



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014115703/10, 17.09.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.09.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.09.2011 FR 1158316

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2015 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 20.11.2016 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20060097361 A1, 11.05.2006. US 2009/0248145 A1, 01.10.2009. MAHMUD G., CAMPBELL C.J. AND ET AL., Directing cell motions on micropatterned ratchets // Nature physics, 2009, vol.5, стр.606-611.. US 20090248145 A1, 01.10.2009. RU 2256912 C2, 20.07.2005.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 21.04.2014

(86) Заявка РСТ:
FR 2012/052073 (17.09.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/041800 (28.03.2013)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ЛЕ БЕРР Маэль (FR),
ПЕЛЬ Матьё (FR),
ЧЕНЬ Йон (FR),
ЛИУ Яньцзунь (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ЭНСТИТЮ КЮРИ (FR),
САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
СЪЕНТИФИК-СНРС (FR),
СОСЬЕТЕ ДЕ ДЕВЕЛОПМАН Э ДЕ
РЕШЕРШ ЭНДЮСТРИЭЛЬ (FR)

(54) УСТРОЙСТВО ДЛЯ НАПРАВЛЕНИЯ МИГРАЦИИ КЛЕТОК И СПОСОБ НАПРАВЛЕНИЯ МИГРАЦИИ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ ТАКОГО УСТРОЙСТВА

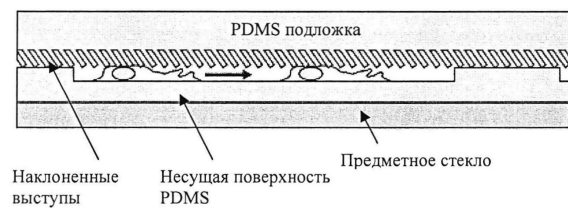
(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биохимии. Предложено устройство и способ направления миграции клеток, а также способ изготовления данного устройства. Устройство содержит подложку с текстурированной поверхностью, имеющей анизотропную трехмерную структуру, для контактирования с клетками. Вышеуказанная структура состоит из периодически расположенных выступов на текстурированной поверхности с формированием равномерной повторяющейся структуры с

промежутками между выступами. Выступы имеют размер меньше клеток, при этом выступы наклонены относительно нормали к плоскости, сформированной текстурированной поверхностью, в направлении, заданном анизотропной структурой. Способ изготовления устройства включает подготовку силиконовой формы с использованием оптической литографии с автоматическим совмещением, причём данная форма представляет собой негативную копию трехмерной структуры, формирование материала,

составляющего трехмерную структуру, и отсоединение силиконовой формы. Способ направления миграции клеток осуществляют путём введения клетки в контакт с

вышеуказанным устройством. Изобретения обеспечивают управляемую миграцию клеток в заданном направлении. 3 н. и 21 з.п. ф-лы, 15 ил.



Фиг. 2

RU 2603083 C2

RU 2603083 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12M 3/04 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014115703/10, 17.09.2012

(24) Effective date for property rights:
17.09.2012

Priority:

(30) Convention priority:
19.09.2011 FR 1158316

(43) Application published: 27.10.2015 Bull. № 30

(45) Date of publication: 20.11.2016 Bull. № 32

(85) Commencement of national phase: 21.04.2014

(86) PCT application:
FR 2012/052073 (17.09.2012)

(87) PCT publication:
WO 2013/041800 (28.03.2013)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"

(72) Inventor(s):

**LE BERR Mael (FR),
PEL Mate (FR),
CHEN Jon (FR),
LIU JA**ntszun (FR)

(73) Proprietor(s):

**ENSTITJU KJURI (FR),
SANTR NASONAL DE LJA RESHERSH
SENTIFIK-SNRS (FR),
SOSETE DE DEVELOPMAN E DE
RESHERSH ENDJUSTRIEL (FR)**

(54) **DEVICE FOR GUIDING CELL MIGRATION AND METHOD OF GUIDING CELL MIGRATION USING SAID DEVICE**

(57) Abstract:

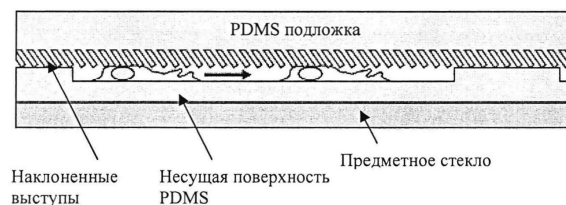
FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biochemistry. Disclosed is a device and a method of guiding cell migration, as well as a method of making said device. Device comprises a substrate having a textured surface having an anisotropic three-dimensional structure for contact with cells. Said structure consists of alternating projections on textured surface with formation of uniform repeating structure with gaps between projections. Projections have a size smaller than cells, wherein projections are inclined relative to perpendicular to plane formed by textured surface, in a direction specified by anisotropic structure. Method involves preparation of a silicone mould using optical lithography with automatic matching, wherein said

mould is a negative copy of a three-dimensional structure, moulding material making up three-dimensional structure, and disconnection of silicone shape. Method of guiding migration of cells is carried by bringing cells into contact with said device.

EFFECT: inventions provide controlled cell migration in a predetermined direction.

24 cl, 15 dwg



Фиг. 2

Изобретение относится к устройству для направления миграции клеток, содержащему подложку с текстурированной поверхностью, которая имеет анизотропную трехмерную структуру, предназначенную для контактирования с клетками.

Миграция клеток является существенной для многих физиологических процессов, таких как органогенез или лечение ран. В естественной среде направление и скорость миграции клеток определяются множеством сигналов, которые могут быть химическими (хемокинез) или физическими (окружающая среда).

In vitro, эти явления могут быть воспроизведены или перенаправлены для придания направления миграции клеткам, например, используя хемоаттрактанты, электрические поля, или путем приспособливания механического окружения для клетки.

Например, в документе EP 1199354 A раскрыт способ формирования структуры клеток на поверхности путем химического управления миграцией клеток. Поверхность обрабатывают так, чтобы обеспечить предварительно подготовленную структуру, состоящую из соединений, которые способствуют росту клеток, и других соединений, которые не способствуют росту клеток. Затем на этой предварительно подготовленной структуре иницируют культивирование клеток. Однако эффективность управления миграцией клеток в такой системе зависит, в основном, от выбора химических соединений, способствующих или предотвращающих рост клеток в соответствии со свойством культивируемых клеток.

