

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle

Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/162857 A1

(43) Date de la publication internationale
13 septembre 2018 (13.09.2018)

W I P O I P C T

(51) Classification internationale des brevets :

C12N S/071 (2010.01) C12N S/077 (2010.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR20 18/050541

(22) Date de dépôt international :

08 mars 2018 (08.03.2018)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

175 1941 09 mars 2017 (09.03.2017) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE BORDEAUX [FR/FR]

; 35, place Pey Berland, 33000 BORDEAUX (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR] ; 101 rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR). INSTITUT D'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL [FR/FR] ; 2 Avenue Augustin Fresnel, 91127 PALAISEAU Cedex (FR).

(72) Inventeurs : ANDRIQUE, Laetitia ; 39 rue Puysegur apt32, 33800 BORDEAUX (FR). RECHER, Gaëlle ; 44 Avenue Paul Bert, 33400 TALENCE (FR). ALESSANDRI, Kevin ; 40 bis rue St Rémi, 33000 BORDEAUX (FR). FEYEUX, Maxime ; 1 rue Jouis, 33400 TALENCE (FR). NASSOY, Pierre ; 25 rue Borda, 33000 BORDEAUX (FR). BIKFALVI, Andréas ; Résidence Gizaillan Bat G2 rue des Acacias, 33170 GRADIGNAN (FR).

(74) Mandataire : LEBRETTE, Camille et al. ; BECKER & ASSOCIES, 25, rue Louis le Grand, 75002 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title: HOLLOW CELLULAR MICROFIBRE AND METHOD FOR PRODUCING SUCH A HOLLOW CELLULAR MICROFIBRE

(54) Titre : MICROFIBRE CELLULAIRE CREUSE ET PROCÉDÉ DE FABRICATION D'UNE TELLE MICROFIBRE CELLULAIRE CREUSE

(57) Abstract: The invention relates to a hollow cellular microfibre comprising the following successive layers arranged around a hole, namely: at least one layer of endothelial cells, at least one layer of smooth muscle cells, a layer of extracellular matrix, and, optionally, an outer hydrogel layer. The invention further relates to a method for producing such a hollow cellular microfibre.

(57) Abrégé : L'invention concerne une microfibre cellulaire creuse comprenant successivement, organisées autour d'une lumière au moins une couche de cellules endothéliales, au moins une couche de cellules musculaires lisses, une couche de matrice extracellulaire, et optionnellement une couche externe en hydrogel. L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une telle microfibre cellulaire creuse.



WO 2018/162857 A1

Microfibre cellulaire creuse et procédé de fabrication d'une telle microfibre cellulaire creuse

L'invention a trait à une microfibre cellulaire creuse artificielle présentant une structure, une histologie et des propriétés mécaniques proches de celles de vaisseaux du système vasculaire animal. L'invention a également trait à un procédé de fabrication permettant d'obtenir une telle microfibre cellulaire creuse. L'invention trouve des applications notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et des greffes de tissus, pour permettre la vascularisation de tissus, et dans le domaine pharmacologique, pour l'étude notamment de molécules candidates ayant une activité liée à la vascularisation.

Depuis plusieurs années, l'ingénierie tissulaire vasculaire s'est développée, avec pour but de recréer artificiellement des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, pour permettre notamment la vascularisation de tissus *in vitro*. Ainsi, une méthode consiste à mouler un hydrogel chargé en cellules autour de tubes à base d'agarose. Les tubes d'agarose sont par la suite retirés, pour créer des réseaux de microtubes (Bertassoni *et al.*, Lab Chip. 2014 Jul 7 ; 14(13) :2202-2211).

Une autre technique consiste à couler un gel de collagène sur un tube en gélatine ou polydiméthylsiloxane (PDMS), qui est retiré une fois la matrice de collagène gélifiée (Backer *et al.*, Lab Chip. 2013 Aug 21 ; 13(16) : 3246-3252 et Jimenez-Torres *et al.*, Methods Mol Biol. 2016 ; 1458 :59-69). Dans tous les cas, la structure obtenue est un bloc d'agarose, collagène ou autre, dans lequel les pseudos-vasseaux sont formés. Il n'est donc pas possible de les en extraire, pour les greffer et revasculariser des tissus. L'utilisation de ces vaisseaux est ainsi limitée à l'étude *in vitro* des propriétés anti-angiogéniques, anti-thrombotiques, etc., de molécules d'intérêt. En outre, ces solutions ne permettent pas de tenir compte de la structure et de l'histologie des vaisseaux naturels, ni des contraintes auxquelles ils sont normalement soumis.

Une autre approche consiste à former un tube en enroulant sur elle-même une couche de fibroblastes, avant de dévitaliser lesdits fibroblastes. Des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales sont alors cultivées dans le tube, pour reproduire des microfibrilles cellulaires mimant des vaisseaux sanguins. Le procédé de fabrication de telles microfibrilles est cependant complexe, nécessitant de multiples manipulations et un temps de développement de plusieurs mois (Peck *et al.*, Materials Today 14(5) :218-224 May 2011).

Récemment, des microfibrilles contenant des cellules endothéliales enveloppées dans une couche d'hydrogel ont été obtenues par co-extrusion (Onoe *et al.*, Nature Materials 31 March

2013). Ces microfibres ne présentent cependant pas des propriétés mécaniques comparables à celles des vaisseaux sanguins ou lymphatiques.

Il existe donc toujours un besoin en des microfibres cellulaires creuses artificielles, qui puissent être individualisées et manipulables et qui présentent une histologie et des propriétés mécaniques proches de celles de vaisseaux sanguins ou lymphatiques naturels.

Résumé de l'invention

En travaillant sur des nouvelles voies de formation de vaisseaux sanguins et lymphatiques, les inventeurs ont découvert qu'il est possible de fabriquer des microfibres cellulaires creuses reproduisant du point de vue histologique et mécanique des vaisseaux du système vasculaire de mammifères, tel que des vaisseaux sanguins. Plus précisément, les inventeurs ont mis au point un procédé d'encapsulation de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses dans une enveloppe d'alginate, à l'intérieur de laquelle les cellules s'organisent d'elles-mêmes en couches homocentriques autour d'une lumière. Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des tubes de longueurs et de diamètres modulables en fonction des besoins. Notamment, il est possible de réaliser des tubes de quelques centimètres et jusqu'à plus de 1 mètre. De même, le diamètre externe des tubes selon l'invention peut varier de 70 μm à plus de 5 mm, de manière à mimer tout type de vaisseaux sanguins et lymphatiques, depuis les veines jusqu'aux artères. En outre, la lumière s'étend dans toute la longueur du tube, rendant lesdits tubes perfusables. Les vaisseaux ainsi obtenus peuvent être aisément individualisés et manipulés.

L'invention a donc pour objet une microfibre cellulaire creuse artificielle comprenant successivement, organisées autour d'une lumière

- au moins une couche de cellules endothéliales ;
- au moins une couche de cellules musculaires lisses ;
- une couche de matrice extracellulaire ; et optionnellement
- une couche externe en hydrogel.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la microfibre cellulaire est un vaisseau sanguin ou un vaisseau lymphatique.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une telle microfibre cellulaire creuse, selon lequel une solution d'hydrogel et une solution de cellules comprenant des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses dans une matrice extracellulaire sont co-extrudées de manière concentrique dans une solution de réticulation apte à réticuler au moins un polymère de la solution d'hydrogel.

Brève description des figures

Figure 1 : Représentation en coupe transversale d'une microfibre cellulaire creuse selon un exemple de réalisation de l'invention, comprenant successivement, depuis l'extérieur vers l'intérieur, une couche externe en alginate (1), une couche de matrice extracellulaire (2), une couche de cellules musculaires lisses (3), une couche de cellules endothéliales (4) et une lumière centrale (5) ;

Figure 2 : Représentation schématique d'un système de coextrusion concentrique pouvant être utilisé pour réaliser les microfibres cellulaires selon l'invention, dans lequel une première pompe comprend une solution d'alginate (ALG), une seconde pompe comprenant une solution intermédiaire comprenant du sorbitol (SI), et la troisième pompe comprenant une solution de cellules (C), ces trois solutions étant amenées jusqu'à une pointe de coextrusion et la pointe (6) étant immergée dans un bain de réticulation (7) pour former la microfibre cellulaire creuse (8) ;

Figure 3 : Vues au microscope de la structure tubulaire d'une microfibre cellulaire obtenue selon le procédé de l'invention. Juste après la formation du tube (Figure 3A), les cellules sont rondes et disposées à l'intérieur de l'ensemble du tube d'alginate ; Après 1 jour de culture 3D (Figure 3B), les cellules viennent s'ancrer sur les bords internes du tube d'alginate, via la matrice extracellulaire, pour former une lumière à l'intérieur du tube ;

Figure 4 : Etude de l'impact des vitesses de co-extrusion d'une solution d'alginate (a), d'une solution de sorbitol (s) et d'une solution de cellules (c) sur l'épaisseur de la couche externe d'alginate dans les microfibres cellulaires creuses obtenues ;

Figure 5 : Etude des diamètres externe (EXT) et interne (INT) de différentes microfibres cellulaires creuses obtenues selon le procédé de l'invention, en fonction du diamètre de l'embout de sortie de co-extrusion (axe des abscisses : 300 μ m, 350 μ m, 450 μ m) ;

Figure 6 : Vue d'un tube d'alginate vide de diamètre 900 μ m, obtenu par extrusion avec un embout de sortie de diamètre 900 μ m ;

Figure 7 : Etude de la contraction des microfibres cellulaires creuses selon l'invention en présence d'Endotheline 1 (ET1) ;

Figure 8 : Etude de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) dans les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) et dans les cellules musculaires lisses (SMC) des microfibres cellulaires creuses dans le temps, sous l'effet de l'endothéline 1.

