

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 049**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2018 PCT/EP2018/086483**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19122291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2018 E 18826368 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2022 EP 3728561**

54 Título: **Chips de múltiples órganos novedosos que establecen la diferenciación de células derivadas de iPSC en equivalentes de órganos**

30 Prioridad:

22.12.2017 EP 17210375

22.12.2017 US 201762609664 P

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

17.08.2022

73 Titular/es:

TISSUSE GMBH (100.0%)

Oudenarder Str. 16

13347 Berlin, DE

72 Inventor/es:

MARX, UWE y

RAMME, ANJA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 921 049 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

Chips de múltiples órganos novedosos que establecen la diferenciación de células derivadas de iPSC en equivalentes de órganos

CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere a chips de múltiples órganos novedosos que establecen la diferenciación de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en equivalentes de órganos sobre dispositivos microfluídicos y métodos correspondientes de generación de equivalentes de órganos. La presente divulgación se refiere también a constructos tisulares de bioingeniería novedosos que imitan las barreras de órganos generadas con células endoteliales derivadas de iPSC y/u organoides bioimpresos en, y/o sembrados sobre, un hidrogel. La presente divulgación se refiere además a métodos de bioingeniería de constructos de órganos que comprenden cultivar conjuntamente células precursoras de órganos derivadas de iPSC y fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales. La presente divulgación se refiere específicamente a un dispositivo microfluídico que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se diferencian a partir de una única iPSC donadora reprogramada a partir de un único tipo de célula somática.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

Los dispositivos microfluídicos son capaces de emular la biología humana *in vitro* a la menos escala biológicamente aceptable. A diferencia de los cultivos celulares y tisulares convencionales (estáticos), los sistemas microfisiológicos aplican un flujo fluido dinámico para la nutrición fisiológica de los tejidos como factor para imitar el funcionamiento de los órganos con un uso mínimo de células y tejidos humanos. La tecnología de chips de múltiples órganos es de particular interés para la industria farmacéutica en términos de desarrollo de fármacos y pruebas de toxicidad. Los modelos de múltiples órganos sobre un chip pueden potenciar la comprensión fundamental de procesos biológicos complejos y se considera que proporcionan pruebas más rápidas, precisas, económicas y clínicamente relevantes de fármacos, así como de cosméticos. Por tanto, hay un reconocimiento creciente en la técnica de que las pruebas *in vitro* usando sistemas microfisiológicos implementados sobre dispositivos microfluídicos pueden ser más efectivas y también ser más fiables que las pruebas *in vivo*.

Las células madre tiene la capacidad de dividirse de manera continua y son capaces de diferenciarse en diversas clases de células. En los últimos años han surgido enfoques basados en células madre para la generación de órganos funcionales, en particular para abordar la escasez de órganos para trasplante, y se ha notificado en la técnica el cultivo de células madre sobre dispositivos de órgano sobre un chip. En particular, Giobbe *et al.* (Nat. Methods, 2015, 12(7), 637-640) describen la diferenciación funcional de células madre pluripotentes en cardiomiocitos y hepatocitos sobre un chip, y Zhang *et al.* (Future Sci. OA, 2017, 3(2), FSO197) describen cultivos de células madre mesenquimales y la diferenciación en dispositivos microfluídicos hacia un órgano sobre un chip. Sin embargo, no hay informes sobre el cultivo conjunto de diferentes células precursoras de órganos derivadas de células madre para establecer chips de múltiples órganos con varios modelos que emulen la funcionalidad de órganos, en particular ningún informe sobre el cultivo conjunto de diferentes células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) para generar equivalentes de órganos sobre dispositivos microfluídicos.

Maschmeyer *et al.* (Lab on a Chip, 2015, 15(12), 2688-2699) se refieren a un chip de cuatro órganos para el cultivo conjunto a largo plazo interconectado de equivalentes de intestino, hígado, piel y riñón humanos.

El documento WO 2014/052835 A1 se refiere a un chip que comprende diferentes tipos de células derivadas de tejidos de intestino, hígado, riñón o barrera hematoencefálica (BHE).

Materne *et al.* (Journal of Biotechnology, 2015, 205(24), 36-46) se refieren a un cultivo conjunto de chip de múltiples órganos de neuroesferas y equivalentes de hígado para pruebas de sustancias a largo plazo.

Imura *et al.* (Analytical Chemistry, 2010, 82(24), 9983-9988) se refieren a un microsistema de bioensayo total para sustancias ingeridas y la evaluación de absorción intestinal, metabolismo hepático y bioactividad.

Maschmeyer *et al.* (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015(95), 77-87) se refieren a cultivos conjuntos de hígado-intestino e hígado-piel humanos basados en chip.

Kyttälä *et al.* (Stem Cell Reports, 2016, 6(2), 200-212) se refieren a la comparación de las propensiones transcriptómica, epigenética y de diferenciación de iPSC humanas apareadas genéticamente derivadas de fibroblastos y sangre y describen que las líneas de iPSC derivadas del mismo donante son altamente similar entre sí.

El documento WO 2017/136462 A2 se refiere a una combinación de sistemas de cultivo celular y sistemas fluidicos microfluídicos, en particular a métodos de cultivo de células gastrointestinales derivadas de iPSC sobre chips microfluídicos.

Hay una necesidad en la técnica de dispositivos microfluídicos de múltiples órganos que establezcan la diferenciación de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en equivalentes de órganos y métodos correspondientes de generación de equivalentes de órganos. La presente divulgación aborda esta necesidad en particular proporcionando dispositivos microfluídicos novedosos que comprenden: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en los que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se diferencian a partir de una única iPSC donadora reprogramada a partir de un único tipo de célula somática, y proporcionando métodos novedosos de bioingeniería de constructos de órganos que comprenden cultivar conjuntamente células precursoras de órganos derivadas de iPSC y fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona, entre otros, chips de múltiples órganos novedosos que establecen la diferenciación de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en equivalentes de órganos. En particular, la presente divulgación se refiere a un dispositivo microfluídico novedoso para cultivar conjuntamente diferentes células precursoras de órganos derivadas de iPSC para generar chips de múltiples órganos con varios modelos que emulan la funcionalidad de órganos. La presente divulgación se refiere además a métodos de bioingeniería de constructos de órganos que comprenden cultivar conjuntamente células precursoras de órganos derivadas de iPSC y fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales. La presente divulgación se refiere también a constructos tisulares de bioingeniería novedosos que imitan barreras de órganos generadas con células endoteliales primarias derivadas de iPSC (incluyendo, por ejemplo, HDMEC) y/u organoides en o sobre un hidrogel.

La presente divulgación se refiere además a para implementar un circuito de sangre y un circuito de orina en un chip microfluídico, y establece un sistema microfisiológico que soporta condiciones fisiológicas para mantener microentornos estables en un sistema que imita la interacción y comunicación cruzada de varios modelos que emulan funcionalidad de órganos. Sorprendentemente, se ha encontrado que un chip de cuatro órganos con equivalentes de intestino, de hígado, de cerebro y de riñón humanos miniaturizados, todos ellos diferenciados previamente a partir de iPSC del mismo donante, muestra una diferenciación adicional de diferentes modelos de órganos derivados de iPSC a lo largo de un periodo de cultivo de 14 días en un medio de cultivo privado de factores de crecimiento. Esta diferenciación adicional se atribuye a una comunicación cruzada entre los equivalentes de órganos. Además, puede observarse una maduración avanzada para diferentes tejidos a lo largo del tiempo. Significativamente, se ha mostrado que diferentes modelos de órganos derivados de iPSC son estables durante el cultivo conjunto en el ADME-N (= chip ADME más equivalente neuronal), es decir, mantienen su fenotipo, y muestran una expresión de gen marcador definida y consistente hacia el tejido dirigido a lo largo del tiempo (experimento 7 y Fig. 21). La presente divulgación proporciona dispositivos microfluídicos novedosos que son adecuados para el establecimiento de ensayo para análisis farmacocinético-farmacodinámico en el contexto de perfilado de ADME(T). Específicamente, la presente divulgación establece un cultivo conjunto a largo plazo sistémico exitoso de cuatro modelos de órganos derivados de iPSC autólogos diferentes de un único donante cultivo en un sistema microfisiológico (MPS) conforme a farmacocinética de base fisiológica (PBPK), sin la adición de factores de crecimiento extra.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona:

[1] Un dispositivo microfluídico que comprende: (a) compartimentos de cultivo celular, en los que (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC); (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC, están depositadas por separado; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática; y (b) que comprende además un compartimento de reservorio, que sirve para añadir solución de nutriente al sistema.

[2] Un dispositivo microfluídico que comprende: (a) compartimentos de cultivo celular, en los que (i) organoides de hepatocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC); (ii) organoides intestinales derivados de iPSC; y (iii) organoides tubulares renales derivados de iPSC; están depositados por separado; en el que los organoides derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática; y (b) que comprende además un compartimento de reservorio, que sirve para añadir solución de nutriente al sistema.

[3] El dispositivo microfluídico según uno cualquiera de [1]-[2], en el que el dispositivo microfluídico comprende un primer circuito y un segundo circuito, y en el que los compartimentos de cultivo celular que contienen las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv), o los organoides derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii),

respectivamente, forman parte del primer circuito, y en el que el segundo circuito comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, estando ambos circuitos conectados entre sí a través de la unidad de filtración y la unidad de reabsorción.

[4] El dispositivo microfluídico de [3], en el que la unidad de filtración comprende una barrera de filtración que permite de manera selectiva el paso de moléculas del primer circuito al segundo circuito basándose en el tamaño y la carga de las moléculas.

[5] Uso del dispositivo microfluídico según uno cualquiera de [1]-[4] en pruebas analíticas, diagnóstico, investigación, validación de dianas, estudios de toxicidad, ingeniería de tejidos, fabricación de tejidos, cribado de fármacos y/o análisis farmacocinético-farmacodinámico.

[6] Un método de detección de un analito en un sistema microfisiológico que hace uso del dispositivo microfluídico según uno cualquiera de [1]-[4].

En diversos aspectos de la presente divulgación, que incluyen cualquier dispositivo microfluídico, constructo tisular, método y uso dado a conocer en el presente documento, las células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC se cultivan con un medio/una solución de nutriente que no contiene factores de crecimiento extra para las células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC. Por ejemplo, si el medio contiene suero de adulto humano, no contiene factores de crecimiento extra específicamente para las células precursoras derivadas de iPSC individuales y/u organoides derivados de iPSC, es decir, no contiene, por ejemplo, factores de crecimiento de hepatocito para hepatocitos. Por consiguiente, en diversos aspectos, el medio/la solución de nutriente no contiene factores de crecimiento que sean específicos para ninguna de las células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC dados a conocer en el presente documento. La presente divulgación abarca el uso de células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC en cualquier dispositivo microfluídico, constructo tisular, método y uso dado a conocer en el presente documento, en el que células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC se cultivan conjuntamente a lo largo de un periodo de al menos dos semanas. Un cultivo conjunto de este tipo también abarca el cultivo conjunto de cuatro organoides/equivalentes de órganos diferentes. Los cuatro organoides/equivalentes de órganos diferentes puede ser un organoide/equivalente de hígado, un organoide/equivalente de riñón (o renal), un organoide/equivalente de cerebro y un organoide/equivalente de intestino. En tales cultivos conjuntos, el medio de cultivo/la solución de nutriente preferiblemente no contiene factores de crecimiento para las células precursoras derivadas de iPSC y/u organoides derivados de iPSC.

Cualquier organoide derivado de iPSC descrito en el presente documento puede ensamblarse a partir de/junto con fibroblastos derivados de iPSC y/o células endoteliales derivadas de iPSC, obteniéndose los fibroblastos derivados de iPSC y/o las células endoteliales derivadas de iPSC del mismo único donante de iPSC (obtenido de un único tipo de célula somática) como organoide derivado de iPSC. Más específicamente, el organoide intestinal puede ensamblarse a partir de/junto con fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, es decir, los organoides intestinales pueden cultivarse conjuntamente con fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. Además, el organoide de hígado puede ensamblarse a partir de/junto con hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC. Además, el organoide renal puede ensamblarse a partir de/junto con fibroblastos (derivados de iPSC) y células endoteliales derivadas de iPSC. Igualmente, el organoide de cerebro puede ensamblarse a partir de/junto con fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. Según lo anterior, los fibroblastos derivados de iPSC y/o las células endoteliales derivadas de iPSC pueden obtenerse del mismo único donante de iPSC (obtenido de un único tipo de célula somática) como organoide derivado de iPSC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: muestra una huella de chip ADME-N a modo de ejemplo (parte superior) y una vista isométrica sobre capas independientes (parte inferior). La vista isométrica ejemplifica la situación de una membrana entre los dos circuitos (circuito de sangre y circuito de orina). ADME-N = chip ADME más equivalente neuronal.

Figura 2: muestra el diseño experimental de chips de iPSC y chips de tejido primario. RPTEC = línea de células epiteliales de túbulo proximal renal. iPSC = célula madre pluripotente inducida. **2A**: Diseño de los experimentos 1.1 y 1.2, **2B**: Diseño del experimento 2.

Figura 3: muestra mediciones de la concentración de glucosa y la actividad de LDH. **3A**: mediciones de la concentración de glucosa y la actividad de LDH del experimento 1.1 (chips de iPSC); **3B**: mediciones de la concentración de glucosa y la actividad de LDH del experimento 1.2 (chips de tejido primario). Se hicieron mediciones diariamente en el compartimento apical del equivalente intestinal, en el reservorio de medio "de sangre" (para el circuito de sangre) y en el reservorio de medio "de orina" (para el circuito de orina).

Figura 4: muestra el equivalente tubular renal del chip ADME-N sembrado completamente con RPTEC humanas (experimento 1.1, día 7). **A**: imagen de fondo claro (BF, *bright field*) el día 7 de cultivo. **B**:-

D: tinción inmunohistológica de RPTEC el día 14 (experimento 1.2) **B:** núcleo teñido con DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol); **C:** membranas celulares teñidas con NaK-ATPasa; **D:** citoesqueleto teñido con citoqueratina 8/18. RPTEC = células epiteliales de túbulo proximal renal.

- 5 Figura 5: muestra mediciones de la concentración de aspartato transaminasa (AST) en el circuito “de sangre” en el reservorio de medio 1 y el circuito “de orina” en el reservorio de medio 2.
- 10 Figura 6: muestra el examen inmunohistológico a modo de ejemplo de un equivalente de intestino derivado de iPSC con células endoteliales primarias el día 7 del cultivo de chip ADME-N (experimento 1.1). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** células endoteliales primarias teñidas para CD31; **C:** organoides intestinales derivados de iPSC teñidos para NaK-ATPasa. **D:** núcleo teñido con DAPI; **E:** organoides intestinales derivados de iPSC teñidos para Cyp3A4; **F:** fibroblastos derivados de iPSC teñidos para vimentina.
- 15 Figura 7: muestra el examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalentes de hígado primarios (de InSphero) cultivados durante dos semanas en el chip ADME-N (experimento 1.2). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** albúmina; **C:** Cyp3A4.
- 20 Figura 8: muestra el examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalente de hígado derivado de iPSC cultivado durante tres semanas en el chip ADME-N (experimento 2). Todas las células se derivan del mismo donante. **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** fibroblastos derivados de iPSC teñidos para vimentina; **C:** citoesqueleto de hepatocitos teñido con citoqueratina 8/18, **D:** núcleo teñido con DAPI; **E:** uniones estrechas teñidas con ZO-1; **F:** albúmina.
- 25 Figura 9: muestra el examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalentes neuronales derivados de iPSC cultivados durante dos semanas en el chip ADME-N (experimento 1.2). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** células neuronales teñidas con b-tubulina III; **C:** célula endotelial primaria teñida con vWF (factor de von Willebrand); **D:** imagen de fondo claro de esferoides neuronales que se encuentran sobre hidrogel impreso que incluye células endoteliales primarias.
- 30 Figura 10: muestra la medición de la concentración de LDH en el compartimento apical del equivalente intestinal, en el circuito de sangre en el reservorio de medio 1 y en el circuito de orina en el reservorio de medio 2 (experimento 2). La función de barrera del equivalente de intestino y del equivalente renal se muestra mediante diferentes concentraciones de LDH en los tres compartimentos.
- 35 Figura 11: muestra la elongación de células endoteliales derivadas de iPSC en los canales del chip de múltiples órganos. Alta expresión del marcador endotelial CD31 el día 8 de cultivo de chip.
- 40 Figura 12: muestra una vista esquemática en sección transversal de un chip ADME de la presente divulgación. A = administración, D = distribución, M = metabolismo, E = excreción.
- 45 Figura 13: muestra imágenes de inmunofluorescencia tras la diferenciación de hepatocitos derivados de iPSC y la formación de esferoides 3D con fibroblasto derivado de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC (equivalentes de hígado). *Vimentina*: hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC (tinción de vimentina). CD31: hepatocitos derivados de iPSC con células endoteliales derivadas de iPSC (tinción de CD31). Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. Escala = 100 µm.
- 50 Figura 14: muestra los niveles de transcripción de genes marcadores hepáticos seleccionados en equivalentes de hígado derivados de iPSC (hepatocitos derivados de iPSC). Niveles de transcripción analizados mediante qPCR. Los equivalentes de hígado derivados de iPSC se cultivaron a lo largo de dos días para generar esferoides de hígado 3D que incluyen hepatocitos, fibroblastos y células endoteliales derivados de iPSC. Los datos se normalizaron con respecto a la TBP de mantenimiento.
- 55 Figura 15: muestra la capacidad de metabolización de equivalentes de hígado 3D derivados de iPSC para metabolizar propranolol para dar glucurónido de propranolol, y ácido alfa-naftoxiláctico, en un único cultivo sobre un chip.
- 60 Figura 16: muestra un desarrollo de modelo de inserto intestinal. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. **a):** esquema de la configuración de modelo intestinal; **b) y c):** cultivo conjunto de organoides intestinales derivados de iPSC y fibroblastos derivados de iPSC tras dos semanas de cultivo estático; **d):** capa de células endoteliales derivadas de iPSC visible bajo la membrana de inserto, bajo un borde de plástico de inserto; **e) y f):** cultivo estático de tres semanas adicionales de modelo intestinal con organoides, fibroblastos y células endoteliales derivados de iPSC; **g):** capa de células endoteliales derivadas de iPSC bajo un borde de inserto de plástico tras tres semanas de cultivo estático. Escala: 500 µm.
- 65

Figura 17: muestra una barrera de hidrogel bioimpresa con organoides intestinales derivados de iPSC, fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales primarias.

5 Figura 18: muestra una barrera hematoencefálica derivada de iPSC constituida por neuroesferas y células endoteliales. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC.

Figura 19: muestra una configuración y una línea temporal de la diferenciación de iPSC en organoides de riñón, esferoides de hígado, neuroesferas y organoides intestinales, la transferencia y el cultivo conjunto en chip ADME-N. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. DE: endodermo definitivo; TW: Transwell.

Figura 20: muestra una caracterización por inmunotinción del modelo de hígado, intestinal, renal y neuronal cultivado conjuntamente en el chip ADME-N durante 14 días (véase el experimento 2). Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. **a) - c)**: modelo de hígado: a: albúmina, ZO-1, b: HNF4α, SLC10A1, y c: Ki67, TUNEL; **d) - f)**: modelo intestinal: d: CDX2, Na⁺/K⁺-ATPasa, e: citoqueratina 8/18, vimentina, y f: Ki67, TUNEL; **g) - i)**: modelo renal: g: citoqueratina 8/18, vimentina, h: acuaporina 1, Na⁺/K⁺-ATPasa, e i: Ki67, TUNEL; **j) - l)**: modelo neuronal: j: TUBB3, PAX6, k: nestina, y l: Ki67, TUNEL. Escala = 50 μm. Las líneas de puntos ilustran la membrana de inserto permeable.

Figura 21: muestra resultados de qPCR del cultivo conjunto en el chip ADME-N del modelo intestinal, de hígado, renal y de cerebro derivado de iPSC. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. Los datos se normalizaron con respecto a la EF1 (a, c) o TBP (b, d) de mantenimiento. N = 3 - 6 para el día 0, 7 y 14; N = 1 - 3 para iPSC, y N = 1 para los controles positivos representados. ND: ninguna señal detectada. Se usó ANOVA unidireccional ordinario con prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el análisis estadístico. En cada uno de a) a d): las barras de izquierda a derecha son "iPSC", "día 0", "día 7", "día 14" y el respectivo "control positivo".

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación establece el cultivo conjunto de diferentes células precursoras de órganos derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC y/o tejidos equivalentes de órganos derivados de iPSC en un dispositivo microfluídico. Los dispositivos microfluídicos novedosos de la presente divulgación implementan chips de múltiples órganos con varios equivalentes de órganos que se basan específicamente en la diferenciación de células derivadas de una única iPSC donadora que a su vez se ha reprogramado a partir de un único tipo de células somáticas. Por tanto, las células derivadas de iPSC usadas en la presente divulgación para la diferenciación en un equivalente de órgano incluyen células precursoras de órganos, y más específicamente células precursoras de células adultas específicas de órganos. Tales células derivadas de iPSC incluyen, por ejemplo, células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC.

En diversos aspectos, la presente divulgación abarca el uso de organoides derivados de iPSC, que incluyen, por ejemplo, organoides de hepatocitos derivados de iPSC. En todavía otros aspectos, la presente divulgación abarca específicamente el uso de neuroesferas derivadas de iPSC.

El experimento 2 de la presente divulgación (véase la Figura 2 para la configuración experimental de los experimentos 1.1, 1.2 y 2) ejemplifica el cultivo conjunto de diferentes células derivadas de iPSC u organoides sobre un chip microfluídico. Los tipos de células usados en el ejemplo 2 reflejan los tipos de órganos descritos para el "chip de múltiples órganos de iPSC" reivindicado: hepatocitos (hígado), células intestinales (intestino), células tubulares renales (riñón) y células neuronales (cerebro). Los conjuntos de chips se cultivaron durante 7, 14 y 21 días. En los puntos finales, se tomaron muestras celulares para exámenes inmunohistológicos, qPCR y secuenciación de ARN. Los sobrenadantes se analizaron para su contenido de glucosa, lactato, LDH (lactato deshidrogenasa), albúmina, urea, ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato transaminasa). Controles de cultivos estáticos de los equivalentes de órganos dados se tomaron el día 0, 7 y 14.

