

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 874**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2017 PCT/FR2017/053225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018 WO18096277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2017 E 17816914 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3545080**

54 Título: **Microcompartimento celular y métodos de preparación**

30 Prioridad:

23.11.2016 FR 1661377

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (33.33%)
35 Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.33%) y
INSTITUT D'OPTIQUE THÉORIQUE ET
APPLIQUÉE (33.34%)**

72 Inventor/es:

**FEYEU, MAXIME;
ALESSANDRI, KEVIN;
NASSOY, PIERRE;
COGNET, LAURENT;
RECHER, GAËLLE y
BEZARD, ERWAN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 013 874 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

Microcompartimento celular y métodos de preparación

5 La invención se refiere a un microcompartimento celular para preservar el estado pluripotente de las células humanas. La invención también se refiere a un método de preparación para obtener tales compartimentos de cultivo celular tridimensionales (3D).

10 Las células pluripotentes se consideran un recurso celular humano importante y su cultivo es de creciente interés, particularmente en los campos médico y farmacéutico. Por lo tanto, la obtención de células pluripotentes en grandes cantidades permitiría responder a las nuevas necesidades expresadas por la industria farmacéutica, que tiende a reducir el uso de modelos animales y a utilizar modelos celulares más relevantes que las numerosas líneas celulares actualmente en uso. Las pruebas de alto rendimiento desarrolladas por empresas farmacéuticas ya utilizan grandes cantidades de células pluripotentes humanas. Similarmente, la ingeniería de tejidos y la terapia celular en humanos dependen de la disponibilidad de cantidades industriales de células pluripotentes humanas.

15 En la actualidad, las células pluripotentes humanas se cultivan principalmente en un entorno bidimensional (2D), tales como placas de Petri, muy alejado del entorno 3D en el que normalmente viven las células. La manipulación de estas células cultivadas en 2D es frecuentemente complicada y requiere pasos de purificación, liberación enzimática, etc. Además, estas células son difíciles de conservar y tienen una tasa de supervivencia muy baja cuando se congelan. La posibilidad de enviar cultivos de células pluripotentes congeladas en cantidades masivas, compatibles con cultivos líquidos, mediante transporte convencional representa un gran desafío tanto para los laboratorios de investigación como para la industria farmacéutica.

20 En respuesta a esta situación, se han desarrollado sistemas de cultivo tridimensionales para aumentar el rendimiento, la eficiencia y la calidad de los sistemas de cultivo de células madre pluripotentes humanas.

25 Sin embargo, los sistemas de cultivo en 3D existentes no son del todo satisfactorios. Frecuentemente se observan fenómenos de fusión incontrolados que dan lugar a agregados celulares cuyo tamaño (>200 µm de diámetro) impide una difusión adecuada dentro del medio de cultivo. En tales sistemas de cultivo 3D, la diferenciación celular es difícil de controlar y/o la tasa de muerte celular es muy alta. Generalmente, la falta de homogeneidad de los productos resultantes del cultivo celular en 3D, así como el costo de tales técnicas, hacen que esta tecnología no sea competitiva frente al cultivo en 2D, que sin embargo resulta insatisfactorio.

30 Por ejemplo, Ashida y col. "Propagation of Human iPS cells in alginate-based microcapsules prepared using reactions catalyzed by horseradish peroxidase and catalase" Artificial cells, Nanomedicine and Biotechnology 2015 Early Online 1-4, describe agregados de células en un hidrogel. Sin embargo, la proliferación celular es muy baja y la pluripotencia no está asegurada en la solución propuesta en ese artículo.

35 Por lo tanto, existe la necesidad de un sistema de cultivo celular en 3D que pueda proporcionar grandes cantidades de células pluripotentes con fenotipos controlados, que puedan utilizarse fácilmente tanto para investigación básica como para aplicaciones industriales.

Resumen de la invención

40 Al trabajar en el desarrollo de microcompartimentos celulares para el cultivo celular en 3D, los inventores desarrollaron un sistema que permite el cultivo masivo de células pluripotentes humanas en suspensión líquida, manteniendo su fenotipo. Los microcompartimentos que se desarrollan permiten que las células crezcan en un medio líquido, utilizando los medios utilizados tradicionalmente en el cultivo en 2D, mientras protegen las células y controlan su fenotipo para evitar la diferenciación espontánea y mantener la pluripotencia. Más precisamente, los microcompartimentos o cápsulas desarrollados por los inventores comprenden sucesivamente, organizados de manera sustancialmente homocéntrica, una cubierta de hidrogel, una capa de matriz extracelular, y una o más capas de células pluripotentes humanas que rodean una luz central. A diferencia de los sistemas de cultivo existentes, la cubierta de hidrogel de las cápsulas según la invención protege las células de tensiones mecánicas provocadas por colisiones o fusiones durante el cultivo en suspensión líquida. Particularmente de forma ventajosa es la estructura de "quiste" de los microcompartimentos según la invención, que permite congelarlos con una alta tasa de supervivencia celular. Las células también pueden diferenciarse antes de su uso, directamente dentro del microcompartimento, o utilizarse en el paso pluripotente, tanto en cultivos en 3D como en 2D. Los inventores también han desarrollado métodos para preparar tales microcompartimentos celulares, asegurando que se obtenga y mantenga la forma del quiste, lo que favorece tanto la congelación como el control del fenotipo de las células que contienen.

