

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 809**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/GB2016/053907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16831713 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3440189**

54 Título: **Micromatriz de tejido esferoide y métodos de fabricación**

30 Prioridad:

06.04.2016 US 201662390660 P
13.09.2016 GB 201615517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2024

73 Titular/es:

MICROMATRICES ASSOCIATES LTD. (100.0%)
23 Wellgate Street
Newport on Tay, Fife DD6 8HS, GB

72 Inventor/es:

PLUMMER, SIMON MATTHEW

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 985 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Micromatriz de tejido esferoide y métodos de fabricación

La presente invención se refiere a una micromatriz de tejido esferoide y a métodos para fabricar la misma.

5 Se usan técnicas de alto rendimiento automatizadas en ciencias biológicas para realizar experimentos múltiples simultáneos para repetición a gran escala. De esta manera, los métodos que normalmente se realizan individualmente pueden realizarse en gran número simultáneamente sin afectar a su calidad.

10 En las ciencias biológicas, una micromatriz es una matriz de un gran número de materiales biológicos sobre un sustrato sólido, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio o una película fina, mediante la cual los materiales biológicos pueden ensayarse usando cribado de alto rendimiento. Se conocen diversos tipos diferentes de micromatrices, incluyendo micromatrices de ADN, micromatrices de proteínas y péptidos, micromatrices de anticuerpos y micromatrices de tejidos.

15 Se conocen micromatrices de tejidos que comprenden bloques de parafina en donde un gran número (por ejemplo, hasta 1.000) de muestras de tejido separadas se pueden ensamblar en una matriz para permitir el análisis histológico múltiple. En técnicas convencionales, se usa una aguja hueca para retirar muestras de tejido pequeñas (<1 mm) de materiales de interés, que se insertan en un bloque de parafina en una matriz espaciada con precisión. Las secciones del bloque pueden cortarse, por ejemplo, usando un microtomo, y analizarse histológicamente. Cada bloque de micromatrices puede cortarse en muchas secciones (por ejemplo, 100-500), que pueden ensayarse independientemente.

20 El documento WO 2015/069742 divulga la preparación de un molde que tiene una matriz de pocillos, que están precargados con agua. Los esferoides se pipetea en los pocillos llenos de agua y el agua y los esferoides dentro de los pocillos se infunden después con agarosa. Una vez que se fija la agarosa, se retira del molde. La implicación es que los esferoides están en la base de miembros de agarosa que se extienden hacia abajo, en lugar de embebidos dentro del cuerpo de la agarosa. La eficacia con la que los esferoides se retienen en la base de los miembros de agarosa tras la retirada del molde no está clara. El molde puede estar hecho de plástico o silicona. Este documento
25 enseña que los esferoides están en el mismo plano de modo que pueden seccionarse y teñirse en un portaobjetos. Sin embargo, este documento no divulga un posicionamiento horizontal preciso de los esferoides; en su lugar, divulga simplemente que los esferoides están dentro de compartimentos separados.

30 La presente invención busca proporcionar una micromatriz de tejido esferoide mejorada, y métodos para fabricar la misma. En la presente memoria, el término "esferoide" pretende significar aglomerados de células, por ejemplo, organoides, o aglomerados esféricos de células en una estructura similar a un tejido. El experto en la técnica entenderá que tales estructuras no necesitan ser estrictamente esféricas; más bien, tienen una tridimensionalidad que refleja propiedades *in vivo*.

35 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona así una micromatriz de tejido esferoide adecuada para seccionamiento, que comprende una matriz regular de esferoides de tejido dispuestos en un patrón de rejilla y embebidos dentro de un molde poroso, en donde los esferoides están colocados con precisión horizontal de manera que el punto central de cada esferoide no está a más de 100 micrómetros de su ubicación de rejilla regular.

40 La micromatriz de tejido esferoide es adecuada para su uso en histología tisular de alto rendimiento. La micromatriz permite la alineación, posicionamiento e incrustación sustancialmente plana de esferoides de tejido en una rejilla geométrica, permitiendo el seccionamiento simultáneo de un gran número (por ejemplo, cientos) de esferoides individuales para análisis histológicos posteriores, por ejemplo, tinción, perfil transcriptómico/proteómico y análisis de imágenes. Sin embargo, la micromatriz de tejido esferoide es adecuada para su uso en otros campos, por ejemplo, en ensayos de tejidos en las industrias del cuidado personal y cosmética, donde pueden no permitirse ensayos con animales.

45 La micromatriz de tejido esferoide de la presente invención comprende un molde poroso, es decir, un molde formado a partir de material poroso. Potencialmente, puede usarse cualquier material poroso adecuado, y un material preferido es un gel de agarosa o agar.

50 Se ha encontrado que la porosidad es importante y beneficiosa; una consecuencia es que todo el producto en una etapa posterior pueda impregnarse con una cera, y por lo tanto pueda seccionarse convenientemente. La porosidad a lo largo del producto, en lugar de estar justo en la proximidad de cada esferoide, proporciona puntos de distinción adicionales e inventivos sobre algunos documentos de la técnica anterior que, por ejemplo, usan una matriz porosa pero solo dentro de pocillos divididos por separado. En la presente invención se utiliza un molde que es poroso en sí mismo. La presente invención permite la formación de un bloque de cera ordenado que puede seccionarse muchas veces.

En contraste con la presente invención, el documento WO 2015/069742 divulga un molde hecho de plástico u otro material en lugar de un molde que es poroso. En la presente invención, los esferoides están rodeados por una matriz porosa que da como resultado una mayor resistencia y permite una mayor densidad de esferoides por unidad de área.

5 El molde poroso se forma inicialmente para contener una serie de orificios colocados regularmente, dispuestos en un patrón de rejilla. Los orificios tienen preferiblemente un diámetro entre 0,2 y 3,0 mm, por ejemplo, de 0,5 a 1,5 mm, preferiblemente aproximadamente 1 mm. Los orificios pueden tener una profundidad de entre 2 y 5 mm, por ejemplo, de 3 a 4 mm, preferiblemente de aproximadamente 4 mm. El molde puede contener, por ejemplo, de 100 a 300 orificios, tal como una rejilla de 10 x 17 de 170 orificios. Sin embargo, puede estar contenido cualquier número de orificios en el molde poroso, por ejemplo, 96 orificios para reflejar la placa de 96 pocillos estándar industrial.

10 La micromatriz de tejido esferoide de la presente invención también comprende una matriz de esferoides de tejido embebidos dentro del molde poroso.

Los esferoides pueden colocarse con mucha precisión de manera que la distancia entre ellos sea muy uniforme. Esto se debe a que, durante la preparación de la matriz, los orificios en donde se han de colocar los esferoides adoptan la forma de pocillos cóncavos o "hoyuelos", lo que significa que cada esferoide está situado en el centro de cada pocillo. Esto contrasta con los pocillos de fondo plano en algunas matrices.

15 En una matriz, la intención será que los esferoides estén ubicados en posiciones ideales predeterminadas, normalmente a intervalos regulares en una matriz regular. Opcionalmente, en la presente invención, los esferoides tienen un diámetro medio y están ubicados horizontalmente de manera que sus centros no están más lejos que dicho diámetro medio de sus posiciones ideales predeterminadas. Opcionalmente, no están más lejos que la mitad de dicho diámetro medio, opcionalmente no están más lejos que 0,1 de dicho diámetro medio.