La presente divulgación se refiere a un dispositivo microfluídico que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

Como se describe en el presente documento, una célula precursora se deriva de una iPSC, es decir, se ha diferenciado a partir de una iPSC. La iPSC, a su vez, se deriva de una célula somática, es decir, se ha reprogramado a partir de una célula somática. Por ejemplo, una célula precursora de hepatocitos se deriva de una iPSC, es decir, se ha diferenciado a partir de una iPSC, que a su vez se deriva de, por ejemplo, una célula cutánea somática, es decir, se ha reprogramado a partir de una célula cutánea somática.

Como se describe en el presente documento, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y solo una) iPSC donadora, que a su vez se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de un único tipo de célula somática. Por ejemplo, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y solo una) iPSC, que se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de, por ejemplo, una célula cutánea somática, un glóbulo blanco, una célula renal, adipocitos, o similares.

Como se describe en el presente documento, una célula precursora, o más específicamente una célula precursora específica de órgano, que se deriva de una iPSC, a modo de definición, ya no es una iPSC, pero puede mostrar todavía expresión de uno o más marcadores específicos de iPSC, por ejemplo, expresión de uno o más factores de reprogramación como OCT4, KLF4, SOX2 y opcionalmente C-MYC. Específicamente, una célula precursora tal como se describe en el presente documento es una célula precursora de órgano, que se ha diferenciado a partir de una iPSC. Incluso más específicamente, una célula precursora específica de órgano tal como se describe en el presente documento es una célula precursora específica de órgano, que se ha diferenciado a partir de una iPSC. Por tanto, una célula precursora tal como se describe en el presente documento puede considerarse una célula de órgano diferenciada previamente o una célula de órgano inmadura diferenciada previamente. Más específicamente, una célula precursora específica de órgano tal como se describe en el presente documento puede considerarse una célula diferenciada previamente y específica de órgano, o una célula diferenciada previamente inmadura y específica de órgano.

En diversas realizaciones, la célula precursora diferenciada a partir de una iPSC puede considerarse una célula precursora específica de órgano inducida (derivada de iPSC).

Preferiblemente, una célula precursora, o más específicamente una célula precursora específica de órgano, tal como se describe en el presente documento da lugar a una célula de órgano funcional madura. Por ejemplo, una célula precursora de hepatocitos tal como se describe en el presente documento (es decir, una célula precursora de hepatocitos derivada de iPSC) da lugar preferiblemente a un hepatocito funcional maduro, pero también puede dar lugar a otras células hepáticas. Por tanto, una célula precursora, o más específicamente una célula precursora específica de órgano, tal como se describe en el presente documento da lugar a una célula madura que muestra o que conserva funciones específicas de célula de órgano. Por ejemplo, una célula precursora de hepatocitos tal como se describe en el presente documento da lugar preferiblemente a una célula madura que muestra o que conserva funciones específicas de hepatocito. En diversas realizaciones, una célula precursora de hepatocitos tal como se describe en el presente documento da lugar a una célula madura que muestra o que conserva funciones específicas de células hepáticas distintas de hepatocitos.

Por consiguiente, tal como se describe en el presente documento, los hepatocitos maduros obtenidos de células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC son capaces de, entre otros, recapitular fenotipos metabólicos observados en poblaciones humanas, expresar enzimas que metabolizan fármacos a niveles equivalentes a hepatocitos humanos primarios y/o mantener una funcionalidad estable *in vitro*.

En diversas realizaciones, la célula precursora diferenciada a partir de una iPSC puede considerarse una célula que induce células de órganos maduras en vista de que tales células precursoras dan lugar a una célula de órgano funcional madura. Por ejemplo, una célula precursora de hepatocitos derivada de iPSC tal como se describe en el presente documento puede considerarse una célula que induce hepatocitos.

En diversas otras realizaciones, la célula precursora diferenciada a partir de una iPSC puede considerarse una célula que induce organoides en vista de sus capacidades para desarrollarse para dar organoides de tipo adulto. Por ejemplo, una célula precursora de hepatocitos derivada de iPSC tal como se describe en el presente documento puede considerarse una célula que induce organoides de hepatocitos.

En diversas realizaciones, las células precursoras, o más específicamente las células precursoras específicas de órganos, tal como se describe en el presente documento pueden expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células de órganos maduras. Por ejemplo, en diversas realizaciones de la presente divulgación, las células precursoras de hepatocitos pueden expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de hepatocitos maduros. En diversas realizaciones, las células precursoras de hepatocitos pueden expresar marcadores celulares que incluyen CD45 y CD109. En diversas realizaciones, las células precursoras de hepatocitos pueden expresar marcadores celulares que incluyen albúmina, HNF4A, alfa-1-antitripsina (AAT) y alfa-fetoproteína (AFP), preferiblemente albúmina y/o AFP.

Igualmente, en diversas realizaciones, una célula de órgano madura tal como se describe en el presente documento expresa uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células de órganos maduras. Por ejemplo, en diversas realizaciones de la presente divulgación, los hepatocitos expresan una o más proteínas de marcador específicas de hepatocitos. En diversas realizaciones, los marcadores de hepatocitos maduros incluyen albúmina, PXR, antígeno H4, alfa-1-antitripsina (AAT), citoqueratina 7 (CK7), citoqueratina 8 (CK8), factor de transcripción nuclear de hepatocitos (HNF-3), proteína de unión a potenciador CAAT (CEBP)-alfa, proteína de unión a potenciador CAAT (CEBP)-beta, SLC10A1 (cotransportador de sodio/ácido biliar – transportador de ácido biliar hepático), HNF4a

(factor nuclear de hepatocitos 4 alfa), citoqueratina 8/18, CYP2A6, CYP2E1 y CYP3A4 (citocromo P450). Los marcadores de hepatocitos maduros preferidos incluyen albúmina, SLC10A1, HNF4a, citoqueratina 8/18, CYP2A6, CYP2E1 y/o CYP3A4.

El metabolismo de fármacos es una función de hepatocitos central. La diferenciación de hepatocitos terminal puede evaluarse mediante la expresión y actividad de enzimas que metabolizan fármacos en la familia del citocromo P450 (CYP). Por tanto, en diversas realizaciones, los marcadores de hepatocitos maduros incluyen uno cualquiera de CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z2, CYP5A1, CYP7A1, CYP7B1, CYP8A1, CYP8B1, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP20A1, CYP21A1, CYP21A2, CYP24A1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1, CYP39A1, CYP46A1 y/o CYP51A1. En diversas realizaciones, los marcadores de hepatocitos maduros incluyen uno cualquiera de CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, citoqueratina 8/18, CYP2A6 y/o CYP2E1. Los marcadores de hepatocitos maduros preferidos incluyen citoqueratina 8/18, CYP2A6, CYP2E1 y/o CYP3A4.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, una célula precursora intestinal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula intestinal funcional madura. Por tanto, una célula precursora intestinal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula intestinal madura que muestra o que conserva funciones específicas de células intestinales. En diversas realizaciones, una célula precursora intestinal derivada de iPSC tal como se describe en el presente documento puede expresar una o más proteínas de marcador (específicas de células intestinales maduras y/o específicas de células precursoras intestinales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células intestinales maduras y/o específicas de células precursoras intestinales incluyen ABCB1, CDH1, CHGA, DPP4, KL5, LGR5, Lyz, SLC2A1, SLC2A3, SOX9 y/o CXCR4.

En diversas realizaciones, una célula intestinal madura tal como se describe en el presente documento es una célula madura del intestino delgado. En diversas otras realizaciones, las células intestinales maduras tal como se describen en el presente documento comprenden células epiteliales maduras del intestino. Todavía en otras realizaciones, las células intestinales maduras tal como se describen en el presente documento comprenden células epiteliales maduras del intestino delgado.

En diversas realizaciones, una célula intestinal madura tal como se describe en el presente documento puede expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células intestinales maduras. En diversas realizaciones, los marcadores celulares intestinales maduros incluyen CD326, CDX2, citoqueratina 8/18 y/o NaK-ATPasa (células epiteliales).

Como se describe adicionalmente en el presente documento, una célula precursora tubular renal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula tubular renal funcional madura, pero también puede dar lugar a otras células renales. Por tanto, una célula precursora tubular renal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula tubular renal madura que muestra o que conserva funciones específicas de células tubulares renales. En diversas realizaciones, una célula precursora tubular renal tal como se describe en el presente documento da lugar a una célula madura que muestra o que conserva funciones específicas de células renales distintas de células tubulares renales. En diversas realizaciones, una célula precursora tubular renal derivada de iPSC tal como se describe en el presente documento puede expresar una o más proteínas de marcador (específicas de células tubulares renales maduras y/o específicas de células precursoras tubulares renales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células tubulares renales maduras y/o específicas de células precursoras tubulares renales incluyen acuaporina 1, MRP2, citoqueratina 8/18 y/o NaK-ATPasa.

En diversas realizaciones, una célula tubular renal madura tal como se describe en el presente documento es una célula epitelial tubular renal madura. En diversas otras realizaciones, una célula tubular renal madura tal como se describe en el presente documento es una célula tubular renal proximal madura, preferiblemente una célula epitelial tubular renal proximal madura. En realizaciones adicionales de la presente divulgación, las células tubulares renales maduras tal como se describen en el presente documento comprenden células epiteliales maduras tubulares renales, preferiblemente células tubulares renales proximales epiteliales maduras.

En diversas realizaciones, una célula tubular renal madura tal como se describe en el presente documento puede expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células tubulares renales maduras. En diversas realizaciones, los marcadores de células tubulares renales maduras incluyen megalina (células tubulares proximales), acuaporina 1, MRP2, citoqueratina 8/18 y/o NaK-ATPasa.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, una célula precursora neuronal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula neuronal funcional madura, pero también puede dar lugar a otras células del cerebro. Por tanto, una célula precursora neuronal derivada de iPSC da lugar preferiblemente a una célula neuronal madura que muestra o que conserva funciones específicas de células neuronales. En diversas realizaciones, una célula precursora neuronal derivada de iPSC tal como se describe en el presente documento puede expresar una o más proteínas de marcador (específicas de células neuronales maduras y/o específicas de células precursoras

neuronales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células neuronales maduras y/o específicas de células precursoras neuronales incluyen nestina (marcador de células madre neuroectodérmicas), TUBB3 (cadena beta-3 de tubulina, biomarcador temprano de la diferenciación de células neurales) y/o PAX6 (proteína de caja apareada Pax-6, factor de transcripción, gen regulador clave del desarrollo de los ojos y del cerebro). En diversas otras realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células neuronales maduras y/o específicas de células precursoras neuronales pueden incluir GFAP, sinaptofisina, NeuN y/o MAP2.

En diversas realizaciones, una célula neuronal madura tal como se describe en el presente documento puede expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células neuronales maduras. En diversas realizaciones, los marcadores de células neuronales maduras incluyen NSE (gamma-enolasa o enolasa-2; una proteína citosólica expresada por neuronas maduras y células de origen neuronal). En diversas realizaciones, los marcadores de células neuronales maduras incluyen además nestina, TUBB3 y/o PAX6. En diversas otras realizaciones, los marcadores de células neuronales maduras incluyen GFAP, sinaptofisina, NeuN y/o MAP2.

La reprogramación de células somáticas se ha establecido con el trabajo de Yamanaka y Takahashi en 2006. Como se describe en el presente documento, la célula somática usada para generar una iPSC puede ser cualquier tipo de célula somática reprogramable a una iPSC, más cualquier tipo de célula somática primaria. En diversas realizaciones, los fibroblastos son el tipo de célula somática primaria usado para la generación de iPSC, preferiblemente fibroblastos derivados de la piel. En diversas otras realizaciones, los queratinocitos (derivados del cabello) son el tipo de célula somática primaria usado para la generación de iPSC. En diversas realizaciones, los fibroblastos incluyen células cutáneas, glóbulos blancos, células renales, adipocitos, y similares.

Como se describe en el presente documento, las iPSC se caracterizan por la expresión de factores de reprogramación, incluyendo, por ejemplo, los factores de reprogramación principales OCT4, KLF4, SOX2 y opcionalmente C-MYC. En diversas realizaciones (preferidas), los factores de reprogramación identificados para expresarse incluyen SOX2, Nanog, OCT3/4, SSEA5 y/o TRA-1-60.

En la presente divulgación, las iPSC se obtienen de un único tipo de célula somática mediante cualquier método de reprogramación disponible y conocido por el experto habitual en la técnica. Menon *et al.* 2016 (Int. J. Mol. Sci., vol. 17, 141) pueden proporcionar un resumen sobre métodos de reprogramación de iPSC que pueden usarse para reprogramar células somáticas para dar iPSC. Kits y protocolos para reprogramar células somáticas para dar iPSC se notifican en la bibliografía y están disponibles comercialmente.

Como se describe en el presente documento, las iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática están disponibles de un fabricante por contrato. Sin embargo, en diversos aspectos, en aspectos particular que pertenecen a los métodos descritos en el presente documento, la presente divulgación abarca una etapa de reprogramación de una (único tipo de) célula somática para dar una iPSC.

En diversas realizaciones, el término "iPSC obtenida de (un único tipo de) célula somática" significa que la iPSC se reprograma a partir de una célula somática, que a su vez puede haberse obtenido previamente o no mediante diferenciación de una iPSC.

En diversas realizaciones, las iPSC según la presente divulgación se obtienen de células somáticas adultas.

En diversas realizaciones, los términos "células somáticas" y/o "células somáticas adultas" pueden abarcar o no "células madre somáticas" y/o "células madre somáticas adultas" y/o "células madre adultas". Preferiblemente, los términos "células somáticas" o "células somáticas adultas" excluyen "células madre somáticas" y/o "células madre somáticas adultas" y/o "células madre adultas".

En la presente divulgación, las células precursoras de órganos derivadas de iPSC pueden obtenerse de las iPSC mediante diferenciación de iPSC usando medios y métodos para diferenciación de iPSC disponibles y conocidos por el experto habitual en la técnica. Kits y protocolos de diferenciación se notifican en la bibliografía y están disponibles comercialmente. La tabla 1 muestra una lista de células derivadas de iPSC. Los protocolos de diferenciación se adaptaron a partir de los artículos científicos listados.

<i>Tipos de células derivadas de iPSC</i>	<i>Referencias</i>
Hepatocitos	Szkolnicka <i>et al.</i> , 2014
Fibroblasto/MSC	Zou <i>et al.</i> , 2013
Organoides intestinales	Kauffman <i>et al.</i> , 2015
Equivalente renal	Morizane <i>et al.</i> , 2017
Esferoides neuronales	Rigamonti <i>et al.</i> , 2016
Células endoteliales	Lippmann <i>et al.</i> , 2012
BHE	
Células endoteliales	Harding <i>et al.</i> , 2017

Los protocolos de diferenciación descritos en los artículos científicos listados en la tabla 1 pueden aplicarse en los métodos de la presente divulgación.

Como se describe en el presente documento, las células precursoras de órganos derivadas de iPSC están disponibles de un fabricante por contrato. Sin embargo, en diversos aspectos, en aspectos particulares que pertenecen a los métodos descritos en el presente documento, la presente divulgación abarca una etapa de diferenciación de iPSC tal como se describe en el presente documento para dar células precursoras (específicas) de órganos. Como se describe en otra parte en el presente documento, tales células precursoras (específicas) de órganos diferenciadas a partir de iPSC pueden considerarse células (específicas) de órganos diferenciadas previamente o células (específicas) de órganos inmaduras diferenciadas previamente.

Como se describe en el presente documento, el dispositivo microfluídico puede comprender: (i) hepatocitos derivados de iPSC; (ii) células intestinales derivadas de iPSC; (iii) células tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células neuronales derivadas de iPSC; obteniéndose las células derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

Como se describe en el presente documento, el dispositivo microfluídico puede comprender: (i) organoides de hepatocitos derivados de iPSC; (ii) organoides intestinales derivados de iPSC; y (iii) organoides tubulares renales derivados de iPSC; obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

El dispositivo microfluídico puede comprender además (iv) organoides derivados de iPSC de un tipo de órgano o de célula adicional, que son diferentes de los organoides según (i), (ii) y (iii), obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

Los organoides adicionales derivados de iPSC según (iv) pueden ser organoides neuronales derivados de iPSC, obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

De manera similar a la divulgación que pertenece a células precursoras de órganos derivadas de iPSC, un organoide derivado de iPSC significa un organoide que puede obtenerse u obtenido mediante diferenciación de iPSC. Como se describe en otra parte en el presente documento, puede considerarse que un "organoide" significa o representa la unidad de órgano o de tejido funcional más pequeña. Por consiguiente, un organoide que puede obtenerse u obtenido mediante diferenciación de iPSC significa específicamente la diferenciación de una única iPSC donadora (obtenida de un único tipo de célula somática) y usando la célula diferenciada como fuente para el organoide. Más específicamente, dichas células diferenciadas se desarrollan para dar organoides que contienen células con propiedades específicas de órganos. Dicha célula diferenciada puede formar organoides esféricos que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto que contienen células con propiedades (funcionales) específicas de órganos.

Preferiblemente, dichas propiedades específicas de órganos son propiedades funcionales específicas de órganos.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, el dispositivo microfluídico puede comprender: (i) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides de hepatocitos de tipo adulto; (ii) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto intestinales; y (iii) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides tubulares renales de tipo adulto, obteniéndose los organoides esféricos derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática. El dispositivo microfluídico puede comprender además (iv) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto que son diferentes de los organoides de tipo adulto según (i), (ii) y (iii), obteniéndose los organoides esféricos derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

Los organoides esféricos derivados de iPSC adicionales según (iv) pueden ser organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides neuronales de tipo adulto, obteniéndose los organoides esféricos derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

Como se describe en el presente documento, como una célula precursora específica de órgano dada a conocer en el presente documento, una célula diferenciada a partir de una iPSC y usada como fuente para un organoide tal como se describió anteriormente (las células diferenciadas se desarrollan para dar organoides que contienen células con propiedades específicas de órganos), a modo de definición ya no es una iPSC, pero todavía puede mostrar expresión de uno o más marcadores específicos de iPSC, por ejemplo, expresión de uno o más factores de reprogramación como OCT4, KLF4, SOX2 y opcionalmente C-MYC. Los factores de reprogramación identificados para expresarse incluyen SOX2, Nanog, OCT3/4, SSEA5 y/o TRA-1-60. Específicamente, una célula diferenciada de este tipo puede considerarse una célula precursora de organoides (específica de órgano), que se ha diferenciado a partir de una iPSC. Por tanto, una célula diferenciada a partir de una iPSC y usada como fuente para un organoide tal como se describió anteriormente, puede considerarse una célula diferenciada previamente, o una célula inmadura diferenciada previamente, que se desarrollan para dar organoides que contienen células con propiedades específicas de órganos,

o que forman organoides esféricos que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto que contienen células con propiedades (funcionales) específicas de órganos.

La célula diferenciada a partir de una iPSC y usada como fuente para un organoide tal como se describió anteriormente puede considerarse una célula específica de órgano inducida (derivada de iPSC).

La célula diferenciada a partir de una iPSC y usada como fuente para un organoide tal como se describió anteriormente (las células diferenciadas se desarrollan para dar organoides que contienen células con propiedades específicas de órganos) puede considerarse una célula que induce organoides (derivada de iPSC), o célula que induce organoides esféricos, en vista de sus capacidades para desarrollarse para dar organoides de tipo adulto, o para formar organoides esféricos que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto.

Como se describe en el presente documento, un organoide derivado de iPSC según la presente divulgación puede ser capaz de, entre otros, recapitular fenotipos metabólicos observados en poblaciones humanas, expresar enzimas que metabolizan fármacos a niveles equivalentes a hepatocitos humanos primarios y/o mantener una funcionalidad estable *in vitro*.

En diversas realizaciones, las células de organoide (es decir, las células que constituyen un organoide) pueden expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador específicos de células de órganos maduras. Por ejemplo, en diversas realizaciones de la presente divulgación, las células de organoide de hepatocitos (derivadas de iPSC) (es decir, células que constituyen un organoide de hepatocitos) pueden expresar una o más proteínas de marcador específicas de hepatocitos maduras. En diversas realizaciones, las células de organoide de hepatocitos pueden expresar marcadores celulares que incluyen CD45 y CD109. En diversas realizaciones adicionales, las células de organoide de hepatocitos pueden expresar marcadores celulares que incluyen albúmina, HNF4A, alfa-1-antitripsina (AAT) y alfa-fetoproteína (AFP), preferiblemente albúmina y/o AFP.

Todavía en realizaciones adicionales, las células de organoide de hepatocitos pueden expresar marcadores celulares que incluyen albúmina, PXR, antígeno H4, AAT, CK7, CK8, HNF-3, CEBP-alfa, CEBP-beta, SLC10A1, HNF4a, citoqueratina 8/18, CYP2A6, CYP2E1 y/o CYP3A4. Los marcadores preferidos incluyen albúmina, SLC10A1, HNF4a, citoqueratina 8/18, CYP2A6, CYP2E1 y CYP3A4.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, las células de organoide intestinal (derivadas de iPSC) (es decir, células que constituyen un organoide intestinal) tal como se describen en el presente documento pueden expresar una o más proteínas de marcador (específicas de células intestinales maduras y/o específicas de células precursoras intestinales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células intestinales maduras y/o específicas de células precursoras intestinales incluyen ABCB1, CDH1, CHGA, DPP4, KL5, LGR5, Lyz, SLC2A1, SLC2A3, SOX0 y/o CXCR4. En diversas otras realizaciones, una célula de organoide intestinal tal como se describe en el presente documento puede expresar marcadores celulares intestinales maduros que incluyen CD326, CDX2, citoqueratina 8/18 y/o NaK-ATPasa.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, las células de organoide tubular renal (derivadas de iPSC) (es decir, células que constituyen un organoide tubular renal) tal como se describen en el presente documento pueden expresar una o más proteínas de marcador (específicas de células tubulares renales maduras y/o específicas de células precursoras tubulares renales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células tubulares renales maduras y/o específicas de células precursoras tubulares renales incluyen acuaporina 1, MRP2, citoqueratina 8/18 y/o NaK-ATPasa.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, las células de organoide neuronal (derivadas de iPSC) (es decir, células que constituyen un organoide neuronal) tal como se describen en el presente documento pueden expresar uno o más marcadores o proteínas de marcador (específicos de células neuronales maduras y/o específicos de células precursoras neuronales). En diversas realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células neuronales maduras y/o específicas de células precursoras neuronales incluyen nestina, TUBB3 y/o PAX6. En diversas otras realizaciones, tales proteínas de marcador específicas de células neuronales maduras y/o específicas de células precursoras neuronales pueden incluir GFAP, sinaptofisina, NeuN y/o MAP2. En diversas realizaciones, una célula de organoide neuronal tal como se describe en el presente documento puede expresar una o más proteínas de marcador específicas de células neuronales maduras. En diversas realizaciones, los marcadores de células neuronales maduras incluyen además nestina, TUBB3 y/o PAX6. En diversas otras realizaciones, los marcadores de células neuronales maduras incluyen GFAP, sinaptofisina, NeuN y/o MAP2.