45 El objeto de la invención es, por lo tanto, un microcompartimento celular que comprende sucesivamente, organizado alrededor de una luz:

- 50 - al menos una capa de células pluripotentes humanas;
- 55 - una capa de matriz extracelular;

- una capa exterior de hidrogel,
estando cerrado dicho microcompartimento.

Ventajosamente, el medio de cultivo llena los espacios que quedan entre las capas.

Otro objeto de la invención es un método para preparar un microcompartimento celular según la invención, que comprende los pasos de

(a) incubar células madre pluripotentes humanas en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

(b) mezclar las células madre pluripotentes del paso (a) con una matriz extracelular;

(c) encapsular la mezcla del paso (b) en una capa de hidrogel;

(d) cultivar las cápsulas obtenidas en el paso (c) en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

(e) enjuagar las cápsulas del paso (d) para eliminar el inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

(f) cultivar las cápsulas del paso (e) durante 3 a 20 días, preferencialmente durante 5 a 10 días, en un medio de cultivo sin ningún inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK, y opcionalmente recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.

Un objeto adicional de la invención es un método para preparar un microcompartimento celular según la invención, que comprende los pasos de

a) mezclar células humanas diferenciadas con una matriz extracelular y agentes de reprogramación celular;

(b) encapsular la mezcla del paso (a) en una capa de hidrogel;

(c) cultivar las cápsulas del paso (b) durante 10 a 40 días y, opcionalmente, recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Foto (A) y representación esquemática (B) de un microcompartimento celular que forma un quiste según la invención (1: capa de hidrogel; 2: capa de matriz extracelular; 3: capas de células pluripotentes; 4: lumen).

Descripción detallada

El objeto de la invención es un microcompartimento celular en 3D que comprende células pluripotentes humanas, en el que se preserva el estado pluripotente de las células.

Microcompartimento celular

El microcompartimento celular según la invención forma un quiste, cuyo centro hueco, o lumen, es preferiblemente acuoso. En el contexto de la invención, un “quiste” es una estructura hueca cerrada que contiene capas que son sustancialmente homocéntricas, lo que significa que están organizadas sucesivamente alrededor de un mismo punto, envolviendo la capa exterior la capa de matriz, que envuelve la capa de células, que rodea el lumen. Generalmente, las células pluripotentes que constituyen el quiste están polarizadas. La polaridad de estas células dentro del quiste puede demostrarse mediante las proteínas TJP-1 o ZO-1, ambas ubicadas en la superficie interna/apical de la capa de células pluripotentes, que linda con el lumen.

El lumen es generado, en el momento de la formación del quiste, por las células que se multiplican y se desarrollan en la capa de matriz extracelular. Ventajosamente, el lumen contiene un líquido, más específicamente un medio de cultivo.

En el contexto de la invención, se entiende por “capa de hidrogel” una estructura tridimensional formada a partir de una matriz de cadenas poliméricas, hinchadas utilizando un líquido, preferencialmente agua. Ventajosamente, el hidrogel utilizado es biocompatible, es decir, no tóxico para las células. Además, la capa de hidrogel debe permitir la difusión de oxígeno y nutrientes para abastecer las células contenidas en el microcompartimento y permitirles sobrevivir. Por ejemplo, la capa exterior de hidrogel contiene alginato. Preferencialmente, la capa exterior comprende solo alginato. En el contexto de la invención, “alginato” se refiere a polisacáridos lineales formados a partir de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G), sales, y derivados de los mismos.

Ventajosamente, el alginato es un alginato de sodio, compuesto por más del 80 % de G y menos del 20 % de M, con un peso molecular medio de 100 a 400 KDa (por ejemplo: PRONOVA™ SLG100) y una concentración total de entre 0,5 % y 5 % en masa. Según la invención, la capa de hidrogel está desprovista de células. En una realización del microcompartimento celular según la invención, la capa exterior comprende alginato.

La capa de matriz extracelular puede contener algunas células. A medida que se forma el quiste, las células ahuecan su espacio en la matriz y se multiplican, llenando el microcompartimento. Por lo tanto, es posible que el límite entre la capa de matriz extracelular y la capa de células pluripotentes no esté perfectamente definido. Por tanto, en la superficie en contacto con la capa celular, la matriz extracelular puede contener algunas células pluripotentes. Por el contrario, la superficie de la capa de matriz extracelular en contacto con la capa de hidrogel está libre de células.

La capa de matriz extracelular es necesaria para que las células pluripotentes sobrevivan en el microcompartimento y para que se cree el quiste.