El posicionamiento preciso de los esferoides significa que es posible superponer una rejilla o plantilla para, entre otras cosas, el análisis de imagen automatizado. Opcionalmente, el método puede automatizarse mediante el uso de robótica.

25 El punto central de cada esferoide no está a más de 100 micrómetros, opcionalmente no más de 50 micrómetros, opcionalmente no más de 20 micrómetros, opcionalmente no más de 10 micrómetros, desde la ubicación horizontal deseada.

Los esferoides están dispuestos sustancialmente en una matriz geométrica regular (por ejemplo, cuadrada). Opcionalmente, cuando la distancia entre esferoides adyacentes es x , la desviación estándar de la colocación de esferoides lejos de las ubicaciones ideales de esferoides de rejilla no es mayor de $0,5x$, opcionalmente no mayor de $0,25x$, opcionalmente no mayor de $0,2x$, opcionalmente no mayor de $0,1x$, opcionalmente no mayor de $0,05x$ u, opcionalmente, no mayor de $0,02x$.

La densidad de esferoides en la matriz puede ser muy alta, por ejemplo, 100 esferoides por cm^2 o más, por ejemplo, 200 esferoides por cm^2 o más, por ejemplo, 400 esferoides por cm^2 o más, por ejemplo, 500 esferoides por cm^2 o más, por ejemplo, hasta 1.000 esferoides por cm^2 . El aparato robótico y/o las etapas del proceso como se describe a continuación se pueden usar para lograr los niveles más altos de precisión.

Los esferoides de tejido pueden comprender cualquier tejido adecuado que se va a probar o ensayar. Por ejemplo, el tejido puede derivarse de células madre pluripotentes inducidas, células primarias o líneas celulares tales como las derivadas de tejidos cancerosos. Por tanto, los esferoides de tejido pueden prepararse a partir de una variedad de diferentes tipos de células incluyendo, por ejemplo, células neuronales, células de piel, células hepáticas, células tumorales, células estromales (por ejemplo, fibroblastos y macrófagos), células inmunes (por ejemplo, linfocitos y células T) y células endoteliales (por ejemplo, células endoteliales vasculares). Los esferoides de tejido pueden formarse a partir de los cultivo 3D in vitro de células.

La micromatriz de tejido esferoide puede comprender esferoides de tejido de diferentes tamaños. Los esferoides de tejido pueden tener un diámetro de esferoide de 50 a 500 μm , por ejemplo, de 100 a 500 μm , tal como 150 μm o/a 350 μm .

En otro aspecto, la presente invención proporciona una micromatriz de tejido esferoide (como se define según el primer aspecto de la presente invención) que comprende una matriz de esferoides de tejido embebidos dentro de un molde poroso en donde los esferoides de tejido comprenden un sustrato sobre el que se cultivan las células antes de la incrustación. Por ejemplo, el sustrato puede ser una perla formada a partir de un material adecuado, tal como poliestireno u otro material plástico adecuado.

Los esferoides de tejido que comprenden un sustrato tal como una perla de poliestireno pueden tener una utilidad particular para el crecimiento de células de la piel, por ejemplo, para su uso en las industrias del cuidado personal o cosmética. En Europa, por ejemplo, no se permiten ensayos con animales para cosméticos, y por tanto existe la necesidad de ensayos en tejido humano. El crecimiento de piel humana sobre perlas es útil porque las células de la piel tienden a crecer sobre la perla como lo harían en la naturaleza, es decir (cuando están presentes) epidermis más externa, dermis debajo de la epidermis, e hipodermis debajo de la dermis. Los estudios han encontrado que si se

forman esferoides de piel humana sin un sustrato, entonces las capas de la piel tienden a crecer de "dentro hacia fuera" en comparación con cómo se forman en la naturaleza, haciéndolos inadecuados para ensayo.

La micromatriz de tejido esferoide puede estar impregnada con un agente estructural adicional, tal como cera de parafina o resina, para una estabilidad estructural adicional.

- 5 Los esferoides de tejido pueden teñirse para análisis histológico, por ejemplo, la medición de biomarcadores (moléculas indicadoras biológicas) mediante análisis de imagen automatizado. Por ejemplo, las respuestas celulares (biomarcadores) pueden monitorizarse mediante imagenología de células basada en microscopio de inmunotinción, tal como con un escáner confocal y análisis de imágenes automatizado. Por ejemplo, la tinción con hematoxilina y eosina es una de las principales tinciones histológicas. La tinción se produce típicamente después de que la micromatriz de tejido esferoide se haya cortado en secciones para su análisis, por ejemplo, mediante un microtomo.

10 Según la presente invención, también se proporciona un método de fabricación de una micromatriz de tejido esferoide (como se define según el primer aspecto de la presente invención), método que comprende las etapas de: formar un molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada, y permitir que el material de molde líquido se endurezca; retirar el molde poroso del molde de colada; rellenar el molde poroso con material de molde líquido adicional, y permitir que se formen rebajos en la superficie del molde mediante la introducción de material de molde líquido a través de contracción a medida que se endurece el material de molde líquido; colocar esferoides de tejido en los rebajos en la superficie del molde poroso; y, sellar los esferoides de tejido dentro del molde rellenando con material de molde líquido y permitir que se endurezca el material de molde líquido.

Este método de la presente invención fabrica una micromatriz de tejido esferoide según la presente invención.

- 20 El método comprende por tanto la etapa de formar un molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada. La temperatura a la que el material poroso será líquido dependerá del material que se esté usando. Un material de molde poroso preferido es agarosa al 0,5-4 % en agua, preferiblemente una mezcla de agarosa al 2 %/agua. Para este material, es adecuada una temperatura de colada de 60 a 70 °C. El molde de colada se equilibra previamente preferentemente a una temperatura adecuada, por ejemplo, 70 °C para gel de agarosa líquido. El molde de colada puede cubrirse con material de molde líquido, por ejemplo, usando una caja de casete de tejido.

25 El material de molde líquido se deja endurecer en el molde de colada. Un periodo de tiempo y temperatura adecuados para esto dependerán del material que se esté usando. Para el gel de agarosa preferido usado en la presente invención, las condiciones de endurecimiento adecuadas son temperatura ambiente durante 20 a 45 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 minutos, seguido de enfriamiento a 0 a 5 °C (por ejemplo, 4 °C) durante 20 a 45 minutos (por ejemplo, 30 minutos).

El molde poroso se retira entonces del molde de colada. Esto debe conseguirse sin fracturar el molde poroso, y puede ayudarse rigidizando el molde poroso, por ejemplo, por enfriamiento. Por lo tanto, un molde de gel de agarosa puede rigidizarse para su retirada del molde de colada enfriando a una temperatura de, por ejemplo, -20 °C durante un período de tiempo apropiado (por ejemplo, de 5 a 15 minutos).

- 35 La retirada del molde poroso del molde de colada puede también facilitarse usando un material de silicio, glicerol o politetrafluoroetileno (teflón), u otro material hidrófobo, en el molde de colada, por ejemplo, un pulverizador de silicio, glicerol o teflón.