En la presente divulgación, las células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide tal como se describió anteriormente (células diferenciadas que se desarrollan para dar organoides que contienen células con propiedades específicas de órganos) pueden obtenerse de las iPSC mediante diferenciación de iPSC usando medios y métodos para diferenciación de iPSC disponibles y conocidos por el experto habitual en la técnica. En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células que inducen organoides derivadas de iPSC (o células precursoras de organoides derivadas de iPSC) están disponibles de un fabricante por contrato. Sin embargo, en diversos aspectos,

en aspectos particulares que pertenecen a los métodos descritos en el presente documento, la presente divulgación abarca una etapa de diferenciación de iPSC tal como se describe en el presente documento para dar tales células que inducen organoides o células precursoras de organoides derivadas de iPSC (es decir, células usadas como fuente para un organoide).

En diversas realizaciones de la presente divulgación, los organoides están incrustados en una matriz extracelular, preferiblemente en una matriz de gel extracelular, más preferiblemente en un extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente a un entorno extracelular tisular). En diversas realizaciones, el extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal comprende una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la mezcla de proteínas gelatinosas es una mezcla de proteínas gelatinosas secretada por células de sarcoma de ratón de Engelbret-Holm-Swarm (EHS). Más preferiblemente, la matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning). En diversas realizaciones de la presente divulgación, la matriz (de gel) extracelular es un hidrogel. En diversas realizaciones de la presente divulgación, la matriz (de gel) extracelular es un hidrogel de colágeno, agarosa, aginato o Matrigel®. En diversas realizaciones adicionales, el hidrogel es un hidrogel sintético.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células precursoras derivadas de iPSC, o los organoides derivados de iPSC, o las células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide, están depositados en el dispositivo microfluídico en compartimentos de cultivo celular independientes.

En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede comprender una mezcla de células derivadas de iPSC y organoides o esferoides derivados de iPSC. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede comprender (i) esferoides de hepatocitos derivados de iPSC; (ii) organoides intestinales derivados de iPSC; (iii) células tubulares renales derivadas de iPSC o células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) esferoides neuronales derivados de iPSC; obteniéndose los esferoides, organoides y células derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática. Preferiblemente, los esferoides, organoides y células derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) están depositados o presentes en compartimentos de cultivo celular independientes del chip microfluídico. Preferiblemente, el compartimento de cultivo celular que comprende los esferoides de hepatocitos derivados de iPSC comprende además fibroblastos, preferiblemente fibroblastos derivados de iPSC. Por consiguiente, el equivalente de hígado derivado de iPSC se logra poniendo esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos (derivados de iPSC) en el respectivo compartimento de cultivo celular.

En realizaciones adicionales preferidas, los organoides intestinales derivados de iPSC están incrustados en una matriz extracelular o hidrogel como en otra parte en el presente documento. En otras realizaciones preferidas, el compartimento de cultivo celular que comprende los organoides intestinales derivados de iPSC comprende además fibroblastos y células endoteliales, preferiblemente fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, o fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales microvasculares primarias. Las células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC se siembran preferiblemente en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

Además, el compartimento de cultivo celular que comprende esferoides neuronales derivados de iPSC comprende además preferiblemente una barrera hematoencefálica bioimpresa. Más específicamente, el compartimento de cultivo celular que comprende esferoides neuronales derivados de iPSC está enriquecido con células endoteliales, preferiblemente células endoteliales derivadas de iPSC, sembradas en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico que comprende compartimentos de cultivo celular que contienen las células precursoras derivadas de iPSC, o los organoides derivados de iPSC, o las células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide, comprende un primer circuito y un segundo circuito, en el que los compartimentos de cultivo celular que contienen las células precursoras derivadas de iPSC, o los organoides derivados de iPSC, o las células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide, forman parte del primer circuito, y en el que el segundo circuito comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, estando ambos circuitos conectados entre sí a través de la unidad de filtración y la unidad de reabsorción. Preferiblemente, la unidad de filtración comprende una barrera de filtración que permite de manera selectiva el paso de moléculas del primer circuito al segundo circuito basándose en el tamaño y la carga de las moléculas. Más preferiblemente, la barrera de filtración es una barrera biológica, incluso más preferiblemente la barrera biológica comprende podocitos. En realizaciones adicionales preferidas, la unidad de reabsorción comprende una barrera que permite la reabsorción de fluido del segundo circuito al primer circuito. Más preferiblemente, la barrera de reabsorción es una barrera biológica, incluso más preferiblemente la barrera biológica comprende células de túbulo renal.

En realizaciones preferidas, el dispositivo microfluídico comprende al menos un compartimento de cultivo celular en el primer circuito que contiene un equivalente o tejido de hígado que imita la función del hígado, y al menos un compartimento de cultivo celular en el primer circuito que contiene un equivalente o tejido de intestino que imita la función del intestino.

En diversas realizaciones, la unidad de filtración y la unidad de reabsorción del segundo circuito pueden considerarse un equivalente de riñón o renal. Preferiblemente, el equivalente de riñón o renal significa un organoide de riñón o renal. Como se describe en el presente documento, un organoide de riñón o renal significa preferiblemente organoides de podocitos y células tubulares renales, más preferiblemente organoides de podocitos derivados de iPSC y células tubulares renales derivadas de iPSC. Igualmente, un organoide de hígado significa preferiblemente un organoide de hepatocitos, más preferiblemente organoides de hepatocitos derivados de iPSC. Igualmente, un organoide de intestino (delgado) significa preferiblemente un organoide de células de intestino (delgado), más preferiblemente un organoide de células de intestino (delgado) derivadas de iPSC. Igualmente, un organoide neuronal significa preferiblemente un organoide de células neuronales, más preferiblemente un organoide de células neuronales derivadas de iPSC. Igualmente, un organoide de tracto respiratorio (preferiblemente pulmón) significa preferiblemente un organoide de células del tracto respiratorio, preferiblemente células de pulmón, más preferiblemente células epiteliales de pulmón. Preferiblemente, las células del tracto respiratorio o las células de pulmón son células derivadas de iPSC del tracto respiratorio o células de pulmón derivadas de iPSC, respectivamente.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, el dispositivo microfluídico novedoso tiene una disposición de compartimentos de cultivo celular de modo que el compartimento de cultivo celular que comprende el “equivalente de hígado” está ubicado aguas abajo del compartimento de cultivo celular que comprende el “equivalente de intestino” (según el diseño para el “circuito de sangre” representado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo). Preferiblemente, los compartimentos de cultivo celular que comprenden el “equivalente de hígado” y el “equivalente de intestino” están dispuestos en un microcanal independiente, que es una rama de la estructura de microcanal principal (según el diseño para el “circuito de sangre” representado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo). Preferiblemente, ningún otro compartimento de cultivo celular está ubicado entre los compartimentos de cultivo celular del equivalente de intestino y del equivalente de hígado. En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede comprender una red microfluídica ramificada (o red ramificada de canales microfluídicos). En realizaciones adicionales preferidas, el dispositivo microfluídico novedoso tiene una disposición de compartimentos de cultivo celular de modo que el compartimento de cultivo celular que comprende el “equivalente neuronal” está dispuesto en paralelo a los compartimentos de cultivo celular que comprenden el “equivalente de hígado” y el “equivalente de intestino”, más preferiblemente el “equivalente neuronal” está dispuesto en una rama de microcanal independiente dispuesta en paralelo a la rama de microcanal que comprende los compartimentos de cultivo celular que comprenden el “equivalente de hígado” y el “equivalente de intestino” (según el diseño para el “circuito de sangre” representado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo).

En el caso de que el dispositivo microfluídico contenga un reservorio de muestreo o reservorio de medio independiente, este está dispuesto preferiblemente en la estructura de microcanal principal, es decir, no está dispuesto en una estructura de microcanal de rama (según el diseño para el “circuito de sangre” representado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo).

Además, en el caso de que el dispositivo microfluídico contenga una microbomba, la microbomba está dispuesta preferiblemente en la estructura de microcanal principal, es decir, no está dispuesta en una estructura de microcanal de rama (según el diseño para el “circuito de sangre” representado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo).

En diversas realizaciones preferidas, el segundo circuito no muestra una red microfluídica ramificada, sino que más bien es un circuito o sistema de circulación no ramificado. Los términos “circuito” y “sistema de circulación” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, un dispositivo microfluídico novedoso que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática, tiene una disposición de compartimentos de cultivo celular según el diseño mostrado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo. Lo mismo es válido para realizaciones según la presente divulgación, en las que el dispositivo microfluídico comprende organoides derivados de iPSC, o células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide.

En diversas otras realizaciones de la presente divulgación, un dispositivo microfluídico novedoso que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática, tiene una disposición de compartimentos de cultivo celular según el diseño para el “circuito de sangre” mostrado en la Fig. 1, sin embargo, sin limitarse al mismo. Tales realizaciones pueden tener o no uno o más compartimentos, que coinciden con los equivalentes tubulares renales y/glomerulares renales del circuito de orina mostrado en la Fig. 1 para proporcionar un solapamiento de los dos circuitos. Lo mismo es válido para realizaciones según la presente divulgación, en las que el dispositivo microfluídico comprende organoides derivados de iPSC, o células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide.

Como se describe en el presente documento, el sistema microfisiológico novedoso del dispositivo microfluídico novedoso que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática, es preferiblemente un sistema de canal cerrado. Lo mismo es válido para realizaciones según la presente divulgación, en las que el dispositivo microfluídico comprende organoides derivados de iPSC, o células derivadas de iPSC usadas como fuente para un organoide.

Por consiguiente, el circuito de sangre y/o de orina del dispositivo microfluídico novedoso forman un circuito cerrado, más específicamente un circuito cerrado de canales microfluídicos. Más específicamente, el sistema microfisiológico novedoso puede considerarse un sistema microfisiológico autosoportado o autocontenido. El sistema de canal cerrado que incluye las dos unidades funcionales renales (unidad de filtración y unidad de reabsorción) posibilita someter a ensayo específicamente la toxicidad para el hígado de fármacos de prueba. En realizaciones preferidas, el sistema microfisiológico o dispositivo microfluídico se hace funcionar con una solución líquida que imita a la sangre en el primer circuito y/o una solución líquida que imita a la orina en el segundo circuito.

El dispositivo microfluídico novedoso que comprende: (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC; (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC; (iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y (iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC; en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática, puede comprender uno o más compartimentos de cultivo celular para cada una de las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv).

Igualmente, un dispositivo microfluídico novedoso que comprende: (i) organoides de hepatocitos derivados de iPSC; (ii) organoides intestinales derivados de iPSC; y (iii) organoides tubulares renales derivados de iPSC, en el que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática, puede comprender uno o más compartimentos de cultivo celular para cada una de las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii) y (iii). En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico comprende además (iv) organoides derivados de iPSC de un tipo de órgano o de célula adicional, que son diferentes de los organoides según (i), (ii) y (iii), obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática. En realizaciones preferidas, los organoides derivados de iPSC adicionales según (iv) son organoides neuronales derivados de iPSC, obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática.

En realizaciones preferidas, el dispositivo microfluídico novedoso comprende cada equivalente de órgano solo una vez, siguiendo el principio de un equivalente de órgano individual por dispositivo microfluídico (o por sistema microfisiológico). Por otro lado, si, por ejemplo, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, esto significa que puede haber al menos dos compartimentos de cultivo celular que comprenden cada uno un equivalente de hígado.

En diversas realizaciones, cada compartimento de cultivo celular (o un único compartimento de cultivo celular) comprende solo un equivalente de órgano, siguiendo el principio de un equivalente de órgano individual por compartimento de cultivo celular.

Además, en diversas realizaciones, un compartimento de cultivo celular puede comprender uno o más equivalentes de órganos, por ejemplo, un equivalente neuronal junto con o en combinación con un equivalente intestinal. En diversas otras realizaciones, cada compartimento de cultivo celular (o un único compartimento de cultivo celular) comprende solo un equivalente de órgano, es decir, un equivalente que pertenece a un único órgano, siguiendo el principio de un equivalente de órgano individual por compartimento de cultivo celular.

La presente divulgación se refiere además a un método de generación de organoides de hepatocitos, organoides intestinales y organoides tubulares renales, comprendiendo el método cultivar conjuntamente (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC, (ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC y (iii) células renales precursoras derivadas de iPSC, en compartimentos de cultivo celular independientes que están en conexión microfluídica entre sí (a través de canales microfluídicos).

La presente divulgación se refiere también a un método de generación de organoides de hepatocitos de tipo adulto, organoides de tipo adulto intestinales y organoides tubulares renales de tipo adulto, comprendiendo el método cultivar conjuntamente (i) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides de hepatocitos de tipo adulto, (ii) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides de tipo adulto intestinales y (iii) organoides esféricos derivados de iPSC que se desarrollan para dar organoides renales de tipo adulto, en compartimentos de cultivo celular independientes que están en conexión microfluídica entre sí (a través de canales microfluídicos).

En diversos aspectos, los métodos se llevan a cabo usando un dispositivo microfluídico que comprende los compartimentos de cultivo celular independientes que están en conexión microfluídica entre sí (a través de canales microfluídicos).

5 En diversos aspectos, los métodos comprenden además preferiblemente cultivar conjuntamente células endoteliales derivadas de iPSC, obteniéndose las células endoteliales derivadas de iPSC del mismo único donante de iPSC que las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii) y (iii), y estando depositadas las células endoteliales derivadas de iPSC en los canales microfluídicos que conectan los compartimentos de cultivo celular.

10 Preferiblemente, el compartimento de cultivo celular que contiene las células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC comprende además fibroblastos derivados de iPSC, que se obtienen del mismo único donante de iPSC que las células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC.

15 Los dispositivos microfluídicos novedosos de la presente divulgación pueden proporcionar ingeniería de organoides o de tejidos con sistemas microfisiológicos *in vitro* usando células precursoras específicas de órganos derivadas de iPSC u organoides específicos de órganos derivados de iPSC. La presente divulgación se refiere además a constructos tisulares de bioingeniería novedosos que imitan barreras de órganos generadas imprimiendo (bioimprimiendo) organoides derivados de iPSC en, y/o sembrándolos en, un hidrogel. En particular, la presente divulgación se refiere específicamente a un constructo de tejido conjuntivo de bioingeniería que imita una barrera de
20 órgano de mamífero que comprende organoides derivados de iPSC, fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, y un constructo de tejido conjuntivo de bioingeniería que imita la barrera hematoencefálica que comprende neuroesferas derivadas de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC.

25 Los chips de iPSC del experimento 1.1 y del experimento 2 de la presente divulgación ejemplifican un constructo tisulares de bioingeniería que imitan la barrera intestinal. En particular, el equivalente de intestino de los chips de iPSC de ambos de dichos experimentos contiene organoides de células intestinales derivadas de iPSC incrustados en hidrogel de Matrigel que contiene también fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. En el modelo de equivalente intestinal derivado de iPSC, las células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC se siembran en el lado basolateral del inserto de cultivo celular.

30 Además, los chips de iPSC del experimento 1.2 contiene un equivalente neuronal con barrera hematoencefálica, con el inserto de cultivo celular conteniendo esferoides neuronales derivados de iPSC enriquecidos con impresión (bioimpresión) de células endoteliales derivadas de iPSC bajo los esferoides neuronales. En el equivalente neuronal con barrera hematoencefálica de los chips de iPSC del experimento 2, el inserto de cultivo celular que contiene
35 esferoides neuronales derivados de iPSC está enriquecido con células endoteliales derivadas de iPSC sembradas en el lado basolateral del inserto de cultivo celular.

Específicamente, en el presente documento se da a conocer un constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero, que comprende: (i) organoides derivados de iPSC; (ii) fibroblastos derivados de iPSC; y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC, en el que los organoides derivados de iPSC y las células según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero. El constructo de tejido conjuntivo puede ser un constructo de tejido conjunto de bioingeniería. Además, la barrera de órgano de mamífero puede ser cualquiera de barrera de piel, barrera de intestino, barrera de tracto respiratorio, por ejemplo barrera de pulmón, barrera de ojo, barrera de tejido mucoso oral y barrera de tejido mucoso genital, sin limitarse a los
45 mismos. Por consiguiente, los organoides derivados de iPSC pueden ser cualquiera de organoides de piel derivados de iPSC, organoides de intestino derivados de iPSC, organoides derivados de iPSC del tracto respiratorio, preferiblemente del pulmón, organoides de ojo derivados de iPSC, organoides de tejido mucoso oral derivados de iPSC y organoides de tejido mucoso genital derivados de iPSC.

50 En diversos aspectos, imitar una barrera de órgano de mamífero significa imitar una función de barrera de órgano de mamífero.

El constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero puede considerarse un equivalente de órgano de barrera.

55 En diversos aspectos, el constructo de tejido conjuntivo imita una barrera de intestino de mamífero. Por consiguiente, en el presente documento se describe un constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de intestino de mamífero, que comprende: (i) organoides de intestino derivados de iPSC; (ii) fibroblastos derivados de iPSC, preferiblemente fibroblastos intestinales derivados de iPSC; y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC, preferiblemente células intestinales derivadas de iPSC endoteliales, en el que los organoides de intestino derivados de iPSC y las células según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

65 Igualmente, un constructo de tejido conjuntivo que imita otra barrera de órgano de mamífero tal como se describe en el presente documento comprende preferiblemente organoides específicos de órganos derivados de iPSC; (ii) fibroblastos derivados de iPSC, más preferiblemente fibroblastos específicos de órgano derivados de iPSC; y (iii)

células endoteliales derivadas de iPSC, más preferiblemente células endoteliales específicas de órgano derivadas de iPSC, en el que los organoides específicos de órganos derivados de iPSC y fibroblastos y células endoteliales según (i), (ii) y (iii) (derivados de iPSC) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

En diversos aspectos, el constructo de tejido conjuntivo (de bioingeniería) que imita una barrera de órgano de mamífero comprende la impresión (bioimpresión) de (i) organoides derivados de iPSC; (ii) fibroblastos derivados de iPSC; y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC en, y/o la siembra en, un hidrogel, en el que los organoides derivados de iPSC y células según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

El hidrogel puede ser una matriz extracelular, preferiblemente una matriz de gel extracelular, más preferiblemente un extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular). El extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal puede comprender una mezcla de proteínas gelatinosas. La mezcla de proteínas gelatinosas puede ser una mezcla de proteínas gelatinosas secretada por células de sarcoma de ratón de Engelbret-Holm-Swarm (EHS). La matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal puede ser la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning). La matriz (de gel) extracelular puede ser un hidrogel de colágeno, agarosa, aginato o Matrigel®. El hidrogel puede ser un hidrogel sintético.

Además, en el presente documento se da a conocer un método de bioingeniería o de generación de un constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero, comprendiendo el método imprimir (bioimprimir) en, y/o sembrar en, un hidrogel: (i) organoides derivados de iPSC, (ii) fibroblastos derivados de iPSC, y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC, en el que los organoides derivados de iPSC y las células según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero. El hidrogel puede ser cualquier hidrogel tal como se describió anteriormente.

La presente divulgación se refiere a un constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero que puede obtenerse u obtenida mediante el método de bioingeniería o de generación de un constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero tal como se describe en el presente documento.

La presente divulgación se refiere al constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera de órgano de mamífero descrito en el presente documento para su uso en una cualquiera de reparación de tejidos, ingeniería de tejidos y/o fabricación de tejidos.

En el presente documento se da a conocer un constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero que comprende: (i) neuroesferas derivadas de iPSC u organoides neuronales derivados de iPSC; y (ii) células endoteliales derivadas de iPSC, en el que las neuroesferas derivadas de iPSC o los organoides neuronales derivados de iPSC, y las células endoteliales derivadas de iPSC según (i) y (ii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero. El constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero puede considerarse un constructo tisular de bioingeniería que imita una barrera hematoencefálica de mamífero. El constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero puede comprender además (iii) fibroblastos derivados de iPSC; en el que las neuroesferas derivadas de iPSC o los organoides neuronales derivados de iPSC, las células endoteliales derivadas de iPSC y los fibroblastos derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

Además, en el presente documento se da a conocer un método de bioingeniería o de generación de un constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero, comprendiendo el método imprimir (bioimprimir) en, y/o sembrar en, un hidrogel: (i) neuroesferas derivadas de iPSC u organoides neuronales derivados de iPSC; (ii) células endoteliales derivadas de iPSC; y (iii) fibroblastos derivados de iPSC, en el que las neuroesferas derivadas de iPSC o los organoides neuronales derivados de iPSC, las células endoteliales derivadas de iPSC, y los fibroblastos derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero. El hidrogel puede ser cualquier hidrogel tal como se describió anteriormente en relación con el constructo tisular que imita una barrera de órgano de mamífero.

En diversos aspectos, imitar una barrera hematoencefálica de mamífero significa imitar una función de barrera hematoencefálica de mamífero.

El constructo de tejido conjuntivo que imita una barrera hematoencefálica de mamífero puede considerarse un equivalente de órgano de barrera.

En el presente documento se da a conocer un constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero que puede obtenerse u obtenido mediante el método de bioingeniería o de generación de un constructo tisular que imita una barrera hematoencefálica de mamífero tal como se describe en el presente documento.

Además, en el presente documento se da a conocer un sistema microfluídico que comprende los constructos de tejido conjuntivo que imitan una barrera de órgano de mamífero o barrera hematoencefálica de mamífero descritos en el presente documento.

Además, en el presente documento se da a conocer un método de bioingeniería o de generación de un constructo de órgano adulto que comprende cultivar conjuntamente (i) células precursoras de órganos derivadas de iPSC, (ii) fibroblastos derivados de iPSC y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC, en un único compartimento de cultivo celular, en el que las células precursoras de órganos derivadas de iPSC y los fibroblastos derivados de iPSC y las células endoteliales según (i), (ii) y (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

En diversos aspectos, el método es un método de bioingeniería o de generación de un constructo de órgano de hígado adulto que comprende cultivar conjuntamente (i) células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC, (ii) fibroblastos derivados de iPSC y/o (iii) células endoteliales derivadas de iPSC, en un único compartimento de cultivo celular, en el que las células precursoras de hepatocitos derivadas de iPSC y los fibroblastos derivados de iPSC y las células endoteliales derivadas de iPSC según (i), (ii), y/o (iii) se obtienen de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática de mamífero.