В документе US 2007/0009572 описан способ подготовки микро- или нанотекстурированной биоразлагаемой пленки, содержащей каналы, ширина которых может изменяться от 10 мкм до 160 мкм, на которую наносят клетки мышц. Тесты показывают, что клетки мышц выравниваются относительно друг друга вдоль каналов, и их морфология изменяется так, что они принимают удлиненную форму. Целью этого способа является не обеспечение миграции клеток в предпочтительном направлении, а содействие их выравниванию друг с другом для получения регулярной укладки клеток.

В документе US 2009/0248145 описан способ для направления ориентации клеток в трехмерной структуре, используя поверхность, содержащую микроканал или последовательность микроканалов, которые параллельны друг другу и имеют ширину, большую размеров клетки, для обеспечения входа в них клеток произвольного поперечного сечения. Как и в предыдущем документе, назначение этого способа состоит не в том, чтобы обеспечить миграцию клеток в предпочтительном направлении, а в том, чтобы способствовать их выравниванию друг с другом.

В публикации Махмуд и др. (Nature Physics 2009, 4, pp. 606) предложены адгезивные структуры в виде храповиков для направления миграции клеток. Наблюдаемый эффект основан на разности адгезии между адгезивными участками каналов и неадгезивными участками подложки таким образом, что, когда величина разности между адгезивными и неадгезивными областями ухудшается с течением времени, направляющая способность миграции клеток больше не наблюдается. Кроме того, линейная или в форме храповиков адгезия в каналах только удерживает клетки на этих адгезионных структурах, т.е. в одном направлении в трехмерном пространстве, и не позволяет, например, организовать ткань на двумерной поверхности. В конечном итоге, структуры, описанные в публикации Махмуд и др., всегда перпендикулярны плоскости, сформированной поверхностью, на которой содержатся клетки.

Эти способы для перенаправления естественного явления миграции клеток также могут применяться in vivo.

В документе US 2009/0093879 описан имплантат, имеющий микро- или нанометрические трехмерные структуры на поверхности. Эти структуры позволяют

управлять адгезией микроорганизмов или фибробластов на поверхности импланта, когда их помещают в живом организме, улучшая тем самым заживление раны.

Предполагается, что микро- или наноструктуры на поверхности могут направлять клетки, которые начинают процесс заживления, позволяя им организовываться в упорядоченном виде на поверхности импланта.

Однако управление миграцией клеток в данном направлении также могло бы иметь медицинское применение, которое не подразумевает принудительную организацию клеток вокруг импланта, такую как направленная миграция клеток к поверхности раны или формирование искусственных органов в технологии культивирования тканей организма.

Таким образом, существует потребность в новых устройствах для направления миграции клеток в выбранном направлении, эффективность которой не зависит от типа рассматриваемых движущихся клеток, и которая была бы простой при реализации, минимально инвазивной для тканей и оставалась бы устойчивой с течением времени.

Направление миграции клеток в данном случае означает, что клетки принуждают к миграции в только одном направлении. Другими словами, при направлении миграции нарушают симметрию миграции в рассматриваемом направлении. «Направление» миграции клеток отличается от «ориентации» миграции клеток, которая характеризует миграцию, предпочтительно, в двух противоположных направлениях, причем ни одно из этих направлений не обладает приоритетом над другим.

Одним объектом изобретения является устройство для направления миграции клеток, содержащее подложку с текстурированной поверхностью, предназначенной для контактирования с клетками и имеющей анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой.

В отличие от описанных в указанных выше документах каналов или микроканалов, принуждающих клетки к выравниванию, согласно настоящему изобретению клетки направляются в направлении анизотропии, формируя тем самым сеть в плоскости, которая совместима с организацией ткани, соответствующей заданной поверхности.

Вторым объектом изобретения является способ направления миграции клеток, включающий в себя этапы, на которых: вводят клетки в контакт с подложкой, имеющей текстурированную поверхность в виде анизотропной трехмерной структуры, состоящей из наклоненных выступов, описанных выше.

Наконец, другим объектом изобретения является набор для направления миграции клеток, включающий в себя описанную выше подложку с текстурированной поверхностью, имеющей анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой, и несущую поверхность, предназначенную для переноса клеток.

Устройство или способ в соответствии с изобретением могут применяться, в частности, в дерматологии, имплантологии и для культивирования тканей организма.

Термины «анизотропная структура» или «структура, имеющая анизотропную конфигурацию» в данном случае следует понимать, как структуру, конфигурация которой имеет определенное направление анизотропии вдоль заданной оси.

В контексте изобретения направление анизотропии анизотропной структуры представляет собой, в частности, направление миграции клеток.

В устройстве согласно изобретению используется подложка с текстурированной поверхностью, трехмерная структура которой состоит из сети наклоненных выступов. Изобретение поясняется чертежами.

На фиг. 1 показана текстурированная поверхность, содержащая сеть наклоненных выступов цилиндрической формы;

на фиг. 2 показаны клетки, помещенные в ограниченное пространство между текстурированной поверхностью и несущей поверхностью;

на фиг. 3 показаны различные варианты выполнения устройства в соответствии с изобретением:

на фиг. 3А показаны простые адгезивные структуры для направления клеток в одном направлении;

на фиг. 3В показана клетка в ограниченном пространстве между текстурированной поверхностью и несущей поверхностью, расстояние между которыми составляет около 5 мкм;

на фиг. 3С показано расположение текстурированной поверхности на мягкой подложке типа геля;

на фиг. 3D представлено использование текстурированной поверхности на живой ткани;

на фиг. 4 показаны различные этапы способа изготовления текстурированной поверхности в соответствии с изобретением:

на фиг. 4(А) показана стеклянная пластина, на которую нанесен слой хрома, покрытый слоем светочувствительной полимерной смолы;

на фигурах 4(В) и 4(С) показано формирование рисунка светочувствительного слоя методом фотолитографии и его перенос на слой хрома в результате травления;

на фиг. 4(Д) показано нанесение слоя полимерной смолы на сформированный рисунок;

на фиг. 4(Е) показано УФ облучение слоя полимерной смолы;

на фиг. 4(Ф) показаны наклонные выступы, сформированные после УФ облучения;

на фиг. 4(Г) показано последующее нанесение слоя из силикона PDMS;

на фиг. 4(Н) показана обратная форма PDMS, сформированная таким образом;

на фиг. 4(И) показано наложение слоя материала, образующего текстурированную поверхность, на обратную форму PDMS;

на фиг. 4(Ж) показана трехмерная поверхность, сформированная таким образом;

на фиг. 5 представлена оптическая микрофотография текстурированной поверхности в соответствии с изобретением;

на фиг. 6 представлена гистограмма среднего направления миграции клеток за 24 часа.

