo celular

Las células HaCaT se mantuvieron y cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco completo (DMEM, Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco), a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células utilizadas como controles experimentales se subcultivaron cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80 %, evitando que las células se diferenciaron. Para imitar las células afectadas por la psoriasis, se preparó un cultivo separado de células HaCaT y se dejó diferenciar, cultivando el cultivo durante 3-4 días adicionales, una vez que se había logrado una confluencia del 100 %.

Tratamiento con citocinas

Para inducir la expresión de la proteína similar a la psoriasis, las células HaCaT diferenciadas se expusieron a una combinación de citocinas inflamatorias 1L-1 α (10 ng/ml, Peprotech) y TNF- α (5 ng/ml, Peprotech) durante 36 horas antes del proceso de bioimpresión.

Bioimpresión

Se utilizaron células HaCaT indiferenciadas y diferenciadas similares a la psoriasis (tratadas con citocinas) para bioimprimir un modelo de piel con la plataforma BIOPIXLAR®. El modelo de piel se formó imprimiendo tiras de células similares a la psoriasis ("enfermas") e indiferenciadas ("sanas") una al lado de la otra. El proceso de impresión se realizó en placas IBIDI® prerrevestidas con CAA. Después de la impresión, se dejó que las células crecieran y proliferaran en medio de crecimiento completo (DMEM + FBS al 10 %) a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h.

En general, se utilizó el siguiente protocolo para imprimir el modelo de piel como se describe en esta invención.

1. Precargar el cabezal de impresión con las suspensiones de células requeridas y otros reactivos. Si la superficie del sustrato no se trata previamente con CAA, la solución de CAA-dp debe precargarse adicionalmente en el cabezal de impresión.

2. Añadir una cantidad adecuada de medio de cultivo celular sin FBS sobre el sustrato, para establecer la inmersión para el cabezal de impresión, luego colocar el cabezal de impresión en relación con la superficie.

3. Si el sustrato no ha sido recubierto con CAA, el área de impresión objetivo se puede recubrir directamente con CAA-dp antes de imprimir las células.

4. Las células se imprimen sobre el sustrato según se desee.

5. Después de la impresión celular, el sustrato se transfiere a una incubadora (37 °C y CO₂ al 5 %) y se permite que las células se adhieran, proliferen y/o crezcan hasta que se logre la capa celular deseada. Se puede agregar FBS al medio de crecimiento después de la impresión.

6. Para construir capas celulares adicionales, todo el sustrato**, incluidas las células cultivadas, se puede tratar previamente con CAA-dp reemplazando el medio de crecimiento con CAA-dp e incubando (37 °C y CO₂ al 5 %) durante 5 min. A continuación, esta solución se puede eliminar y el sustrato cargado de células se puede enjuagar suavemente con tampón 1x de PBS o medio de cultivo sin FBS.

7. Antes de la impresión, la capa adicional de células, la solución en la que se sumerge el sustrato, se puede intercambiar con medio de cultivo sin FBS.

8. Repetir las etapas 3-7 para imprimir una nueva capa de células.

** Si se va a tratar un área localizada para la impresión en lugar del sustrato global, el CAA-dp se puede aplicar localmente exponiendo la superficie a la solución de CAA-dp utilizando el cabezal de impresión. Este patrón localizado no requiere un cambio completo del medio de inmersión del sustrato.

5 Tratamiento farmacológico

Para verificar la aplicabilidad del modelo de piel bioimpreso, se comparó el efecto del ácido transretinoico total (Retinoic Acid, RA) (Sigma), un fármaco utilizado para muchos trastornos de la piel, con un control. Cuatro horas después de la impresión, se introdujo RA en el medio de crecimiento completo a una concentración final de 1 μ M. A continuación, se dejó crecer el modelo durante 20 horas. El modelo de control se trató con cantidades iguales del disolvente de AR.