Preferiblemente, la capa de matriz extracelular forma un gel en el lado interior de la capa de hidrogel, es decir, el lado que mira hacia el lumen del microcompartimento. La capa de matriz extracelular comprende una mezcla de proteínas extracelulares y compuestos necesarios para el cultivo celular, y más particularmente el cultivo celular pluripotente. Preferiblemente, la matriz extracelular comprende proteínas estructurales, tales como lamininas que contienen subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, o $\alpha 5$, subunidades $\beta 1$ o $\beta 2$ y subunidades $\gamma 1$ o $\gamma 3$, entactina, vitronectina, colágeno, y factores de crecimiento, tales como TGF-beta y/o EGF. En una realización, la capa de matriz extracelular consiste en, o contiene, Matrigel® y/o Geltrex®.

Según la invención, el microcompartimento celular contiene una o más capas de células madre pluripotentes humanas. Una célula madre pluripotente, o célula pluripotente, significa una célula que tiene la capacidad de formar todos los tejidos presentes en todo el organismo de origen, pero sin poder formar un organismo completo como tal.

En una realización particular, las células encapsuladas son células madre pluripotentes, tales como células madre pluripotentes inducidas (IPS, por sus siglas en inglés), células MUSE, por sus siglas en inglés (células diferenciables a multilinaje resistentes al estrés) que se encuentran en la piel y la médula ósea de mamíferos adultos, o células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés) obtenidas sin destruir el embrión del que derivan.

En el contexto de la invención, “células madre pluripotentes inducidas” (iPSC o IPS) se refieren a células madre pluripotentes obtenidas mediante reprogramación genética de células somáticas diferenciadas, y que muestran una morfología y un potencial de autorrenovación y pluripotencia parcialmente similares a los de las células madre embrionarias. Estas células son particularmente positivas para marcadores de pluripotencia, tales como la tinción con fosfatasa alcalina y la expresión de las proteínas NANOG, SOX2, OCT4 y SSEA3/4. Los métodos para obtener células madre pluripotentes inducidas son bien conocidos por el experto en la técnica y se describen en artículos de Yu y col. (Science, 2007, 318 (5858): 1917-1920), Takahashi y col. (Cell, 2007, 131(5): 861-872) y Nakagawa y col. (Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 101-106).

En el caso de las células madre embrionarias obtenidas sin destruir el embrión del que derivan, las células madre pluripotentes se definen como células derivadas de la masa celular interna del blastocisto, y que tienen la capacidad de dar lugar a la formación de todos los tejidos del organismo. La pluripotencia de las células madre embrionarias puede evaluarse mediante la presencia de marcadores tales como los factores de transcripción OCT4 y NANOG y marcadores de superficie tales como SSEA3/4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Las células madre embrionarias se obtienen sin destruir el embrión del que se originan, por ejemplo utilizando la técnica descrita en Chung y col. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 113-117).

En una realización, las células madre pluripotentes humanas utilizadas para los microcompartimentos según la invención se inducen a la pluripotencia a partir de células somáticas.

Ventajosamente, la capa de células contiene al menos 95 % en volumen, preferiblemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de células y matriz producida por dichas células. Las células son esencialmente pluripotentes. “Esencialmente” significa que al menos 90 % de las células contenidas en la capa celular son células pluripotentes, preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % son células pluripotentes.

Ventajosamente, el lumen del quiste contiene medio de cultivo. En particular, se puede utilizar cualquier medio de cultivo que permita cultivar células pluripotentes en suspensión, incluido cualquier medio de cultivo utilizado convencionalmente en cultivo 2D.

El microcompartimento celular está cerrado. Es la capa exterior de hidrogel la que le da al microcompartimento celular su tamaño y forma. El microcompartimento puede tener cualquier forma compatible con la encapsulación celular.

Ventajosamente, se controlan las dimensiones del microcompartimento celular. En una realización, el microcompartimento celular según la invención tiene forma esférica. Preferiblemente, el diámetro de tal un microcompartimento está entre 10 μm y 1 mm, más preferiblemente entre 50 μm y 500 μm , incluso más preferiblemente menos de 500 μm , preferiblemente menos de 400 μm .

5 En otra realización, el microcompartimento celular según la invención tiene una forma alargada. En particular, el microcompartimento puede tener forma ovoide o tubular. Ventajosamente, el diámetro más pequeño de tal un microcompartimento ovoide o tubular está entre 10 μm y 1 mm, más preferiblemente entre 50 μm y 500 μm , incluso más preferiblemente menos de 500 μm , preferiblemente menos de 400 μm . “Dimensión más pequeña” significa el doble de la distancia mínima entre un punto en la superficie exterior de la capa de hidrogel y el centro del microcompartimento.