Подложка

В контексте настоящего изобретения технический эффект направления миграции клеток достигается посредством определенной текстурированной поверхности, описанной выше, которая имеет анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, формируемой упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, передаваемом упомянутой анизотропной структурой, когда упомянутую текстурированную поверхность вводят в контакт с клетками.

Подложка с текстурированной поверхностью, в частности микротекстурированной или нанотекстурированной, может быть адгезивной или неадгезивной.

Выбор адгезивной подложки, в частности, может дополнительно улучшить

технический эффект направления миграции клеток, уже полученной с помощью устройства, использующего специфичную поверхность в соответствии с изобретением.

Адгезивные материалы, которые могут быть пригодными для подложки в соответствии с изобретением, в частности, могут быть гидрофильными или

5 гидрофобными, с их обработкой в соответствующих случаях активатором адгезии клеток, и, в частности, выбранными среди следующих:

- биосовместимые пластики: например, полистирол (PS), обычно используемый при культивировании клеток, силиконовые полимеры, такие как полидиметилсилоксан (PDMS), используемый в «лабораториях на кристалле», гели блоксополимера, такого как стирол-этилен/бутилен-стирол (SEBS), используемый при производстве перевязочных материалов, или молочные и гликолевые поликислоты (PLGA, PLA: гидрофильные), которые являются биоразлагаемыми и которые можно использовать для имплантатов или в качестве опоры для искусственной ткани; некоторые из этих пластиков предпочтительно могут быть активированными кислородной плазмой, для повышения их гидрофильности и способствования адгезии клеток,

- керамика, в общем, гидрофильная, такая как оксиды или нитриды металла, например, стекло (SiO_2), нитрид кремния (Si_3N_4), двуокись титана (TiO_2) или другие; эти материалы используются при культивировании клеток, в «лабораториях на кристалле» или в качестве имплантатов; эти материалы, предпочтительно, могут быть активированы кислородной плазмой, для повышения их гидрофильности и способствования адгезии клеток,

- инертные металлы, такие как золото, платина, палладий или металлы, оксидированная или азотированная поверхность которых является стабильной, такие как хром или титан, которые используются для имплантатов; предпочтительно, металлы могут быть обработаны молекулами из семейства тиолов для повышения или уменьшения их способности к адгезии клеток.

Также можно способствовать адгезии клеток путем химической обработки несущего материала. При этом можно использовать:

- заряженные полимеры (полиэлектролиты), которые проявляют сильную адсорбцию через электростатическое взаимодействие к оксидированным поверхностям (естественно, например, оксиды, или искусственно, путем активации поверхностей кислородной плазмой), например, поли-L-лизин (PLL) или полиорнитин (PORN);

- белки с адгезией клеток (интегрины), или внеклеточная белковая матрица (фибронектин, ламинин, коллаген), или пептиды, подражающие этим белкам, такие как структура RGD (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота).

В пределах объема настоящего изобретения также возможно регулировать адгезию клеток к подложке для оптимизации подвижности клеток. Уровень адгезии клеток к подложке можно регулировать путем обработки подложки ратиометрической смесью адгезивных молекул и неадгезивных молекул. Например, можно использовать смесь PLL-PEG и PLL-PEG-RGD, или смесь PLL-PEG и фибронектина.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения подложка с текстурированной поверхностью может быть неадгезивной, т.е. клетки не могут прилипнуть к подложке, что позволяет снимать подложку без повреждения клеток. Такая неадгезивная подложка также называется незагрязняемой подложкой.

Неадгезивное свойство подложки обеспечивает низкую способность адсорбции белка и низкую способность адгезии клеток, что, в общем, ограничивает воспалительные реакции.

Неадгезивные материалы, пригодные для неадгезивной подложки, могут представлять

собой супергидрофобные материалы, такие как фторполимеры (например, политетрафторэтилен (PTFE)), или гели, такие как полиакриламид (PAM) или полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA).

5 В качестве альтернативы, неадгезивная подложка может состоять из материала, которому были приданы неадгезивные свойства в результате химической обработки.

Химическая обработка для придания подложке неадгезивного свойства может, например, включать в себя прививки на подложке мономолекулярного слоя геля, например, полиэтиленгликоля (PEG), в частности, PEG, силанизированного на оксидах или тиолированного на металлах, или конъюгированного с полиэлектролитом, для
10 придания продолжительной способности адсорбции за счет электростатического взаимодействия на подложке, как в случае привитого сополимера полилизина и PEG (PLL-PEG).

Предпочтительно, неадгезивный материал представляет собой фторполимер или материал, которому было придано свойство неадгезивности в результате химической
15 обработки, такой, как прививка молекулами, например, молекулами полиэтиленгликоля (PEG).

Текстурированная поверхность

Текстурированная поверхность устройства согласно изобретению имеет анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети наклонных выступов.

20 В настоящем описании термин «сеть наклонных выступов» означает, что наклонные выступы расположены периодически на текстурированной поверхности для формирования равномерной повторяющейся структуры.

Направление наклона выступов позволяет, в частности, придать направление меньшего трения, определяя тем самым предпочтительное направление движения
25 клеток. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления изобретения для увеличения трения сеть выступов показана с промежутками, определенными как расстояние между двумя выступами, меньшее размера клеток, так что клетка всегда находится в контакте с по меньшей мере двумя выступами. Для предотвращения случайной циркуляции клеток между выступами это расстояние предпочтительно не
30 превышает 20 мкм.

В контексте изобретения размер текстурированной поверхности больше размера клеток.

Предпочтительно, промежутки сети выступов составляют от 0,1 до 15 мкм, более предпочтительно от 5 до 10 мкм, а наиболее предпочтительно - приблизительно 5 мкм.

35 В контексте изобретения выступы сети анизотропной трехмерной структуры, составляющей текстурированную поверхность, наклонены относительно нормали к плоскости, формируемой упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном указанной анизотропной структурой.

В частности, эти выступы предпочтительно наклонены на угол, меньший или равный
40 45° относительно нормали к плоскости, сформированной текстурированной поверхностью, а более предпочтительно - на угол от 10° до 45°.

Предпочтительно выступы имеют нанометрический размер, т.е. их высота, измеренная от подложки текстурированной поверхности, составляет приблизительно один нанометр, в частности, от 100 нм до 20 мкм, для ограничения формирования выемок и исключения
45 прокола клеток под давлением выступов.

В частности, предпочтительно отношение высоты выступов к их диаметру составляет от 0,5 до 20, предпочтительно от 2 до 10.

Предпочтительно такое соотношение размеров можно использовать для

регулирования жесткости подложки, воспринимаемой клетками, используя тот факт, что чем больше соотношение размеров столбиков, тем менее жесткими являются выступы, и, следовательно, тем легче они могут быть искривлены под действием сил, прикладываемых клетками.