Description détaillée

Microfibre cellulaire creuse

L'invention a pour objet des microfibres cellulaires creuses artificielles, dont l'histologie et les propriétés mécaniques et physiologiques miment celles de vaisseaux du système vasculaire animal, et notamment du système vasculaire des mammifères.

Les inventeurs ont réussi à produire in vitro des microfibres à base de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales, dont l'organisation en couches concentriques autour d'une lumière rend lesdites microfibres perfusables. Par « perfusable », on entend dans le contexte de l'invention qu'il est possible d'injecter un fluide dans ladite microfibre, à l'intérieur de laquelle il peut circuler. Avantagusement, les microfibres cellulaires creuses selon l'invention sont également étanches, en ce sens que le fluide injecté dans lesdites microfibres ne s'échappe pas ou que très faiblement à travers l'épaisseur des microfibres. L'étanchéité d'une microfibre selon l'invention dépend principalement du taux de confluence des cellules dans ladite microfibre. Le taux de confluence peut notamment être adapté en jouant sur le nombre de cellules injectées lors de la formation de la microfibre. En outre, les microfibres selon l'invention sont manipulables, car individualisées.

Selon l'invention, la microfibre cellulaire est une structure tubulaire creuse, contenant des couches sensiblement homocentriques, en ce sens qu'elles sont organisées successivement autour d'un même point. Ainsi, la lumière centrale de la microfibre est bordée par la couche de cellules endothéliales 4, qui est entourée par la couche de cellules musculaire lisse 3, elle-même entourée par une couche de matrice extracellulaire 2 et éventuellement une couche externe en hydrogel 1 (figure 1). Une section transversale de la microfibre cellulaire selon l'invention comprend ainsi des couches successives sensiblement concentriques.

La lumière est générée, au moment de la formation du tube, par les cellules musculaires lisses et endothéliales qui s'auto-assemblent et s'orientent spontanément par rapport à la couche

de matrice extracellulaire. Avantageusement, la lumière contient un liquide et plus particulièrement du milieu de culture.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la microfibre cellulaire creuse comprend une couche externe d'hydrogel. Dans le contexte de l'invention, la « couche externe d'hydrogel » désigne une structure tridimensionnelle formée à partir d'une matrice de chaînes de polymères gonflée par un liquide, et préférentiellement de l'eau. Avantageusement, le ou les polymères de la couche externe d'hydrogel sont des polymères réticulables lorsque soumis à un stimulus, tel qu'une température, un pH, des ions, etc. Avantageusement, l'hydrogel utilisé est biocompatible, en ce sens qu'il n'est pas toxique pour les cellules. En outre, la couche d'hydrogel doit permettre la diffusion d'oxygène et de nutriments pour alimenter les cellules contenues dans la microfibre et permettre leur survie. Les polymères de la couche d'hydrogel peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Par exemple, la couche externe d'hydrogel contient un ou plusieurs polymères parmi les polymères à base de sulfonate, tel que le polystyrène sulfonate de sodium, les polymères à base d'acrylate, tel que le polyacrylate de sodium, le polyéthylène glycol diacrylate, le composé gélatine méthacrylate, les polysaccharides, et notamment les polysaccharides d'origine bactérienne, telle que la gomme gellane, ou d'origine végétale, telles que la pectine ou l'alginate. Dans un mode de réalisation, la couche externe d'hydrogel comprend au moins de l'alginate. Préférentiellement, la couche externe d'hydrogel ne comprend que de l'alginate. Dans le contexte de l'invention, on entend par « alginate » des polysaccharides linéaires formés à partir de β -D-mannuronate (M) et α -L-guluronate (G), des sels et dérivés de ceux-ci. Avantageusement, l'alginate est un alginate de sodium, composé à plus de 80% de G et moins de 20% de M, avec une masse moléculaire moyenne de 100 à 400 kDa (par exemple : PRONOVA® SLG100) et une concentration totale comprise entre 0.5% et 5% en masse volumique (poids/volume).

La couche externe d'hydrogel peut permettre de renforcer la rigidité de la microfibre cellulaire et ainsi de faciliter sa manipulation.

Avantageusement, la couche d'hydrogel comprend des polymères aptes à limiter l'adhésion cellulaire (« *cell-repellent* »), afin de faciliter le cas échéant la séparation de ladite couche d'hydrogel de la microfibre cellulaire ou sa dégradation sans affecter la structure de la microfibre cellulaire.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la microfibre cellulaire est dépourvue de couche externe d'hydrogel et comprend directement, en tant que couche la plus externe, une couche de matrice extracellulaire.

Préférentiellement, la couche de matrice extracellulaire forme un gel sur la face interne de la couche en hydrogel, c'est-à-dire la face dirigée vers la lumière du microcompartiment. La couche de matrice extracellulaire comprend un mélange de protéines et de composés extracellulaires nécessaires à la culture cellulaire. Préférentiellement, la matrice
5 extracellulaire comprend des protéines structurales, telles que des laminines contenant les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 4$ ou $\alpha 5$, les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 2$, et les sous-unités $\gamma 1$ ou $\gamma 3$, de la vitronectine, des laminines, du collagène, ainsi que des facteurs de croissance, tels que du TGF-béta et/ou de l'EGF. Dans un mode de réalisation, la couche de matrice extracellulaire consiste en, ou contient du Matrigel[®], de la Geltrex[®], du collagène, et notamment du
10 collagène de type 1 à 19, modifié ou non, de la gélatine, de la fibrine, de l'acide hyaluronique, du chitosan, ou un mélange d'au moins deux de ces composants.

Selon l'invention, la microfibre cellulaire comprend des cellules musculaires lisses, organisées en une ou plusieurs couches autour et éventuellement au moins en partie dans la couche de matrice extracellulaire.

15 Les cellules musculaires lisses peuvent être notamment choisies parmi les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules musculaires lisses lymphatiques, les cellules musculaires lisses du tube digestif, les cellules musculaires lisses de bronches, les cellules musculaires lisses de reins, les cellules musculaires lisses de vessie, les cellules musculaires lisses de derme, les cellules musculaires lisses d'utérus et les cellules musculaires lisses de globe oculaire, de
20 mammifère et notamment humaines. Préférentiellement, les cellules musculaires lisses sont choisies parmi les cellules musculaires lisses d'origine lymphatique ou vasculaire, telles que les cellules musculaires lisses d'artère ombilicale, les cellules musculaires lisses d'artère coronaire, les cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire, etc.

Dans un mode de réalisation particulier, les cellules musculaires lisses sont des cellules
25 musculaires lisses d'artère coronaire, telles que des cellules musculaires lisses d'artère coronaire humaine.

Dans un mode de réalisation particulier, les cellules musculaires lisses sont obtenues à partir de cellules souches induites pluripotentes, qui ont été forcées à se différencier en cellules musculaires lisses.

30 Selon l'invention, l'épaisseur de la ou des couches de cellules musculaires lisses peut varier en fonction de la destination de la microfibre cellulaire. Par « épaisseur », on entend la dimension dans une section transversale de la microfibre s'étendant radialement par rapport au centre de ladite section transversale. Les cellules musculaires lisses permettent la contraction de la

microfibre. Il est donc possible d'adapter la force contractile de la microfibre cellulaire, selon qu'elle est destinée à être utilisée en tant que vaisseau sanguin ou vaisseau lymphatique, mais également en fonction de la nature dudit vaisseau reproduit (artère, veine cave, veine, veinule, etc.). L'homme du métier sait quelle est la force contractile attendue en fonction du vaisseau à reproduire et sait ainsi adapter l'épaisseur de la ou des couches de cellules musculaires lisses, de même que la nature des cellules musculaires lisses.

Avantageusement, la ou les couches de cellules musculaires lisses contient au moins 95% en volume, préférentiellement au moins 96%, 97%, 98%, 99% de cellules musculaires lisses et de matrice produite par lesdites cellules. La ou les couches de cellules musculaires lisses peuvent éventuellement comprendre des cellules endothéliales. Avantageusement, le pourcentage en volume de cellules endothéliales dans la couche de cellules musculaires lisses est inférieur à 5%, préférentiellement inférieur à 4%, 3%, 2%, 1%.