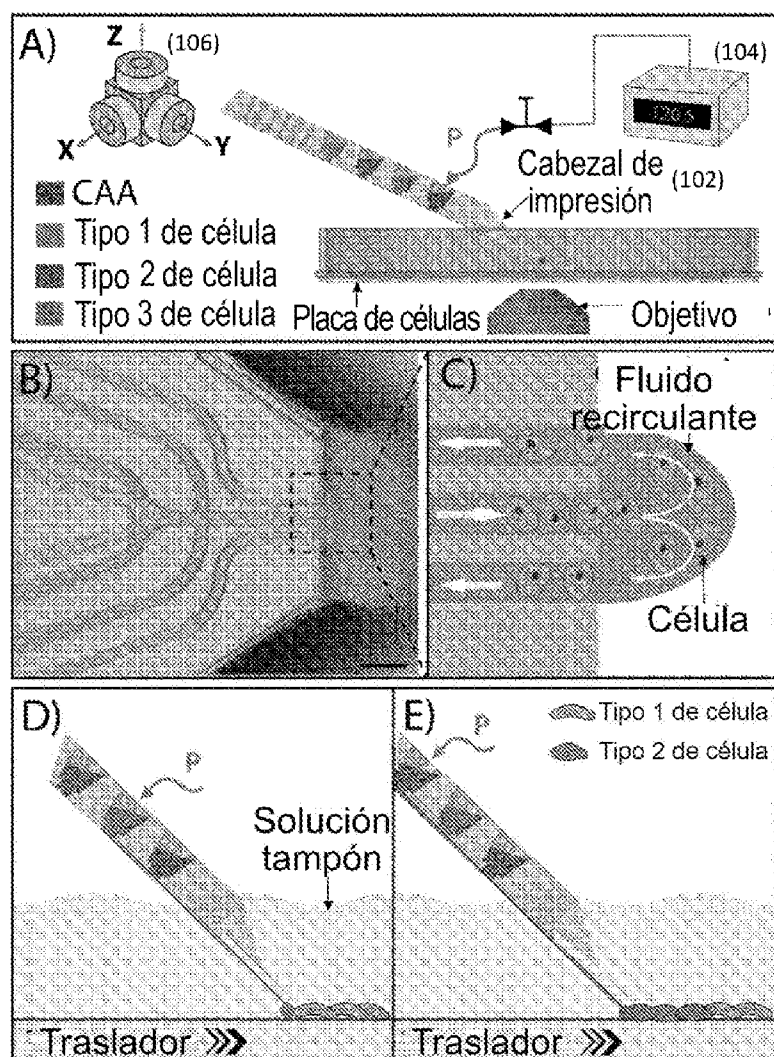
10 Tinción por inmunofluorescencia

El medio de cultivo se retiró de la placa y los modelos impresos se lavaron tres veces con PBS precalentado (37 °C). A continuación, las células se fijaron con acetona enfriada durante 5-6 minutos a -20 °C. La acetona se retiró de la placa y luego se lavó a fondo con PBS sin permitir que las células se secan entre enjuagues. A continuación, las células fijadas se incubaron con reactivo de bloqueo ULTRACRUZ® (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente (Room Temperature, RT). Después del bloqueo, las células se tiñeron con anticuerpo primario de conejo (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) diluido en reactivo de bloqueo ULTRACRUZ® a RT durante 1 h. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con ALEXA-FLUOR® 488 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) a RT durante 1 h. Después, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS, y se montaron usando medio de montaje acuoso ULTRACRUZ® con DAPI (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), y se sellaron con cubreobjetos. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio fluorescente (ZEISS® AXIOVERT® AI, Carl Zeiss, Alemania) equipado con 5X (EC PLAN-NEOFLUAR®, NA 0.16) y 10X (EC plan-NEOFLU AR®, NA 0.30) objetivos, LED 385nm, LED 470nm y LED N-White, fuentes de luz y cubos de filtro correspondientes para la detección de emisiones azules, verdes y rojas (conjuntos de filtros CARL ZEISS® Nr. 49, Nr. 44 y 43). Las imágenes se procesaron y analizaron utilizando los paquetes de software CARL ZEISS®, ZEN Blue v.2.6 e IMAGEJ™.