10 En una realización particular, el espesor de la capa exterior de hidrogel es del 5 al 40 % del radio del microcompartimento. El espesor de la capa de matriz extracelular representa del 5 al 80 % del radio del microcompartimento y está ventajosamente unida a la cara interna de la cubierta de hidrogel. El espesor de la capa de células pluripotentes es aproximadamente del 10 % del radio del microcompartimento. La capa de células pluripotentes está en contacto con la capa de matriz extracelular en al menos un punto, y puede estar presente un espacio lleno con medio de cultivo entre la capa de matriz y el quiste. El lumen representa entonces del 5 al 30 % del radio del microcompartimento. En el contexto de la invención, el “espesor” de una capa es la dimensión de dicha capa que se extiende radialmente desde el centro del microcompartimento.

15 En un ejemplo particular, el microcompartimento celular tiene una forma esférica con un radio de 100 μm . La capa de hidrogel tiene un espesor de entre 5 μm y 40 μm . La capa de matriz extracelular tiene un espesor que varía de 5 μm a aproximadamente 80 μm . La capa de células pluripotentes tiene un espesor de 10 a 30 μm con el lumen que tiene un radio de aproximadamente 5 a 30 μm .

20 Generalmente, la presencia de la capa exterior de hidrogel impone un tamaño máximo a la capa celular y, mediante el confinamiento, limita la proliferación celular descontrolada, que podría conducir a la muerte celular por anoxia y/o diferenciación celular descontrolada en las capas más profundas, es decir, las más cercanas al lumen del quiste. En 2D, en una placa de Petri, las colonias son discos: Las células del corazón del disco tienden a morir (cada nueva célula resultante de una división queda excluida de la colonia por falta de espacio) o a diferenciarse como resultado del estrés de las células circundantes; las células en el borde tienden a diferenciarse y solo una banda a la distancia adecuada tiene el fenotipo óptimo. La topología del microcompartimento aquí presentado, la superficie interna de la esfera formada por la cápsula, permite generar una “colonia” de células madre (la capa de células pluripotentes) “sin bordes” donde todas las células están posicionadas óptima y equivalentemente tanto para la difusión de pequeñas moléculas como en términos de tensiones mecánicas. Ventajosamente, la densidad celular en el microcompartimento está entre 1 y varios miles de células por microcompartimento, preferiblemente entre 50 y 1000 células por microcompartimento de 100 μm de radio.

Métodos para preparar microcompartimentos celulares

35 La invención también cubre métodos para preparar microcompartimentos celulares para obtener el microcompartimento celular según la invención. Más particularmente, la invención propone crear un microcompartimento celular que contenga células madre pluripotentes organizadas en quistes directamente a partir de células madre pluripotentes, o de células diferenciadas que serán reprogramadas en células pluripotentes en el interior de la cápsula de hidrogel durante la formación de los microcompartimentos.

40 Para la implementación del método de preparación según la invención se puede utilizar cualquier método para producir microcompartimentos celulares que contengan matriz extracelular y células madre pluripotentes dentro de una cápsula de hidrogel. En particular, es posible preparar microcompartimentos adaptando el método y el dispositivo microfluido descrito en Alessandri y col., 2016 (“A 3D print microfluidic device for Production of Functionalized Hydrogel Microcapsules for Culture and Differentiation of Human Neuronal Stem Cells (hNSC)”, Lab on a Chip, 2016, vol. 16, n.º 9, págs. 1593–1604), según los pasos que se describen a continuación.

En una primera realización, el método de preparación según la invención comprende los pasos de

50 (a) incubar células madre pluripotentes humanas en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

(b) mezclar las células madre pluripotentes del paso (a) con una matriz extracelular;

55 (c) encapsular la mezcla del paso (b) en una capa de hidrogel;

(d) cultivar las cápsulas obtenidas en el paso (c) en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

60 (e) enjuagar las cápsulas del paso (d) para eliminar el inhibidor de la trayectoria RHO/ROCK;

(f) cultivar las cápsulas del paso (e) durante 3 a 20 días, preferencialmente durante 5 a 10 días, hasta que se obtenga un quiste, y opcionalmente recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.

65 El paso de incubación (a) y el paso de cultivo (d) en un medio que contiene uno o más inhibidores de la trayectoria RHO/ROCK (“proteína quinasa asociada a Rho”), tales como tiazovivina ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{OS}$) y/o Y-27632 ($\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$), promueven la supervivencia de células madre pluripotentes y la adhesión celular a la matriz extracelular durante la

formación de la capa externa de hidrogel alrededor de dicha matriz extracelular. Sin embargo, estos pasos deben tener un límite de tiempo, de modo que los inhibidores de la trayectoria RHO/ROCK no impidan la formación de quistes.

5 Por lo tanto, preferencialmente, la incubación del paso (a) se realiza durante un tiempo comprendido entre unos minutos y unas horas, preferencialmente entre 2 minutos y 2 horas, más preferiblemente entre 10 minutos y 1 hora.