Los fibroblastos derivados de iPSC pueden ser fibroblastos hepáticos derivados de iPSC. Las células endoteliales derivadas de iPSC pueden ser células hepáticas endoteliales derivadas de iPSC.

El método de bioingeniería o de generación de un constructo de órgano adulto puede llevarse a cabo usando un dispositivo microfluídico que comprende un compartimento de cultivo celular para cultivar conjuntamente (i) células precursoras de órganos derivadas de iPSC, (ii) fibroblastos derivados de iPSC y (iii) células endoteliales derivadas de iPSC.

El constructo de órgano adulto puede considerarse un equivalente de órgano adulto que imita una función de órgano adulto.

Como se describe en el presente documento, un constructo de órgano adulto puede caracterizarse por la expresión de marcadores o proteínas de marcador indicativos de un órgano adulto, o un equivalente de órgano adulto que imita una función de órgano adulto. En diversas realizaciones, un órgano adulto, o un equivalente de órgano adulto que imita una función de órgano adulto, puede considerarse un órgano maduro, o un equivalente de órgano maduro que imita una función de órgano adulto. Proteínas de marcador indicativas de y expresadas por órganos maduros, o equivalentes de órganos maduros que imitan una función de órgano adulto, se describen en otra parte en el presente documento.

En el presente documento se da a conocer un constructo de órgano adulto que puede obtenerse u obtenido mediante el método de bioingeniería o de generación de un constructo de órgano adulto tal como se describe en el presente documento.

Específicamente, en el presente documento se da a conocer un constructo (de órgano) de hígado adulto que puede obtenerse u obtenido mediante el método de bioingeniería o de generación de un constructo (de órgano) de hígado adulto tal como se describe en el presente documento.

Además, en el presente documento se da a conocer un método novedoso de bioingeniería de células endoteliales adultas que comprende exponer células precursoras endoteliales derivadas de iPSC a tensión de cizalladura. El método puede comprender cultivar las células precursoras endoteliales derivadas de iPSC en los canales microfluídicos de un sistema microfluídico. La Fig. 11 de la presente divulgación demuestra que la tensión de cizalladura promueve la elongación de células endoteliales derivadas de iPSC en los canales del chip de múltiples órganos.

En el presente documento se da a conocer un método de bioingeniería o de generación de células endoteliales adultas que comprende exponer células precursoras endoteliales derivadas de iPSC a tensión de cizalladura.

El método puede comprender cultivar las células precursoras endoteliales derivadas de iPSC en los canales microfluídicos de un sistema microfluídico.

En el presente documento se dan a conocer células endoteliales adultas que pueden obtenerse u obtenidas mediante el método de bioingeniería o de generación de células endoteliales adultas tal como se describe en el presente documento.

La presente divulgación proporciona además la implementación de un circuito de sangre y un circuito de orina en un chip microfluídico, y establece un sistema microfisiológico que soporta condiciones fisiológicas para mantener un microentorno estable en un sistema que imita la interacción y comunicación cruzada de varios modelos que emulan una funcionalidad de órgano. Los dispositivos microfluídicos novedosos son adecuados para el establecimiento de

ensayo para análisis farmacocinético-farmacodinámico en el contexto de perfilado de ADME(T). La Fig. 1 de la presente divulgación muestra una huella de chip ADME-N (ADME + equivalente neuronal) a modo de ejemplo (parte superior) y una vista isométrica de capas independientes (parte inferior). La vista isométrica ejemplifica la situación de una membrana entre los dos circuitos (circuito de sangre y circuito de orina). La Fig. 12 muestra una vista esquemática en sección transversal parcial de un chip ADME de la presente divulgación.

Se ha mostrado que un dispositivo microfluídico novedoso que implementa un circuito de sangre y un circuito de orina tal como se describe en el presente documento establece y mantiene la estabilidad homeostática del sistema microfisiológico, tal como se evidencia mediante las mediciones de glucosa y LDH representadas en las Figuras 3 y 10.

Los compartimentos glomerular y tubular (unidad de filtración y unidad de reabsorción) pueden lograrse con una combinación de una membrana de policarbonato y una capa apretada de células renales (Fig. 4). La primera implementa una barrera técnica para filtrar constituyentes de medio de peso molecular mayor y retarda su difusión. La última reabsorbe sustancias y provoca el desarrollo de gradientes de concentración a través del circuito "de sangre" y "de orina". Este gradiente es visible no solo para LDH, sino también para aspartato transaminasa (AST, Fig. 5). Ambas de sus concentraciones claramente diferentes demuestran la función de la membrana renal del chip ADME microfluídico novedoso proporcionado por la presente divulgación. La AST se origina del equivalente de hígado ya que es una enzima intracelular encontrada en hepatocitos.

Todos los equivalentes de órganos se evaluaron de manera inmunohistoquímica para determinar la identidad, funcionalidad y viabilidad (Fig. 6-9).

Un análisis metabólico reveló el establecimiento de una homeostasis reproducible entre todos los equivalentes de órganos. La presente divulgación posibilita la demostración de polarización celular, reorganización, función de barrera y tráfico que se observa *in vivo*. El logro de un microentorno estable en el dispositivo microfluídico novedoso que combina un primer circuito con uno o más compartimentos de cultivo celular y un segundo circuito que comprende una unidad de filtración y de reabsorción que se solapa con el primer circuito en las unidades renales abre posibilidades para pruebas de dosis repetidas, por ejemplo, en el desarrollo de fármacos.

En el presente documento se da a conocer a un dispositivo microfluídico novedoso que comprende un primer circuito con uno o más compartimentos de cultivo celular, y un segundo circuito que comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, en el que ambos circuitos están conectados entre sí a través de la unidad de filtración y la unidad de reabsorción. La Figura 1 muestra un diseño a modo de ejemplo de un dispositivo microfluídico novedoso que comprende dos circuitos (denominados "circuito de sangre" y "circuito de orina") que contienen cavidades para la incorporación de los siguientes equivalentes de órganos: intestino, hígado, riñón (segregado en glomérulo y túbulo) y tejido neuronal. Los primeros tres tejidos se usan para lograr el denominado perfil de ADME (adsorción, distribución, metabolismo, excreción). El último es un tejido adicional que suplementa ese perfil. El chip, por tanto, se denomina chip ADME-N (ADME + equivalente/tejido neuronal). Un compartimento de reservorio en cada circuito permite el muestreo de sobrenadantes ("reservorio de medio 1 y 2"). El medio se perfunde a través de la red microfluídica mediante dos microbombas neumáticas, incorporadas, una para cada circuito. Los circuitos se solapan en los dos compartimentos de unidad renal y están separados mediante una membrana porosa hecha de policarbonato.

En comparación con sistemas/chips de un único órgano, el sistema microfisiológico/chip microfluídico de la presente divulgación puede considerarse un sistema/chip de múltiples órganos dado que el dispositivo microfluídico comprende dos circuitos, y de ese modo comprende al menos dos compartimentos de cultivo celular, estando uno de ellos localizado en el primer circuito y siendo el otro una de las unidades del segundo circuito que imita la función renal, en particular la unidad de reabsorción.

Puede considerarse que el dispositivo microfluídico novedoso comprende un primer circuito con uno o más compartimentos de cultivo celular, y un segundo circuito que comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, solapándose ambos circuitos en la unidad de filtración y la unidad de reabsorción. En diversas realizaciones preferidas, las partes solapantes de los dos circuitos (o las partes que conectan ambos circuitos entre sí) están separadas por una membrana porosa. Estas partes de solapamiento/de conexión significan específicamente la unidad de filtración y la unidad de reabsorción.

Dicha membrana porosa que separa las partes de solapamiento/de conexión de los dos circuitos puede ser una membrana porosa sintética o una biológica. Dicha membrana porosa puede estar hecha de cualquiera de colágeno, fibrina o matriz extracelular (incluyendo matriz de órgano descelularizada) sin estar limitada a los mismos.

La membrana porosa puede presentar las mismas propiedades que un inserto Transwell®. La membrana porosa puede reabsorbir mediante las células.

La membrana porosa puede estar hecha de policarbonato.

La membrana porosa puede ser una membrana porosa hecha de poli(dimetilsiloxano) (PDMS).

La unidad de filtración y la unidad de reabsorción son compartimentos de cultivo celular independientes para la incorporación de células de riñón, en particular un equivalente glomerular renal (unidad de filtración) y un equivalente tubular renal (unidad de reabsorción).

Como se describe en el presente documento, los términos “compartimento(s) de cultivo celular” y “cámara(s) de cultivo celular” o “cavidad(es) de cultivo celular” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento. Un compartimento de cultivo celular según la presente divulgación es un compartimento, una cámara o una cavidad particularmente adecuado para cultivar células y tejidos tal como se usa y se describe en el contexto de la presente divulgación. En diversas realizaciones, el compartimento de cultivo celular comprende un formato de placa de pocillos, en particular placas de cultivo celular de (micro)pocillos (o múltiples pocillos) en cualquiera de un formato de 6, 12, 24, 48, 96 y 384 pocillos. Las realizaciones preferidas abarcan múltiples pocillos en un formato de 24, 48, 96 o 384 pocillos. Los múltiples pocillos pueden estar hechos de una variedad de materiales, aunque los materiales más comunes son poliestireno y polipropileno, que pueden usarse en diversas realizaciones de la presente divulgación. En diversas otras realizaciones, el compartimento de cultivo celular es un inserto (microfluido) Transwell®, más preferiblemente un inserto (microfluido) Transwell® hecho de policarbonato (PC), poliéster (PE), politetrafluoroetileno recubierto con colágeno (PTFE) o PET (poli(tereftalato de etileno)). Como se describe en el presente documento, puede describirse que un compartimento de cultivo celular usado en el contexto de la presente divulgación tiene una (superficie de) membrana porosa para el cultivo y crecimiento celular/tisular.

Como se describe en el presente documento, una membrana porosa significa específicamente, sin limitarse a ello, una membrana que tiene una estructura porosa que puede usarse no solo para filtrar, medir y/o separar moléculas químicas y/o biológicas, sino también como superficie para el cultivo y crecimiento celular o tisular. La membrana porosa de un compartimento de cultivo celular tal como se usa en el contexto de la presente divulgación sirve específicamente para establecer una conexión de fluido entre el equivalente de órgano comprendido por el compartimento de cultivo celular y la red microfluido. Por consiguiente, en diversas realizaciones, la membrana porosa de un compartimento de cultivo celular tal como se describe en el presente documento dispuesta de modo que el equivalente de órgano (células/tejido) situado sobre la superficie de la membrana porosa está en conexión de fluido con los canales microfluido del dispositivo microfluido. En diversas realizaciones, la membrana porosa puede sembrarse con células en ambos lados de la membrana. Preferiblemente, se siembran células endoteliales en el lado inferior de la membrana porosa.

En general, a través de procesos de fabricación pueden ajustarse los tamaños de poro desde unos pocos nanómetros hasta micrómetros, posibilitando de ese modo la filtración, medición y separación de moléculas químicas y biológicas objetivo, y también el flujo fluido entre los equivalentes de órganos en los compartimentos de cultivo celular y la red de canales microfluido. En diversas realizaciones, la membrana porosa es una membrana porosa tal como se describió anteriormente. Por tanto, la membrana porosa puede ser una membrana porosa sintética o una biológica. En diversas realizaciones, dicha membrana porosa puede estar hecha de cualquiera de colágeno, fibrina o matriz extracelular (incluyendo matriz de órgano descelularizada) sin limitarse a los mismos. En diversas realizaciones, la membrana porosa presenta las mismas propiedades que un inserto Transwell®. En diversas realizaciones, la membrana porosa es reabsorbible por células. En diversas otras realizaciones, la membrana porosa está hecha de policarbonato. En diversas otras realizaciones preferidas, la membrana porosa es una membrana porosa hecha de poli(dimetilsiloxano) (PDMS).

Como se describe en el presente documento, el término “primer circuito” significa específicamente un sistema circulatorio que imita un sistema circulatorio de sangre de mamífero, que imita más específicamente el sistema circulatorio de sangre humana. Como se describe adicionalmente en el presente documento, los términos “primer circuito” y “equivalente de circuito de sangre” o “circuito de sangre biomimético” puede usarse de manera intercambiable en el presente documento. Igualmente, tal como se describe en el presente documento, el término “segundo circuito” significa específicamente un sistema circulatorio que imita un sistema urinario de mamífero, que imita más específicamente el sistema urinario humano. Como se describe adicionalmente en el presente documento, los términos “segundo circuito” y “equivalente de circuito de orina” o “circuito de orina biomimético” puede usarse de manera intercambiable en el presente documento.

La filtración renal incluye filtración tanto pasiva como activa, actuando el glomérulo como barrera de filtración pasiva que impide que las proteínas séricas de peso molecular mayor entren en la nefrona. Por consiguiente, tales proteínas séricas de peso molecular mayor continúan circulando en la corriente sanguínea. Como se describe en el presente documento, la unidad de filtración del dispositivo microfluido novedoso dado a conocer en el presente documento comprende una barrera de filtración que permite de manera selectiva el paso de moléculas del primer circuito (“circuito de sangre”) al segundo circuito (“circuito de orina”) basándose en el tamaño y la carga de las moléculas, imitando de ese modo la barrera de filtración glomerular selectiva.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, la barrera de filtración comprendida por la unidad de filtración se establece mediante la membrana porosa que separa la unidad de filtración (y la unidad de reabsorción) del circuito de sangre (que separa las partes solapantes de los dos circuitos). Por tanto, según tales realizaciones, la barrera de filtración puede considerarse una barrera de filtración mecánica (porosa). Específicamente, la barrera de filtración

mecánica (porosa) imita la barrera de filtración glomerular. Por consiguiente, en diversas realizaciones, la barrera de filtración puede establecerse incluso mediante un compartimento de cultivo celular que tiene una membrana porosa. En realizaciones preferidas, la barrera de filtración mecánica tiene un tamaño de poro de aproximadamente 8 nm, pero puede tener un tamaño de poro ≤ 8 nm. Según otras realizaciones preferidas, la barrera de filtración mecánica tiene un tamaño de poro que fija un límite superior de aproximadamente 69 kDa para que las proteínas séricas entren en el segundo circuito (de orina). En diversas realizaciones, la barrera de filtración mecánica tiene un tamaño de poro que fija un límite para que albúmina, preferiblemente albúmina sérica (o albúmina sanguínea), entre en el segundo circuito (de orina).

En diversas otras realizaciones de la presente divulgación, la barrera de filtración comprendida por la unidad de filtración es una barrera de filtración biológica. Preferiblemente, la barrera de filtración biológica es una barrera que tiene ranuras de filtración que fijan un límite superior de aproximadamente 69 kDa para que las proteínas séricas entren en el segundo circuito (de orina). En diversas realizaciones, la barrera de filtración biológica comprende podocitos (también denominados células epiteliales viscerales). Más específicamente, la barrera de filtración biológica es una barrera (de filtración) de podocitos que impide que proteínas de plasma sanguíneo entren en el segundo circuito (de orina). La barrera de filtración de podocitos tiene preferiblemente ranuras de filtración que fijan un límite superior de aproximadamente 69 kDa para que las proteínas séricas entren en el segundo circuito (de orina). En diversas realizaciones, la barrera biológica o de filtración de podocitos tiene un tamaño de poro que fija un límite para que albúmina, preferiblemente albúmina sérica (o albúmina sanguínea), entre en el segundo circuito (de orina).

En fisiología renal, la reabsorción (o reabsorción tubular) es el proceso mediante el que la nefrona retira agua y solutos del fluido tubular (preorina) y los devuelve a la sangre en circulación. El filtrado glomerular se vuelve más concentrado, que es una de las etapas en la formación de orina. La reabsorción permite que muchos solutos útiles (principalmente glucosa y aminoácidos), sales y agua vuelvan a la circulación sanguínea. Como se describe en el presente documento, la unidad de reabsorción del dispositivo microfluídico novedoso dado a conocer en el presente documento comprende una barrera que permite la reabsorción de fluido del segundo circuito (circuito de orina) al primer circuito (circuito de sangre). En diversas realizaciones de la presente divulgación, la barrera de reabsorción comprendida por la unidad de reabsorción puede ser una barrera mecánica (porosa) que imita la barrera de reabsorción. Preferiblemente, la barrera de reabsorción es una barrera biológica, más preferiblemente la barrera de reabsorción biológica comprende células de túbulo renal (o células tubulares renales). Más específicamente, la barrera de reabsorción biológica es una barrera (de reabsorción) de células tubulares renales que devuelve agua, sal y solutos (incluyendo las últimas proteínas) al primer circuito (circuito de sangre). Como se describe en el presente documento, la reabsorción puede considerarse como el flujo de filtrado glomerular desde la barrera de reabsorción (específicamente desde las células tubulares) al primer circuito (circuito de sangre), permitiendo de ese modo el paso selectivo de ciertas sustancias, en particular agua, sal y solutos, de vuelta al primer circuito (circuito de sangre). La célula tubular renal puede considerarse una célula tubular proximal renal.

El segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso dado a conocer en el presente documento puede comprender un compartimento, que no sirve como compartimento de cultivo celular, sino que sirve como compartimento de reservorio (de medio). Preferiblemente, un compartimento de reservorio (de medio) de este tipo puede servir exclusivamente como "reservorio de muestreo" o "cámara/compartimento de muestreo" para tomar muestras del segundo circuito, y/o que sirve exclusivamente como "reservorio de muestra" o "cámara/compartimento de muestra" para añadir una muestra de prueba al segundo circuito del sistema microfluídico. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, el segundo circuito no comprende compartimentos de cultivo celular distintos de los dos compartimentos/unidades que constituyen la unidad de filtración y la unidad de reabsorción, aunque incluye un compartimento de reservorio (adicional) independiente, que sirve para tomar muestras (compartimento de muestreo) del segundo circuito, y/o que sirve como "reservorio de muestra" o "cámara/compartimento de muestra" para añadir una muestra de prueba al segundo circuito del sistema microfluídico.

El compartimento de reservorio puede usarse para añadir una solución de nutriente al sistema, que es por qué también se denomina compartimento de reservorio de medio. Por consiguiente, el compartimento de reservorio puede servir para tres funciones, muestrear y alimentar y añadir muestras de prueba, sin embargo, no sirve como compartimento de cultivo celular que porta un equivalente de órgano.

El primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso dado a conocer en el presente documento puede comprender igualmente un compartimento, que no sirve como compartimento de cultivo celular, sino que sirve como compartimento de reservorio (de medio). Preferiblemente, un compartimento de reservorio (de medio) de este tipo puede servir exclusivamente para tomar muestras del primer circuito. Además, un compartimento de reservorio de este tipo puede usarse para añadir una solución de nutriente al sistema, que es por qué puede denominarse compartimento de reservorio de medio. Por consiguiente, el compartimento de reservorio del primer circuito puede servir para ambas funciones, muestrear y alimentar, sin embargo, no sirve como compartimento de cultivo celular que porta un equivalente de órgano. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, el primer circuito puede comprender un compartimento de reservorio además del uno o más compartimentos de cultivo celular, que sirve para tomar muestras (compartimento de muestreo) del primer circuito y/o para añadir medio (solución de nutriente) al sistema.

Como se describe en el presente documento, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un tejido que imita la función del hígado ("equivalente de hígado").

Como se describe adicionalmente en el presente documento, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino. Una realización de este tipo es particularmente útil para lograr un perfilado de ADME porque el chip microfluídico comprende entonces equivalentes de órganos de intestino e hígado (primer circuito), y riñón (segundo circuito). Como se describe en el presente documento, los equivalentes de órganos de intestino, hígado y riñón pueden considerarse equivalentes de órganos "de ADME". En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico novedoso puede comprender uno o más equivalentes de órganos "no de ADME" adicionales, que son diferentes de los equivalentes de órganos "de ADME" de intestino, hígado y riñón. En diversas realizaciones, tales equivalentes de órganos "no de ADME" adicionales incluyen, pero no se limitan a, un equivalente neuronal, un equivalente de piel o un equivalente de tracto respiratorio (preferiblemente equivalente de pulmón).

Todavía en otras realizaciones preferidas de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal, estableciendo de ese modo un chip ADME-N.

En otras realizaciones preferidas de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de piel. Una realización de este tipo es también útil para lograr un perfilado de ADME porque el chip microfluídico comprende entonces equivalentes de órganos de piel e hígado (primer circuito), y riñón (segundo circuito). La administración de una muestra de prueba (fármaco de prueba) se realiza entonces a través del equivalente de piel. Tales realizaciones son particularmente útiles para someter a prueba cosméticos y/o productos de consumo, incluyendo cremas.

En otras realizaciones preferidas de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de tracto respiratorio, específicamente un equivalente de pulmón. Una realización de este tipo es también útil para lograr un perfilado de ADME porque el chip microfluídico comprende entonces equivalentes de órganos de tracto respiratorio/pulmón e hígado (primer circuito), y riñón (segundo circuito). La administración de una muestra de prueba (fármaco de prueba) se realiza entonces a través del tracto respiratorio/equivalente de pulmón. Tales realizaciones son particularmente útiles para someter a prueba sustancias, incluyendo fármacos, previstas para su aplicación a través del tracto respiratorio/pulmón.

En diversas otras realizaciones de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de piel.

En diversas realizaciones adicionales de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de tracto respiratorio, preferiblemente de pulmón.

Todavía en otras realizaciones de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de piel, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de tracto respiratorio, preferiblemente de pulmón.

Todavía en realizaciones adicionales de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de piel, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de tracto respiratorio, preferiblemente de pulmón, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los

compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de piel.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de tracto respiratorio, preferiblemente de pulmón.

Los equivalentes de órganos preferidos incluyen equivalente de riñón, equivalente de hígado, equivalente de intestino, preferiblemente equivalente de intestino delgado, equivalente neuronal (de cerebro), equivalente de tracto respiratorio/pulmón y equivalente de piel. En el caso de equivalente de riñón (o renal), el equivalente significa específicamente un equivalente del glomérulo y túbulo. Más específicamente, tales equivalentes de glomérulo y túbulo están dispuestos en unidades independientes (unidad de filtración y unidad de reabsorción, respectivamente) del segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso previsto en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, un “compartimento de cultivo celular” comprende o contiene un equivalente de órgano, que abarca células y tejidos que imitan una función de órgano. Por tanto, en diversas realizaciones, los términos “equivalente de órgano” y “células/tejido que imitan una función de órgano” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

En diversas realizaciones, un equivalente de órgano o un tejido que imita una función de órgano es un tejido de órgano primario, por ejemplo, un tejido de hígado primario o un tejido de intestino primario. Preferiblemente, el tejido de órgano primario comprende células epiteliales del respectivo órgano, es decir, células epiteliales de, por ejemplo, el tracto gastrointestinal, la piel o el tracto respiratorio.