Selon l'invention, la microfibre cellulaire creuse comprend une couche de cellules endothéliales, bordant et délimitant la lumière centrale.

Les cellules endothéliales peuvent notamment être choisies parmi les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (UVEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de peau (DMEC), les cellules endothéliales du sang de derme (DBEC), les cellules endothéliales lymphatiques de derme (DLEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de cœur (CMEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de poumon (PMEC) et les cellules endothéliales de microvaisseaux d'utérus (UtMEC), de mammifères et notamment humaines.

Dans un mode de réalisation particulier, les cellules endothéliales sont des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (UVEC), et notamment des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC).

Dans un mode de réalisation particulier, les cellules endothéliales sont obtenues à partir de cellules souches induites pluripotentes, qui ont été forcées à se différencier en cellules endothéliales.

Avantageusement, la microfibre cellulaire comprend une unique couche de cellules endothéliales.

Avantageusement, la ou les couches de cellules endothéliales contient au moins 95% en volume, préférentiellement au moins 96%, 97%, 98%, 99% de cellules endothéliales et de matrice produite par lesdites cellules. La ou les couches de cellules endothéliales peuvent

éventuellement comprendre des cellules musculaires lisses. Avantageusement, le pourcentage en volume de cellules musculaires lisses dans la couche de cellules endothéliales est inférieur à 5%, préférentiellement inférieur à 4%, 3%, 2%, 1%.

Selon l'invention, il est possible, notamment en fonction de l'utilisation qui sera faite de la microfibre cellulaire creuse, d'utiliser des cellules animales de toute origine, telles que des cellules de souris, des cellules de singe, des cellules humaines, etc. Avantageusement, les cellules utilisées pour réaliser la microfibre cellulaire selon l'invention sont des cellules humaines.

Dans un mode de réalisation particulier, le ratio moyen cellules endothéliales / cellules musculaires lisses, en cm^2 , dans une microfibre cellulaire creuse de l'invention est compris entre 3/1 et 2/1

Avantageusement, le diamètre interne de la microfibre cellulaire est compris entre 50 μm et 500 μm , préférentiellement entre 50 μm et 200 μm , plus préférentiellement entre 50 μm et 150 μm , encore plus préférentiellement entre 50 μm et 100 μm , +/- 10 μm . Par « diamètre interne », on entend le diamètre de la lumière de la microfibre. Dans un mode de réalisation particulier, le diamètre interne de la microfibre cellulaire est de 100 μm . Dans un autre mode de réalisation, le diamètre interne est de 70 μm .

Le diamètre externe de la microfibre cellulaire peut également varier. Par « diamètre externe », on entend le plus grand diamètre de la microfibre. En présence d'une couche externe d'hydrogel, le diamètre externe est avantageusement compris entre 250 μm et 5 mm. En l'absence de couche externe d'hydrogel, le diamètre externe est avantageusement compris entre 70 μm et 5 mm, préférentiellement entre 70 μm et 500 μm , plus préférentiellement entre 70 μm et 200 μm , encore plus préférentiellement entre 70 μm et 150 μm , +/- 10 μm . Dans un mode de réalisation particulier, le diamètre externe de la microfibre, en présence de la couche externe d'hydrogel, est de 300 μm . Dans un mode de réalisation particulier, le diamètre externe de la microfibre, en l'absence de la couche externe d'hydrogel, est de 150 μm .

Dans un mode de réalisation particulier, la microfibre cellulaire selon l'invention comprend une couche externe d'hydrogel de 100 à 150 μm d'épaisseur, une épaisseur de cellules (cellules endothéliale et cellules musculaires lisses) de 150 à 200 μm et une lumière de 100 à 150 μm de diamètre.

Avantageusement, la microfibre cellulaire selon l'invention a une longueur, ou plus grande dimension, d'au moins 50 cm, préférentiellement au moins 60 cm, 70 cm, 80 cm, 90 cm, 100 cm, 110 cm, ou plus.

Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse

5 L'invention a également pour objet un procédé de préparation permettant d'obtenir une microfibre cellulaire creuse selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention propose d'encapsuler des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses dans une enveloppe externe d'hydrogel à l'intérieure de laquelle lesdites cellules vont se réorganiser pour former des couches sensiblement concentriques et ménager une lumière centrale. L'encapsulation se
10 fait au moyen d'un procédé de coextrusion concentrique, lors duquel la solution d'hydrogel est coextrudée avec la solution de cellules directement dans un bain de réticulation, ou solution de réticulation, comprenant un agent de réticulation permettant de réticuler l'hydrogel et ainsi de former l'enveloppe externe autour des cellules.

Tout procédé d'extrusion permettant de coextruder de manière concentrique de l'hydrogel et
15 des cellules peut être utilisé. Notamment, il est possible de réaliser les microfibres cellulaires selon l'invention en adaptant la méthode et le dispositif microfluidique décrits dans Alessandri *et al.*, (PNAS, September 10, 2013 vol. 110 no.37 14843-14848 ; Lab on a Chip, 2016, vol. 16, no. 9, p. 1593-1604) ou dans Onoe *et al.*, (Nat Material 2013, 12(6):584-90), de manière à ce que l'ensemble des solutions soit coextrudé dans un bain de réticulation, plutôt qu'au-dessus
20 d'un tel bain. Par exemple, le procédé selon l'invention est mis en œuvre au moyen d'un dispositif d'extrusion à double ou triple enveloppes concentriques tel que décrit dans le brevet FR2986165.

Dans le contexte de l'invention, on entend par «solution de réticulation», une solution comprenant au moins un agent réticulant adapté pour réticuler un hydrogel comprenant au
25 moins un polymère hydrophile, tel que de l'alginate, lorsqu'elle est mise en contact avec celui-ci. La solution de réticulation peut être par exemple une solution comprenant au moins un cation divalent. La solution de réticulation peut également être une solution comprenant un autre agent réticulant connu de l'alginate ou du polymère hydrophile à réticuler, ou un solvant, par exemple de l'eau ou un alcool, adapté pour permettre une réticulation par
30 irradiation ou par toute autre technique connue dans l'art.

Avantageusement, la solution de réticulation est une solution comprenant au moins un cation divalent. Préférentiellement, le cation divalent est un cation permettant de réticuler de l'alginate en solution, Il peut s'agir par exemple d'un cation divalent choisi dans le groupe

com prenant Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} et Sr^{2+} , ou d'un mélange d'au moins deux de ces cations divalents. Le cation divalent, par exemple le Ca^{2+} , peut être associé à un contre-ion pour former par exemple des solutions de type CaCl_2 ou CaCO_3 , bien connues de l'homme du métier. La solution de réticulation peut également être une solution comprenant du CaCO_3 couplé à du Glucono **delta-lactone** (GDL) formant une solution de CaCO_3 -GDL. La solution de réticulation peut également être un mélange de CaCO_3 - CaSO_4 -GDL.

Dans un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la solution de réticulation est une solution comprenant du calcium, notamment sous la forme Ca^{2+} ,

L'homme du métier est à même **d'ajuster** la nature du cation divalent et/ou du contre-ion, ainsi que sa concentration aux autres paramètres du procédé de la présente invention, notamment à la nature du polymère utilisé et à la vitesse et/ou au degré de réticulation **désiré(e)**. Par exemple, la concentration de cation divalent dans la solution de réticulation est comprise entre 10 et 1000 mM.

La solution de réticulation peut comprendre d'autres constituants, bien connus de l'homme du métier, que ceux décrit ci-dessus, afin d'améliorer la réticulation de la gaine **d'hydrogel** dans les conditions, notamment temps et/ou température, particulières.

Avantageusement, les cellules **endothéliales** ont été préalablement cultivées dans un milieu de culture comprenant des facteurs de croissance de l'**endothélium** vasculaire (VEGF) de manière à favoriser la formation d'endothélium et l'**angiogenèse**. Dans un exemple de réalisation, les cellules endothéliales ont été préalablement cultivées dans du milieu EGM-2®.

Avantageusement, les cellules musculaires lisses ont été préalablement cultivées dans un milieu de culture comprenant des facteurs de croissance adaptés à la culture des cellules musculaires lisses, tel que le facteur de croissance transformant $\beta 1$, le facteur EGF, le facteur bFGF, etc. Dans un exemple de réalisation, les cellules musculaires lisses ont été préalablement cultivées dans du milieu SmGM2® de la société Lonza ou dans un milieu de culture spécifiquement adapté aux cellules musculaires lisses commercialisé par la société Promocell (par exemple le milieu HCASMC®, HAoSMC®, etc.),

La solution de cellules utilisée pour la coextrusion comprend des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses en suspension dans de la matrice extracellulaire.

Dans un mode de réalisation particulier, la solution de cellules comprend **entre 20 et 30% en volume de cellules et entre 70 et 80% en volume de matrice extracellulaire**.