Asimismo, preferencialmente, el paso (d) de cultivo se realiza durante un tiempo de entre 2 y 48 horas, preferencialmente durante un tiempo de entre 6 y 24 horas, más preferencialmente durante un tiempo de entre 12 y 18 horas.

10 El paso (e) es necesario para garantizar que se eliminen todos los rastros de inhibidores de la trayectoria RHO/ROCK. El paso (e) se lleva a cabo mediante enjuague, y preferiblemente una pluralidad de veces, en medios de cultivo sucesivos libres de inhibidores de la trayectoria RHO/ROCK.

15 Ventajosamente, el paso (f) se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para obtener un microcompartimento celular en donde la capa de células pluripotentes y el lumen tienen un espesor acumulativo igual al 10 al 95 % del radio del microcompartimento, es decir, durante un tiempo suficiente para permitir el paso de dos células a alrededor de mil células. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo adecuado para cultivar células madre pluripotentes y, en particular, solución salina tamponada con fosfato tal como el "medio Rowell Park Memorial Institute".

20 En una realización, el método según la invención comprende un paso intermedio (a') que consiste en disociar las células madre pluripotentes del paso (a) antes del paso (b), utilizando preferiblemente un reactivo libre de enzimas. Ventajosamente, dicho reactivo se inhibe o se aclara antes de la etapa de encapsulación, en particular mediante aclarados sucesivos en un medio específico para las células pluripotentes. Por ejemplo, el reactivo utilizado es un tampón isoosmótico que contiene EDTA o EGTA, tal como ReLeSR®. Por supuesto, también es posible utilizar tripsina o un reactivo que contenga una enzima, pero la tasa de supervivencia de las células pluripotentes al final de este paso puede ser menor en comparación con el uso de un reactivo sin enzima. En todos los casos, el paso de enjuague es necesario para eliminar todos los rastros del reactivo utilizado para la disociación celular.

30 En una realización, al menos uno de los pasos (a'), (b), (c), (d) o (e) se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 y 8 °C, preferiblemente todos los pasos (a'), (b), (c), (d) y (e). Mantener una temperatura de aproximadamente 4 °C pone en letargo los procesos biológicos de las células, incluida la transducción de señales del entorno externo. Esto permite limitar el fenómeno de muerte celular, que podría ser inducido por el desprendimiento celular.

35 En otra realización, el método para preparar un microcompartimento celular según la invención comprende los pasos de

(a) mezclar células humanas diferenciadas con matriz extracelular y con agentes de reprogramación celular que no permean la capa de hidrogel;

40 (b) encapsular la mezcla del paso (a) en una capa de hidrogel;

(c) cultivar las cápsulas del paso (b) durante 10 a 40 días y, opcionalmente, recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.

45 En otra realización, el método para preparar un microcompartimento celular según la invención comprende los pasos de

(a) mezclar células humanas diferenciadas con matriz extracelular;

(b) encapsular la mezcla del paso (a) en una capa de hidrogel;

50 (c) incubar las cápsulas del paso (b) con agentes de reprogramación celular que permean la capa de hidrogel y cultivar las cápsulas durante 10 a 40 días, recuperando opcionalmente los microcompartimentos celulares resultantes.

Por ejemplo, las células diferenciadas utilizadas son fibroblastos.

55 Un experto en la técnica sabe cómo reprogramar una célula diferenciada en una célula madre reactivando la expresión de genes asociados al estadio embrionario mediante factores específicos, denominados en la presente invención como "agentes de reprogramación". Como ejemplos se pueden citar los métodos descritos a continuación: Takahashi y col., 2006 ("Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors" Cell, 2006 vol 126, págs. 663-676), Ban y col., 2009 ("Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome" Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009; 85(8):348-62) y la solicitud internacional WO2010/105311, cuyo título es "Production of reprogrammed pluripotent cells".

65 Ventajosamente, los agentes de reprogramación están coencapsulados con las células diferenciadas, para concentrar el producto y favorecer el contacto con todas las células. En el caso de agentes de reprogramación que permean la capa de hidrogel, es posible agregar dichos agentes al medio de cultivo después de la etapa de encapsulación.

Los agentes de reprogramación permiten imponer una sucesión de cambios fenotípicos en las células hasta la etapa pluripotente. Ventajosamente, el paso (a) de reprogramación se realiza utilizando medios de cultivo específicos, favoreciendo estos cambios fenotípicos. Por ejemplo, las células se cultivan en un primer medio que comprende 10 % de suero humano o bovino, en un medio esencial mínimo de Eagle (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con un inhibidor del receptor de proteína quinasa de serina/treonina (tal como el producto SB-431542 (C₂₂H₁₆N₄O₃)), uno o más inhibidores de la trayectoria RHO/ROCK (proteína quinasa asociada a RHO), tales como taizovivina y/o Y-27632, factores de crecimiento de fibroblastos, tales como FGF-2, ácido ascórbico y antibióticos, tales como tricostatina A (C₁₇H₂₂N₂O₃). Después, el medio de cultivo se reemplaza por un medio que promueve la multiplicación de las células pluripotentes, tal como el medio mTeSR®1.