En diversas realizaciones, un tejido que imita una función de órgano puede ser un tejido que comprende células epiteliales del respectivo órgano, es decir, células epiteliales de, por ejemplo, el tracto gastrointestinal, la piel o el tracto respiratorio. En diversas otras realizaciones, un tejido que imita una función de órgano puede ser un tejido que comprende células de una línea celular, incluyendo células que pueden obtenerse de una línea celular disponible comercialmente.

En diversas otras realizaciones, un tejido que imita una función de órgano es un tejido que comprende células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Específicamente, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y sola una) iPSC donadora, que a su vez se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de un único tipo de célula somática. Por ejemplo, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y sola una) iPSC, que se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de, por ejemplo, una célula cutánea somática, glóbulo blanco, renal célula, adipocitos, o similares.

Como se describe en otra parte en el presente documento, células o un tejido que imitan una función de órgano incluyen organoides y esferoides. Por tanto, en diversas realizaciones, un equivalente de órgano significa específicamente un organoide o esferoide de una cierta funcionalidad de órgano, por ejemplo, un organoide de células intestinales o hepatocitos, o un esferoide de células intestinales o hepatocitos.

Las células, los tejidos y/o los órganos del dispositivo microfluídico previsto por la presente divulgación pueden modelarse en una complejidad bidimensional (2D), tridimensional (3D) u organotípica. 2D significa una suspensión de cultivos celulares monocapa, mientras que 3D incluye, por ejemplo, cultivos multicapa de diferente geometría, incluyendo, por ejemplo, organoides y esferoides. La organotípica difiere de 3D por capturar características adicionales de la arquitectura de órgano *in vivo*.

En diversas realizaciones, un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de órgano es un compartimento de cultivo celular que comprende un organoide. Como se describe en el presente documento, puede considerarse que el término “organoide” significa o representa la unidad de órgano o tejido funcional más pequeña. Una selección de histologías de organoide, todas con funcionalidad relevante y geometría de conglomerado altamente variable, se ha publicado para 15 órganos humanos clave por Marx *et al.* (Marx *et al.* 2012, Altern Lab Anim 40, 235-257).

Como se describe adicionalmente en el presente documento, un organoide según la presente divulgación significa específicamente un organoide de células derivadas de iPSC, sin embargo, sin limitarse a ello. Como se describe adicionalmente en el presente documento, un organoide puede considerarse un cultivo celular/tisular, que mita una función de órgano. Como se describe adicionalmente en el presente documento, un organoide puede caracterizarse normalmente por cualquiera de las siguientes características, sin limitarse a las mismas: (i) (al menos) un constructo o estructura multicelular tridimensional; (ii) una colección de tipos de células específicas de órganos; (iii) si se genera

a partir de células madre (preferiblemente iPSC), recapitula habitualmente un programa de organogénesis de desarrollo; (iv) autoorganización (capacidad de las células para autoensamblarse y/o autoorganizarse para dar tejidos).

En diversas realizaciones, un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de órgano es un compartimento de cultivo celular que comprende esferoides que imitan una función de órgano. Como se describe en el presente documento, un esferoide según la presente divulgación significa específicamente un esferoide de células derivadas de iPSC, sin embargo, sin limitarse a ello. Como se describe adicionalmente en el presente documento, un esferoide puede considerarse una agregación o autoensamblaje de (agrupaciones esféricas de) células, que se asemejan estrechamente a tejidos de órganos *in vivo*. Un esferoide tiene, como un organoide, una arquitectura estructural tridimensional. En comparación con los organoides, se considera que hay un orden superior de autoensamblaje en organoides en oposición a los cultivos de esferoides. En diversas realizaciones, un organoide puede considerarse un cultivo celular/tisular que imita una función de órgano.

Los organoides preferidos incluyen organoide de riñón, organoide de hígado, organoide de intestino, preferiblemente organoide de intestino delgado, organoide neuronal (de cerebro), organoide de tracto respiratorio/pulmón y organoide de piel. En el caso de un organoide de riñón (o renal), el organoide significa específicamente un organoide del glomérulo y túbulo. Más específicamente, tales organoides de glomérulo y túbulo están dispuestos en unidades independientes (unidad de filtración y unidad de reabsorción, respectivamente) del segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso previsto en el presente documento.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC), más específicamente RPTEC sembradas en la unidad de reabsorción. Preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC comprende organoides de células intestinales derivadas de iPSC. Más preferiblemente, los organoides de células intestinales derivadas de iPSC están incrustados en una matriz extracelular, preferiblemente en una matriz de gel extracelular, más preferiblemente en un extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular). En diversas realizaciones, el extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal comprende una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la matriz extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning).

En realizaciones adicionales preferidas, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC, específicamente organoides de células intestinales derivadas de iPSC, comprende además fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, o fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales microvasculares primarias. Las células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC se siembran preferiblemente en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

Además, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC comprende preferiblemente esferoides neuronales derivados de iPSC. Más preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, comprende una barrera hematoencefálica impresa (bioimpresa). Más específicamente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, está enriquecido con células endoteliales, preferiblemente células endoteliales derivadas de iPSC, impresas (bioimpresas) bajo los esferoides neuronales.

Además, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC comprende preferiblemente esferoides de hepatocitos derivados de iPSC. Más preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC, específicamente esferoides de hepatocitos derivados de iPSC, comprende además fibroblastos, preferiblemente fibroblastos derivados de iPSC. En realizaciones preferidas, el equivalente de hígado derivado de iPSC se logra poniendo esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC en el respectivo compartimento de cultivo celular.

En diversas realizaciones, las RPTEC comprenden una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende tejido de hígado primario, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un tejido de intestino primario, preferiblemente un tejido de intestino delgado primario, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC), más específicamente RPTEC sembradas en la unidad de reabsorción y/o unidad de filtración. En diversas realizaciones, el tejido de hígado primario comprende hepatocitos (humanos) primarios. El tejido de hígado primario puede ser un modelo de hígado disponible

comercialmente, por ejemplo, el 3D InSight™ Human Liver Microtissues XL, InSphero. En diversas realizaciones, el tejido de hígado primario o modelo de hígado puede comprender 50 esferoides, que contienen cada uno 3.000 hepatocitos primarios. Además, en realizaciones preferidas, el tejido de intestino primario comprende células endoteliales y epiteliales de intestino derivadas de células (humanas) primarias, y más preferiblemente comprende además fibroblastos (humanos). El tejido de intestino primario puede ser un modelo de intestino disponible comercialmente, por ejemplo, el modelo de tejido 3D EpiIntestinal® (MatTek Corporation). Además, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC comprende preferiblemente esferoides neuronales derivados de iPSC. Más preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, comprende una barrera hematoencefálica impresa (bioimpresa). Más específicamente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, está enriquecido con células endoteliales, preferiblemente células endoteliales derivadas de iPSC, que están impresas (bioimpresas) bajo los esferoides neuronales.

En diversas realizaciones, las RPTEC comprenden una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente renal derivado de iPSC. Preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC comprende organoides de células intestinales derivadas de iPSC. Más preferiblemente, los organoides de células intestinales derivadas de iPSC están incrustados en una matriz extracelular, preferiblemente en una matriz de gel extracelular, más preferiblemente en un extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular). En diversas realizaciones, el extracto de matriz (de gel) extracelular de tipo membrana basal comprende una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la matriz extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning).

En realizaciones adicionales preferidas, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de intestino derivado de iPSC, específicamente organoides de células intestinales derivadas de iPSC, comprende además fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, o fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales microvasculares primarias. Las células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC se siembran preferiblemente en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

Además, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC comprende preferiblemente esferoides neuronales derivados de iPSC. Más preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, comprende una barrera hematoencefálica impresa (bioimpresa). Más específicamente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente neuronal derivado de iPSC, específicamente esferoides neuronales derivados de iPSC, está enriquecido con células endoteliales, preferiblemente células endoteliales derivadas de iPSC, sembradas en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

Además, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC comprende preferiblemente esferoides de hepatocitos derivados de iPSC. Más preferiblemente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende un equivalente de hígado derivado de iPSC, específicamente esferoides de hepatocitos derivados de iPSC, comprende además fibroblastos, preferiblemente fibroblastos derivados de iPSC. En realizaciones preferidas, el equivalente de hígado derivado de iPSC se logra poniendo esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC en el respectivo compartimento de cultivo celular.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende tejido de hígado primario, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un tejido de intestino primario, preferiblemente un tejido de intestino delgado primario, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un tejido neuronal primario, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un tejido renal primario, preferiblemente un tejido renal primario en la unidad de reabsorción, más preferiblemente un tejido (de células epiteliales) tubular primario en la unidad de reabsorción, y un tejido glomerular primario en la unidad de filtración. Preferiblemente, el tejido renal primario comprende células renales epiteliales, más específicamente células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC), pudiendo sembrarse las células renales epiteliales o RPTEC en la unidad de reabsorción, y el tejido glomerular primario comprende podocitos, que pueden sembrarse en la unidad de filtración. En diversas realizaciones, el tejido de hígado primario comprende hepatocitos (humanos) primarios. El tejido de hígado primario puede ser un modelo de hígado disponible comercialmente, por ejemplo, el 3D InSight™ Human Liver Microtissues XL, InSphero. Además, en realizaciones preferidas, el tejido de intestino primario comprende células endoteliales y epiteliales de intestino derivadas de células (humanas) primarias, y más preferiblemente comprende

además fibroblastos (humanos). El tejido de intestino primario puede ser un modelo de intestino disponible comercialmente, por ejemplo, el modelo tisular 3D EpilIntestinal® (MatTek Corporation). Además, el tejido neuronal primario comprende preferiblemente células neuronales primarias. Todavía en realizaciones adicionales preferidas, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende el tejido neuronal primario, específicamente células neuronales primarias, comprende además una barrera hematoencefálica impresa (bioimpresa). Más específicamente, el al menos un compartimento de cultivo celular que comprende el tejido neuronal primario, específicamente células neuronales primarias, está enriquecido con células endoteliales, que o bien pueden sembrarse en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular o bien están impresas (bioimpresas) bajo los esferoides neuronales.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un organoide de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un organoide de intestino, preferiblemente un organoide de intestino delgado, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un organoide renal en la unidad de reabsorción y/o la unidad de filtración. En diversas realizaciones, al menos un compartimento de cultivo celular adicional del primer circuito comprende además un organoide adicional, que es diferente del organoide de hígado, el organoide de intestino (incluyendo el organoide de intestino delgado) y el organoide renal. Un organoide adicional de este tipo puede considerarse un organoide “no de ADME”, mientras que el organoide de hígado, el organoide de intestino (incluyendo el organoide de intestino delgado) y el organoide renal pueden considerarse organoides “de ADME”. En diversas realizaciones, un organoide (no de ADME) adicional de este tipo puede ser cualquiera de un organoide neuronal, un organoide de piel o un organoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). En diversas realizaciones, al menos dos compartimentos de cultivo celular adicionales del primer circuito comprenden además dos organoides “no de ADME” adicionales (un organoide por compartimento de cultivo celular adicional), que son diferentes del organoide de hígado, el organoide de intestino (incluyendo el organoide de intestino delgado) y el organoide renal. En diversas realizaciones, los dos organoides (no de ADME) adicionales pueden seleccionarse de cualquiera de un organoide neuronal, un organoide de piel y/o un organoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). Todavía en otras realizaciones, al menos tres compartimentos de cultivo celular adicionales del primer circuito comprenden además tres organoides “no de ADME” adicionales (un organoide por compartimento de cultivo celular adicional). En diversas realizaciones, los tres organoides “no de ADME” adicionales son un organoide neuronal, un organoide de piel y/o un organoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). Preferiblemente, los organoides son organoides de células de órganos derivadas de iPSC. Específicamente, el organoide de hígado es preferiblemente un organoide de hepatocitos derivados de iPSC, y el organoide de intestino es preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC, más preferiblemente un organoide de células derivadas de iPSC del intestino delgado, y el organoide neuronal es preferiblemente un organoide de células neuronales derivadas de iPSC, y el organoide renal es preferiblemente un organoide de células renales derivadas de iPSC.

En diversos aspectos de la presente divulgación, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un esferoide de hígado, y al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito comprende un esferoide de intestino, preferiblemente un organoide de intestino delgado, y el segundo circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un esferoide renal en la unidad de reabsorción y/o la unidad de filtración. En diversas realizaciones, al menos un compartimento de cultivo adicional del primer circuito comprende además un esferoide adicional, que es diferente del esferoide de hígado, el esferoide de intestino (incluyendo el esferoide de intestino delgado) y el esferoide renal. Un esferoide adicional de este tipo puede considerarse un esferoide “no de ADME”, mientras que el esferoide de hígado, el esferoide de intestino (incluyendo el esferoide de intestino delgado) y el esferoide renal pueden considerarse esferoides “de ADME”. En diversas realizaciones, un esferoide (no de ADME) adicional de este tipo puede ser cualquiera de un esferoide neuronal, un esferoide de piel y/o un esferoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). En diversas realizaciones, al menos dos compartimentos de cultivo celular adicionales del primer circuito comprenden además dos esferoides “no de ADME” adicionales (un esferoide por compartimento de cultivo celular adicional), que son diferentes del esferoide de hígado, el esferoide de intestino (incluyendo el esferoide de intestino delgado) y el esferoide renal. En diversas realizaciones, los dos esferoides (no de ADME) adicionales pueden seleccionarse de cualquiera de un esferoide neuronal, un esferoide de piel y/o un esferoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). Todavía en otras realizaciones, al menos tres compartimentos de cultivo celular adicionales del primer circuito comprenden además tres esferoides “no de ADME” adicionales (un esferoide por compartimento de cultivo celular adicional). En diversas realizaciones, los tres esferoides “no de ADME” adicionales son un esferoide neuronal, un esferoide de piel y/o un esferoide de tracto respiratorio (preferiblemente de pulmón). Preferiblemente, los esferoides son esferoides de células de órganos derivadas de iPSC. Específicamente, el esferoide de hígado es preferiblemente un esferoide de hepatocitos derivados de iPSC, y el esferoide de intestino es preferiblemente un esferoide de células intestinales derivadas de iPSC, más preferiblemente un esferoide de células derivadas de iPSC del intestino delgado, y el esferoide neuronal es preferiblemente un esferoide de células neuronales derivadas de iPSC, y el esferoide renal es preferiblemente un esferoide de células renales derivadas de iPSC.

En diversas realizaciones, un compartimento de cultivo celular puede comprender uno o más equivalentes de órganos, por ejemplo, un equivalente neuronal junto con o en combinación con un equivalente intestinal. En diversas otras realizaciones, cada compartimento de cultivo celular (o un único compartimento de cultivo celular) puede comprender solo un equivalente de órgano, siguiendo el principio de un equivalente de órgano individual por compartimento de

cultivo celular. Por otro lado, si, por ejemplo, al menos uno de los compartimentos de cultivo celular del primer circuito del dispositivo microfluídico novedoso comprende un equivalente de hígado, esto significa que puede haber dos compartimentos de cultivo celular del primer circuito que comprenden cada uno un equivalente de hígado. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el dispositivo microfluídico novedoso comprende cada equivalente de órgano solo una vez, siguiendo el principio de un equivalente de órgano individual por dispositivo microfluídico (o por sistema microfisiológico).

La presente divulgación proporciona el uso de un dispositivo microfluídico novedoso descrito en el presente documento en pruebas analíticas, diagnóstico, investigación, validación de dianas, estudios de toxicidad, ingeniería de tejidos, fabricación de tejidos, cribado de fármacos y/o análisis farmacocinético-farmacodinámico, específicamente perfilado de ADME(T).

La presente divulgación posibilita hacer funcionar un sistema microfisiológico y establece el denominado perfilado de ADME basándose en un dispositivo microfluídico novedoso previsto en el presente documento. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de funcionamiento de un sistema microfisiológico haciendo uso de los dispositivos microfluídicos novedosos descritos en el presente documento, y proporciona además un ensayo de ADME (absorción, distribución, metabolismo, excreción) que comprende los dispositivos microfluídicos novedosos. Además, en el presente documento se da a conocer un ensayo de ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción, toxicidad) que comprende los dispositivos microfluídicos novedosos descritos en el presente documento.

Específicamente en el proceso de descubrimiento de fármacos, el perfilado de ADME (o cribado) *in vitro* proporciona una base para seleccionar nuevas entidades moleculares y compuestos candidatos que tienen un metabolismo de fármacos, una farmacocinética o perfiles de seguridad deseables, que son necesarios para la selección de candidatos de fármaco y el desarrollo preclínico y clínico de fase tardía. El perfil (o las propiedades) de ADME(T) de un fármaco (sustancia de prueba) permiten al desarrollador de fármacos entender los datos de seguridad y de eficacia requeridos para la aprobación regulatoria.

En el método de funcionamiento de un sistema microfisiológico, el tiempo de cultivo puede durar semanas o incluso meses, posibilitando el modelado de la enfermedad y una exposición a sustancia de dosis repetida.

La presente divulgación proporciona un método de realización de un perfilado de ADME (absorción, distribución, metabolismo, excreción) haciendo uso del dispositivo microfluídico novedoso previsto por la presente divulgación. La presente divulgación proporciona también un método de realización de un perfilado de ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción, toxicidad) haciendo uso del dispositivo microfluídico novedoso descrito en el presente documento. Además, en el presente documento se da a conocer un método de generación de un perfil de ADME, o un perfil de ADMET de un fármaco (de prueba) que comprende realizar un cribado de ADME o cribado de ADMET, respectivamente, usando el dispositivo microfluídico novedoso previsto por la presente divulgación.

El método de funcionamiento de un sistema microfisiológico tal como se da a conocer en el presente documento comprende preferiblemente añadir de manera selectiva una solución de nutriente al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, preferiblemente el equivalente de intestino, más preferiblemente el equivalente de intestino delgado. El equivalente de órgano comprende preferiblemente tejido que comprende células epiteliales del tracto gastrointestinal, preferiblemente del intestino, incluso más preferiblemente del intestino delgado. Con el fin de reproducir condiciones *in vivo* fisiológicas, la presente divulgación hace funcionar preferiblemente el sistema microfisiológico añadiendo de manera selectiva la solución de nutriente al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, preferiblemente el equivalente de intestino, más preferiblemente el equivalente de intestino delgado.

En diversas realizaciones, una solución de nutriente se añade de manera selectiva al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de piel y/o equivalente de tracto respiratorio, más específicamente equivalente de pulmón.

Como se describe en el presente documento, una solución de nutriente comprende específicamente sustancias (nutrientes) que son esenciales para que células o un cuerpo crezcan o se recuperen (incluyendo aminoácidos, sales (electrolitos) y glucosa), y calorías en forma de carbohidratos. Específicamente, una solución de nutriente tal como se describe en el presente documento es una solución de nutriente para la proliferación celular. Como se describe en el presente documento, los términos "solución de nutriente" y "medio de cultivo celular" pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

Se ha encontrado sorprendentemente que los chips microfluídicos novedosos previstos en el presente documento pueden establecer homeostasis en el sistema microfisiológico. Esto se ha mostrado mediante niveles constantes de glucosa y LDH (Fig. 3). Una concentración de glucosa constante sugiere un consumo constante y una regulación activa de la glucosa disponible. Los niveles de glucosa han alcanzado niveles iguales en todos los compartimentos. Además, se ha encontrado sorprendentemente que la alimentación de manera selectiva a través del equivalente de intestino (de manera apical a través del equivalente de intestino) era suficiente para suministrar tanto el circuito "de

sangre” como el circuito “de orina”. Además, la actividad de LDH se mostrada ser bastante constante a lo largo de los experimentes. En comparación con la glucosa, los niveles de LDH son diferentes en cada compartimento. La función de barrera del equivalente de intestino y el equivalente renal se muestra mediante diferentes concentraciones de LDH en los tres “compartimentos” (es decir, circuito de sangre -> reservorio de medio 1; circuito de orina -> reservorio de medio 2; y compartimento de intestino). Las barreras, por tanto, diferencian entre las sustancias que las atraviesan. La penetración activa o pasiva de glucosa, mientras se retienen otras sustancias, indican interacciones prácticas entre subconjuntos del sistema de chip.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de imitación de homeostasis que comprende hacer funcionar un sistema microfisiológico que comprende un primer circuito con uno o más compartimentos de cultivo celular y un segundo circuito que comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, estando ambos circuitos conectados entre sí a través de la unidad de filtración y la unidad de reabsorción. Según las realizaciones (preferidas) descritas en otra parte en el presente documento con respecto al dispositivo microfluídico novedoso, la unidad de filtración comprendida por el segundo circuito del sistema microfisiológico comprende preferiblemente una barrera de filtración que permite de manera selectiva el paso de moléculas del primer circuito al segundo circuito basándose en el tamaño y la carga de las moléculas. Más preferiblemente, la barrera de filtración es una barrera biológica, comprendiendo incluso más preferiblemente la barrera biológica podocitos.

Además, según las realizaciones (preferidas) descritas en otra parte en el presente documento con respecto al dispositivo microfluídico novedoso, la unidad de reabsorción comprendida por el segundo circuito del sistema microfisiológico comprende preferiblemente una barrera que permite la reabsorción de fluido del segundo circuito al primer circuito. Más preferiblemente, la barrera de reabsorción es una barrera biológica, comprendiendo incluso más preferiblemente la barrera biológica células de túbulo renal.

En diversas realizaciones del método novedoso de imitación de homeostasis, una solución de nutriente se añade de manera selectiva al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular (del primer circuito) que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, más específicamente el equivalente de intestino, incluso más específicamente el equivalente de intestino delgado. En diversas realizaciones, el equivalente de órgano comprende células epiteliales, o tejido que comprende células epiteliales, del tracto gastrointestinal, preferiblemente del intestino, incluso más preferiblemente del intestino delgado.