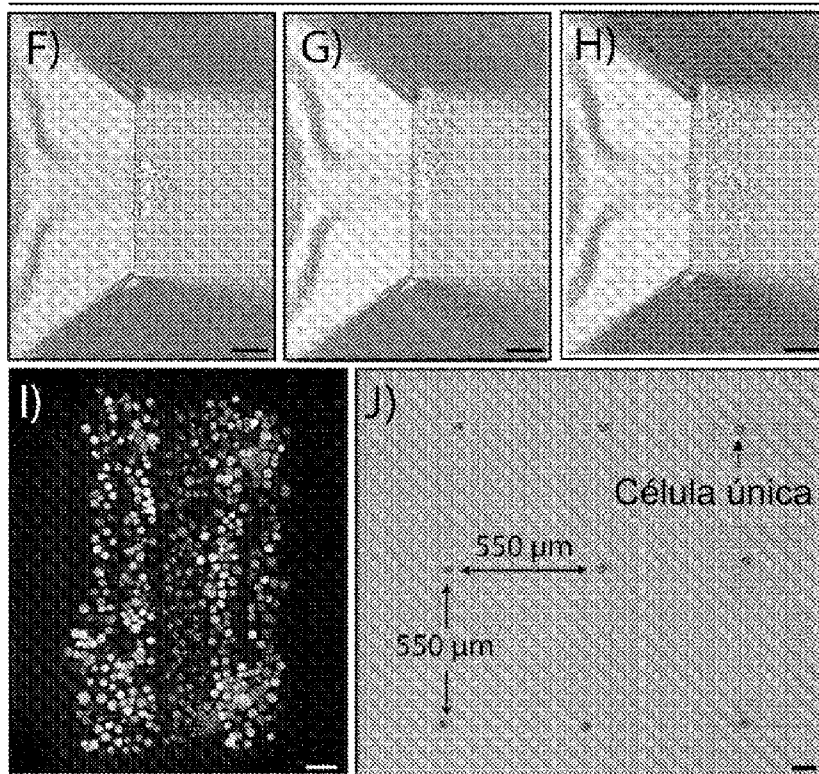
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de generación de estructuras biológicas tridimensionales, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) depositar, usando un dispositivo de confinamiento de flujo, una primera capa de una suspensión en un patrón sobre un sustrato, comprendiendo la suspensión un líquido y una pluralidad de células;
 - (b) permitir que la pluralidad de células se una al sustrato y forme una primera capa de células unidas;
 - (b') cultivar la pluralidad de células en la primera capa durante un período de tiempo de entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 8 semanas, con el fin de establecer o aumentar la cantidad de uno o más seleccionados del grupo que consiste en: interacciones célula-célula, uniones célula-célula, masa celular y cantidad celular, dando como resultado el cultivo una estructura similar a un tejido;
 - (c) depositar un agente de unión celular sobre la primera capa de células unidas;
 - (d) depositar, utilizando un dispositivo de confinamiento de flujo, una segunda capa de la suspensión en un patrón sobre el agente de fijación celular; y
 - (e) repetir las etapas (b)-(d) hasta que se genere una estructura biológica que tenga un espesor predefinido,
- 15 donde las etapas a)-d) no se realizan en el cuerpo humano o animal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo además medir la expresión de proteínas, la expresión génica, los marcadores metabólicos, las interacciones célula-célula, los iones u otras propiedades biológicas, físicas o químicas de la pluralidad de células, incluido el flujo recirculatorio.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el período de tiempo comprende uno o más intervalos de tiempo seleccionados del grupo que consiste en: de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 día, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, y de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 8 semanas.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el espesor predefinido se selecciona de entre el grupo que consiste en: aproximadamente 1 μm , entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 10 μm , entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 100 μm , entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 1 mm, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 1,5 mm, entre aproximadamente 1,5 mm y aproximadamente 5 mm, entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 2 cm, entre aproximadamente 2 cm y 10 cm, y entre aproximadamente 10 cm y 50 cm.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo además:
 - (e) repetir las etapas (a)-(c) en una nueva ubicación en el sustrato.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el agente de unión celular se aplica en un patrón.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la suspensión comprende una pluralidad de tipos celulares.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo además:
 - (f) depositar un agente bloqueador de células sobre la segunda capa de la suspensión.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en donde el agente de bloqueo celular se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), copolímeros de bloque, albúmina de suero bovino (BSA), tensioactivo, caseína, politetrafluoroetileno (PTFE), silanos, soluciones particuladas, nanopartículas, nanopartículas metálicas, nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de aluminio, nanopartículas de titanio y microesferas poliméricas.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el agente de unión celular se selecciona del grupo que consiste en: proteínas de adhesión, proteínas de unión celular, biomoléculas de adhesión celular, moléculas de adhesión celular, polilisina, laminina, fibronectina, vitronectina, matriz extracelular (ECM), actina, integrina, perlecano, desmina, poliglicanos, fibulina, elastina, tropoelastina, cadherina, gelatina, concanavalina, colágeno, estructuras lipídicas, nanotubos lipídicos, vesículas lipídicas, gotas lipídicas, suero de crecimiento, suero fetal bovino, suero de ternera, suero de caballo, ácidos nucleicos, hebras de ADN, hebras de ARN, soluciones catiónicas, soluciones de calcio, soluciones de magnesio y soluciones de zinc.
- 50