Ventajosamente, las cápsulas resultantes del paso (b) contienen cada una de ellas entre 1 y 500 células diferenciadas, preferiblemente entre 50 y 200.

En una realización, al menos uno de los pasos (a), (b), (c) o (d) se lleva a cabo a una temperatura de entre 0 y 4 °C, preferiblemente todos los pasos (a), (b), (c) y (d). Mantener una temperatura inferior o igual a 4 °C pone en letargo los procesos biológicos de las células, incluida la transducción de señales del entorno externo. Esto permite limitar el fenómeno de muerte celular, que podría ser inducido por el desprendimiento celular.

Los microcompartimentos obtenidos en el paso (d) se pueden clasificar para aislar microcompartimentos celulares con la forma de quiste deseada. Tal una etapa de clasificación puede realizarse de forma continua, de modo que se separen los microcompartimentos celulares que ya presentan la forma de quiste deseada, de los microcompartimentos que aún están en proceso de formación. Tal un paso de clasificación puede llevarse a cabo mediante un simple análisis morfológico, sin alterar otros microcompartimentos en los que la reprogramación todavía está en curso y/o la organización del quiste aún no está completa.

Generalmente, los microcompartimentos celulares obtenidos según los métodos de la invención pueden congelarse antes de cualquier utilización. De hecho, la forma del quiste favorece la supervivencia celular dentro del microcompartimento y, tras la descongelación, la tasa de supervivencia supera el 80 %. Ventajosamente, la congelación se realiza con nitrógeno líquido, lo que permite una vitrificación rápida de los microcompartimentos y limita el riesgo de formación de cristales en el interior de las membranas lipídicas de las células. Los microcompartimentos celulares se pueden suspender en un tampón de congelación para promover la supervivencia celular. Es posible, por ejemplo, utilizar tampones de congelación que se utilizan convencionalmente para congelar embriones.

A continuación, los microcompartimentos celulares congelados se pueden descongelar según sea necesario.

Solicitudes

Los microcompartimentos celulares que constituyen el objeto de la presente invención se pueden utilizar para un amplio rango de aplicaciones. De hecho, las células que contienen se pueden recuperar fácilmente mediante simple hidrólisis y/o disolución de la capa exterior de hidrogel. Además, las células pluripotentes se pueden diferenciar dentro de la cápsula de hidrogel o después de la hidrólisis/disolución de dicha cápsula de hidrogel, según sea necesario, para obtener grandes cantidades de líneas celulares de interés. Ventajosamente, las células se diferencian en uno o más tipos de células de interés dentro del microcompartimento, es decir, antes de la hidrólisis de la capa exterior de hidrogel.

Los microcompartimentos celulares, y más precisamente las células que contienen, pueden utilizarse con fines de investigación y desarrollo, tanto en la forma de red celular 3D como, de manera más convencional, en cultivo 2D. También se pueden utilizar con fines terapéuticos, tales como terapia celular e ingeniería de tejidos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo de obtención de microcompartimentos celulares a partir de células humanas inducidas a pluripotencia.

Soluciones utilizadas:

Solución 1, basada en medio DMEMF12 suplementada con tiazovivina 2 µm

Solución 2, PBS sin magnesio ni calcio suplementada con tiazovivina 1 µm y 2 µm

Solución 3, tampón de desprendimiento celular no enzimático: RelesR™ suplementado con tiazovivina 2 µm.

Solución 4, medio de cultivo de células madre pluripotentes: MTeSR1™ medio celular hES/hIPS STEMCELL™).

Solución 4+, Solución 4 suplementada con tiazovivina 2 µm.

Solución 5 Matrigel™.

Solución 6, sorbitol 300 mm con tiazovivina 2 µm.

Solución celular:

5 Una placa de Petri de células IPS humanas (obtenidas de fibroblasto dérmico primario; Después se utiliza el kit de reprogramación Sendai normal, humano, adulto ATCC® PCS-201-012™ y CytoTune™-iPS 2.0 (ref A16517) que utiliza la tecnología presentada en el ejemplo 2) de 25 cm² con una confluencia del 90 % para igualar los volúmenes recomendados. Todos los pasos posteriores se llevan a cabo a 4 °C hasta que la cubierta de hidrogel se entrecruza en el baño de calcio.

10 Paso 1: Enjuague las células con la solución 1. Espere 10 minutos a 1 hora.

Paso 2: Enjuague dos veces con 4 ml de solución 2.

Paso 3: Succione suavemente la solución.

15

Paso 4: Incube las células con 4 ml de solución 3 durante 5-10 minutos.

Paso 5: Separe las células con 2 ml de solución 4+ utilizando una pipeta de cono ancho para reducir el esfuerzo cortante.

20 Paso 6: Centrifugue la suspensión celular a 360 g durante 5 minutos.

Paso 7: Succione el sobrenadante.