Las realizaciones (preferidas) descritas en el presente documento en relación con el dispositivo microfluídico novedoso se aplicables igualmente al método novedoso de imitar homeostasis que comprende hacer funcionar un sistema microfisiológico tal como se describe en el presente documento. Por tanto, realizaciones (preferidas) descritas en otra parte en el presente documento en relación con el dispositivo microfluídico novedoso son también realizaciones preferidas en relación con el método novedoso de imitar homeostasis que comprende hacer funcionar un sistema microfisiológico. Más específicamente, las realizaciones (preferidas) descritas en otra parte en el presente documento en relación con el dispositivo microfluídico novedoso son también realizaciones preferidas del sistema microfisiológico comprendido por el método novedoso de imitar homeostasis.

La presente divulgación proporciona también un método de detección de un analito en un sistema microfisiológico que hace uso de un dispositivo microfluídico tal como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones, el método comprende añadir una muestra de prueba a un compartimento de cultivo celular del primer circuito, comprendiendo preferiblemente dicho compartimento de cultivo celular un equivalente de órgano seleccionado de cualquiera de equivalente de tracto gastrointestinal, más específicamente equivalente de intestino, equivalente de piel y/o equivalente de tracto respiratorio, más específicamente equivalente de pulmón. El equivalente de órgano comprende preferiblemente tejido que comprende células epiteliales del tracto gastrointestinal, la piel o el tracto respiratorio. En realizaciones preferidas, una muestra de prueba se añade a un compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, más específicamente el equivalente de intestino. Más preferiblemente, la muestra de prueba se añade de manera selectiva a un compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, específicamente el equivalente de intestino, más específicamente el equivalente de intestino delgado.

En diversas realizaciones, una muestra de prueba se añade de manera selectiva al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de piel y/o equivalente de tracto respiratorio, más específicamente el equivalente de pulmón.

En diversas otras realizaciones, una muestra de prueba se añade de manera selectiva al sistema microfisiológico a través de una cavidad diferente de los compartimentos de cultivo celular que comprenden los equivalentes de órganos. Una cavidad de este tipo puede ser el “reservorio de medio” del circuito de sangre y/o del circuito de orina. Como se describe en otra parte en el presente documento, se pretende que un “reservorio de medio” de este tipo sea un “reservorio de muestreo” o “cámara/compartimento de muestreo” que sirve exclusivamente para tomar una muestra o sobrenadante de cultivo del sistema microfluídico, y/o que se pretende que sea un “reservorio de muestra” o “cámara/compartimento de muestra” que sirve exclusivamente para añadir una muestra de prueba al sistema microfluídico.

En diversas realizaciones, la muestra de prueba es una muestra de prueba líquida, que se añade preferiblemente al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de tracto gastrointestinal, específicamente el equivalente de intestino, más específicamente el equivalente de intestino delgado. En diversas realizaciones, la muestra de prueba es un producto cosmético o de consumo, incluyendo una crema, que se añade preferiblemente al sistema microfisiológico a través del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente de piel.

El método de detección de un analito según la presente divulgación puede comprender tomar una muestra de un “reservorio de medio” del circuito de sangre y/o del circuito de orina. Como se describe en otra parte en el presente documento, puede pretenderse que un “reservorio de medio” de este tipo sea un “reservorio de muestreo” o “cámara/compartimento de muestreo” que sirve para tomar una muestra o sobrenadante de cultivo del sistema microfluídico, y/o que puede pretenderse que sea un “reservorio de muestra” o “cámara/compartimento de muestra” que sirve para añadir una muestra de prueba al sistema microfluídico, pero que no sirve como compartimento de cultivo celular para un equivalente de órgano.

El método de detección de un analito según la presente divulgación puede comprender además analizar la muestra tomada del sistema microfluídico a través de una cámara de muestreo para la presencia de metabolitos, preferiblemente metabolitos tóxicos. El método de detección de un analito según la presente divulgación permite específicamente detectar metabolitos de fármacos añadidos como muestras de prueba al sistema microfisiológico.

El método de detección de un analito según la presente divulgación puede comprender además detectar un analito en el flujo de fluido del primer circuito y/o el segundo circuito.

En realizaciones preferidas del método de detección de un analito, una muestra de prueba se añade a o se deposita en un compartimento de cultivo celular del primer circuito, que es el mismo o diferente del compartimento de cultivo celular al que se le añade una solución de nutriente.

Además, en el presente documento se da a conocer un método de cultivo y/o mantenimiento de células que comprende sembrar un dispositivo microfluídico novedoso descrito en el presente documento con células.

Todavía adicionalmente en el presente documento se da a conocer un kit para hacer funcionar un sistema microfisiológico que comprende un dispositivo microfluídico novedoso descrito, e instrucciones para su uso.

El dispositivo microfluídico previsto por la presente divulgación puede estar en forma de una placa o un chip. Las placas se basan habitualmente en las dimensiones de placa de microtitulación y usando flujo microfluídico pasivo, basado en la gravedad, o bombeo a borde activo. Los chips de tamaño de portaobjetos de microscopio y otros formatos pueden hacerse funcionar mediante un flujo microfluídico activo o pasivo, emulando de ese modo la tensión de cizalladura a tasas intersticiales o intracapilares fisiológicas. En el caso de un flujo microfluídico activo, pueden usarse microbombas externas o en chip. Preferiblemente, el dispositivo microfluídico previsto por la presente divulgación está en forma de un chip.

En diversas realizaciones del dispositivo microfluídico novedoso o el sistema microfisiológico novedoso dado a conocer en el presente documento, el primer circuito comprende uno o más canales microfluídicos que están alineados con células endoteliales. Como se describe en otra parte en el presente documento, la presente divulgación demuestra que la tensión de cizalladura promueve la elongación de células endoteliales derivadas de iPSC en los canales del chip de múltiples órganos (Fig. 11).

En diversas realizaciones, el dispositivo microfluídico novedoso o el sistema microfisiológico novedoso comprende una microbomba, preferiblemente una microbomba peristáltica. En diversas realizaciones, uno de los dos circuitos (primer y segundo circuito) puede tener una microbomba (es decir, “microbomba de circuito de sangre” o “microbomba de circuito de orina”). En realizaciones preferidas, cada uno de los dos circuitos (primer y segundo circuito) tiene su propia microbomba (es decir, “microbomba de circuito de sangre” y “microbomba de circuito de orina”). Las microbombas son preferiblemente microbombas “en chip”, según la realización preferida que el dispositivo microfluídico novedoso o el sistema microfisiológico novedoso es un sistema de canal cerrado.

Como se describe en el presente documento, los métodos novedosos previstos en el presente documento pueden abarcar una etapa de depositar y/o cultivar un equivalente de órgano, preferiblemente un tejido que comprende células (epiteliales) o células (epiteliales) derivadas de iPSC del respectivo órgano, en un compartimento de cultivo celular del primer circuito.

En diversas realizaciones, el equivalente de intestino puede comprender (además) fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC. Preferiblemente, el equivalente de intestino es un equivalente de intestino derivado de iPSC que comprende además fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC. Más preferiblemente, el equivalente de intestino es un equivalente derivado de iPSC formado por una capa de una matriz extracelular, que está cubierta por fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC. La capa de una matriz extracelular es preferiblemente una capa a base de gel de una matriz extracelular. Incluso más preferiblemente, el equivalente de

intestino es un organoide de células intestinales derivadas de iPSC. Preferiblemente, el equivalente de intestino es un equivalente derivado de iPSC, preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC, formado por una capa de un extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular), estando la capa cubierta por fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC. En diversas realizaciones, el extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal comprende una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la matriz extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning).

En diversas realizaciones, el equivalente de intestino, que es preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC, está incorporado o incrustado en la matriz extracelular mencionada anteriormente.

En diversas realizaciones, el equivalente de intestino, que es preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC, comprende una capa (cerrada) de células endoteliales, incluyendo células endoteliales microvasculares primarias o derivadas de iPSC (se prefieren las últimas), en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular. En diversas realizaciones, el equivalente de intestino, que es preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC, comprende una capa (cerrada) de células endoteliales derivadas de iPSC en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

En diversas realizaciones, el equivalente de intestino puede comprender (además) fibroblastos y células endoteliales, en particular fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC, tal como se describió anteriormente. Por consiguiente, en diversas realizaciones, el equivalente de intestino es un equivalente de intestino derivado de iPSC formado por una capa de una matriz extracelular, que está cubierta por fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC, y comprendiendo el equivalente de intestino además otra capa de células endoteliales, preferiblemente células endoteliales microvasculares primarias, en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular. Alternativamente, en diversas realizaciones, el equivalente de intestino es un equivalente de intestino derivado de iPSC formado por una capa de una matriz extracelular, que está cubierta por fibroblastos, en particular fibroblastos derivados de iPSC, y comprendiendo el equivalente de intestino además otra capa de células endoteliales derivadas de iPSC en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular.

En diversas realizaciones, el equivalente de intestino está incorporado o incrustado en la matriz extracelular mencionada anteriormente.

Además, tal como se describió anteriormente, el equivalente de intestino derivado de iPSC es preferiblemente un organoide de células intestinales derivadas de iPSC. Además, la capa de la matriz extracelular es preferiblemente una capa a base de gel de una matriz extracelular, más preferiblemente una capa de un extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular). El extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal puede comprender una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la matriz extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning).

En diversas realizaciones, el equivalente neuronal puede comprender (además) células endoteliales, en particular células endoteliales derivadas de iPSC. Preferiblemente, el equivalente neuronal es un equivalente derivado de iPSC que comprende además células endoteliales, en particular células endoteliales derivadas de iPSC. Más preferiblemente, las células endoteliales, en particular células endoteliales derivadas de iPSC, están presentes en el lado basolateral del equivalente neuronal del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente neuronal. Alternativamente, el equivalente neuronal es un equivalente neuronal derivado de iPSC que comprende además células endoteliales derivadas de iPSC impresas (bioimpresas) (y por tanto presentes) bajo el equivalente neuronal. Preferiblemente, el equivalente neuronal derivado de iPSC comprende esferoides u organoides de células neuronales derivadas de iPSC, y las células endoteliales derivadas de iPSC están impresas (bioimpresas) (y por tanto presentes) bajo el esferoide u organoide neuronal de células neuronales derivadas de iPSC. Preferiblemente, el equivalente neuronal derivado de iPSC comprende esferoides u organoides de células neuronales derivadas de iPSC, que están incorporados o incrustados en una capa de una matriz extracelular. Preferiblemente, las células endoteliales derivadas de iPSC están impresas (bioimpresas) (y por tanto presentes) en la matriz extracelular bajo (basolateral) los esferoides neuronales u organoides de células neuronales derivadas de iPSC. Como se describió anteriormente, la matriz extracelular es preferiblemente una matriz de gel extracelular, más preferiblemente un extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal (que se asemeja normalmente al entorno extracelular tisular). El extracto de matriz extracelular de tipo membrana basal puede comprender una mezcla de proteínas gelatinosas. Preferiblemente, la matriz extracelular de tipo membrana basal es la matriz de membrana basal Matrigel® (Corning).

Las células endoteliales impresas (bioimpresas) bajo los esferoides neuronales o organoides, o sembradas en el lado basolateral del equivalente neuronal, en particular en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente neuronal, se asemejan a la barrera hematoencefálica, y su ajuste se ha mostrado mediante una TEER de 20-78 $\Omega \times \text{cm}^2$ tras dos semanas de cultivo de chip. La resistencia eléctrica transepitelial/transendotelial (TEER) es una técnica cuantitativa ampliamente aceptada para medir la integridad de la dinámica de unión estrecha en modelos de cultivo celular de capas de células endoteliales y epiteliales. TEER es un indicador fuerte de la integridad de las barreras celulares antes de evaluarse, por ejemplo, para el transporte de fármacos o productos químicos. Las mediciones de TEER pueden realizarse en tiempo real sin daño celular y generalmente se basan en

medir la resistencia óhmica o medir la impedancia a través de un amplio espectro de frecuencias. Las mediciones para diversos tipos de células se han notificado con sistemas de medición disponibles comercialmente y también con implementaciones microfluídicas construidas a medida. Algunos de los modelos de barrera que se han caracterizado ampliamente usando TEER incluyen los modelos de barrera hematoencefálica (BHE), de tracto gastrointestinal (GI) y pulmonares.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células endoteliales impresas (bioimpresas) bajo los esferoides u organoides neuronales, o sembradas en el lado basolateral del equivalente neuronal, en particular en el lado basolateral del compartimento de cultivo celular que comprende el equivalente neuronal, muestran una TEER de 20-78 $\Omega \times \text{cm}^2$, específicamente tras dos semanas de cultivo de chip.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células del equivalente intestinal se caracterizan por la expresión de marcadores específicos de células intestinales epiteliales, incluyendo incluyendo sacarasa-isomaltasa, el transportador oligopeptídico intestinal SLC15A1/transportador peptídico 1 (PEPT1) y la enzima metabolizadora principal CYP3A4.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células del equivalente intestinal y/o del equivalente de hígado se caracterizan por la expresión de marcadores específicos incluyendo la enzima metabolizadora principal CYP3A4.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células del equivalente de hígado se caracterizan por la expresión de marcadores específicos incluyendo citoqueratina 8/18.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, el equivalente de hígado se caracteriza por la expresión de proteína de unión estrecha ZO-1.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células del equivalente neuronal se caracterizan por la expresión de marcadores específicos incluyendo beta-tubulina III.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, las células endoteliales (primarias) se caracterizan por la expresión de CD31 y/o factor de von Willebrand (vWF).

En diversas realizaciones de la presente divulgación, los fibroblastos (derivados de iPSC) se caracterizan por la expresión de vimentina.

Como se describe en el presente documento, cualquier tipo de células usadas y descritas en la presente divulgación pueden derivarse de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Específicamente, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y sola una) iPSC donadora, que a su vez se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de un único tipo de célula somática. Por ejemplo, las células pueden derivarse (es decir, diferenciarse) a partir de una única (es decir, una y solo una) iPSC, que se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de, por ejemplo, una célula cutánea somática, un glóbulo blanco, una célula renal, adipocitos, o similares. Por tanto, en la medida de que las células no estén ya identificadas como células derivadas de iPSC, las células usadas y descritas en la presente divulgación pueden ser células derivadas de iPSC según diversas realizaciones, preferiblemente células derivadas de iPSC que se han diferenciado a partir de una única (es decir, una y solo una) iPSC donadora, que se ha obtenido (es decir, reprogramado) a partir de un único tipo de célula somática.

Como se describe en el presente documento, la referencia al “intestino” significa según las realizaciones preferidas la referencia al “intestino delgado”. Por ejemplo, la referencia a “equivalente de intestino” o “células del intestino” significa según las realizaciones preferidas la referencia a “equivalente de intestino delgado” o “células del intestino delgado”, respectivamente.

Como se describe en el presente documento, la referencia a “células” abarca la referencia a “células de mamífero”, aunque se prefiere la referencia a “células humanas”. Por ejemplo, la referencia a “células endoteliales” abarca la referencia a “células endoteliales de mamífero”, aunque se prefiere la referencia a “células endoteliales humanas”.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, la referencia a “tejido” abarca la referencia a “tejido de mamífero”, aunque se prefiere la referencia a “tejido humano”. Por ejemplo, la referencia a “tejido de hígado” abarca la referencia a “tejido de hígado de mamífero”, aunque se prefiere la referencia a “tejido de hígado humano”.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, en diversas realizaciones, puede considerarse que el término “tejido” es un “cultivo tisular”.

Además, tal como se describe en el presente documento, “cultivo de células” significa preferiblemente “cultivo fluídico de células”.

En diversas realizaciones, la presente divulgación abarca tensión de cizalladura fluídica (o de fluido), específicamente tensión de cizalladura fluídica (o de fluido) fisiológicamente relevante.

EJEMPLOS

Diseño de chip del chip ADME-N

Se realiza un diseño de chip que tiene limitaciones disminuidas a escala desde la fisiología humana. Se consideran datos dimensionales así como características de flujo. El diseño comprende dos circuitos (denominados “de sangre” y “de orina”) que contienen cavidades para la incorporación de los siguientes equivalentes de órganos: intestino, hígado, riñón (segregado en glomérulo y túbulo) y tejido neuronal (Fig. 1). Los primeros tres tejidos se usan para lograr el denominado perfil de ADME (adsorción, distribución, metabolismo, excreción). El último es un tejido adicional que suplementa este perfil. El chip se denomina, por tanto, chip ADME-N. Un compartimento de reservorio en cada circuito permite el muestreo de sobrenadantes (reservorio de medio 1 y 2). El medio se perfunde a través de la red microfluídica mediante dos microbombas neumáticas, incorporadas, una para cada circuito. Los circuitos se solapan en los dos compartimentos de riñón y están separados por una membrana porosa hecha de policarbonato.

Compartimento de intestino

El equivalente de intestino se realizó poniendo un inserto de cultivo celular de pie de 24 pocillos en la respectiva cavidad (compartimento de cultivo celular). El inserto contenía o bien un modelo intestinal disponible comercialmente (EpilIntestinal®, MatTek) o bien organoides de células intestinales derivadas de iPSC incrustados en Matrigel que contiene también fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. En el modelo de equivalente intestinal derivado de iPSC, se sembraron células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC en el lado basolateral del inserto de cultivo celular de pie de 24 pocillos. El lado apical del inserto se usó para la alimentación diaria de una solución nutritiva (Nutriflex® peri, B.Braun). En total, el lado apical contenía un sobrenadante de 250 µl.

Compartimento neuronal

El equivalente neuronal con barrera hematoencefálica consistía en un inserto de cultivo celular colgante de 96 pocillos que contenía esferoides neuronales derivados de iPSC enriquecidos con células endoteliales derivadas de iPSC sembradas en el lado basolateral del inserto de cultivo celular colgante de 96 pocillos o bioimpresas bajo los esferoides neuronales. El lado apical del inserto contenía un volumen de 75 µl.

Compartimento de hígado

El equivalente de hígado se logró poniendo o bien modelos de hígado disponibles comercialmente (3D InSight™ Human Liver Microtissues XL, InSphero) o bien esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC en la respectiva cavidad. De los primeros, 50 esferoides se pusieron en un chip, que contenía cada uno 3.000 hepatocitos primarios. De los últimos, 20 esferoides se pusieron en un chip, que contenían cada uno 50.000 células.

Compartimento de riñón (renal)

Los compartimentos de riñón se sembraron o bien con una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC) o bien con células renales derivadas de iPSC.

Los protocolos de diferenciación usados para las células derivadas de iPSC se adaptaron de diferentes artículos científicos listados en la tabla 1.

Tabla 1: Lista de células derivadas de iPSC. Los protocolos de diferenciación se adaptaron de los artículos científicos listados

<i>Tipos de células derivadas de iPSC</i>	<i>Referencias</i>
Hepatocitos	Szkolnicka <i>et al.</i> , 2014
Fibroblasto/MS	Zou <i>et al.</i> , 2013
Organoides intestinales	Kauffman <i>et al.</i> , 2015
Equivalente renal	Morizane <i>et al.</i> , 2017
Esferoides neuronales	Rigamonti <i>et al.</i> , 2016
Células endoteliales BHE	Lippmann <i>et al.</i> , 2012
Células endoteliales	Harding <i>et al.</i> , 2017

El circuito “de sangre” tenía un volumen global de aproximadamente 1,37 ml (sin incluir volúmenes apicales). El circuito “de orina” tenía un volumen global de aproximadamente 0,58 ml. Inicialmente, el chip contenía medio con glucosa y

suero. Cada día, se tomaron muestras tanto de los reservorios de medio como del lado apical del equivalente de intestino. Los volúmenes tomados se reemplazaron por medio libre de glucosa para el reservorio de medio “de sangre” y medio libre de glucosa y de suero para el reservorio de medio “de orina”. Al compartimento intestinal se le administró una solución rica en glucosa Nutriflex® peri. De este modo, se alimentaron diariamente 1,0 mg de glucosa al sistema solo a través del equivalente de intestino.

Se cultivaron conjuntos de chips durante 7, 14 y 21 días (Fig. 2). En los puntos finales, se tomaron muestras celulares para exámenes inmunohistológicos, qPCR y secuenciación de ARN. Los sobrenadantes se analizaron para su contenido de glucosa, lactato, LDH, albúmina, urea, ALT y AST. Se tomaron controles de cultivos estáticos de los equivalentes de órganos dados el día 0, 7 y 14.

Experimento 1.1: Chips de iPSC - 3 chips

- equivalente de hígado de iPSC
- equivalente de intestino de iPSC
- equivalente neuronal de iPSC con barrera hematoencefálica impresa
- riñón de RPTEC

Compartimento de intestino

El inserto del equivalente de intestino contiene organoides de células intestinales derivadas de iPSC incrustados en Matrigel que contiene también fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. En el modelo de equivalente intestinal derivado de iPSC, se siembran células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC en el lado basolateral del inserto de cultivo celular de pie de 24 pocillos.

Compartimento neuronal

El equivalente neuronal con barrera hematoencefálica consiste en un inserto de cultivo celular que contiene esferoides neuronales derivados de iPSC enriquecidos con células endoteliales derivadas de iPSC bioimpresas bajo los esferoides neuronales.

Compartimento de hígado

El equivalente de hígado se logra poniendo esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC en la respectiva cavidad. 20 esferoides se ponen sobre un chip, conteniendo cada uno 50.000 células (relación 24:1 de hepatocitos:fibroblastos).

Compartimento de riñón (renal)

Los compartimentos de riñón se siembran con una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC).

Experimento 1.2: Chips de tejido primario - 10 chips

- tejido de hígado primario
- intestino delgado primario
- equivalente neuronal de iPSC con barrera hematoencefálica impresa
- riñón de RPTEC

Compartimento de intestino

El inserto del equivalente de intestino contiene un modelo intestinal disponible comercialmente (EpiIntestinal®, MatTek).

Compartimento neuronal

El equivalente neuronal con barrera hematoencefálica consiste en un inserto de cultivo celular que contiene esferoides neuronales derivados de iPSC enriquecidos con células endoteliales derivadas de iPSC bioimpresas bajo los esferoides neuronales.

Compartimento de hígado

El equivalente de hígado se logra poniendo modelos de hígado disponibles comercialmente (3D InSight™ Human Liver Microtissues XL, InSphero) en la respectiva cavidad. 50 esferoides se ponen sobre un chip, conteniendo cada uno 3.000 hepatocitos primarios.

Compartimento de riñón (renal)

Los compartimentos de riñón se siembran con una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTEC).