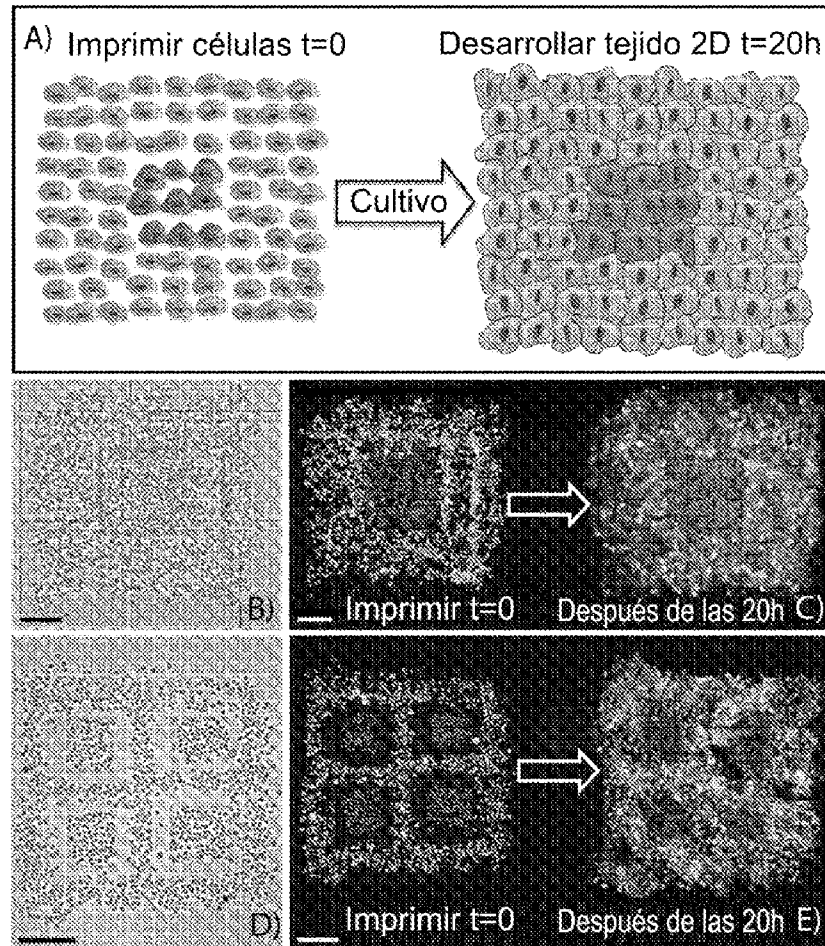
- 5 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en: agente de unión celular, plástico, vidrio, silicio, papel, algodón, biomaterial, películas lipídicas, gel, aerogel, hidrogel, matriz polimérica, metales, óxidos metálicos, membranas semipermeables, membranas permeables, polisacáridos, almidón, colágeno, celulosa, gelatina, andamios biológicos, tejido biológico, tejido descelularizado, tejido no biológico y células biológicas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el sustrato comprende secciones adyacentes de diferentes materiales de sustrato.