Una vez retirado del molde de colada, el molde poroso se rellena con material de molde líquido adicional, y se permite que se formen rebajos en la superficie del molde mediante la introducción de material de molde líquido a través de contracción a medida que se endurece el material de molde líquido. Antes del relleno, el molde poroso puede calentarse para eliminar los gases atrapados u otras impurezas, a una temperatura adecuada, por ejemplo, de 60 a 70 °C, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, de 10 a 30 minutos (por ejemplo, 20 minutos). Este calentamiento se realiza preferiblemente en un entorno sellado para evitar la evaporación del material. El molde poroso se cubre con material de molde líquido como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. El material de molde líquido puede ser el mismo o diferente que el material usado para formar el molde poroso; por ejemplo, se puede usar un gel de agarosa al 0,1 - 1,0 % en agua, opcionalmente al 0,4 % en agua o al 0,7 % en agua. Al material de molde líquido de relleno puede añadirse un marcador colorante adecuado, por ejemplo, azul de bromofenol o azul de Coomassie. A medida que se permite que el material líquido se endurezca, se introduce en el molde poroso bajo tensión superficial formando rebajos en la superficie del molde, debido a la contracción del material del molde a medida que se endurece. Los rebajos se forman típicamente dentro del 1 mm superior del molde.

Los esferoides de tejido se colocan en los rebajos en la superficie del molde poroso, y se sellan dentro del molde mediante la adición de más material de molde líquido. De nuevo, para gel de agarosa en agua, es adecuada una temperatura de 60 a 70 °C. El material de molde líquido se deja endurecer, por ejemplo, enfriando hasta 0 a 5 °C (por ejemplo, 4 °C) durante 30 minutos.

- 55 El molde de colada puede estar hecho de una variedad de materiales tales como silicona o policarbonato. El molde de colada es generalmente inerte y no poroso. Las protuberancias del molde de colada se usan para hacer pocillos complementarios en el molde de agarosa/poroso y pueden variarse en su forma, dimensión y separación.

En los métodos descritos anteriormente, después de que el molde poroso (por ejemplo, agarosa) se libere del molde de colada, se añade material poroso adicional (por ejemplo, agarosa) a los pocillos en el molde poroso (por ejemplo, agarosa), y luego se forman rebajes en el material poroso adicional (por ejemplo, agarosa) a medida que se introduce en los pocillos, y posteriormente se colocan esferoides en esos rebajes.

- 5 Una forma alternativa de proporcionar rebajes adecuados para los esferoides es la siguiente. Las protuberancias del molde de colada (por ejemplo, protuberancias en forma de U) pueden tener protuberancias más pequeñas (por ejemplo, protuberancias en forma de tetina) en sus partes superiores. Estos dan como resultado pocillos (por ejemplo, pocillos en forma de U) en el molde poroso (por ejemplo, agarosa) con rebajes (por ejemplo, hoyuelos) en sus bases (por ejemplo, en sus puntos centrales) que permiten que los esferoides se coloquen por gravedad precisamente en los hoyuelos de los pocillos y los retengan cuando los pocillos se rellenan posteriormente con material poroso (por ejemplo, agarosa). Así, en esta variación del método, se consigue precisión al tener hoyuelos o rebajes que se forman en la base de molde poroso propiamente dicha en lugar de en material poroso adicional. Las diferentes formas de conseguir altos niveles de precisión en la localización de los esferoides amplían la aplicabilidad de la invención y las posibilidades de automatización.
- 10
- 15 Por tanto, desde un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de fabricación de una micromatriz de tejido esferoide (tal como se define según el primer aspecto de la presente invención), método que comprende las etapas de: formar un molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada; permitir que se endurezca el material de molde líquido; retirar el molde poroso del molde de colada; colocar esferoides en rebajes en las bases de pocillos en el molde de material poroso; y sellar los esferoides dentro del molde poroso añadiendo material poroso adicional en la parte superior de los esferoides; en donde los rebajes en las bases de los pocillos en el material poroso están formados por protuberancias del molde de colada que portan protuberancias adicionales en forma de pezón.
- 20

Las características opcionales y/o preferidas del primer método de la presente invención también se aplican cuando sea apropiado, *mutatis mutandis*, al método alternativo de fabricación.

- 25 Los métodos de la presente invención dan como resultado, por tanto, esferoides que se intercalan entre componentes de matriz porosa (por ejemplo, entre capas de agarosa). Esto es porque los esferoides se colocan sobre un sustrato poroso (por ejemplo, agarosa) y después se coloca más sustrato poroso (por ejemplo, un material de agarosa diferente) en la parte superior. Por el contrario, en algunas matrices de la técnica anterior, las muestras se colocan en la parte inferior de pocillos no porosos, de modo que cualquier matriz porosa rodea, pero no está debajo de las muestras.
- 30

- La micromatriz de tejido esferoide formada mediante estos métodos puede entonces impregnarse con un agente estructural adicional, tal como cera de parafina o resina (por ejemplo, resina de metacrilato), para estabilidad estructural adicional, en uno o más ciclos en condiciones adecuadas. Por ejemplo, la cera de parafina puede impregnar una micromatriz de tejido esferoide formada a partir de gel de agarosa en ciclos de una hora a 60 °C, a presión atmosférica o a presión inferior (por ejemplo, 0,5 atm).
- 35

- La impregnación del molde con resina, por ejemplo, material polimérico, por ejemplo, polímero de metacrilato, permite seccionar el bloque en un microtomo usando, por ejemplo, una cuchilla de vidrio o diamante. La resina es más rígida que la cera y permite el corte de secciones más delgadas (por ejemplo, <1 µm). Las secciones son también más rígidas y es menos probable que se distorsionen que la cera cuando se montan para análisis. Esto permite posibilidades adicionales para conseguir altos niveles de precisión que a su vez facilita la fabricación de micromatrices de esferoides de alta densidad.
- 40

En uso, la micromatriz de tejido esferoide de la presente invención puede seccionarse y usarse para análisis. Por ejemplo, las secciones pueden colocarse en un portaobjetos de microscopio de vidrio, y pueden teñirse con un material de tinción histológica, para análisis de imágenes.

- 45 La presente invención proporciona un paso hacia delante en términos de imagenología. Varios métodos de imagenología conocidos son métodos de "montaje completo", es decir, intentan obtener imágenes de esferoides completos y padecen en términos de difracción, y también son incapaces de ensayar múltiples puntos finales debido a la incapacidad para aplicar recuperación inducida por calor (HIER) de las dianas en preparaciones de montaje completo. La presente invención es ventajosa para evitar la dispersión de la luz, proporcionar una resolución más alta y permitir un análisis más preciso porque facilita la imagenología a través del esferoide. Las aplicaciones novedosas incluyen la tinción múltiple de esferoides hepáticos con marcadores celulares inflamatorios y la cuantificación de la lesión hepática inducida por fármacos usando marcadores de citocinas. Otras aplicaciones incluyen el cribado de fármacos que actúan contra tumores en esferoides híbridos que contienen células tumorales y normales; esto puede implicar la identificación de las células tumorales mediante tinción con un marcador específico de tumor tal como una proteína marcada fluorescente verde (GF) y posteriormente tinción para la diana de fármaco dentro de las células tumorales.
- 50
- 55

A continuación, se describirán en detalle realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