Paso 8: Resuspenda con 0,5 ml de solución 4+.

25

Paso 9: Centrifugue nuevamente a 360 g y succione el sobrenadante.

Paso 10: Resuspenda el sedimento celular en 70 µl de solución 5 y 100 µl de solución 6 (el volumen del sedimento debe ser 30 µl). La solución celular está lista.

30

Encapsulación:

35 El dispositivo de encapsulación se prepara como se describe en Alessandri y col., 2016 ("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, 2016, vol. 16, n.º 9, págs. 1593-1604).

40 En resumen, se esterilizan las distintas partes del dispositivo (en autoclave); las tres soluciones requeridas se cargan en tres bombas de jeringa: i) solución de alginato (PRONOVA®SLG100 al 2 % en peso en agua destilada), ii) solución intermedia (sorbitol a 300 mm), iii) solución celular (preparada en el paso anterior). Las tres soluciones se coinyectan concéntricamente utilizando un inyector de microfluidos para formar un chorro que se divide en gotas con la solución de alginato como la capa exterior y la solución celular como el núcleo. Estas gotas se recolectan en un baño de calcio (a 100 mm), que endurece la solución de alginato para formar la cáscara.

45 Para mejorar la monodispersidad de los microcompartimentos celulares, el alginato se carga con una corriente continua de +2 KV. Se dispone un anillo en el suelo, de 2 cm de diámetro, a 500 µm de la punta en el plano perpendicular al eje del chorro que sale del inyector de microfluidos para generar el campo eléctrico.

Tenga en cuenta que bajo estas condiciones de encapsulación, la capa de Matrigel® se forma espontáneamente.

50 Tratamiento después de la encapsulación:

Paso 1: Las cápsulas se recuperan utilizando un tamiz de células de 40 µm, después se enjuagan con la solución 1 y se almacenan en un matraz de 75 cm² con 20 ml de la solución 4+.

55 Paso 2: El matraz se mantiene durante 12 h en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂.

Paso 3: Cambie el medio a la solución 4 para permitir que se formen quistes.

60 Paso 4: Después de 24 a 72 horas, se forman quistes de unas pocas docenas de células en las cápsulas. Los microcompartimentos celulares maduran después de 5 a 10 días.

Ejemplo 2: Protocolo de obtención de microcompartimentos celulares a partir de fibroblastos humanos.

Soluciones utilizadas:

65

Solución 1, base media DMEMF12

ES 3 013 874 T3

Solución 2, PBS sin magnesio y sin calcio suplementado

Solución 3, tampón de desprendimiento de células tripsina EDTA

Solución 4, medio de cultivo de fibroblastos: 10 % de suero humano en base media DMEM

Solución 4+, Solución 4 suplementada con tiazovivina 2 μm .

Solución 5 Matrigel™.

Solución 6, sorbitol 300 mm con tiazovivina 2 μm .

Solución celular:

Una placa de Petri de 25 cm² de fibroblasto dérmico primario; Después, se utiliza normal, humano, adulto (ATCC® PCS-201-012®) con baja densidad de confluencia para igualar los volúmenes recomendados (1 a 2 millones de células). Todos los pasos posteriores se llevan a cabo a 4 °C hasta que la cubierta se entrecruza en el baño de calcio.

Paso 1: Enjuague las células con la solución 2.

Paso 2: Succione suavemente la solución.

Paso 3: Incube las células con 4 ml de solución 3 durante 5-10 minutos.

Paso 4: Separe las células con 2 ml de solución 4+ utilizando una pipeta de cono ancho para reducir el esfuerzo cortante.

Paso 6: Centrifugue la suspensión celular a 360 g durante 5 minutos.

Paso 7: Succione el sobrenadante.

Paso 8: Resuspenda con 0,5 ml de solución 4+.

Paso 9: Centrifugue nuevamente a 360 g y succione el sobrenadante.

Paso 10: Resuspenda el sedimento celular en 90 μl de solución 5 y 100 μl de solución 6 (el volumen del sedimento debe ser 10 μl).

Paso 11: Añada 1/10 del contenido del “kit de reprogramación Sendai CytoTune® -IPS 2.0” (que contiene un virus de reprogramación) destinado a una placa de 6 pocillos. La solución celular está lista.

Encapsulación:

La encapsulación se lleva a cabo según el protocolo del Ejemplo 1.

Tratamiento después de la encapsulación:

Paso 1: Las cápsulas se recuperan utilizando un tamiz de células de 40 μm , después se enjuagan con la solución 1 y se almacenan en un matraz de 75 cm² con 20 ml de la solución 4+.

Paso 2: El matraz se mantiene durante 24 h en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂.

Paso 3: Cambie el medio todos los días. Cada cápsula contiene de 1 a 10 fibroblastos cuando se forman las cápsulas. El virus reprogramador tiene una eficiencia de transformación de aproximadamente 0,2 %. Por lo tanto, la mayoría de las cápsulas contendrán pocas o ninguna célula reprogramada. Los quistes comienzan a formarse después de 15 a 40 días. Los fibroblastos son alargados y no forman quistes. Todos los quistes que se forman están formados por IPS.