5 Например, микростолбики или наностолбики, сформованные в стандартной подложке PDMS, с жесткостью 2 МПа, позволяют получить жесткость в диапазоне от 1,7 кПа, для соотношения размеров от 6,25, до 61 кПа, для соотношения размеров 1,9 (Thesis by S. Ghassemi, Columbia University, 2011, pp. 38 (<http://academiccommons.columbia.edu/catalog/ac:131397>)).

10 Иногда жесткость выступов позволяет индуцировать определенный фенотип, определенную дифференциацию или профилирование клеток в контакте с подложкой, одновременно сохраняя требуемые свойства направления клеток. Действительно, было показано, что определенные клетки, когда они развиваются на более жестких подложках, имеют тенденцию дифференцировки в клетки костей, тогда как те же клетки, когда они
15 развиваются на более гибких подложках, проявляют тенденцию дифференцировки в нейронные клетки.

Таким образом, может оказаться предпочтительным регулировать соотношение размеров выступов текстурированной поверхности (в частности, когда клетки переносят на эту поверхность) для модификации фенотипа, дифференцировки или профилирования
20 упомянутых клеток.

Наклонные выступы могут иметь любую геометрическую форму, в частности, могут быть выполнены в форме цилиндров, конусов, пирамид, пластинок или чешуек по существу треугольной, полуэллиптической или полукруглой формы.

Когда выступы выполнены в форме пластинок, их поперечное сечение может быть
25 прямоугольным или может иметь форму параллелограмма. При этом поперечное сечение определяется плоскостью, нормальной к оси упомянутой пластины.

Предпочтительно наклонные выступы имеют форму цилиндров, которые, в частности, могут иметь круглое или овальное поперечное сечение. При этом поперечное сечение определяется плоскостью, нормальной к оси упомянутого цилиндра.

30 Поперечное сечение выступов, независимо от его формы, находится внутри круга заданного диаметра, определенного как диаметр упомянутых выступов.

Когда диаметр выступов не является постоянным (например, когда выступы выполнены коническими), диаметр измеряется для поперечного сечения, расположенного на половине длины выступов.

35 Предпочтительно наклонные выступы имеют диаметр от 10 нм до 10 мкм, предпочтительно, от 0,5 до 3 мкм.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения область, занимаемая наклонными выступами, расположенными периодически на текстурированной поверхности, составляет от 5% до 50% текстурированной поверхности, а
40 предпочтительно - приблизительно 5%.

Такие анизотропные структуры, состоящие из сети наклонных выступов, могут, например, быть получены путем фотолитографии или наноимпринтной литографии с последующим анизотропным сухим травлением, например, реактивным ионным травлением (RIE), включающим в себя системы плазменного факела (плазмы с
45 индуктивной связью, ICP) или DRIE (глубокое реактивное ионное травление), с наклоном образца во время фотолитографии или во время травления, так, чтобы получить наклон структур.

Изготовление текстурированной поверхности

Текстурированная поверхность устройства, в соответствии с изобретением, которая имеет анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети наклонных выступов, может быть подготовлена любым способом, известным специалисту в данной области техники.

5 Однако автору настоящей заявки удалось разработать новый способ подготовки поверхности этого типа.

Наклонные выступы фактически могут быть получены путем отливки кремниевого полимера (PDMS) или путем формования сополимера поли(молочной-ко-гликолевой кислоты) (PLGA) на силиконовой (PDMS) форме.

10 Наклонные выступы, когда их используют для направления клеток при ограничении, предпочтительно могут быть изготовлены из кремниевого полимера (PDMS), поверхности которого было придано свойство отсутствия адгезии.

В соответствии с другим вариантом наклонные выступы, когда их используют для направления клеток без ограничения, предпочтительно, могут быть изготовлены путем
15 формования сополимера поли(молочной-ко-гликолевой кислоты) (PLGA) на силиконовой (PDMS) форме, как представлено на фиг. 4.

Таким образом, способ изготовления текстурированной поверхности, которая имеет анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной
20 поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой, включает в себя этапы, на которых:

I. подготавливают силиконовую форму, представляющую собой негативную копию упомянутой трехмерной структуры, в частности, используя самосовмещенную оптическую литографию,

25 II. формируют материал, образующий упомянутую трехмерную структуру,
III. отсоединяют силиконовую форму.

В частности, силиконовая (PDMS) форма может быть получена с использованием самосовмещенной оптической литографии способом, включающим в себя, в частности, следующие этапы:

30 I. наносят слой светочувствительной смолы на оптическую маску,

II. облучают упомянутый слой полимерной смолы через оптическую маску, используя источник света, с углом падения (соответствующим углу, формируемому падающими лучами, и нормалью к плоскости, формируемой маской), упомянутый угол падения устанавливает угол наклона столбиков анизотропной трехмерной структуры,

35 III. при необходимости покрывают упомянутую трехмерную поверхность полимерной смолы противозагрязняющим материалом,

IV. выполняют отливку слоя PDMS на упомянутой трехмерной поверхности полимерной смолы, так, чтобы получить упомянутую силиконовую (PDMS) форму,

40 V. после полимеризации отсоединяют полученную в результате форму PDMS (фиг. 4(H)).

Оптическая маска, используемая на этапе I, может представлять собой прозрачную подложку, обычно используемую для оптических масок, например, стеклянную пластину, на которой формируются структуры, составляющие маску, изготовленную из поглощающего свет металлического материала, например хрома. Эти маски обычно
45 используют в фотолитографии, и они являются коммерчески доступными или могут быть произведены с помощью способов, известных специалистам в данной области техники.

Специалисты в данной области техники могут, например, формировать оптическую

маску путем нанесения поглощающего свет слоя металла (в частности, хрома) на прозрачную подложку, такую как стеклянная пластина, и формирования структуры (например, матрицы из отверстий) на упомянутом слое металла, например, путем вытравливания травильным раствором, таким как ChromeEtch, поставляемым компанией

5 MicroChem.

Для этого формируют рисунок путем сканирования лазерным лучом, сфокусированным на слое светочувствительной полимерной смолы, нанесенной на прозрачную подложку (стеклянную пластину), покрытую заранее слоем хрома. После удаления полимерной смолы эти структуры переносят на слой хрома путем погружения

10

стеклянной подложки в ванну с ChromeEtch. В конечном итоге, структуры из полимерной смолы, использовавшиеся в качестве маски, удаляют, используя соответствующий растворитель.