Las Figuras 1a a 1d ilustran un método de fabricación de una micromatriz de tejido esferoide según una realización de la presente invención;

- 5 La Figura 2a muestra una matriz de esferoides tumorales según una realización de la presente invención, que muestra el tamaño de los esferoides tumorales;

La Figura 2b es una imagen escaneada de la sección de la matriz de esferoides de la matriz de esferoides tumorales mostrada en la Figura 2a teñida con hematoxilina y eosina;

- 10 La Figura 2c es una imagen de alta resolución aumentada de un solo esferoide en la matriz mostrada en las Figuras 2a y 2b;

La Figura 3a muestra una matriz de esferoides neuronales según una realización de la presente invención que muestra el tamaño de los esferoides neuronales;

La Figura 3b es una imagen escaneada de la sección de la matriz de esferoides de la matriz de esferoides neuronales mostrada en la Figura 3a teñida con hematoxilina y eosina;

- 15 La Figura 3c es una imagen de alta resolución aumentada de un solo esferoide en la matriz mostrada en las Figuras 3a y 3b;

La Figura 4a muestra una micromatriz de tejido esferoide según una realización de la presente invención que incorpora perlas de poliestireno;

La Figura 4b muestra una sección de la micromatriz de tejido esferoide mostrada en la Figura 4a;

- 20 La Figura 5a muestra una imagen de alta resolución de un esferoide de células tumorales de una matriz de tejido esferoide según una realización de la presente invención;

La Figura 5b muestra una imagen de alta resolución de un esferoide tumoral;

La Figura 5c muestra un análisis automático de imágenes de una sección de esferoides completa a través de todos los esferoides en una micromatriz de tejido esferoide según una realización de la presente invención; y

- 25 La Figura 6 muestra la estructura de pocillos formados en un molde poroso según un método alternativo de la presente invención.

Con referencia a las Figuras 1a a 1d, se describe un método preferido de fabricación de una micromatriz de tejido esferoide de la presente invención.

- 30 En un método preferido, el molde poroso se fabrica vertiendo material de gel líquido en un molde de colada. Para formar el molde poroso puede usarse cualquier material poroso adecuado, preferiblemente un material de gel de agarosa o agar. Una composición de gel de agarosa preferida comprende del 0,5 al 4 % de agarosa en agua, preferiblemente una mezcla de agarosa al 2 %/agua. El gel de agarosa líquido se vierte en el molde de colada a una temperatura de 60 a 70 °C, estando el molde de colada pre-equilibrado a 70 °C. Se coloca una caja de casete de tejido (por ejemplo, de polímero acetal) en la parte superior del molde de colada y se rellena con gel de agarosa líquido. Se deja que la agarosa en gel líquido se endurezca a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 a 45 minutos, preferiblemente 30 minutos, y después se enfría a 4 °C durante 30 minutos. El gel se enfría a continuación a una temperatura de -20 °C durante 10 minutos para rigidizar el gel, de modo que se pueda retirar del molde de colada sin fracturarse. El molde poroso puede retirarse del molde de colada insertando dos microespátulas (anchura 4 mm, profundidad 0,5 mm, longitud 10 cm) hacia abajo a cada lado de la base del molde de colada y sacando el molde poroso del molde de colada.

- 40 El molde de agarosa poroso se calienta entonces en un horno a 70 °C en una bolsa de plástico sellada para evitar la evaporación durante 20 minutos, y los orificios en el molde se rellenan entonces con gel de agarosa líquido al 0,1 al 1,0 % en agua, preferiblemente el 0,4 %, que contiene marcador de colorante azul de coomassie, a una temperatura de 60 a 70 °C, preferiblemente 70 °C. El gel de agarosa líquido se introduce en el molde bajo tensión superficial y se deja endurecer formando cámaras rebajadas en el 1 mm superior del molde que ocurren debido a la contracción del volumen de gel a medida que se endurece (véase la Figura 1a).

- 45 Los esferoides de tejido de un diámetro de 50 a 500 µm, por ejemplo, de 100 a 500 µm, tal como de 150 µm o/a 350 µm, que pueden formarse a partir del cultivo 3D in vitro de células, y que pueden derivarse de células madre pluripotentes inducidas, células primarias o líneas celulares tales como las derivadas de tejidos cancerosos, se fijan en formaldehído tamponado neutro (NBF) que contiene 100 ml de formaldehído puro disuelto en 900 ml de agua desionizada que contiene 4 g de dihidrógenofosfato sódico, monohidrato y 6,5 g de hidrógenofosfato disódico, y luego se colocan en los rebajes en la parte superior del molde de agarosa (véase la Figura 1b).

Después de que los esferoides de tejido se colocan en los rebajes del molde de agarosa, se sellan por recubrimiento con gel de agarosa líquido a una temperatura de 60 a 70 °C (véase la Figura 1c). El molde se enfría después a 4 °C durante 30 minutos para endurecer el sello de gel de agarosa, y se coloca en una solución de etanol al 70 % durante un mínimo de 1 a 10 días, preferentemente 5 días.

- 5 La micromatriz de tejido esferoide se impregna a continuación con cera de parafina fundida en un procesador de tejidos (Figura 1d), utilizando los siguientes ciclos:

Tiempo (horas)	Solución	Temp. (°C)	Vacío (en Hg)
2	Etanol al 70 %	25	-
2	Etanol al 95 %	25	-
2	Etanol al 100 %	25	-
2	Etanol al 100 %	25	-
2	Etanol al 100 %	25	-
1	Xileno	25	-
2	Xileno	25	-
2	Xileno	25	-
3	Parafina	60	-
3	Parafina	60	15

Después de la incrustación en parafina, la micromatriz de tejido esferoide se puede seccionar y las secciones se colocan en portaobjetos de vidrio de microscopio (25 mm x 75 mm), antes de la tinción histológica y/o la imagenología de perfiles proteómicos por espectrometría de masas con desorción láser asistida por matriz y el análisis de imágenes automatizado.

- 10 Los ejemplos de las imágenes disponibles de diferentes micromatrices de tejido esferoide de realizaciones de la presente invención se muestran en las Figuras 2a a 5c.

- 15 Mientras que la Figura 1 ilustra un método para localizar esferoides en una matriz, la Figura 6 ilustra un método alternativo. Con referencia a la Figura 6, el molde de colada 20, mostrado en sección transversal, contiene protuberancias 21, mostradas en forma ampliada, que tienen generalmente forma de U, pero tienen protuberancias 22 más pequeños en forma de boquilla. Estos dan como resultado un molde poroso (por ejemplo, un molde de agarosa) que tiene pocillos 23 en forma de U con hoyuelos 24 en la base de los pocillos 23, para la localización de esferoides 25.

- 20 Se ha mostrado que los esferoides contenidos en los productos de la presente invención mantienen su integridad. Esto se ha confirmado usando análisis morfológico celular verificado por un patólogo.

La presente invención puede proporcionar así una micromatriz de tejido esferoide y un método de fabricación de la misma, para su uso en histología de alto rendimiento. La micromatriz de tejido esferoide proporciona la alineación plana y el posicionamiento de esferoides de tejido en una rejilla geométrica que facilita el seccionamiento simultáneo de muchos (por ejemplo, cientos) de esferoides individuales para el análisis posterior.