Le ratio en volume de cellules endothéliales / cellules musculaires lisses dans la solution de cellules est avantageusement compris entre 3/1 et 2/1.

Selon le procédé de l'invention, la coextrusion est réalisée de manière à ce que la solution d'hydrogel entoure la solution de cellules.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, la coextrusion implique également une solution intermédiaire, comprenant du sorbitol. Dans ce cas, la coextrusion est réalisée de manière à ce que la solution intermédiaire soit disposée entre la solution d'hydrogel et la solution de cellules (figure 2A).

- 10 Dans un mode de mise en œuvre particulier, la vitesse d'extrusion de la solution d'alginate est comprise entre 1 et 10 ml/h, préférentiellement entre 2 et 5 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 3 ml/h et de manière préférée égale à 2 ml/h, +/- 0,5 ml/h.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, la vitesse d'extrusion de la solution intermédiaire est comprise entre 0,1 et 5 ml/h, préférentiellement entre 0,5 et 1 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

- 15 Dans un mode de mise en œuvre particulier, la vitesse d'extrusion de la solution de cellules est comprise entre 0,1 et 5 ml/h, préférentiellement entre 0,5 et 1 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

- 20 La vitesse de coextrusion des différentes solutions peut être facilement modulée par l'homme du métier, de manière à adapter le diamètre interne de la microfibre et l'épaisseur de la couche d'hydrogel.

Dans tous les cas, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est supérieure à la vitesse d'extrusion de la solution de cellules et éventuellement de la solution intermédiaire. Notamment, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est au moins deux fois, trois fois ou quatre fois supérieure à la vitesse d'extrusion de la solution de cellules.

- 25 Préférentiellement, les vitesses d'extrusion de la solution de cellules et de la solution intermédiaire sont identiques.

Dans un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 2 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse d'extrusion de la solution de cellules comme de la solution intermédiaire est de 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 9 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse d'extrusion de la solution de cellules comme de la solution intermédiaire est de 3 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

5 Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 3 ml/h, +/- 0,05 ml/h, la vitesse d'extrusion de la solution de cellules est de 2 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse d'extrusion de la solution intermédiaire est de 1 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

10 Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 2 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse de coextrusion de la solution de cellules comme de la solution intermédiaire est de 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 2 ml/h, et la vitesse de coextrusion de la solution de cellules comme de la solution intermédiaire est de 1 ml/h. Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel
15 est de 2 ml/h, +/- 0,05 ml/h, la vitesse d'extrusion de la solution de cellules est de 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse d'extrusion de la solution intermédiaire est de 1,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

20 Dans un autre mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, la vitesse d'extrusion de la solution d'hydrogel est de 2 ml/h, +/- 0,05 ml/h, la vitesse d'extrusion de la solution de cellules est de 1,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et la vitesse d'extrusion de la solution intermédiaire est de 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

Dans un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, tel qu'illustré aux figures 2A et 2B, la solution de réticulation, la solution intermédiaire et la solution de cellules sont chargées dans trois compartiments concentriques d'un dispositif de coextrusion, de
25 manière à ce que la solution de réticulation (ALG), formant le premier flux, entoure la solution intermédiaire (SI) qui forme le second flux, qui elle-même entoure la solution de cellules (C) qui forme le troisième flux. La pointe 6 du dispositif d'extrusion, par laquelle sortent les trois flux, débouche dans la solution de réticulation 7, de sorte qu'au sortir de la pointe 6 un tube 8 se forme. Le premier flux constitue l'enveloppe externe rigide en hydrogel. Le second flux
30 constitue l'enveloppe intermédiaire et le troisième flux l'enveloppe interne contenant les cellules.

Le procédé selon l'invention permet d'encapsuler des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales dans une gaine externe en hydrogel. De manière surprenante, les inventeurs ont observé qu'après seulement quelques heures, les cellules contenues dans cette gaine d'hydrogel se réorganisent d'elles-mêmes, de telle manière que les cellules endothéliales
5 délimitent une lumière interne longitudinale s'étendant sur toute la longueur de la microfibre cellulaire, et que les cellules musculaires lisses s'orientent vers l'extérieur par rapport à la lumière. La présence de matrice extracellulaire lors de la coextrusion semble nécessaire pour que les cellules puissent s'ancrer à la matrice et ainsi s'étaler, se diviser et proliférer. La matrice permet également de diminuer les risques d'apoptose des cellules à l'intérieur de la
10 microfibre cellulaire, et favorise le phénomène de réorganisation cellulaire au sein de la gaine d'hydrogel.

Avantageusement, la microfibre cellulaire obtenue par coextrusion est maintenue dans un milieu de culture adaptée pendant au moins 10h, préférentiellement au moins 20h, encore plus préférentiellement au moins 24h avant d'être utilisée. Ce temps de latence permet
15 avantageusement aux cellules de se réorganiser dans la gaine d'hydrogel de manière à former les couches concentriques autour d'une lumière, telles que décrites ci-dessus.

Selon l'invention, il est possible d'utiliser directement la microfibre cellulaire creuse obtenue par coextrusion, c'est-à-dire une microfibre comprenant une gaine d'hydrogel, ou de procéder à une hydrolyse de ladite gaine afin de récupérer une microfibre exempte d'hydrogel.

20 Applications

Les microfibres cellulaires creuses objets de la présente invention peuvent être utilisées pour de nombreuses applications, notamment à visées médicales ou pharmacologiques.

Les microfibres cellulaires selon l'invention peuvent notamment être utilisées pour des tests d'identification et/ou de validation de molécules candidates ayant une action sur tout ou
25 partie du système vasculaire, et notamment sur les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Par exemple, de telles microfibres peuvent être utilisées pour tester les propriétés anti-angiogéniques, anti-thrombotiques, régulatrices de la tension artérielle, de transport de gaz dans le sang, etc., de molécules candidates.

Les microfibres cellulaires creuses selon l'invention peuvent également être utilisées en
30 ingénierie tissulaire, afin de vasculariser des échantillons de tissus biologiques de synthèse et augmenter ainsi leur viabilité. De tels échantillons de tissus vascularisés peuvent être utilisés

par exemple par les industries pharmaceutiques et cosmétiques, afin de réaliser des tests *in vitro*, notamment en alternative aux tests sur animaux.

- De même, les microfibres cellulaires creuses selon l'invention peuvent être utilisées en médecine régénératrice, afin de permettre la vascularisation d'organes de synthèses, tels que
- 5 des tissus de peau, de cornée, de foie, etc. obtenus par impression 3D ou autre, avant de les greffer dans un sujet.

EXEMPLES

Exemple 1 : Protocole d'obtention d'une microfibre cellulaire creuse

10 Matériel & méthode

Cellules :

Cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC) cultivées dans un milieu de culture comprenant du VEGF en passage 3 (p3), 4 (p4) ou 5 (p5), fournies à l'état cryopréservé dans de l'azote liquide à -80°C sous la référence c-12205 par la société PromoCell®.

- 15 Cellules musculaires lisses d'artère coronaire humaine, en passage 2 (p2), fournies à l'état cryopréservé dans de l'azote liquide à -80°C sous la référence CC-2583 par la société Lonza.

Milieus :

Milieu de culture des cellules endothéliales : Promocell EGM2® kit (ref C-22111) (milieu à +4°C et compléments à -20°C).

- 20 Milieux pour détacher les cellules endothéliales : Detach KIT® [Hepes BSS (30 mM HEPES) + Trypsin / EDTA Solution (0.04 % / 0.03 %) + Trypsin Neutralizing Solution (TNS)] de la société PromoCell (ref C-41210).

Milieu de congélation des cellules endothéliales : Cryo-SFM de la société PromoCell (ref C-29912).

- 25 Milieu de culture des cellules musculaires lisses : SmGm2-bullet® kit de la société Lonza (ref CC-3182) (milieu à +4°C et compléments à -20°C).

Milieu pour détacher les cellules musculaires lisses : Detach KIT® de la société PromoCell (ref C-41210).

Milieu de congélation des cellules musculaires lisses : Cryo-SFM de la société PromoCell (ref C-29912).

5 Solutions :

Solution de réticulation : CaCl_2 100mM

Solution intermédiaire : Sorbitol 300mM

Solution d'hydrogel : alginate 2,5% w/v (LF200FTS) dans 0,5mM SDS

Matrice extracellulaire : Matrigel® classique (sans rouge phénol et avec facteurs de croissance)

10 *Traitement des cellules endothéliales HUVEC :*

Amplification

Des cellules HUVEC au stade p3 sont décongelées et amplifiées selon les protocoles usuels jusqu'au stade p5, p6 ou p7, la coextrusion étant réalisée avec des cellules entre les stades p5 et p7.

15 *Traitement des cellules musculaires lisses (SMC) :*

Amplification

Les cellules SMC au stade p2 sont décongelées, puis cultivées selon les protocoles usuels jusqu'au stade p5, p6 ou p7, la coextrusion étant réalisée avec des cellules entre les stades p5 et p7.