Для производства оптических масок может использоваться, например, неиспользованная маска типа Cr PR-AZ1518 (стеклянная пластина, покрытая тонким

15

слоем хрома и слоем полимерной смолы), поставляемая компанией MicroChem. На этапе I толщину нанесенного слоя полимерной смолы, в частности, выбирают в соответствии с требуемой высотой столбиков. Полимерная смола представляет собой, например, эпоксидную полимерную смолу SU-8 3000, поставляемую компанией

20

MicroChem. После формирования поперечных связей в полимерной смоле на этапе II часть полимерной смолы, которая не была облучена, предпочтительно, может быть удалена соответствующим растворителем.

Угол, выбранный для облучения на этапе II, определяет угол наклона выступов относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной

25

поверхностью (фиг.4(E)). Поскольку свет преломляется в используемой прозрачной подложке, угол столбиков не всегда точно представляет собой угол падения света; это зависит от природы материала подложки. Специалисты в данной области техники могут регулировать угол падения для получения требуемого угла наклона столбиков в зависимости от используемой подложки.

30

Угол, выбранный для облучения на этапе II, может, в частности, быть меньше 90°, предпочтительно, меньше 45°, а более предпочтительно - от 10° до 45°.

Противозагрязняющий материал, в случае необходимости добавляемый на этапе III, может представлять собой, например, триметилхлоросилан (TMCS).

В конечном итоге, на основе полученных в результате форм PDMS получают

35

анизотропную трехмерную поверхность в соответствии с настоящим изобретением путем формования материала (PDMS или PLGA), составляющего упомянутую трехмерную структуру, например, путем отливки кремниевого полимера на силиконовой форме, заранее помещенной в вакуумную среду, или путем теплового формования, в случае сополимера поли(молочной-ко-гликолевой кислоты) (PLGA).

40

После отверждения материала, составляющего трехмерную поверхность, форму PDMS отделяют от образца трехмерной поверхности, получая, таким образом, сеть выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой (фиг. 4(J)).

45

При изготовлении анизотропной трехмерной поверхности в соответствии с изобретением, используя тепловое формование сополимера PLGA, упомянутое формование осуществляют при температуре от 80 до 100°C (предпочтительно, от 60 до 90°C, и, более предпочтительно, приблизительно при 90°C) и давлении от 60 до 120

бар (предпочтительно, от 100 до 120 бар, а более предпочтительно - приблизительно 120 бар), в течение примерно 10 минут (фиг. 4(I)). После охлаждения и снижения давления до атмосферного форму PDMS отделяют от образца трехмерной поверхности.

5 Таким образом, специалисты в данной области техники могут изменять высоту, диаметр и угол наклона выступов, регулируя различные параметры процесса.

Поверхность носителя

В соответствии с изобретением клетки, миграцией которых управляют, помещают на подложку, называемую «несущей поверхностью».

10 Несущая поверхность, на которой расположены клетки, может представлять собой описанную выше текстурированную поверхность или искусственную поверхность, такую как поверхность для культивирования клеток (например, гель), предметное стекло, внутреннюю часть микрофлюидного канала или поверхность естественной среды для упомянутых клеток, такую как поверхность живой ткани или поверхность раны.

15 В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления изобретения клетки могут направляться в результате их ограничения между несущей поверхностью и упомянутой текстурированной поверхностью.

Ограничение клеток позволяет усилить их направление, в частности, когда подложка, на которой расположены клетки, выполнена неадгезивной.

20 В этом случае расстояние между несущей поверхностью и текстурированной поверхностью составляет от 0 до 10 мкм, предпочтительно от 3 до 6 мкм, так что толщина клетки после ограничения составляет от 3 до 6 мкм, что обеспечивает возможность их миграции.

25 Когда носитель, по которому выполняется перенос клеток, выполнен «мягким», т.е. когда он имеет жесткость меньше приблизительно 20 кПа, в частности, от 100 Па до 20 кПа, а предпочтительно - от 500 Па до 10 кПа, отсутствует необходимость в наличии дополнительных выступов, поскольку поверхность является «достаточно мягкой», чтобы не допустить разрушение клеток нанотекстурированной подложкой, при этом клетки образуют свое пространство ограничения, деформируя несущую поверхность.

30 Эти «мягкие» носители представляют собой гель или тип слоя клеток малой жесткости. Используемые гели могут представлять собой гели искусственного происхождения, такие как полиакриламид (РАМ) или полиэтиленгликоль диакрилат (PEGDA), или гели естественного происхождения, такие как коллаген, матригель или гиалуроновая кислота (НА). Жесткость этих гелей можно регулировать, изменяя их

35 состав и условия образования в них поперечных связей.

И наоборот, когда носитель, на который помещены клетки, имеет жесткость свыше приблизительно 20 кПа, желательно, чтобы упомянутый носитель имел дополнительные выступы, чтобы не повреждать клетки.

40 Несущая поверхность и/или упомянутая текстурированная поверхность могут содержать один или несколько дополнительных выступов, которые позволяют регулировать расстояние между этими двумя поверхностями.

Высота выступов измеряется относительно поверхности, на которой они помещены.

45 Дополнительные выступы, в частности, могут быть выполнены в форме столбиков диаметром от 100 до 500 мкм, и высотой от 1 до 10 мкм, предпочтительно от 3 до 6 мкм, и, в любом случае, такой высоты, чтобы толщина клетки после ограничения составляла от 3 до 6 мкм, когда носитель имеет жесткость свыше приблизительно 20 кПа.

Способ направления миграции клеток

Изобретение также относится к способу направления миграции клеток, который включает в себя ввод клеток в контакт с подложкой, текстурированная поверхность которой имеет анизотропную трехмерную структуру, при этом упомянутая структура состоит из выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, формируемой
5 текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой.

В этом способе используется текстурированная поверхность, которая выполнена так, как описано выше.

Клетки также переносятся на несущей поверхности, как описано ранее, таким
10 образом, что они могут быть ограничены между текстурированной поверхностью и несущей поверхностью.

Изобретение также относится к устройству, содержащему подложку с текстурированной поверхностью, предназначенную для ввода в контакт с клетками и имеющую анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов,
15 наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном указанной анизотропной структурой, для использования в способе направления миграции клеток.

Применение

Устройства в соответствии с изобретением, в частности, могут иметь множество
20 применений для направления миграции клеток *in vivo* или *in vitro*.

Термин «направление *in vitro*» означает направление миграции клеток в культуре в полностью искусственной среде.

Клетки могут быть, например, культивированы на искусственной несущей поверхности, такой как поверхность культивирования клеток (например, гель),
25 текстурированную поверхность затем накладывают на несущую поверхность для ограничения клеток.