25

REIVINDICACIONES

1. Una micromatriz de tejido esferoide adecuada para seccionamiento, que comprende una matriz regular de esferoides de tejido dispuestos en un patrón de rejilla y embebidos dentro de un molde poroso, en donde los esferoides están colocados horizontalmente con precisión de manera que el punto central de cada esferoide no está a más de 100 micrómetros de su ubicación de rejilla regular.
2. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 1, en donde el molde poroso está formado a partir de un gel de agarosa o agar.
3. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que contiene de 100 a 300 esferoides.
4. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 3, que comprende una rejilla de 10 x 17 de 170 esferoides.
5. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que contiene 96 esferoides.
6. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde la densidad de esferoides por cm² es 100 o más.
7. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde los esferoides de tejido comprenden tejido derivado de una o más de células madre pluripotentes inducidas, células primarias, líneas celulares derivadas de tejidos cancerosos, células neuronales, células de la piel, células hepáticas, células tumorales, células estromales, células inmunes y células endoteliales.
8. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde los esferoides de tejido se forman a partir del cultivo 3D in vitro de células.
9. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde los esferoides de tejido tienen un diámetro de 50 a 500 µm.
10. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde los esferoides de tejido comprenden un sustrato sobre el que se cultivan las células antes de la incrustación.
11. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 10, en donde el sustrato es una perla formada de poliestireno (amberlita) u otro material plástico poroso.
12. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 10 u 11, en donde los esferoides de tejido comprenden células de piel humana.
13. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior, en donde los esferoides de tejido se tiñen para análisis histológico.
14. Una micromatriz de tejido esferoide según cualquier reivindicación anterior que está impregnada con un agente estructural adicional.
15. Una micromatriz de tejido esferoide según la reivindicación 14 que está impregnada con cera de parafina o una resina.
16. Un método de fabricación de una micromatriz de tejido esferoide que comprende una matriz regular de esferoides de tejido dispuestos en un patrón de rejilla, método que comprende las etapas de:
formar un molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada, y permitir que el material de molde líquido se endurezca;
retirar el molde poroso del molde de colada;
rellenar el molde poroso con material de molde líquido adicional, y permitir que se formen rebajes en la superficie del molde mediante la introducción de material de molde líquido mediante contracción a medida que se endurece el material de molde líquido;
colocar esferoides de tejido en los rebajes en la superficie del molde poroso; y
sellar los esferoides de tejido dentro del molde mediante recubrimiento con material de molde líquido y permitir que el material de molde líquido se endurezca;
en donde los esferoides están colocados horizontalmente con precisión de manera que el punto central de cada esferoide no está a más de 100 micrómetros de su ubicación de rejilla regular.

17. Un método según la reivindicación 16 para fabricar una micromatriz de tejido esferoide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
18. Un método según la reivindicación 16 o 17, en donde el material de molde líquido es agarosa del 0,5 al 4 % en agua.
- 5 19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la etapa de formar el molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada se realiza a una temperatura de 60 a 70 °C.
20. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde el material del molde líquido se deja endurecer en el molde de colada a temperatura ambiente durante 20 a 45 minutos, seguido de enfriamiento a 0 a 5 °C durante 20 a 45 minutos.
- 10 21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde antes de cubrirlo, el molde poroso se calienta de 60 a 70 °C durante 10 a 30 minutos en un entorno sellado.
22. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde el molde poroso se cubre con material de molde líquido que comprende un gel de agarosa del 0,1 al 1,0 % en agua.
- 15 23. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en donde los rebajes se forman en el 1 mm superior del molde.
24. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en donde los esferoides de tejido se sellan dentro de los rebajes del molde al cubrir con material de molde líquido a una temperatura de 60 a 70 °C.
25. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en donde después del sellado de los esferoides de tejido dentro de los rebajes del molde, se deja que el material de molde líquido se endurezca enfriando a 0 a 5 °C durante aproximadamente 30 minutos.
- 20 26. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en donde la micromatriz de tejido esferoide se impregna con un agente estructural adicional.
27. Un método según la reivindicación 26, en donde el agente estructural es cera de parafina o una resina.
28. Un método para fabricar una micromatriz de tejido esferoide que comprende una matriz regular de esferoides de tejido dispuestos en un patrón de rejilla, método que comprende las etapas de: formar un molde de material poroso a partir de material de molde líquido en un molde de colada; permitir que el material de molde líquido se endurezca; retirar el molde poroso del molde de colada; colocar esferoides en rebajes en las bases de pocillos en el molde de material poroso; y sellar los esferoides dentro del molde poroso añadiendo material poroso adicional en la parte superior de los esferoides; en donde los rebajes en las bases de los pocillos en el material poroso se forman mediante protuberancias del molde de colada que llevan protuberancias adicionales en forma de pezón; y en donde los esferoides se colocan horizontalmente de manera precisa de manera que el punto central de cada esferoide no está a más de 100 micrómetros desde su ubicación de rejilla regular.
- 25 29. Un método como se reivindica en la reivindicación 28, que comprende además una etapa posterior de impregnación de la micromatriz con un agente estructural adicional.
- 30 30. Un método como se reivindica en la reivindicación 29, en donde el agente estructural es cera de parafina o una resina.
- 35 31. Uso de una micromatriz de tejido esferoide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en un método analítico que comprende seccionar dicha micromatriz de tejido esferoide para seccionar simultáneamente múltiples esferoides y analizar las secciones.