REIVINDICACIONES

1. Un microcompartimento celular que comprende sucesivamente, organizado alrededor de una luz:
- 5 -al menos una capa de células pluripotentes humanas;
 -una capa de matriz extracelular;
 -una capa exterior de hidrogel,
- 10 en donde dicho microcompartimento está cerrado.
2. El microcompartimento celular según la reivindicación 1, en donde la capa exterior comprende alginato.
3. El microcompartimento celular según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho microcompartimento tiene una forma esférica o alargada.
- 15 4. El microcompartimento celular según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho microcompartimento tiene un diámetro o una dimensión menor de entre 10 μm y 1 mm, preferiblemente entre 50 μm y 500 μm , más preferiblemente menos de 500 μm , incluso más más preferiblemente menos de 400 μm .
- 20 5. El microcompartimento celular según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la densidad celular se sitúa entre uno y varios miles de células, preferiblemente 50 a 1000 células por microcompartimento.
6. Un método para preparar un microcompartimento celular según una de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende los siguientes pasos:
- 25 (a)incubar células madre pluripotentes humanas en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la ruta RHO/ROCK;
 (b)mezclar las células madre pluripotentes del paso (a) con una matriz extracelular;
 (c)encapsular la mezcla del paso (b) en una capa de hidrogel;
30 (d)cultivar las cápsulas obtenidas en el paso (c) en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de la ruta RHO/ROCK;
 (e)enjuagar las cápsulas del paso (d) para eliminar el inhibidor de la ruta RHO/ROCK;
 (f)cultivar las cápsulas del paso (e) durante 3 a 20 días, preferiblemente durante 5 a 10 días, y opcionalmente recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.
- 35 7. El método para preparar un microcompartimento según la reivindicación 6, que comprende un paso intermedio que consiste en
(a')disociar las células madre pluripotentes del paso (a) antes del paso (b), preferiblemente mediante un reactivo libre de enzimas.
- 40 8. El método para preparar un microcompartimento celular según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende los pasos de
- 45 (a)mezclar células humanas diferenciadas con una matriz extracelular y agentes de reprogramación celular;
 (b)encapsular la mezcla del paso (a) en una capa de hidrogel;
 (c)cultivar las cápsulas del paso (b) durante 10 a 40 días y, opcionalmente, recuperar los microcompartimentos celulares obtenidos.
- 50 9. El método para preparar un microcompartimento celular según la reivindicación 8, en donde cada cápsula del paso (b) contiene entre 1 y 500 células diferenciadas.
10. El método para preparar un microcompartimento celular según una de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende un paso posterior que consiste en congelar los microcompartimentos celulares obtenidos en el paso (f) según la reivindicación 6 o en el paso (c) según la reivindicación 8.
- 55

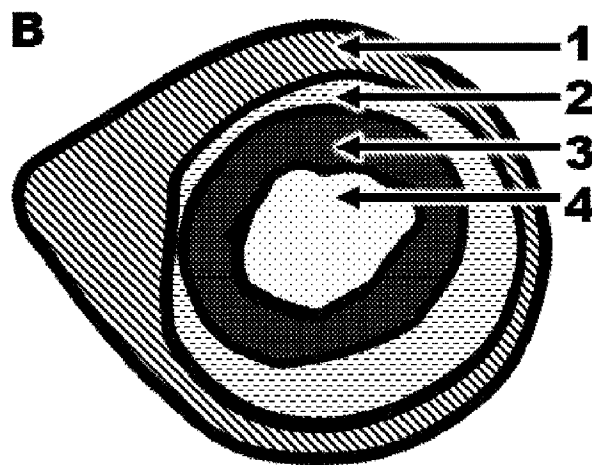
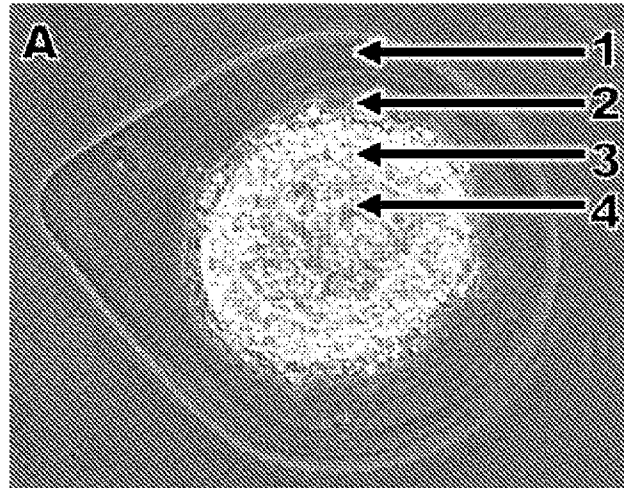


Figura 1