Experimento 2: Chips de iPSC - 21 chips

- equivalente de hígado de iPSC
- equivalente de intestino de iPSC
- equivalente neuronal de iPSC con barrera hematoencefálica
- equivalente renal de iPSC

Compartimento de intestino

El inserto del equivalente de intestino contiene organoides de células intestinales derivadas de iPSC incrustados en Matrigel que contiene también fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC. En el modelo de equivalente intestinal derivado de iPSC, se siembran células endoteliales microvasculares primarias o células endoteliales derivadas de iPSC en el lado basolateral del inserto de cultivo celular de pie de 24 pocillos.

Compartimento neuronal

El equivalente neuronal con barrera hematoencefálica consiste en un inserto de cultivo celular que contiene esferoides neuronales derivados de iPSC enriquecidos con células endoteliales derivadas de iPSC sembradas en el lado basolateral del inserto de cultivo celular.

Compartimento de hígado

El equivalente de hígado se logra poniendo esferoides de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC en la respectiva cavidad. 20 esferoides se ponen sobre un chip, conteniendo cada uno 50.000 células (relación 24:1 de hepatocitos:fibroblastos).

Compartimento de riñón (renal)

Los compartimentos de riñón se siembran con células renales derivadas de iPSC.

Resultados

Los chips eran homeostáticos. Esto se mostró mediante niveles constantes de glucosa y LDH (Fig. 3). Una concentración de glucosa constante sugería un consumo constante y una regulación activa de la glucosa disponible. Los niveles de glucosa han alcanzado niveles iguales en todos los compartimentos. La alimentación solo de manera apical a través del equivalente intestinal era suficiente para suministrar el circuito tanto "de sangre" como "de orina". Además, la actividad de LDH se ha mostrado bastante constante a lo largo de los experimentos. En comparación con la glucosa, los niveles de LDH son diferentes en cada compartimento. La función de barrera del equivalente de intestino y del equivalente renal se muestra mediante diferentes concentraciones de LDH en los tres compartimentos (es decir, circuito de sangre -> reservorio de medio 1; circuito de orina -> reservorio de medio 2; y compartimento de intestino). Las barreras, por tanto, diferencian entre las sustancias que las atraviesan. La penetración activa o pasiva de glucosa, al tiempo que se retienen otras sustancias, indican interacciones prácticas entre subconjuntos del sistema de chip.

Los compartimentos glomerular y tubular se lograron con una combinación de una membrana de policarbonato y una capa estrecha de células renales (Fig. 4). La primera implementa una barrera técnica para filtrar constituyentes de medio grandes y retarda su difusión. La última reabsorbe sustancias y provoca la acumulación de gradientes de concentración a través del circuito "de sangre" y "de orina". Este gradiente es visible no solo para LDH sino también para aspartato transaminasa (AST, Fig. 5). Sus dos concentraciones claramente diferentes demuestran la función de la membrana de riñón del chip ADME-N. La AST solo puede proceder del equivalente de hígado ya que es una enzima intracelular encontrada en hepatocitos y células de músculo.

Todos los equivalentes de órganos se evaluaron de manera inmunohistoquímica para determinar la identidad, funcionalidad y viabilidad (Fig. 6-9). El equivalente de intestino derivado de iPSC se formó mediante una capa de Matrigel cubierta con fibroblastos derivados de iPSC. Organoides intestinales que rodean una luz se incorporaron al gel (Fig. 6). Las células intestinales derivadas de iPSC expresaban NaK-ATPasa y Cyp3A4. En el experimento 1.2, una capa cerrada de células endoteliales microvasculares primarias formaba, además, otra capa en el lado basolateral del inserto de cultivo celular.

El equivalente de hígado primario mostró marcadores funcionales al final de su periodo de cultivo de dos semanas (Fig. 7). Además, para el equivalente de hígado derivado de iPSC se confirmaron marcadores funcionales tras tres semanas de cultivo en el chip ADME-N (Fig. 8).

El equivalente neuronal derivado de iPSC expresaba marcadores funcionales para β -tubulina III al final de su periodo de cultivo de dos semanas (Fig. 9). Las células endoteliales impresas en el hidrogel muestran expresión de vWF tras dos semanas de cultivo de chip (experimento 1.2). El ajuste de la barrera de sangre se muestra mediante valores de TEER de $20\text{--}78\ \Omega \times \text{cm}^2$ tras dos semanas de cultivo de chip (experimento 2).

Experimento 3: Equivalente 3D de hígado con hepatocitos derivados de iPSC, células endoteliales y fibroblastos.

Se llevó a cabo una diferenciación celular de hepatocitos con modificaciones con respecto a Szkolnicka *et al.* (Szkolnicka *et al.*, 2014). Se llevó a cabo una diferenciación de fibroblastos con modificaciones con respecto a Zou *et al.*, 2013). Se realizó una diferenciación endotelial según Harding *et al.* (Harding *et al.*, 2017). Se formaron esferoides usando placas de unión ultrabaja. La Figura 13 muestra imágenes de inmunofluorescencia tras la diferenciación de hepatocitos derivados de iPSC y la formación de esferoides 3D. La Figura 14 muestra niveles de transcripción de genes marcadores hepáticos seleccionados en equivalentes de hígado derivados de iPSC (hepatocitos derivados de iPSC). Los niveles de transcripción se analizaron mediante qPCR. Los equivalentes de hígado derivados de iPSC se cultivaron a lo largo de dos días para generar esferoides de hígado 3D que incluían hepatocitos derivados de iPSC, fibroblastos y células endoteliales. Los datos se normalizaron con respecto a la TBP de mantenimiento. La Figura 15 muestra la capacidad de metabolización de equivalentes de hígado 3D para metabolizar propranolol para dar glucurónido de propranolol, y ácido alfa-naftoxiláctico, en un único cultivo sobre un chip.

Experimento 4: Equivalente intestinal que consiste en organoides intestinales derivados de iPSC, fibroblasto derivado de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC.

El modelo intestinal se construyó únicamente a partir de células derivadas de iPSC de iPSC StemUse101 (organoides intestinales derivados de iPSC, fibroblasto derivado de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC). Ya se vio una alta densidad de organoides tras dos semanas de cultivo conjunto de fibroblasto derivado de iPSC y organoides. Tras tres semanas en cultivo estático, los organoides se fusionaron entre sí y crecieron de tamaño. La visualización de células endoteliales derivadas de iPSC era posible bajo el borde del inserto. Una monocapa de células endoteliales derivadas de iPSC era todavía visible tras tres semanas de cultivo estático. La Figura 16 muestra los resultados.

Experimento 5: Barrera de hidrogel con organoides intestinales derivados de iPSC, fibroblasto y células endoteliales.

Se bioimprimieron hidrogeles con fibroblastos y se sembraron con células endoteliales primarias y organoides intestinales. La Figura 17 muestra los resultados.

Experimento 6: Barrera hematoencefálica derivada de iPSC en el chip.

Se realizó la diferenciación de iPSC para dar células esferoides progenitoras corticales, denominadas neuroesferas, en un sistema de miniorreactor DASbox® (Eppendorf). El protocolo de cultivo se adaptó a partir de Rigamonti *et al.*, 2016). La diferenciación de células endoteliales hematoencefálicas se adaptó a partir de Lippmann *et al.*, 2014). Las neuroesferas se transfirieron a un Transwell y las células endoteliales hematoencefálicas se sembraron debajo de la membrana. La Figura 18 muestra los resultados.

Experimento 7: Experimento de cultivo conjunto de ADME-N. (ADME-N = chip ADME más equivalente neuronal)

En un experimento de prueba de concepto, la combinación de cuatro modelos de órganos derivados de iPSC diferentes de la línea de iPSC StemUse101 se cultivó a lo largo de dos semanas en el chip ADME-N. Por tanto, el chip ADME-N se denomina también chip de 4 órganos. El chip ADME-N se diseñó para albergar un modelo de inserto de 24 pocillos de pie intestinal, equivalentes de hígado, organoides renales y neuroesferas en una disposición que emula la fisiología humana. El modelo de barrera intestinal se construyó sobre un inserto de 24 pocillos. Organoides intestinales se cultivaron conjuntamente con fibroblastos y una monocapa de células endoteliales derivadas de iPSC se sembró bajo la membrana de inserto. El modelo de hígado se ensambló a partir de hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC. Una solución de una única célula de organoides renales se usó para sembrar la membrana en ambos compartimentos de riñón seis días antes del inicio del cultivo conjunto de ADME-N. El tejido neuronal se diferenció en un sistema de biorreactor y se puso como esferoides en un Transwell de 96 pocillos. Se eligió esta combinación de órganos para permitir estudios que evalúan perfiles de ADME de compuestos (= chip/perfil cumplía

con farmacocinética de base fisiológica (PBPK)). La configuración compleja de este experimento se muestra en la Figura 19 (véase el experimento 2 y la parte correspondiente de la figura 2). La Figura 20 muestra una caracterización por inmunotinción del modelo de hígado, intestinal, renal y neuronal cultivo conjuntamente en el chip ADME-N durante 14 días. La Figura 21 muestra resultados de qPCR del cultivo conjunto en el chip ADME-N del modelo intestinal, de hígado, renal y de cerebro derivado de iPSC.

Los cuatro modelos de órganos derivados de iPSC diferentes no solo mostraron ser estables tras dos semanas de cultivo conjunto en el chip ADME-N, es decir, mantenían su fenotipo. Sorprendentemente, se ha encontrado que un chip de cuatro órganos con equivalentes de intestino, de hígado, de cerebro y de riñón humanos miniaturizados, todos ellos diferenciados previamente a partir de iPSC del mismo donante, muestra diferenciación adicional de diferentes modelos de órganos derivados de iPSC a lo largo de un periodo de cultivo de 14 días en un medio de cultivo privado de factores de crecimiento. Esta diferenciación adicional se atribuye a una comunicación cruzada entre los equivalentes de órganos. Además, puede observarse una maduración avanzada para diferentes tejidos a lo largo del tiempo. Significativamente, se ha mostrado que diferentes modelos de órganos derivados de iPSC son estables durante el cultivo conjunto en el ADME-N (= chip ADME más equivalente neuronal), es decir, mantienen su fenotipo, y muestran una expresión de gen marcador definida y consistente hacia el tejido dirigido a lo largo del tiempo (experimento 7 y Fig. 21). Modelo de intestino (Fig. 21a): NaKATPasa - adenosina trifosfatasa de sodio-potasio (transporte de nutrientes en el intestino delgado); CDX2 - homeobox de tipo caudal 2 (importante para la regulación transcripcional del epitelio intestinal)

Modelo de hígado (Fig. 21b): Genes regulados por incremento significativos son Alb – albúmina (producida solo en el hígado); MRP2 - proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) (expresada en la parte canalicular de los hepatocitos y es funcional durante el transporte biliar) y AFP - alfa-fetoproteína – proteína de hígado fetal (maduración de hepatocitos).

Modelo de cerebro (Fig. 21d): Genes regulados por incremento significativos son TBR1 - T-box, cerebro 1 (factor de transcripción importante para el desarrollo del cerebro) y MAPR2 - proteína asociada a microtúbulos 2 (esencial para la neurogénesis).

La presente divulgación establece un cultivo conjunto a largo plazo sistémico exitoso de cuatro modelos de órganos derivados de iPSC autólogos diferentes de un único donante cultivado en un sistema microfisiológico (MPS) conforme a farmacocinética de base fisiológica (PBPK), sin la adición de factores de crecimiento extra.

Lista de referencias (citadas, entre otros, en la tabla 1):

1. Szkolnicka, D., Farnworth, S. L., Lucendo-villarin, B. & Hay, D. C. Deriving Functional Hepatocytes from Pluripotent Stem Cells. 1-12 (2014). doi:10.1002/9780470151808.sc01g05s30
2. Zou, L. *et al.* A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D scaffolds. Sci. Rep. 3, 2243 (2013).
3. Kauffman, A. L. *et al.*, Directed differentiation protocols for successful human intestinal organoids derived from multiple induced pluripotent stem cell lines. 2, 1-10 (2015).
4. Morizane, R. & Bonventre, J. V. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells. Nat. Protoc. 12, 195-207 (2016).
5. Rigamonti, A. *et al.* Stem Cell Reports. Stem Cell Reports 6, 993-1008 (2016).
6. Lippmann Etan S. *et al.* Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells Derived from Pluripotent Stem Cells. Nat. Biotechnol. 30, 783-791 (2012).
7. Harding, A. *et al.* Highly Efficient Differentiation of Endothelial Cells from Pluripotent Stem Cells Requires the MAPK and the PI3K Pathways. Stem Cells 35, 909-919 (2017).

REIVINDICACIONES

1.- Un dispositivo microfluídico que comprende:

(a) compartimentos de cultivo celular, en los que

(i) células precursoras de hepatocitos derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC);

(ii) células precursoras intestinales derivadas de iPSC;

(iii) células precursoras tubulares renales derivadas de iPSC; y

(iv) células precursoras neuronales derivadas de iPSC,

están depositadas por separado;

obteniéndose las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática; y

(b) que comprende además un compartimento de reservorio, que sirve para añadir solución de nutriente al sistema.

2.- Un dispositivo microfluídico que comprende:

(a) compartimentos de cultivo celular, en los que

(i) organoides de hepatocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC);

(ii) organoides intestinales derivados de iPSC; y

(iii) organoides tubulares renales derivados de iPSC;

están depositados por separado;

obteniéndose los organoides derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii) de un único donante de iPSC obtenidas de un único tipo de célula somática; y

(b) que comprende además un compartimento de reservorio, que sirve para añadir solución de nutriente al sistema.

3.- El dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el dispositivo microfluídico comprende un primer circuito y un segundo circuito, y en el que los compartimentos de cultivo celular contienen las células precursoras derivadas de iPSC según (i), (ii), (iii) y (iv), o los organoides derivados de iPSC según (i), (ii) y (iii), respectivamente, forman parte del primer circuito, y en el que el segundo circuito comprende una unidad de filtración y una unidad de reabsorción, estando ambos circuitos conectados entre sí a través de la unidad de filtración y la unidad de reabsorción.

4.- El dispositivo microfluídico según la reivindicación 3, en el que la unidad de filtración comprende una barrera de filtración que permite de manera selectiva el paso de moléculas del primer circuito al segundo circuito basándose en el tamaño y la carga de las moléculas.

5.- Uso del dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en pruebas analíticas, diagnóstico, investigación, validación de dianas, estudios de toxicidad, ingeniería de tejidos, fabricación de tejidos, cribado de fármacos y/o análisis farmacocinético-farmacodinámico.

6.- Un método de detección de un analito en un sistema microfisiológico que hace uso del dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

Fig. 1: Huella de chip ADME-N a modo de ejemplo (parte superior) y vista isométrica sobre capas independientes (parte inferior) que ejemplifica la situación de una membrana entre los dos circuitos.

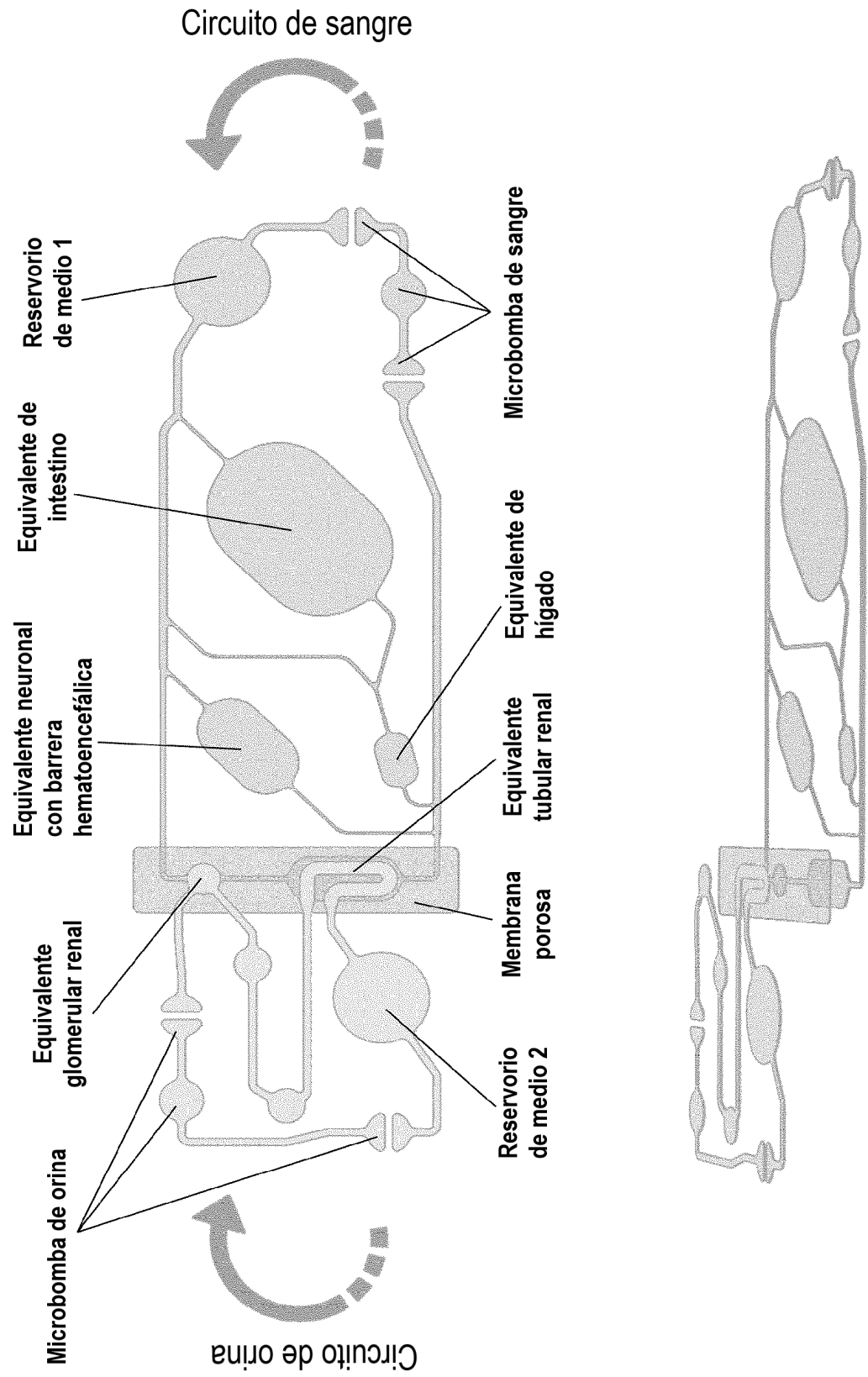


Fig.2: Diseño experimental de chips de iPSC y chips de tejido primario

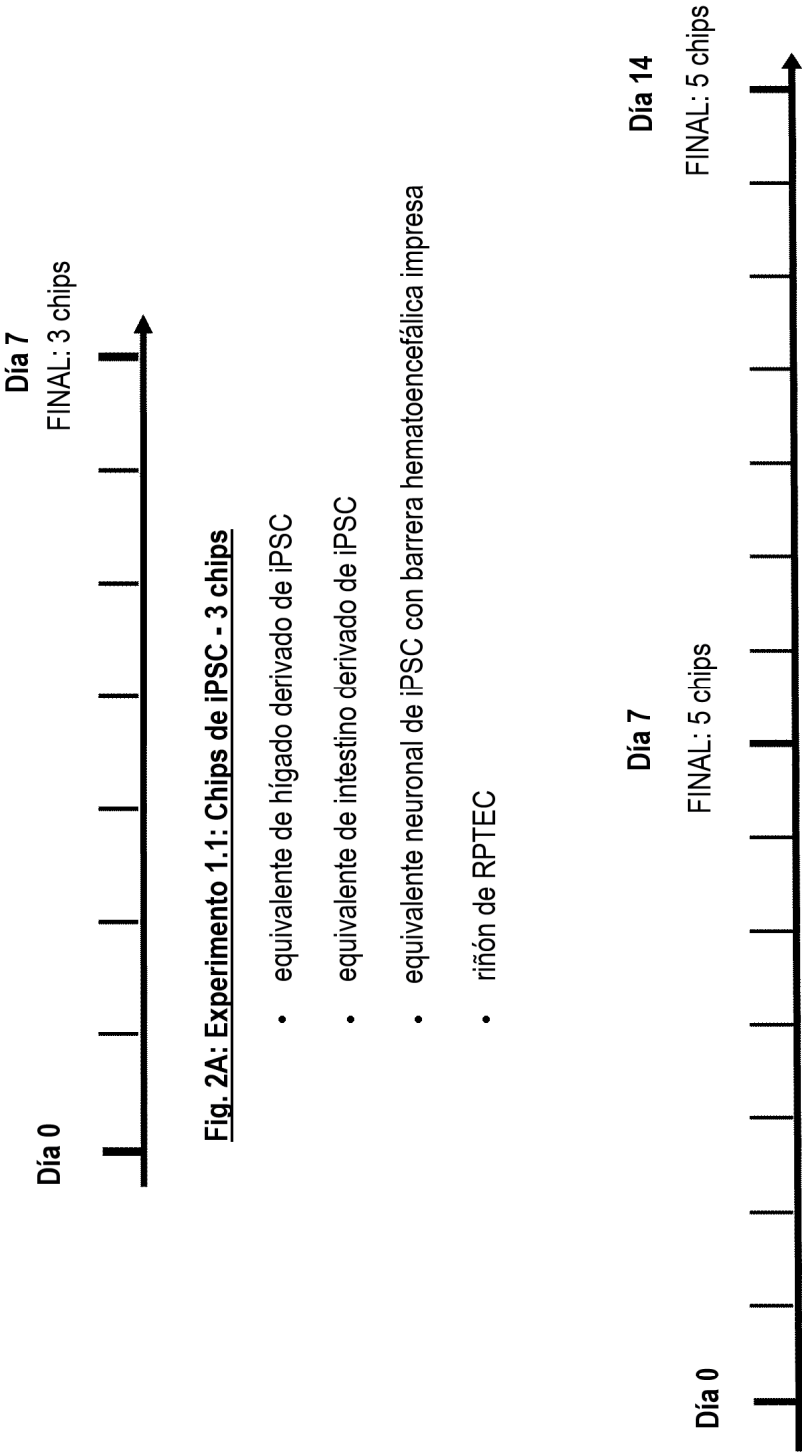


Fig. 2 (cont.): Diseño experimental de chips de iPSC - Experimento 2

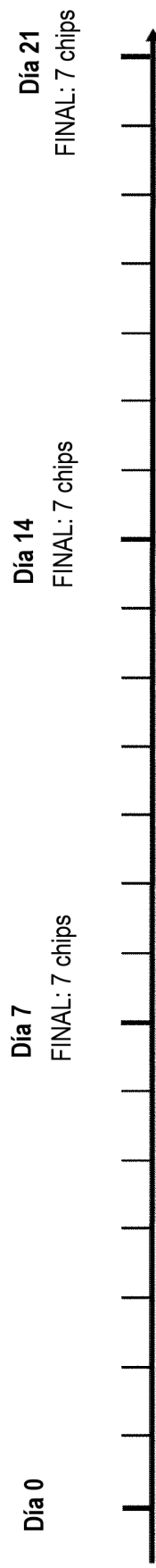


Fig. 2B: Experimento 2: Chips de iPSC - 21 chips

- equivalente de hígado derivado de iPSC
- equivalente de intestino derivado de iPSC
- equivalente neuronal derivado de iPSC con barrera hematoencefálica
- equivalente renal derivado de iPSC

Fig. 3: Concentración de glucosa y actividad de LDH de los experimentos 1.1 y 1.2, medidas diariamente en el compartimento apical del equivalente intestinal, en el reservorio de medio “de sangre” y en el reservorio de medio “de orina”.