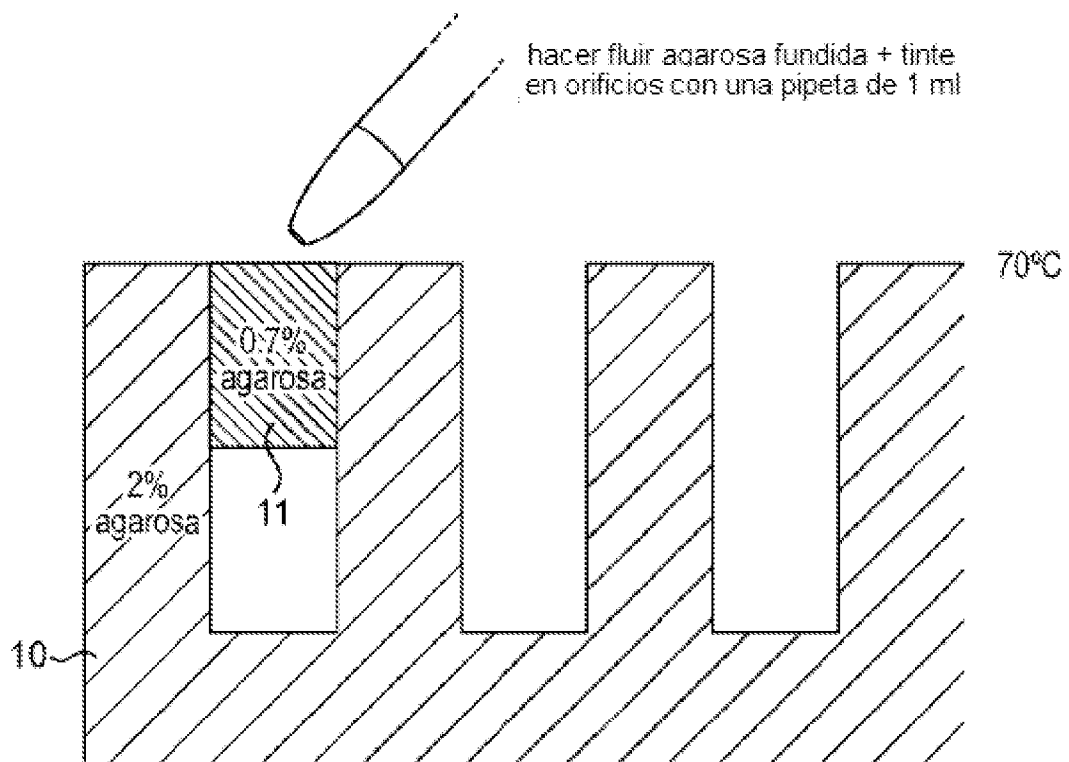


FIG. 1A

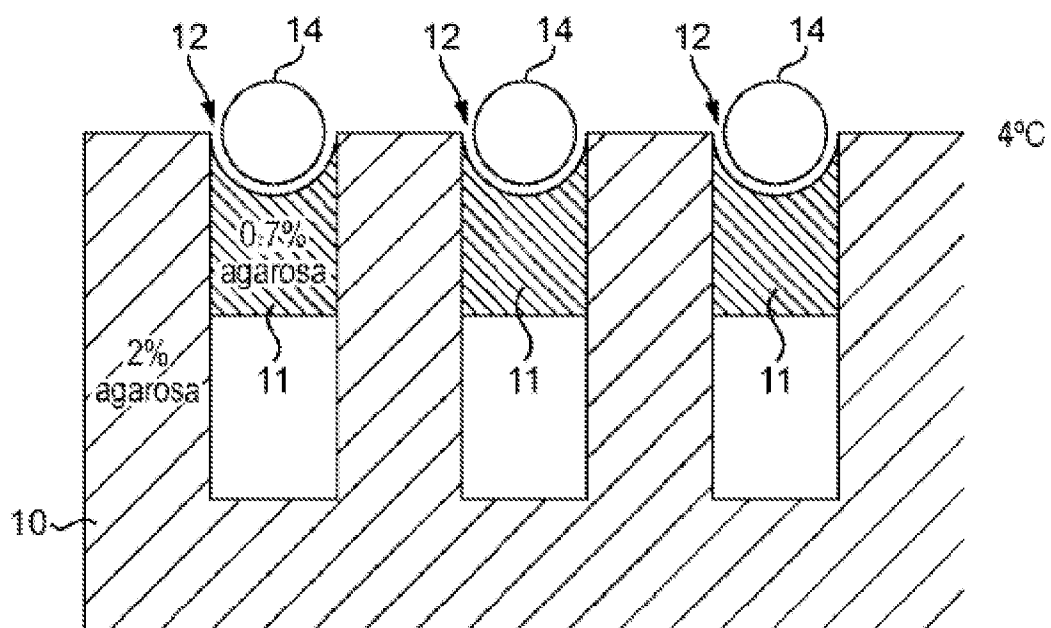


FIG. 1B

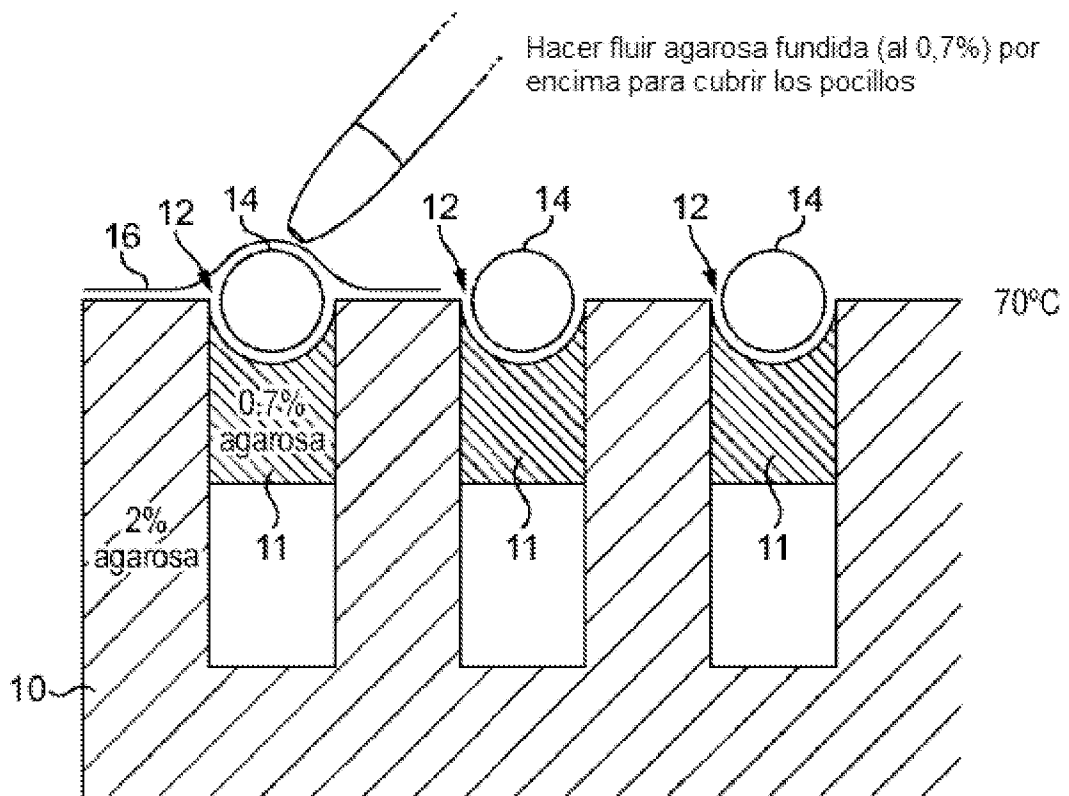


FIG. 1C

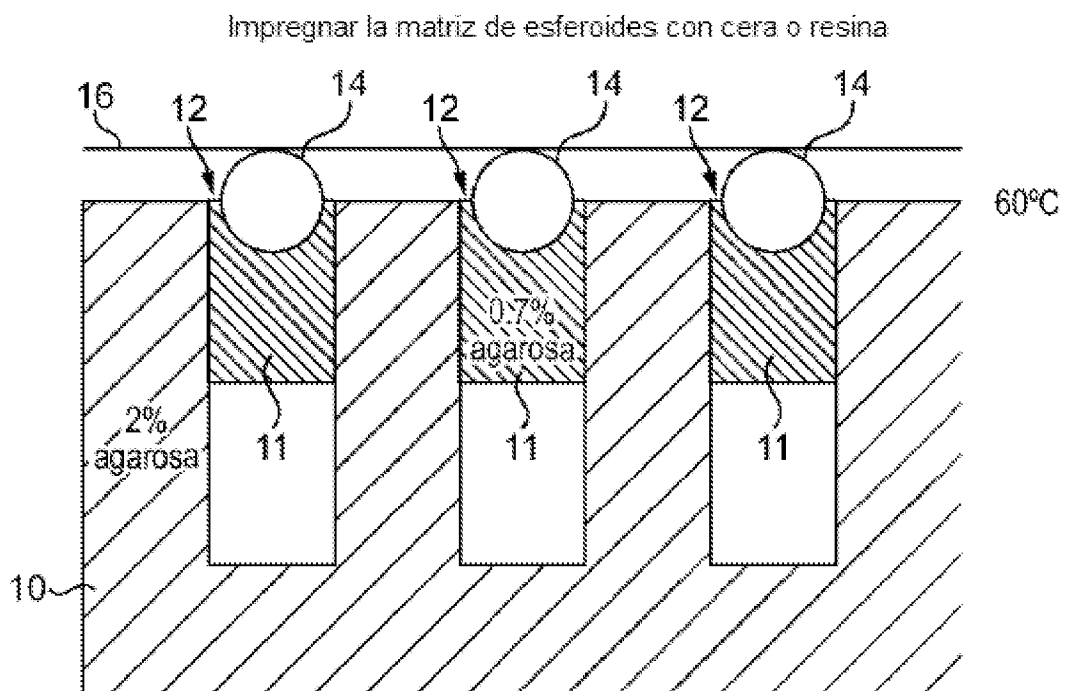
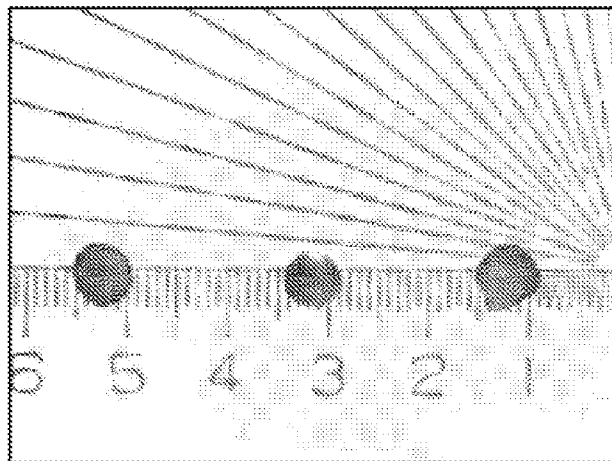


FIG. 1D



Esferoides de células
tumorales diám. $\sim 500\mu\text{M}$
secciones $\sim 100 \times 5\mu\text{M}$

Escala en mm

Matriz de esferoides de tejido que muestra el tamaño de esferoides tumorales

FIG. 2A

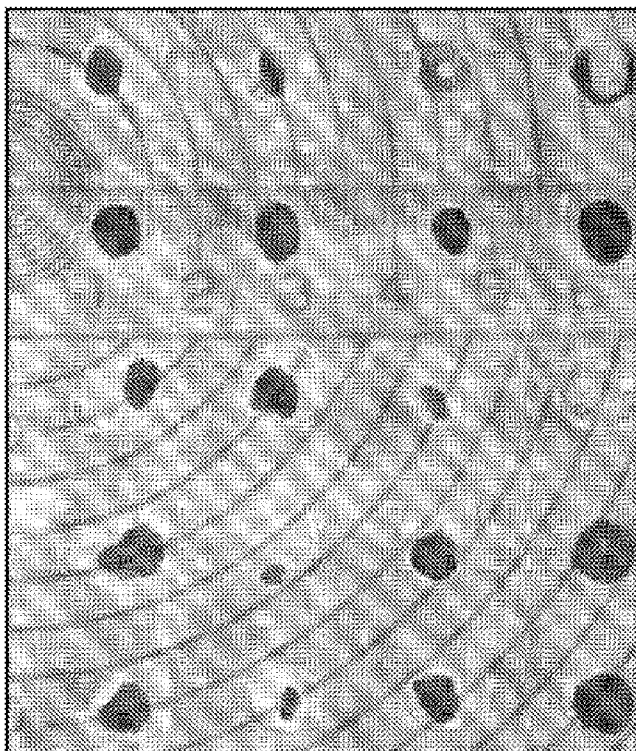