20 Système de coextrusion

- 3 seringues hamilton 12ml contenant respectivement de l'alginate 2,5% et les deux autres du sorbitol 300 mM stériles

-tuyau standard Teflon de diamètre 13

- pompe à seringues neMESYS® (de la société Cetoni) et logiciel associé

- puce d'injection imprimée en 3D (voir publication Alessandri K et al., 2016)

Procédé d'extrusion

- Reprendre 30 μ l de cellules ($\frac{1}{2}$ SMC et $\frac{1}{2}$ HUVEC) dans 60 μ l de Matrigel[®]

5 - procéder à la coextrusion des trois solutions selon la méthode décrite dans Alessandri et al., 2016 (Figure 2A) avec comme vitesses d'extrusion 2ml/heure pour alginate et 0,5ml/h pour la solution de sorbitol et la solution de cellules, en maintenant la pointe du dispositif d'extrusion immergée dans la solution de réticulation (figure 2B).

Résultats

10 La coextrusion des trois solutions dans une solution de Ca^{2+} telle que décrite ci-dessus a permis d'obtenir des tubes, ou microfibres cellulaires creuses, d'environ 1 mètre de longueur et de diamètre externe 300 μ m. Après 24h (figure 3B), les cellules se sont réorganisées et auto-assemblées à l'intérieur du tube d'alginate de manière à créer une lumière centrale de diamètre environ 150 μ m. Le tube comprend alors successivement, et organisées de manière concentrique autour de la lumière, une couche de cellules HUVEC, une couche de cellules
15 SMC, une couche de Matrigel[®] et une couche d'alginate réticulée.

Exemple 2 : Caractérisation des microfibres cellulaires creuses

Les microfibres cellulaires creuses obtenues à l'exemple 1 ont été caractérisées aux moyens de marqueurs spécifiques par immunofluorescence et microscopie confocale. La
20 réorganisation des cellules à l'intérieur de l'enveloppe d'alginate a été suivie par vidéomicroscopie.

Matériel & méthode

Immunomarquage :

Les microfibres cellulaires, ou tubes, ont été fixées à des temps différents (J1/J5), avec 4%
25 paraformaldéhyde dilué dans du DMEM sans rouge phénol (PAN), toute la nuit à 4°C.

Les cellules des tubes ont alors été perméabilisées (30 min en triton 1% dans du DMEM sans rouge phénol, à température ambiante sous agitation). Les sites non spécifiques des cellules

ont été saturés pendant une heure à 4°C dans une solution de BSA1%/ SVF2% (bovine sérum albumine et sérum de veau fœtal).

Les microfibres cellulaires ont ensuite été mises en présence d'anticorps primaires spécifiques, dirigés chacun contre une protéine d'intérêt :

- 5 - CD31 : marqueur spécifique des membranes des cellules endothéliales
- aSMA (alpha smooth muscle actine) : marqueur spécifique du cytosquelette des SMC
- VE-Cadhérine : marqueur spécifique des jonctions cellulaires endothéliales et de la formation d'un endothélium imperméable
- 10 - tubuline : marqueur spécifique du cytosquelette
- KI67 : marqueur spécifique de la prolifération cellulaire
- aCaspase3 : marqueur spécifique de l'apoptose.

L'anticorps primaire a été dilué au 1/100^{ème} dans du DMEM sans rouge phénol + 1%BSA/ 2%SVF toute la nuit sous agitation à 4°C. Après 2x15min de lavage en DMEM sans rouge phénol, les tubes ont été incubés avec un anticorps secondaire (qui va reconnaître spécifiquement l'anticorps primaire) couplé à un fluorochrome, dilué au 1/1000^{ème} dans du DMEM sans rouge phénol + 1%BSA/ 2%SVF pendant 1 h à température ambiante. Après 2x15min de lavages en DMEM sans rouge phénol, les tubes ont été analysés en microscopie confocale pour visualiser la fluorescence.

20 Résultats :

- J1 : un jour après formation du tube, les cellules sont organisées de la manière suivante : SMC (marqueur aSMA spécifique, alpha Smooth Muscle Actine) côté Matrigel[®] et HUVEC (marqueur CD31 spécifique) côté lumière. Les deux types cellulaires prolifèrent (marqueur KI67 positif) et ne présentent que très peu de mort cellulaire (peu de marquage caspase 3 spécifique).

- J5 : 5 jours après formation du tube, les jonctions cellulaires deviennent serrées : le contour cellulaire des HUVEC est beaucoup plus visible avec des cellules de plus en plus rapprochées. Ce phénomène correspond à l'« endothélialisation », c'est-à-dire la formation d'un endothélium dont la fonction est de devenir étanche. De plus, à J5, les cellules arrêtent de proliférer (perte du signal KI67) mais ne meurent pas pour autant (pas d'augmentation du signal caspase 3), ce qui indique que les cellules entrent en quiescence, comme c'est le cas dans un endothélium vasculaire humain normal.

Exemple 3 : Evaluation de la capacité de perfusion des microfibres cellulaires creuses

La perfusabilité des microfibres a par ailleurs été évaluée en les reliant à un système d'injection comprenant des solutions fluorescentes.

Un système de perfusion des microfibres cellulaires creuses a été mis au point en utilisant des
 5 pipettes Pasteur en verre étirées sous la flamme jusqu'à avoir un diamètre correspondant au diamètre interne des microfibres cellulaires, soit $150\mu\text{m}$. Les pipettes étirées ont été connectées à une seringue contenant du milieu de culture (EGM2[®] Promocell), elle-même branchée à un pousse-seringue pour permettre la perfusion de liquide à une vitesse physiologique de $50\mu\text{L}/\text{min}$. La vitesse de perfusion peut varier en fonction du diamètre
 10 interne de la microfibre cellulaire.

Les microfibres cellulaires sont coupées en morceaux de quelques centimètres de long et sont placées dans du milieu de culture en boîte de pétri 3cm, sous une loupe binoculaire. Elles sont alors raccordées à la pointe des pipettes Pasteur étirées.

Le système complet (microfibre cellulaire /milieu de culture, pipette étirée, seringue) est
 15 ensuite remis en culture (incubateur 37°C , 5% de CO_2) et permet la perfusion de milieu EGM2[®] en permanence dans les tubes vasculaires.

Un système de perfusion identique a été utilisé pour vérifier l'étanchéité des microfibres cellulaires. $200\mu\text{L}$ de traceur fluorescent ont été injectés à l'intérieur des microfibres cellulaires selon l'invention (HUVEC + SMC), de même qu'à l'intérieur de microfibres
 20 cellulaires ne comprenant que des cellules endothéliales et à l'intérieur d'un tube d'alginate (Fluorescein isothiocyanate FITC-dextran de 500kDa ou 20 kDa Sigma-Aldrich) à une vitesse physiologique de $50\mu\text{L}/\text{min}$.

La vitesse de diffusion de chaque traceur fluorescent à travers l'alginate a été filmée et quantifiée.

Résultats

- Contrôle négatif (tube d'alginate sans cellule + FITC-Dextran 500kDa) : les molécules de Dextran, de haut poids moléculaire, ne passe pas à travers les pores de l'alginate ;
- Contrôle positif (tube d'alginate sans cellule + FITC-Dextran 20kDa) : les molécules de Dextran, de faible poids moléculaire, diffuse facilement à travers les pores de l'alginate ;

- Microfibre alginate / HUVEC/SMC selon l'invention + FITC Dextran 20kDa : les molécules de Dextran, de faible poids moléculaire, ne diffusent pas ou très peu à travers les couches de cellules, qui rendent la microfibre étanche ;

5 - Microfibre HUVEC/SMC selon l'invention (après hydrolyse de la couche externe d'alginate) + FITC Dextran 20kDa : la vitesse de diffusion des molécules de Dextran à travers les couches de cellules est proche de celle observée pour la microfibre selon l'invention comprenant encore la couche externe d'alginate.

Ainsi, même en l'absence de la couche externe d'alginate, la structure, la perfusabilité et l'étanchéité de la microfibre cellulaire creuse selon l'invention du tube sont maintenues.

10

Exemple 4 : Modification contrôlée de l'épaisseur de la couche externe d'alfinate

Trois microfibrilles cellulaires creuses ont été fabriquées, selon le protocole décrit à l'exemple 1, en faisant varier les vitesses d'extrusion de la solution de sorbitol et de la solution de cellules pour une vitesse d'extrusion de l'alginate constante. Les vitesses d'extrusion pour les trois

15 microfibrilles cellulaires creuses sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Vitesses d'extrusion des différentes solutions

	Alginate	Sorbitol	Suspension cellulaire
Microfibre 1	2 mL.h ⁻¹	1 mL.h ⁻¹	1 mL.h ⁻¹
Microfibre 2	2 mL.h ⁻¹	0.5 mL.h ⁻¹	1.5 mL.h ⁻¹
Microfibre 3	2 mL.h ⁻¹	1.5 mL.h ⁻¹	0.5 mL.h ⁻¹

Le but de cette expérimentation est de vérifier 1/ la reproductibilité des dimensions des microfibrilles cellulaires creuses à paramètres identiques, 2/ l'impact des vitesses de flux sur

20 l'épaisseur de la paroi externe d'alginate.