В другом варианте текстурированная поверхность может быть интегрирована в одну из сторон микрофлюидного канала для направления миграции клеток в упомянутом микрофлюидном канале.

Текстурированные поверхности устройства в соответствии с изобретением могут
30 использоваться либо для изучения биологических и физических механизмов миграции и роста клеток культуры или для сортировки клеток путем их разделения в соответствии с их характеристиками миграции.

В качестве альтернативы, устройство в соответствии с изобретением позволяет
35 направлять клетки по двумерным или трехмерным носителям, по меньшей мере частично покрытым текстурированной направляющей поверхностью, для производства искусственных органов (культивирования ткани).

Устройство в соответствии с изобретением может применяться в любой области, где
40 необходимо направлять клетки искусственно и независимо от их хемотаксического поведения.

Термин «направление *in vivo*» означает направление роста клеток и миграцию в живом организме, например в организме человека.

В этом случае несущая поверхность состоит из натурального физиологического носителя для клеток, к которому прикладывают текстурированную поверхность.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления направления
45 *in vivo* текстурированная поверхность может использоваться для направления клеток, присутствующих на поверхности раны, для распределения клеток по ране. Устройство в этом случае представляет собой перевязочный материал, имеющий на своей

поверхности микро- или наноструктуры.

В соответствии с другим вариантом направления *in vivo* текстурированная поверхность может использоваться для направления клеток вокруг протеза, чтобы способствовать распределению клеток вокруг него.

5 В соответствии с еще одним вариантом направления *in vivo* текстурированная поверхность может использоваться для направления клеток вокруг внутренней пленки или перевязочного материала, помещенного внутрь тела живого организма, чтобы способствовать распределению клеток внутри или вокруг органа.

10 Устройство в соответствии с изобретением, в частности, может быть выполнено в виде перевязочного материала, имплантата, протеза, носителя искусственной ткани, микрофлюидного канала или «лаборатории на кристалле» с интегрированными каналами.

Пример

15 Эффект направления миграции клеток устройства в соответствии с изобретением был установлен для культур клеток фибробластов нормальной кожи человека (NHDFs) в лаборатории.

Культуры клеток NHDF покрыли силиконовым (полидиметилсилоксан PDMS) покрытием с квадратной сетью наклоненных цилиндров. Сеть наклоненных цилиндров имела следующие параметры: промежуток 4 мкм, диаметр 1,5 мкм, высота 5 мкм и 20 наклон 40° относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой поверхностью (фиг. 2).

Сеть наклоненных цилиндров была изготовлена путем отливки силиконового полимера PDMS в силиконовую (PDMS) форму, как показано на фиг. 4.

25 Силиконовая форма (PDMS) была подготовлена с использованием формы, изготовленной способом самосовмещенной оптической литографии.

С этой целью в качестве основной подложки использовали оптическую маску, состоящую из стеклянной пластины, покрытой тонким слоем хрома и слоем полимерной смолы AZ1518, поставляемой компанией MicroChem, артикул PR-AZ1518 Cr.

30 Структуры, в данном случае матрицы из отверстий, изготовили на упомянутом слое светочувствительной смолы, используя сканирование лазерным лучом, сфокусированным на упомянутом светочувствительном слое (фиг. 4(B)), после чего выполнили этап проявления полимерной смолы.

Эти структуры затем переместили в слой хрома, который имел свойства поглощения света, используя влажное травление (ChromeEtch), а структуры полимерной смолы 35 удалили изопропанолом (фиг. 4(C)).

Слой эпоксидной смолы SU-8 3005, поставляемой компанией MicroChem, толщиной приблизительно 5 мкм, затем нанесли на стеклянную пластину, содержащую ранее определенные структуры (фиг. 4(D)).

40 Стеклопластину, содержащую упомянутый слой полимерной смолы, затем перевернули так, чтобы облучить ультрафиолетовым светом сторону стеклянной пластины, под углом падения приблизительно 70° таким образом, что угол наклона цилиндров относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, составил 40° (фиг. 4(E)).

После выделения наклоненных цилиндров на поверхности полимерной смолы 45 упомянутую трехмерную поверхность полимерной смолы, сформированную таким образом, покрыли противозагрязняющим материалом (триметилхлорсилан или TMCS).

Сформированную таким образом трехмерную поверхность затем использовали для получения силиконовой (PDMS) «контрформы» для получения негативных копий этих

форм. С этой целью слой смеси PDMS/сшивающего агента (RTV615A, General Electric, сшивание при 70° в течение 1 часа) вылили на поверхность полимерной смолы, обработанную противозагрязняющим составом (фиг. 4(G)). После формирования поперечных связей слой PDMS отсоединили от трехмерной поверхности, формируя, таким образом, негативную форму упомянутой поверхности (фиг. 4(H)).

В конечном итоге, получили сеть наклоненных цилиндров в соответствии с изобретением путем отливки смеси PDMS/сшивающего агента (RTV615A, General Electric, сшивание при 70° в течение 1 часа) в форму после помещения этой формы в условия вакуума в течение 1 часа (фиг. 5).

Силиконовая поверхность, кроме того, поддерживалась широкими столбиками высотой 5 мкм и 400 мкм диаметром, помещенными через каждый миллиметр и сформованными в PDMS.

Чтобы находящиеся в контакте с наклоненными цилиндрами клетки в культуре не разрушались, между 2 поверхностями формировали промежуток в 5 мкм для обеспечения миграции этих клеток с ограничением (фиг. 2).

Силиконовой поверхности, покрытой сетью наклоненных цилиндров, было придано свойство неадгезивности с помощью химической обработки, состоящей в прививке сополимера поли (L-лизина) и полиэтиленгликоля (PLL-g-PEG).

Подложка культуры клеток (NHDF) со своей стороны также состоит из PDMS, обработанного фибронекстином (50 мг/мл).

Неожиданно было замечено, что NHDF мигрировали под поверхностью, покрытой наклонными цилиндрами, предпочтительно, в направлении наклона цилиндров. На фиг. 6 представлена гистограмма направления миграции клеток за 24 часа. Каждый элемент представленного набора обозначает направление миграции клеток в течение 24 часов после ограничения. Здесь представлены 75 клеток.

Этот эффект также наблюдали для различных сетей выступов, имеющих диаметр 1,5 мкм и следующие значения высоты h , расстояния d между выступами и углами наклона a относительно нормали:

- (h, d, a)=(7 мкм, 4 мкм, 80°),
- (h, d, a)=(7,5 мкм, 7 мкм, 60°),
- (h, d, a)=(5 мкм, 5 мкм, 45°),
- (h, d, a)=(7 мкм, 4 мкм, 80°),
- (h, d, a)=(4 мкм, 4 мкм, 60°),
- (h, d, a)=(4 мкм, 6,5 мкм, 60°),
- (h, d, a)=(4 мкм, 9 мкм, 60°) и
- (h, d, a)=(4 мкм, 11,5 мкм, 60°).