Imagen escaneada de la sección de matriz de esferoides
teñida con hematoxilina y eosina

FIG. 2B

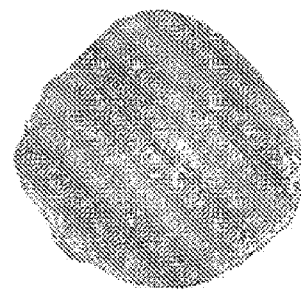
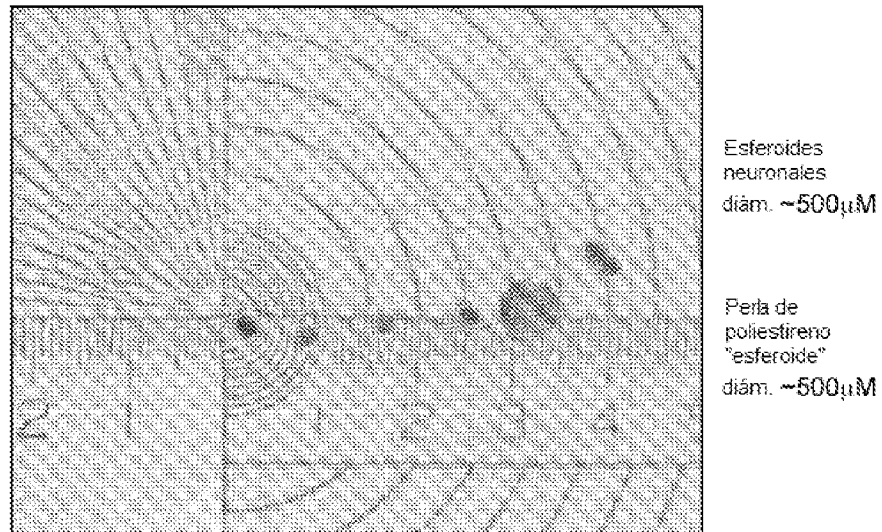


Imagen de alta resolución aumentada
de un único esferoide en la matriz

FIG. 2C



Matriz de esferoides neuronales que muestra el tamaño de los esferoides neuronales

FIG. 3A

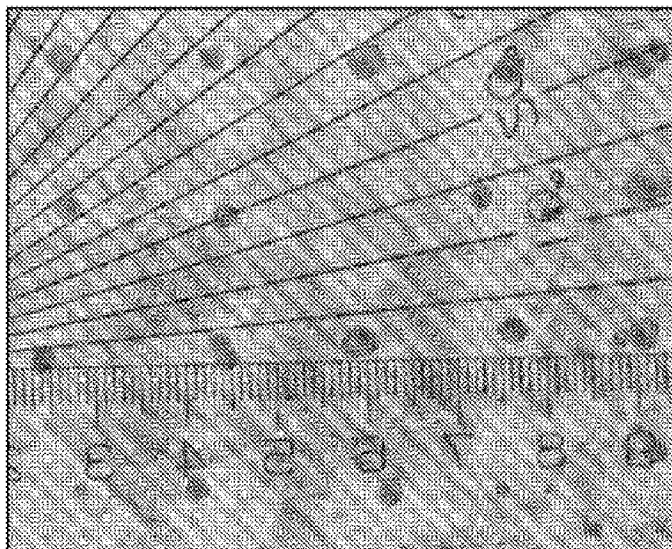
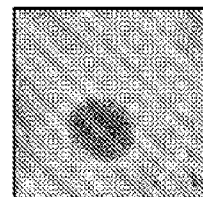
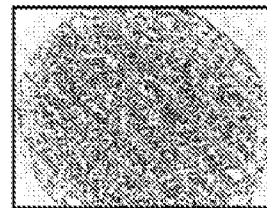