Résultats

Lorsque les deux flux intérieurs (solution de sorbitol et solution de cellules) sont extrudés à la même vitesse, la couche externe d'alginate des microfibrilles obtenues est plus épaisse (figure 4). Même en gardant un ratio (vitesse du flux d'alginate) / [(vitesse du flux de sorbitol)

25 + (vitesse du flux de suspension cellulaire)] constant, l'asymétrie cinétique des flux de sorbitol

et de la suspension cellulaire conduit à la production d'une couche externe d'alginate plus fine, avec un effet plus marqué lorsque la vitesse du flux de sorbitol est la plus faible.

Ces expérimentations confirment que les diamètres externes et internes des microfibres cellulaires creuses peuvent être modulés par le système de co-extrusion. Plus particulièrement, les résultats montrent qu'il est possible de faire varier légèrement, mais de manière significative, l'épaisseur de la couche externe d'alginate en faisant varier la vitesse des flux des solutions co-extrudées.

Exemple 5 : Modification contrôlée du diamètre des microfibres cellulaires creuses

Des microfibres cellulaires creuses ont été fabriquées, selon le protocole décrit à l'exemple 1, en modifiant l'embout de sortie des solutions du système de coextrusion concentrique (voir l'embout/pointe de co-extrusion 6, figure 2), pour obtenir un embout de sortie de diamètre 300 μ m, 350 μ m, 450 μ m et 900 μ m. Avec l'embout à 900 μ m, la solution d'alginate a été extrudée seule, pour produire des tubes d'alginate vides (sans suspension cellulaire).

Le diamètre externe et le diamètre interne, c'est-à-dire la lumière des microfibres, ont été mesurés après synthèse desdites microfibres.

Résultats

Les résultats exposés dans le tableau ci-dessous et dans la figure 5 confirment qu'il est possible de modifier les dimensions des microfibres et modifiant le diamètre de la pointe de co-extrusion du système de co-extrusion. En outre, l'obtention d'un tube d'alginate creux d'un diamètre de 900 μ m avec un embout de sortie de 900 μ m (Figure 6) confirme que le procédé selon l'invention permet d'obtenir des microfibres cellulaires creuses parfaitement de diamètre parfaitement contrôlé.

Diamètres externe et interne des microfibres en fonction du diamètre de l'embout de sortie

Diamètre d'embout	300 μ m	350 μ m	450 μ m
Diamètre externe	264,68 μ m $\pm$ 10,9 μ m	360,37 $\pm$ 10,8 μ m	448,53 μ m $\pm$ 12,33 μ m
Diamètre interne	158,17 $\pm$ 6,32 μ m	203,11 $\pm$ 16,53 μ m	321,62 $\pm$ 21,47 μ m

Exemple 6 : Mesure de la contractilité des microfibres cellulaires creuses et des flux calciques

Matériel & méthode

Des microfibres cellulaires creuses de diamètre interne d'environ 400 μm ont été produites conformément à l'exemple 1.

Après 24 h de culture, les microfibres sont incubées pendant 45 min en présence d'une sonde fluorescente sensible au calcium, le Fluo-4 AM (ThermoFisher scientific, F23917, 50 μg dissous dans 4 μL d'acide Pluronique -à 20 % dans le DMSO-, puis dilué dans 800 μL d'EGM2, concentration finale : 50 μM), à 37°C. Le groupement AM (acétoxyméthyl) permet à la molécule de traverser la membrane plasmique, il est clivé par les estérases intracellulaires ce qui emprisonne la sonde dans le compartiment cytoplasmique. Les variations de l'intensité de signal de fluorescence renseignent sur les variations qualitatives (sonde non-ratiométrique) de calcium libre accessible au site de liaison de la molécule. Cette information est une mesure indirecte de l'activation de voies de signalisation mettant en œuvre une entrée de calcium extracellulaire, et/ou une libération des stocks calciques du réticulum endoplasmique.

Après rinçage en milieu de culture EGM2, les microfibres sont imagées en épifluorescence avec un stéréoéomicroscope. Un vasoconstricteur spécifique des vaisseaux sanguins, l'endothéline 1 (ET1, 0,1 μM), est appliqué au voisinage du tube, dans le milieu de culture. Le signal de fluorescence est collecté avant, pendant et après l'application du vasoconstricteur.

Les données collectées permettent de mesurer : 1/ la contraction des microfibres (mesure du diamètre externe), 2/ les variations d'intensité du signal de fluorescence du Fluo-4 AM, (le calcium intracellulaire est le second messager impliqué dans la cascade de signalisation déclenchant la contraction des fibres musculaires et donc la diminution du diamètre interne du vesseloïde).

Résultats

La présence d'Endothéline 1 entraîne la contraction des microfibres, et une diminution significative du diamètre interne, d'environ 5% (figure 7).

Les mesures des variations de concentrations calciques, type cellulaire par type cellulaire (cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) et cellules musculaires lisses (SMC)), indiquent que sous l'effet de l'endothéline 1, on observe une augmentation quasi-instantanée du calcium intracellulaire, suivie de plusieurs oscillations (figure 8). Ce

mécanisme classiquement observé dans des vaisseaux sanguins matures, est responsable du déclenchement et de la propagation du signal permettant la contraction : $ET_1 \rightarrow \uparrow Ca^{2+} \rightarrow$ contraction

5 Ces résultats confirment que les cellules qui composent les microfibres cellulaires creuses selon l'invention se comportent de manière identique aux cellules des vaisseaux sanguins matures.

REVENDICATIONS

1. Microfibre cellulaire creuse artificielle comprenant successivement, organisées autour d'une lumière

5 - au moins une couche de cellules endothéliales ;

- au moins une couche de cellules musculaires lisses ;

- une couche de matrice extracellulaire ; et optionnellement

- une couche externe en hydrogel.

10 2. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon la revendication 1, dans laquelle la couche externe en hydrogel comprend de l'alginate.

3. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le ratio en cm^2 cellules endothéliales / cellules musculaires lisses dans la microfibre cellulaire creuse est compris entre 3/1 et 2/1.

15 4. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle les cellules endothéliales sont choisies parmi les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (UVEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de peau (DMEC), les cellules endothéliales du sang de derme (DBEC), les cellules endothéliales lymphatiques de derme (DLEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de cœur (CMEC), les cellules endothéliales de microvaisseaux de poumon (PMEC), les cellules endothéliales de
20 microvaisseaux d'utérus (UtMEC) de mammifère.

5. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle les cellules musculaires lisses sont choisies parmi les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules musculaires lisses lymphatiques, les cellules musculaires lisses du tube digestif, les cellules musculaires lisses de bronches, les cellules musculaires lisses de reins, les
25 cellules musculaires lisses de vessie, les cellules musculaires lisses de derme, les cellules musculaires lisses d'utérus, les cellules musculaires lisses de globe oculaire de mammifère.

6. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle les cellules endothéliales et/ou les cellules musculaires lisses ont été obtenues à partir de cellules souches induites à la pluripotence (IPS)

7. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle le diamètre interne est compris entre 50 μm et 500 μm , préférentiellement entre 50 μm et 200 μm , plus préférentiellement entre 50 μm et 150 μm , encore plus préférentiellement entre 50 μm et 70 μm , +/- 10 μm .

8. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle le diamètre externe, en présence de la couche externe d'hydrogel, est compris entre 250 μm et 5 mm, et le diamètre externe en l'absence de la couche d'hydrogel est compris entre 70 μm et 5 mm, préférentiellement entre 70 μm et 500 μm , plus préférentiellement entre 70 μm et 200 μm , encore plus préférentiellement entre 70 μm et 150 μm , +/- 10 μm .

9. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications 1 à 8, ladite microfibre cellulaire étant un vaisseau sanguin.

10. Microfibre cellulaire creuse artificielle selon l'une des revendications 1 à 8, ladite microfibre cellulaire étant un vaisseau lymphatique.

11. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon l'une des revendications 1 à 10, selon lequel une solution d'hydrogel et une solution de cellules comprenant des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses dans une matrice extracellulaire sont co-extrudées concentriquement dans une solution de réticulation apte à réticuler l'hydrogel.

12. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon la revendication 11, selon lequel la solution de cellules comprend entre 20 et 30% en volume de cellules et entre 70 et 80% en volume de matrice extracellulaire.

13. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon la revendication 11 ou 12, selon lequel le ratio en volume de cellules endothéliales / cellules musculaires lisses dans la solution de cellules est compris entre 3/1 et 2/1.

14. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon l'une des revendications 11 à 13, selon lequel la vitesse d'extrusion de la solution de cellules est comprise entre 0,1 et 5 ml/h, préférentiellement entre 0,5 et 1 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h, et/ou la vitesse d'extrusion de la solution d'alginate est comprise entre 1

et 10 ml/h, préférentiellement entre 2 et 5 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 3 ml/h, +/- 0,5 ml/h.

15. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon l'une des revendications 11 à 14, selon lequel une solution intermédiaire, comprenant du sorbitol, est co-extrudée
5 entre la solution d'alginate et la solution de cellules, la vitesse d'extrusion de la solution intermédiaire étant préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 ml/h, préférentiellement entre 0,5 et 1 ml/h, encore plus préférentiellement égale à 0,5 ml/h, +/- 0,05 ml/h.

16. Procédé de préparation d'une microfibre cellulaire creuse selon l'une des revendications 11 à 15, comprenant l'étape supplémentaire consistant à hydrolyser la couche externe en
10 alginate après formation du vaisseau.

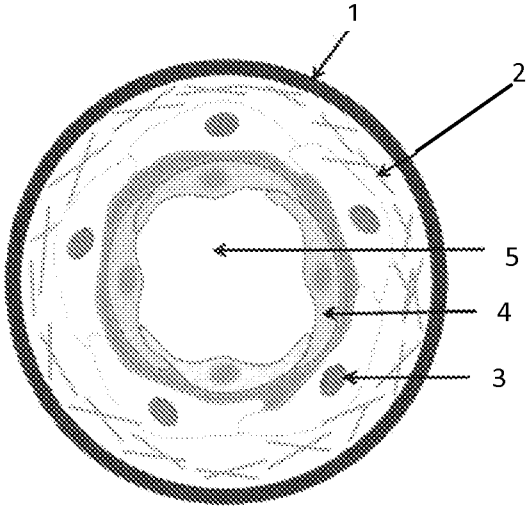


FIGURE 1

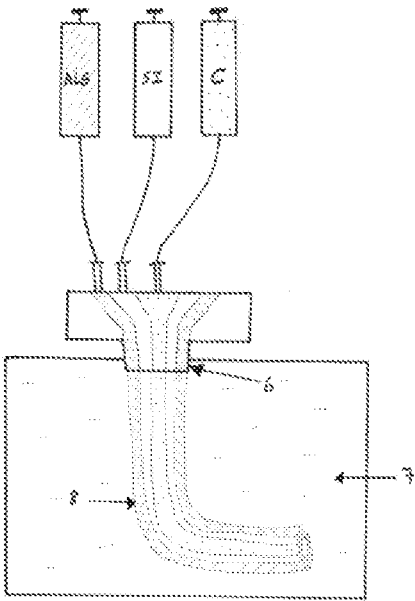


FIGURE 2

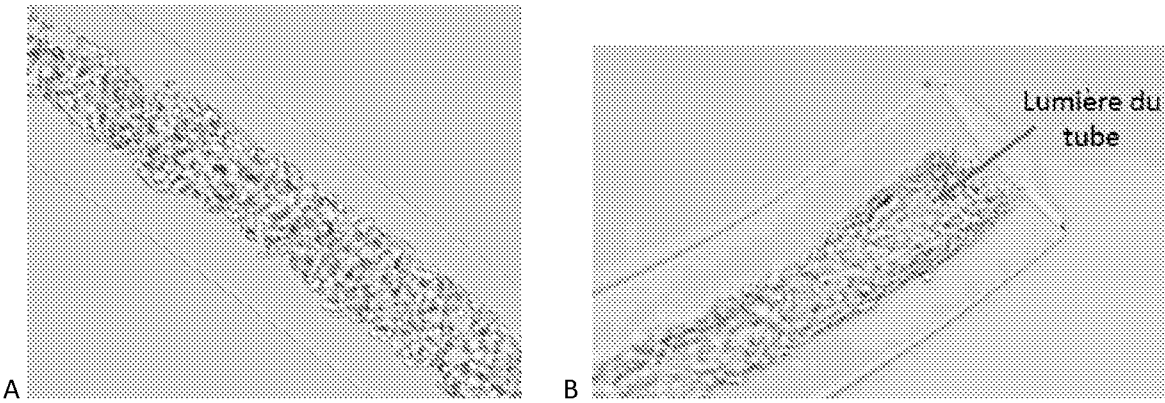


FIGURE 3

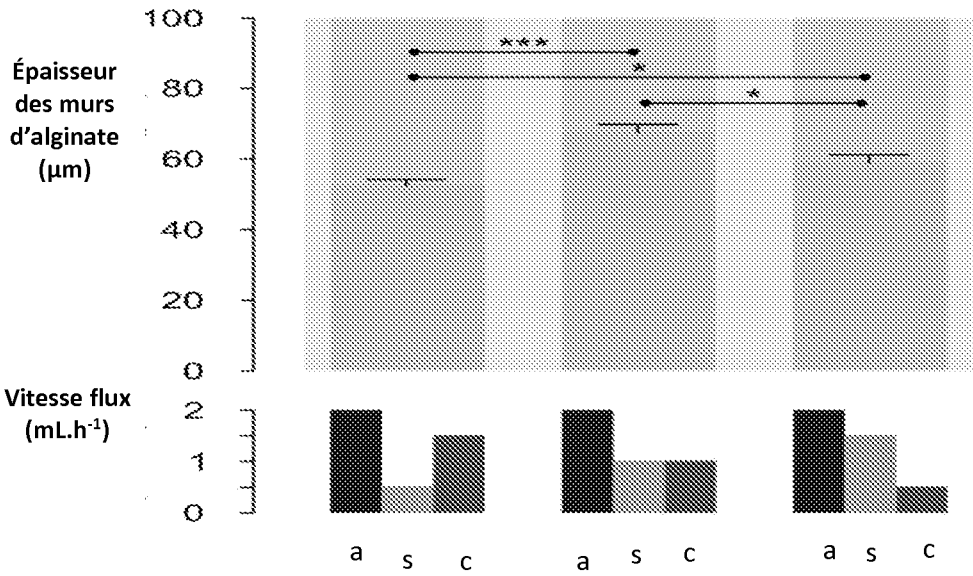


FIGURE 4

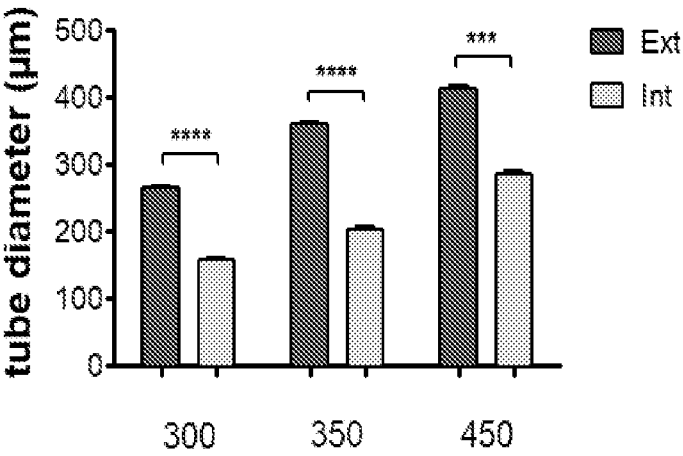


FIGURE 5

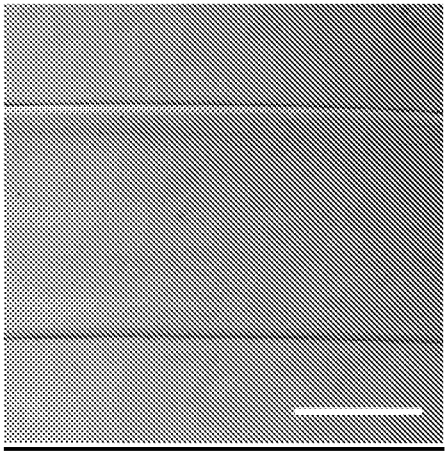


FIGURE 6

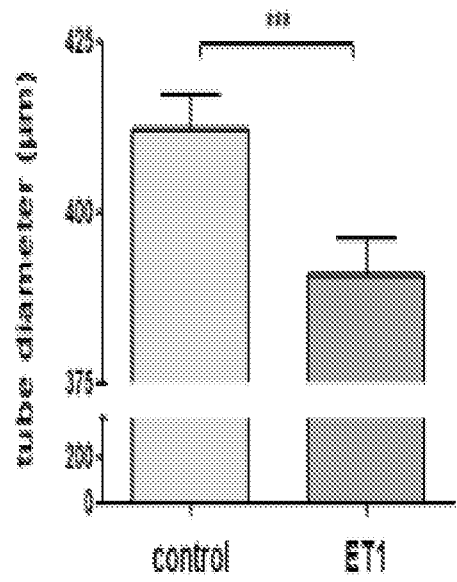


FIGURE 7

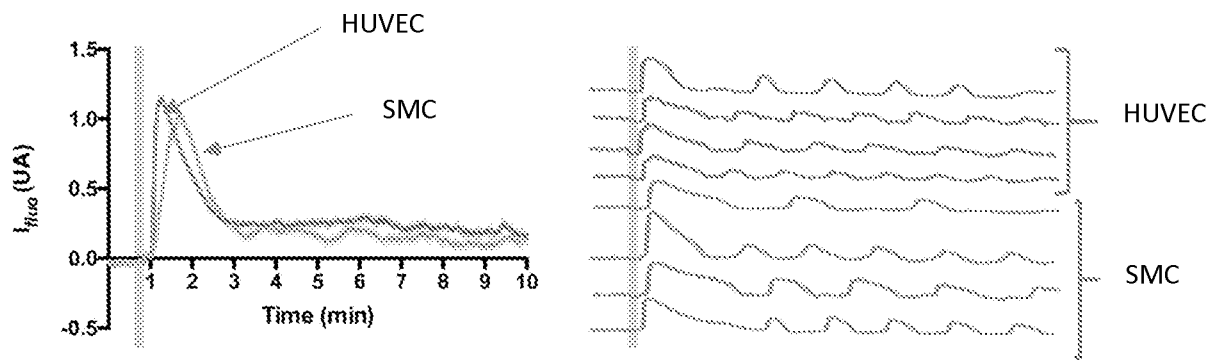


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/050541A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/071 C12N5/077
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Wo 2015/178427 AI (UNIV TOKYO [JP]) 26 November 2015 (2015-11-26) the whole document -& US 2017/130184 AI (TAKEUCHI SHOJI [JP] ET AL) 11 May 2017 (2017-05-11) the whole document column 8; example 2 figures 5-6 -----	1-5 ,7-10
X	Wo 2013/136184 A2 (NOVAHEP AB [SE]) 19 September 2013 (2013-09-19) the whole document figure 4; example 1 ----- -/- .	1,4,5 , 7-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 2018

Date of mailing of the international search report

29/05/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zuber Perez , C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2018/050541

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L'HEUREUX N ET AL: "A completely biological tissue-engineered human blood vessel", THE FASEB JOURNAL, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol . 12, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01) , pages 47-56, XP008132869 , ISSN: 0892-6638	1,4,5 , 7-9
Y	the whole document page 48, last paragraph -----	6
X	US 2015/118747 A1 (GERECHT SHARON [US] ET AL) 30 April 2015 (2015-04-30) the whole document example 7 paragraph 166 - column 17, paragraph 167 -----	1,4,5 , 7-9
Y	LUNCHANG WANG ET AL: "Fabrication of tissue-engineered vascular grafts with stem cells and stem cell-derived vascular cells", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol . 16, no. 3, 8 December 2015 (2015-12-08) , pages 317-330, XP055396473 , ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI : 10.1517/14712598.2016.1118460	6
A	the whole document Section 2.2; page 8 - page 10 -----	1-5 ,7-16
A	KEVIN ALESSANDRI ET AL: "A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC)", LAB ON A CHIP, vol . 16, no. 9, 1 January 2016 (2016-01-01) , pages 1593-1604, XP055393107 , ISSN: 1473-0197 , DOI : 10.1039/C6LC00133E cited in the application the whole document -----	1-16
A	THOTTAPILLI L & NAIR: "Scaffolds in vascular regeneration: current status" , VASCULAR HEALTH AND RISK MANAGEMENT, 1 January 2015 (2015-01-01) , page 79, XP055408508, DOI : 10.2147/VHRM.S50536 the whole document table 1 -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2018/050541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
Wo 2015178427 AI	26-11-2015	EP 3147346 AI	29-03-2017
		JP W02015178427 AI	20-04-2017
		US 2017130184 AI	11-05-2017
		WO 2015178427 AI	26-11-2015

US 2017130184 AI	11-05-2017	EP 3147346 AI	29-03-2017
		JP W02015178427 AI	20-04-2017