При этом выступы были изготовлены из различных материалов (PDMS, поли (молочная-ко-гликолевая кислота) PLGA).

Формула изобретения

1. Устройство для направления миграции клеток, содержащее подложку с текстурированной поверхностью, предназначенной для контактирования с клетками и имеющей анизотропную трехмерную структуру, состоящую из сети выступов, представляющей собой расположенные периодически выступы на текстурированной поверхности с формированием равномерной повторяющейся структуры с промежутками между выступами, меньшими размера клеток, при этом выступы наклонены относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой.

2. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что указанные промежутки меньше 20 мкм, более предпочтительно - от 0,1 до 15 мкм, еще более предпочтительно - от 5 до 10 мкм, а наиболее предпочтительно - приблизительно 5 мкм.

3. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что наклонные выступы имеют угол наклона относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, меньше или равный 45° , а предпочтительно - от 10° до 45° .

4. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что отношение высоты наклонных выступов к их диаметру составляет от 0,5 до 20, предпочтительно, от 2 до 10.

5. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что наклонные выступы имеют форму цилиндров, имеющих, в частности, круглое или овальное поперечное сечение, конусов, пирамид, пластин, имеющих, в частности, поперечное сечение в форме прямоугольника или параллелограмма, или чешуек по существу треугольной, полуэллиптической или полукруглой формы.

6. Устройство по п. 5, характеризующееся тем, что наклонные выступы имеют форму цилиндров с диаметром от 10 нм до 10 мкм, предпочтительно от 0,5 до 3 мкм.

7. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что подложка с текстурированной поверхностью выполнена адгезивной.

8. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что подложка с текстурированной поверхностью выполнена неадгезивной.

9. Устройство по п. 8, характеризующееся тем, что неадгезивная подложка состоит из неадгезивного материала, такого как фторполимер, или материала, которому свойство неадгезивности было придано в результате химической обработки, такой как прививка молекулами полиэтиленгликоля.

10. Устройство по любому из пп. 1-9, характеризующееся тем, что оно выполнено в форме перевязочного материала, имплантата, протеза, носителя искусственной ткани, микрофлюидного канала или устройства «лаборатория на кристалле» с интегрированными каналами, а предпочтительно, упомянутое устройство представляет собой перевязочный материал.

11. Способ направления миграции клеток, включающий в себя этапы, на которых вводят клетки в контакт с устройством по любому из пп. 1-9.

12. Способ направления по п. 11, характеризующийся тем, что клетки помещают на несущую поверхность.

13. Способ направления по п. 12, характеризующийся тем, что несущая поверхность представляет собой искусственную поверхность, такую как поверхность культуры клеток, предметное стекло, внутреннюю часть микрофлюидного канала или поверхность естественной окружающей среды упомянутых клеток, такую как поверхность живой ткани или поверхность раны.

14. Способ направления по любому из пп. 12 или 13, характеризующийся тем, что клетки ограничены между несущей и текстурированной поверхностями.

15. Способ направления по п. 14, характеризующийся тем, что расстояние между несущей и текстурированной не превышает 10 мкм, а предпочтительно составляет от 3 до 6 мкм.

16. Способ направления по п. 12, характеризующийся тем, что несущая поверхность и/или текстурированная поверхность содержат один или несколько дополнительных выступов для регулировки расстояния между двумя упомянутыми поверхностями.

17. Способ направления по п. 16, характеризующийся тем, что дополнительные выступы выполнены в форме столбиков диаметром от 100 до 500 мкм и высотой менее

10 мкм, предпочтительно от 3 до 6 мкм.

18. Способ изготовления устройства по любому из пп. 1-9, включающий в себя этапы, на которых:

- 5 - готовят силиконовую форму, представляющую собой негативную копию упомянутой трехмерной структуры, в частности, с использованием оптической литографии с автоматическим совмещением;
- формируют материал, составляющий упомянутую трехмерную структуру;
- отсоединяют силиконовую форму.

10 19. Способ изготовления по п. 18, характеризующийся тем, что этап подготовки силиконовой формы с использованием оптической литографии с автоматическим совмещением включает в себя этапы, на которых:

- наносят слой светочувствительной смолы на оптическую маску;
- облучают упомянутый слой смолы через оптическую маску, используя источник света с углом падения, соответствующим углу, формируемому падающими лучами, и нормалью к плоскости, формируемой маской, так что упомянутый угол падения определяет угол наклона столбиков анизотропной трехмерной структуры;
- 15 - при необходимости покрывают упомянутую трехмерную поверхность полимерной смолы противозагрязняющим материалом;
- выполняют отливку слоя из полидиметилсилоксана на упомянутой трехмерной поверхности полимерной смолы так, чтобы получить упомянутую силиконовую форму;
- 20 - после полимеризации отсоединяют полученную в результате форму из полидиметилсилоксана.

20. Способ изготовления по п. 19, характеризующийся тем, что после формирования поперечных связей полимерной смолы, образованных на этапе облучения слоя светочувствительной смолы, часть полимерной смолы, которая не была облучена, удаляют, используя соответствующий растворитель.

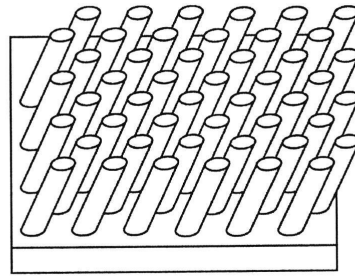
21. Способ изготовления по любому из пп. 19 или 20, характеризующийся тем, что при необходимости добавляемый противозагрязняющий материал представляет собой триметилхлоросилан.

30 22. Способ изготовления по п. 18, характеризующийся тем, что анизотропную трехмерную поверхность образуют путем формования материала, например, путем отливки кремниевого полимера на силиконовой форме, заранее помещенной в условия вакуума, или путем теплового формования в случае сополимера поли(молочной-ко-гликолевой кислоты).