Imagen escaneada de la sección de matriz de esferoides
teñida con hematoxilina y eosina

FIG. 3B



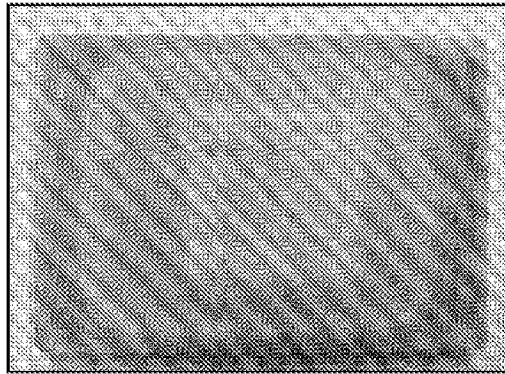
X10



X40

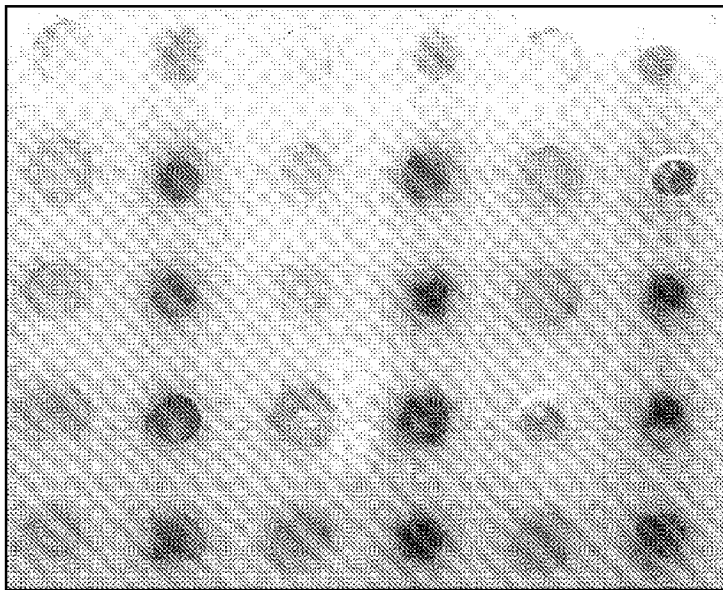
Imagen de alta resolución
aumentada de un único
esferoide en la matriz

FIG. 3C



Incorporación de perlas de poliestireno
en bloque que muestra bloque

FIG. 4A



Sección de las perlas de poliestireno

FIG. 4B

Características:
- Disposición plana de
esferoides en un bloque.
- Rejilla geométrica
adecuada para análisis
automatizado de imágenes.
- Retiene el formato/organización
de 96 pocillos

Esferoide hepático

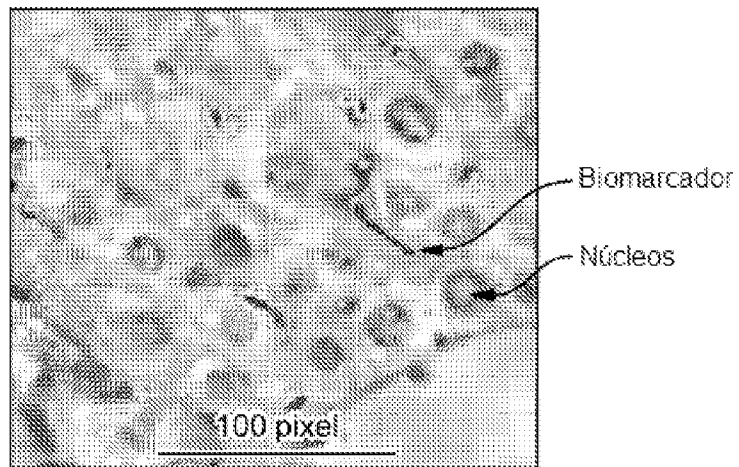


FIG. 5A

Esferoide tumoral

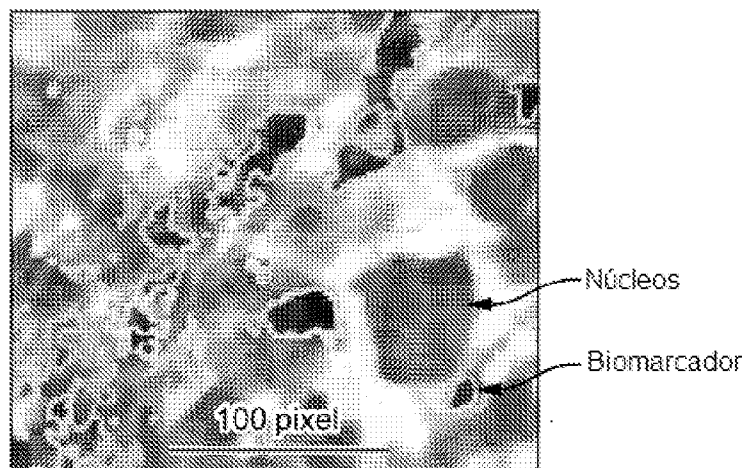


FIG. 5B

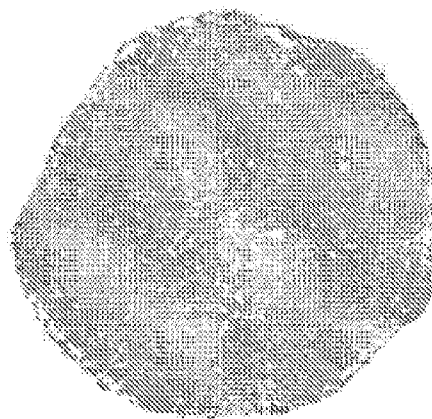


FIG. 5C

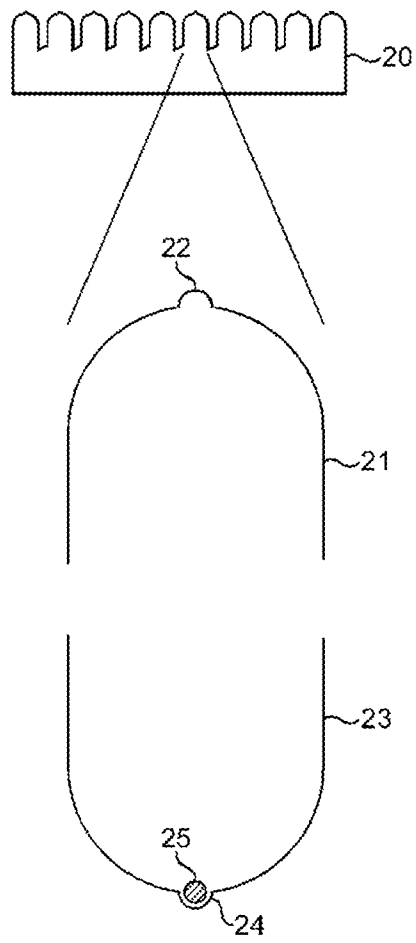


FIG. 6