		US 2017130184 AI	11-05-2017
		WO 2015178427 AI	26-11-2015

WO 2013136184 A2	19-09-2013	AU 2013234037 AI	02-10 -2014
		CA 2867441 AI	19-09-2013
		CN 104411816 A	11-03-2015
		DK 2782995 T3	20-02-2017
		EP 2782995 A2	01-10 -2014
		ES 2615102 T3	05-06 -2017
		HK 1202582 AI	22-12-2017
		JP 6165787 B2	19-07-2017
		JP 6215387 B2	18-10-2017
		JP 2015511491 A	20-04-2015
		JP 2016144470 A	12-08-2016
		PL 2782995 T3	31-05 -2017
		PT 2782995 T	14-02 -2017
		US 2014377864 AI	25-12 -2014
		US 2016045642 AI	18-02-2016
		US 2017049935 AI	23-02-2017
		US 2018055973 AI	01-03 -2018
		WO 2013136184 A2	19-09-2013

US 2015118747 AI	30-04-2015	US 2015118747 AI	30-04-2015
		WO 2015066526 AI	07-05-2015

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2018/050541

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N5/071 C12N5/077 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	Wo 2015/178427 Al (UNIV TOKYO [JP]) 26 novembre 2015 (2015-11-26) le document en entier -& US 2017/130184 Al (TAKEUCHI SHOJI [JP] ET AL) 11 mai 2017 (2017-05-11) le document en entier colonne 8; exemple 2 figures 5-6 -----	1-5 ,7-10
X	Wo 2013/136184 A2 (NOVAHEP AB [SE]) 19 septembre 2013 (2013-09-19) le document en entier figure 4; exemple 1 ----- -/- .	1,4,5 , 7-9
X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents X Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 mai 2018		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29/05/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Zuber Perez , C

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	L'HEUREUX N ET AL: "A compl etely biologi cal ti ssue-engi neered human blood vessel ", THE FASEB JOURNAL, FEDERATION OF AMERICAN SOCI ETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol . 12, no. 1, 1 janvi er 1998 (1998-01-01) , pages 47-56, XP008132869 , ISSN: 0892-6638	1,4,5 , 7-9
Y	le document en enti er page 48, derni er alinéa -----	6
X	US 2015/118747 A1 (GERECHT SHARON [US] ET AL) 30 avri l 2015 (2015-04-30) le document en enti er exempl e 7 alinéa 166 - col onne 17, alinéa 167 -----	1,4,5 , 7-9
Y	LUNCHANG WANG ET AL: "Fabri cati on of ti ssue-engi neered vascul ar grafts with stem cel ls and stem cel l-deri ved vascul ar cel ls", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol . 16, no. 3, 8 décembre 2015 (2015-12-08) , pages 317-330, XP055396473 , ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI : 10.1517/14712598.2016. 1118460	6
A	le document en enti er Secti on 2.2; page 8 - page 10 -----	1-5 ,7-16
A	KEVIN ALESSANDRI ET AL: "A 3D pri nted microfl uidic devi ce for producti on of functi onal ized hydrogel microcapsul es for cul ture and differenti ati on of human Neuronal Stem Cel ls (hNSC) ", LAB ON A CHIP, vol . 16, no. 9, 1 janvi er 2016 (2016-01-01) , pages 1593-1604, XP055393107 , ISSN: 1473-0197 , DOI : 10.1039/C6LC00133E cité dans la demande le document en enti er -----	1-16
A	THOTTAPPELLI L & NAI R: "Scaffol ds in vascul ar régénérati on: current status" , VASCULAR HEALTH AND RISK MANAGEMENT, 1 janvi er 2015 (2015-01-01) , page 79, XP055408508, DOI : 10.2147/VHRM. S50536 le document en enti er tabl eau 1 -----	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2018/050541

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
Wo 2015178427 AI	26-11-2015	EP 3147346 AI	29-03-2017
		JP W02015178427 AI	20-04-2017
		US 2017130184 AI	11-05-2017
		wo 2015178427 AI	26-11-2015

US 2017130184 AI	11-05-2017	EP 3147346 AI	29-03-2017
		JP W02015178427 AI	20-04-2017
		US 2017130184 AI	11-05-2017
		wo 2015178427 AI	26-11-2015

wo 2013136184 A2	19-09-2013	AU 2013234037 AI	02-10 -2014
		CA 2867441 AI	19-09-2013
		CN 104411816 A	11-03-2015
		DK 2782995 T3	20-02-2017
		EP 2782995 A2	01-10 -2014
		ES 2615102 T3	05-06 -2017
		HK 1202582 AI	22-12-2017
		JP 6165787 B2	19-07-2017
		JP 6215387 B2	18-10 -2017
		JP 2015511491 A	20-04-2015
		JP 2016144470 A	12-08-2016
		PL 2782995 T3	31-05 -2017
		PT 2782995 T	14-02 -2017
		US 2014377864 AI	25-12 -2014
		US 2016045642 AI	18-02-2016
		US 2017049935 AI	23-02-2017
		US 2018055973 AI	01-03 -2018
		wo 2013136184 A2	19-09-2013

US 2015118747 AI	30-04-2015	US 2015118747 AI	30-04-2015
		wo 2015066526 AI	07-05-2015