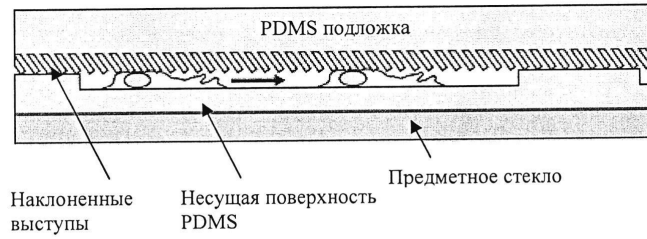
35 23. Способ изготовления по п. 22, характеризующийся тем, что анизотропную трехмерную поверхность образуют путем теплового формования сополимера поли(молочной-ко-гликолевой кислоты), выполняемого при температуре от 80 до 100°C под давлением от 60 до 120 бар в течение приблизительно 10 минут.

40 24. Способ изготовления по п. 23, характеризующийся тем, что форму из полидиметилсилоксана отделяют от образца трехмерной поверхности после охлаждения и снижения давления до атмосферного, в результате упомянутая трехмерная поверхность имеет сеть выступов, наклоненных относительно нормали к плоскости, сформированной упомянутой текстурированной поверхностью, в направлении, заданном упомянутой анизотропной структурой.

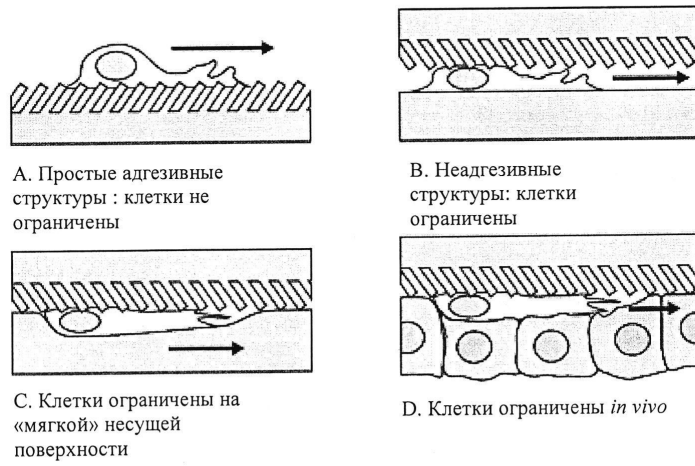
45



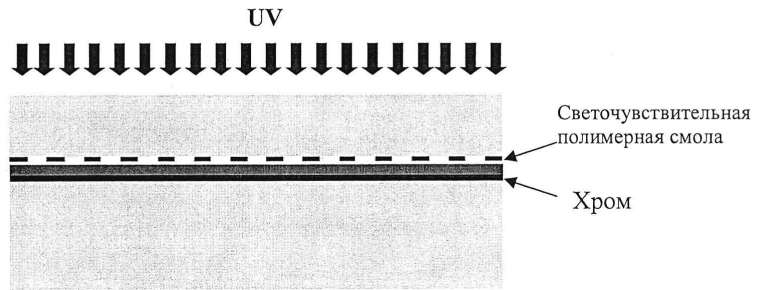
Фиг. 1



Фиг. 2



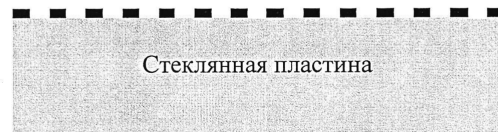
Фиг. 3



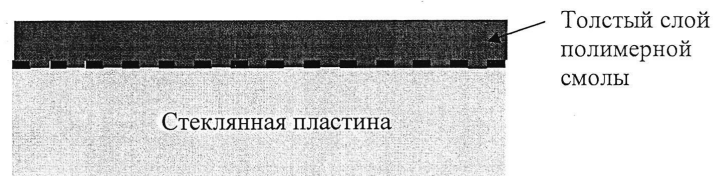
Фиг. 4 (А)



Фиг. 4 (В)

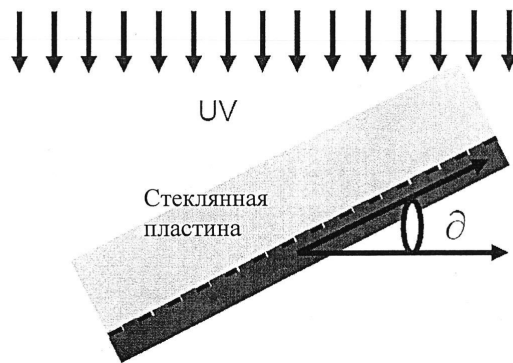


Фиг. 4 (С)

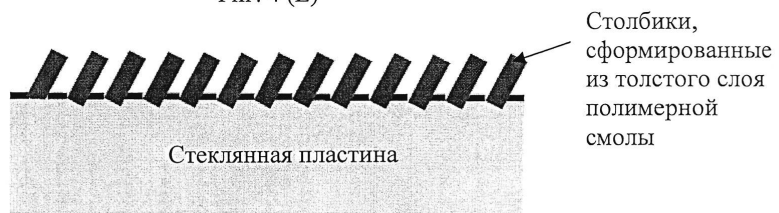


Фиг. 4 (D)

3/4



Фиг. 4 (Е)



Фиг. 4 (F)

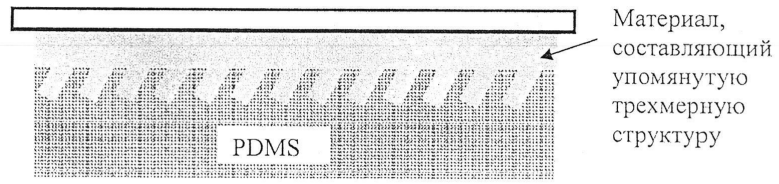


Фиг. 4 (G)



Фиг. 4 (H)

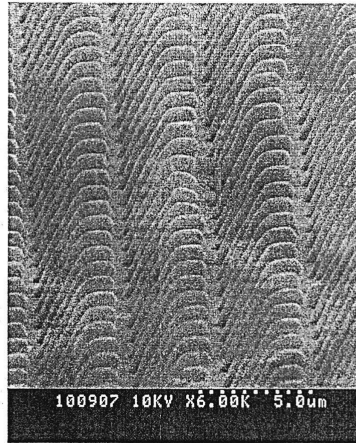
4/4



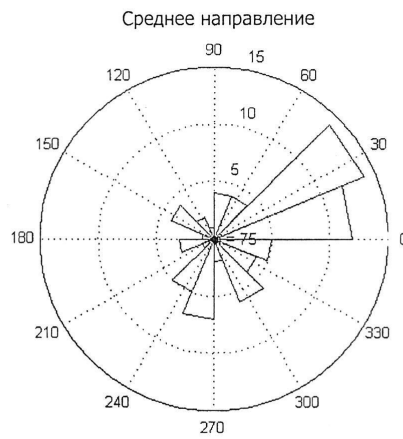
Фиг. 4 (I)



Фиг. 4 (J)



Фиг. 5



Фиг. 6