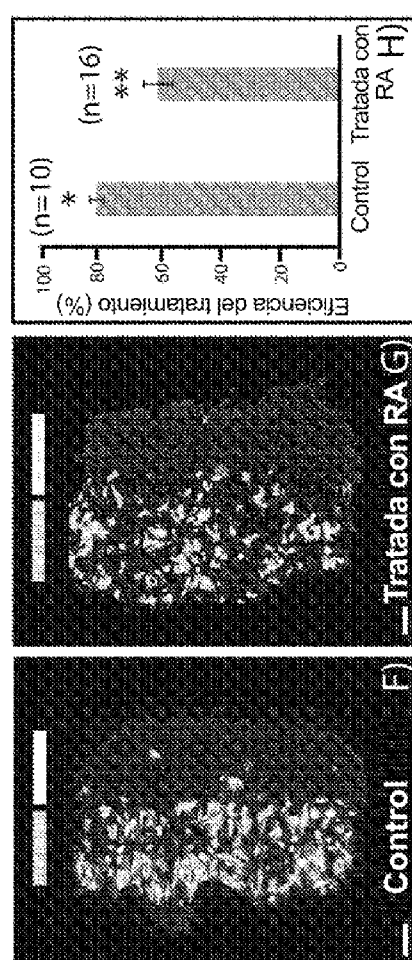
FIGS. 1A-1E



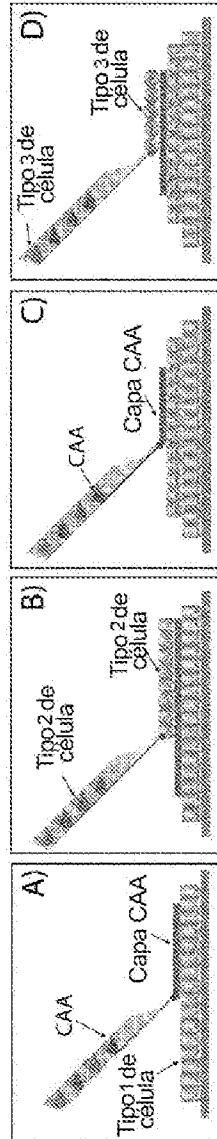
FIGS. 1F-1J



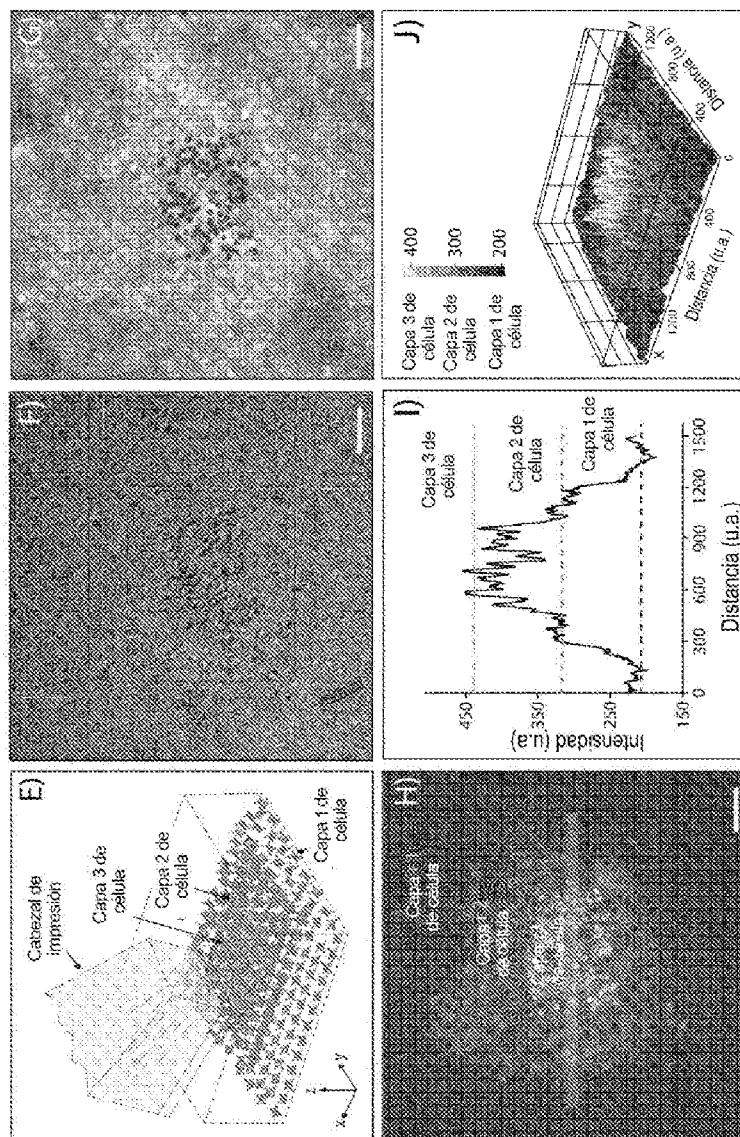
FIGS. 2A-2E



FIGS. 2F-2H



FIGS. 3A-3D



FIGS. 3E-3J

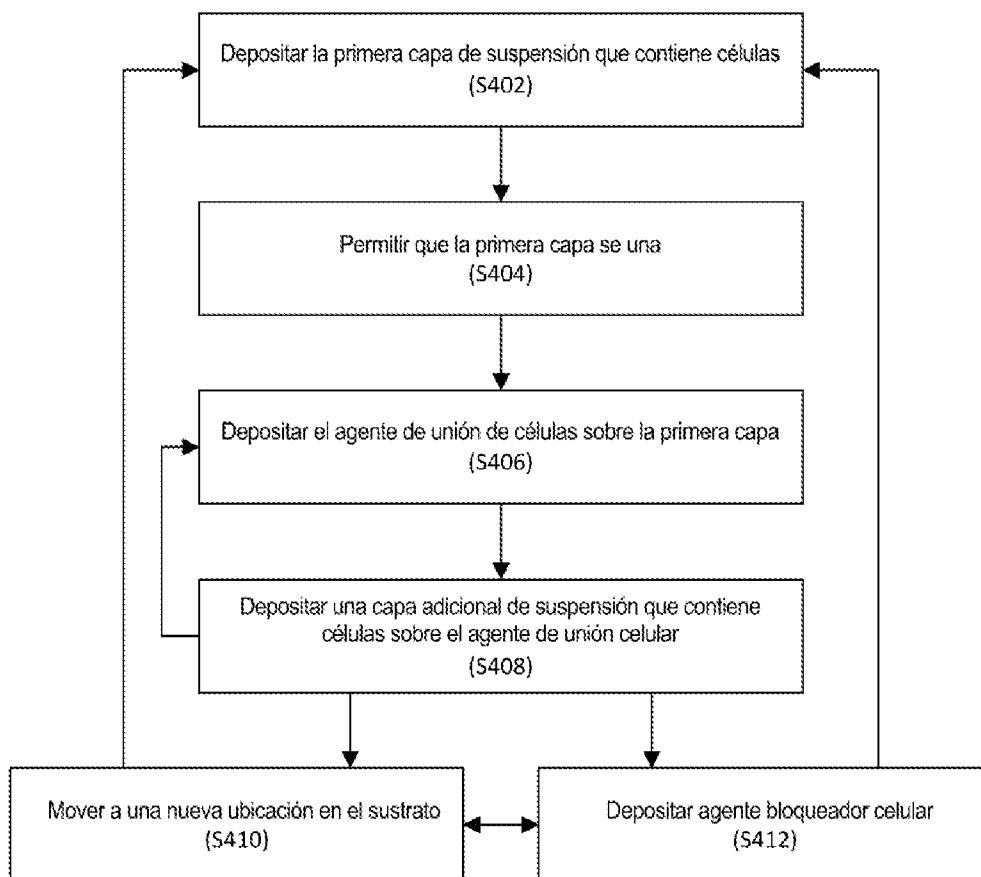


FIG. 4