Fig. 3A: Experimento 1.1: Chips de iPSC - chips

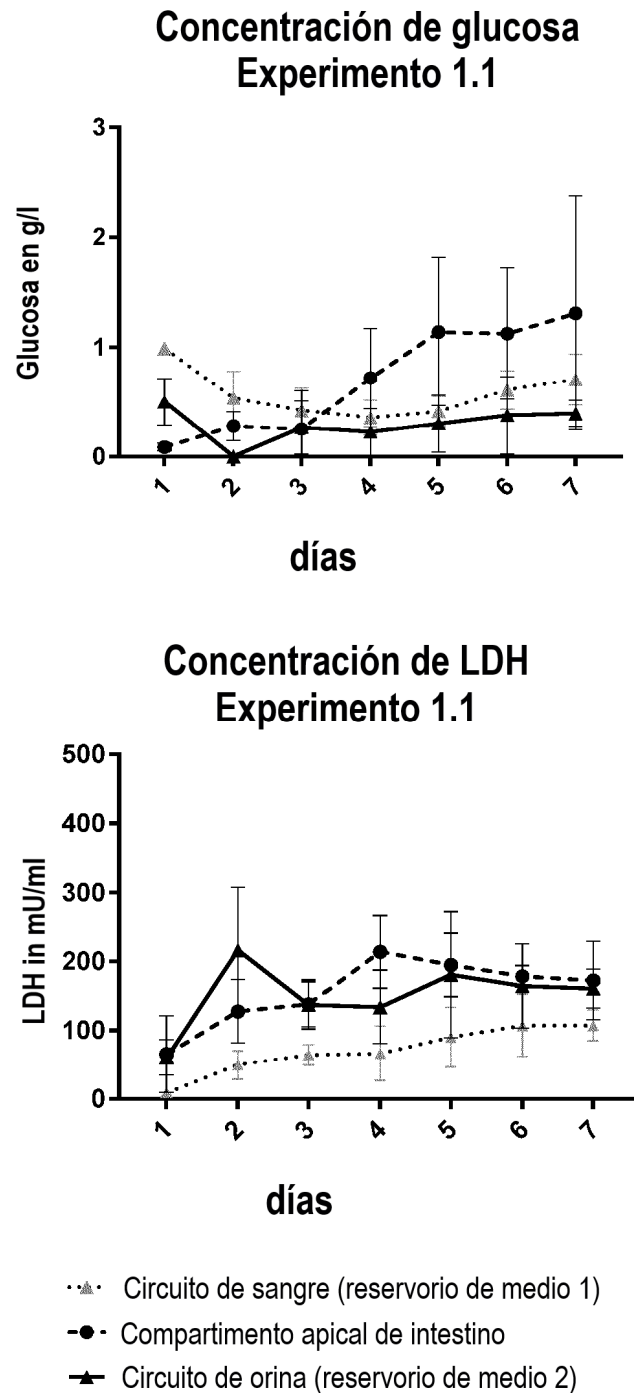


Fig. 3 (cont.): Concentración de glucosa y actividad de LDH de los experimentos 1.1 y 1.2, medidas diariamente en el compartimento apical del equivalente intestinal, en el reservorio de medio “de sangre” y en el reservorio de medio “de orina”.

Fig. 3B: Experimento 1.2: Chips de tejido primario - 10 chips

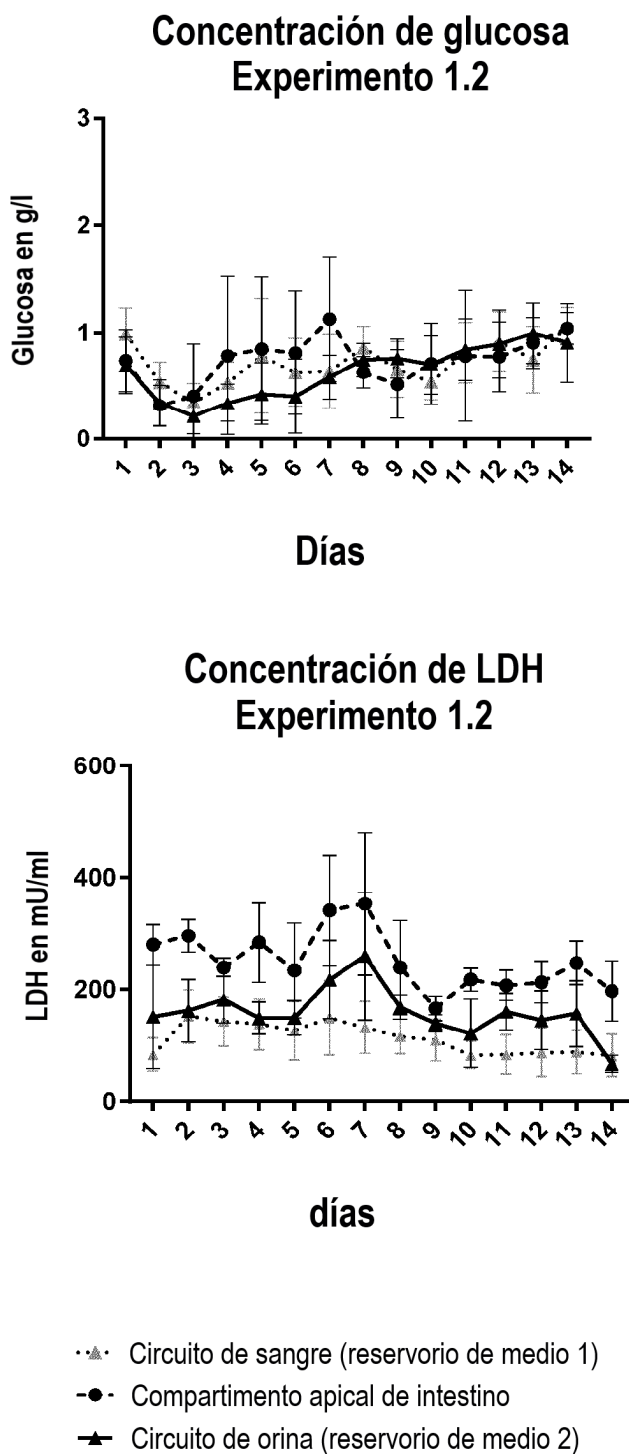
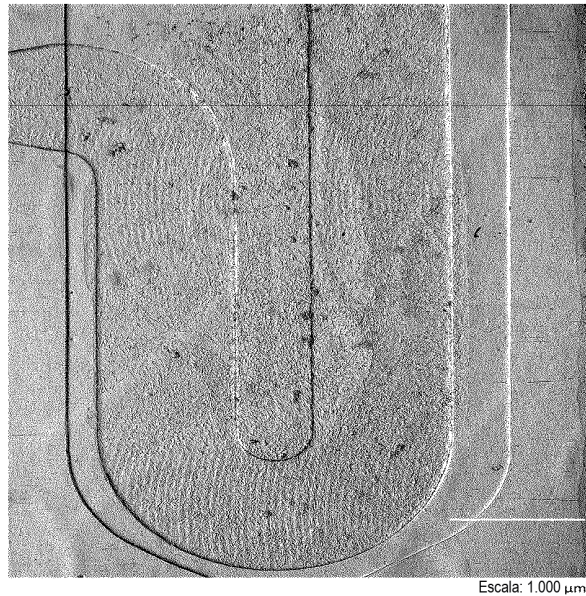
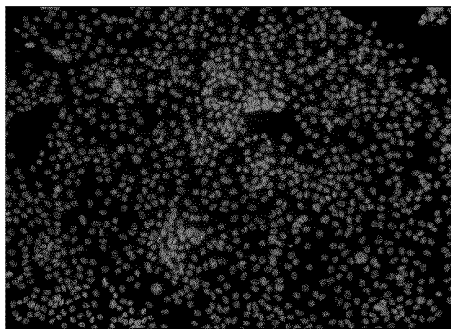


Fig. 4: Equivalente tubular renal sembrado completamente con RPTEC humanas (experimento 1.1, día 7). **A:** imagen de fondo claro (BF) el día 7 de cultivo. **B-D:** tinciones inmunohistológicas de RPTEC el día 14 (experimento 1.2) **B:** núcleo teñido con DAPI; **C:** membranas celulares teñidas con NaK-ATPasa; **D:** citoesqueleto teñido con citoqueratina 8/18.

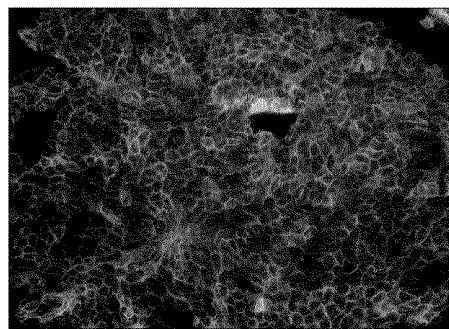
A: BF



B: DAPI



C: NaK-ATPasa



D: Citoqueratina 8/18

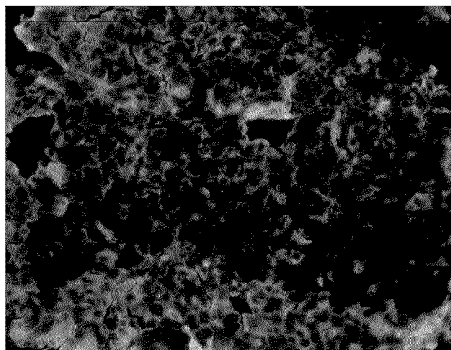


Fig. 5: Concentración de aspartato transaminasa (AST) medida en el circuito “de sangre” en el reservorio de medio 1 y en el circuito “de orina” en el reservorio de medio 2.

Experimento 2: Chips de iPSC - 21 chips

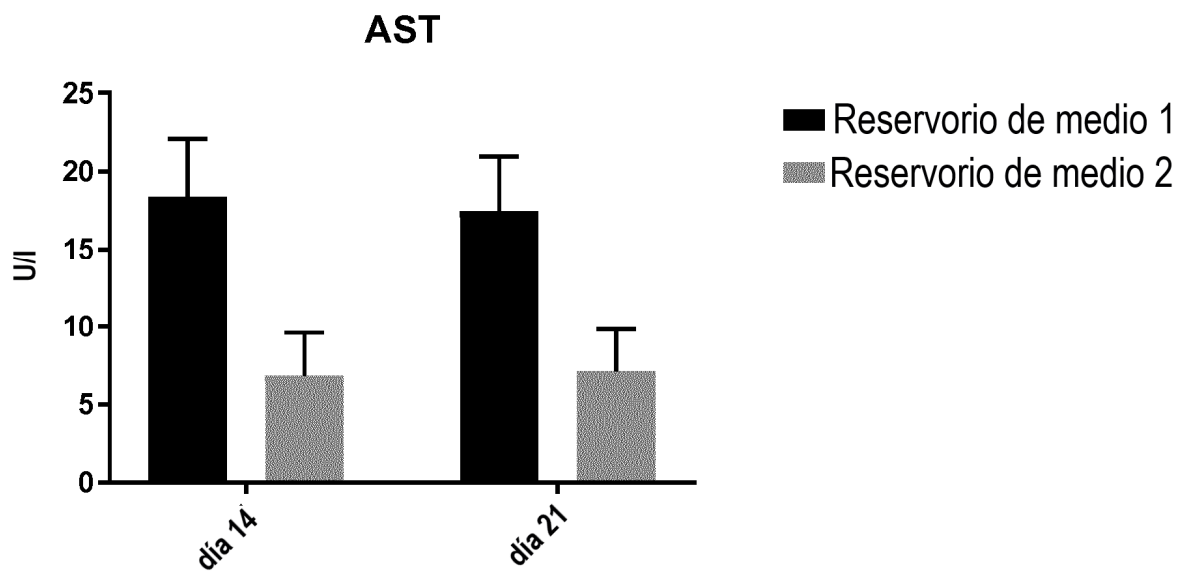
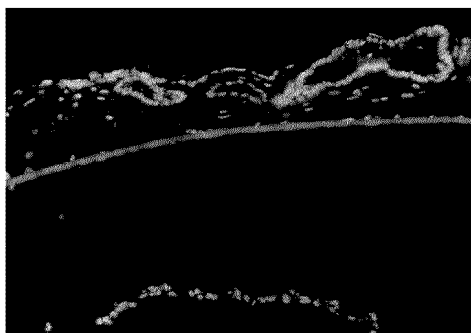
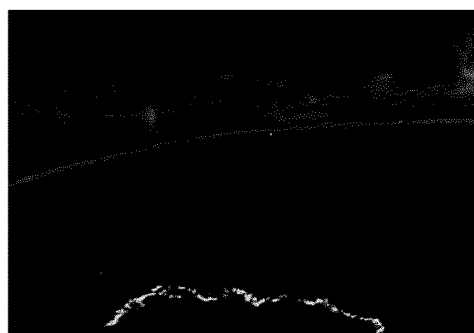


Fig. 6: Examen inmunohistológico a modo de ejemplo de un equivalente de intestino derivado de iPSC con células endoteliales primarias el día 7 del cultivo de chip ADME-N (experimento 1.1). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** células endoteliales primarias teñidas para CD31; **C:** organoides intestinales derivados de iPSC teñidos para NaK-ATPasa. **D:** núcleo teñido con DAPI; **E:** organoides intestinales derivados de iPSC teñidos para Cyp3A4; **F:** fibroblastos derivados de iPSC teñidos para vimentina.

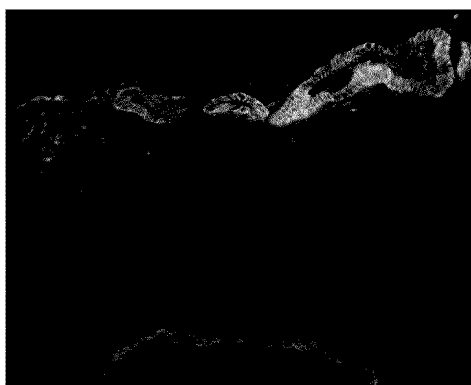
A: DAPI



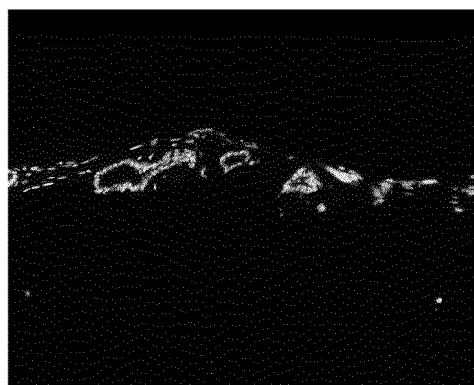
B: CD31



C: NaK-ATPasa



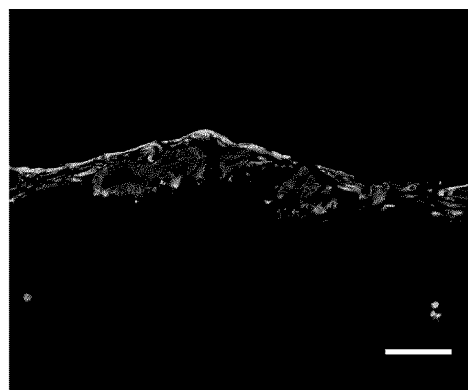
D: DAPI



E: Cyp3A4



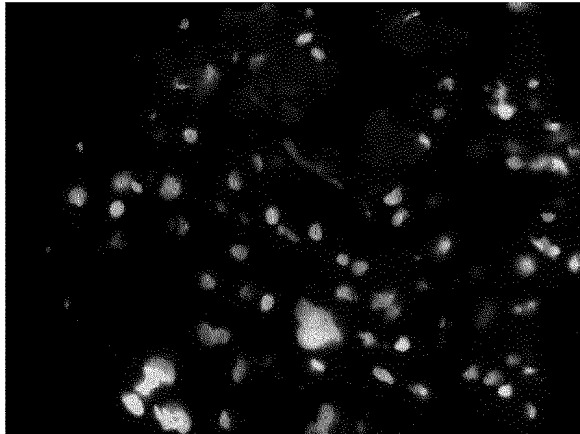
F: Vimentina



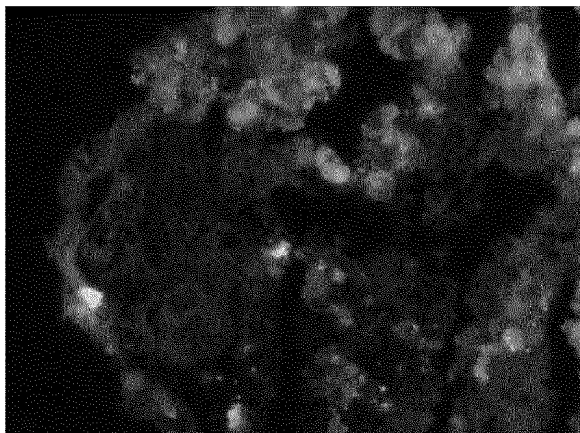
Escala: 100 μ m

Fig. 7: Examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalentes de hígado primarios (de InSphero) cultivados durante dos semanas en el chip ADME-N (experimento 1.2). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** albúmina; **C:** Cyp3A4.

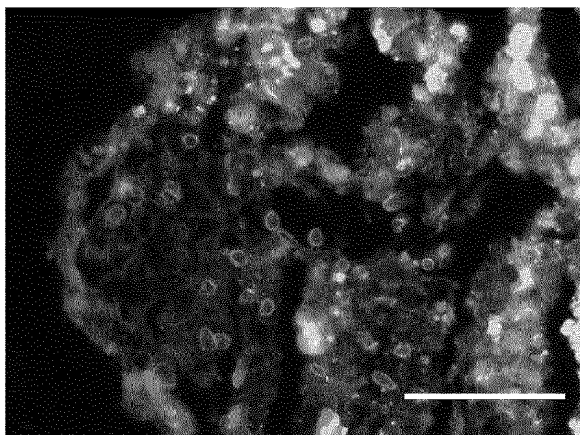
A: DAPI



B: Albúmina



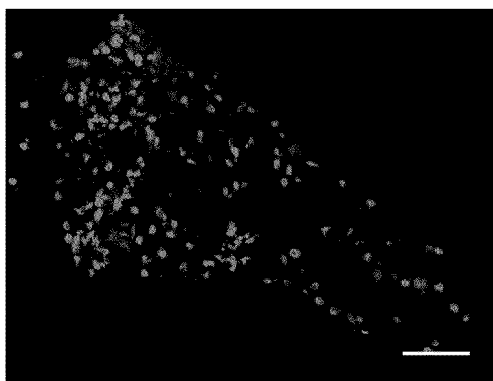
C: Cyp3A4



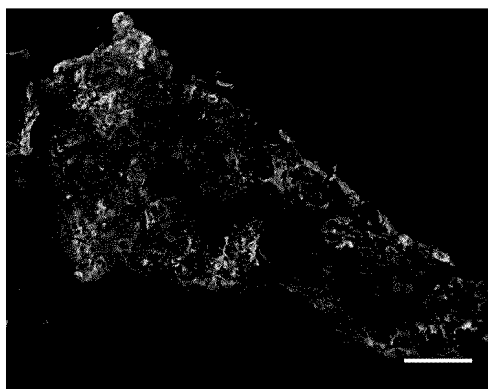
Escala: 100 μ m

Fig. 8: Examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalente de hígado derivado de iPSC cultivado durante tres semanas en el chip ADME-N (experimento 2). Todas las células se derivan del mismo donante. **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** fibroblastos derivados de iPSC teñidos para vimentina; **C:** citoesqueleto de hepatocitos teñido con citoqueratina 8/18, **D:** núcleo teñido con DAPI; **E:** uniones estrechas teñidas con ZO-1; **F:** albúmina.

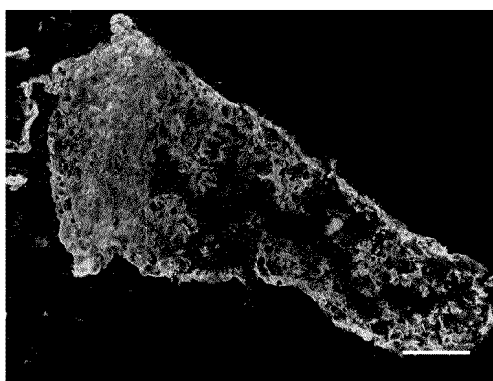
A: DAPI



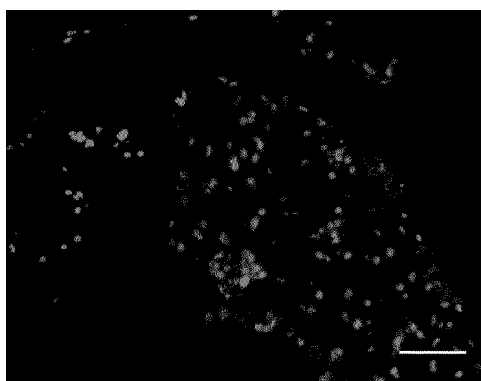
B: Vimentina



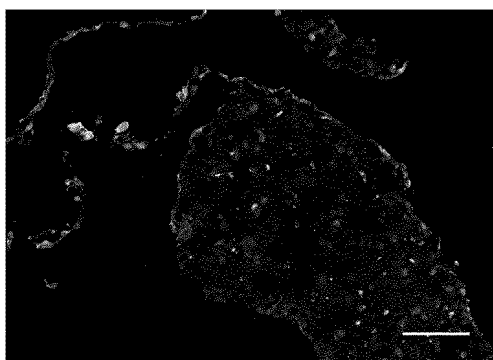
C: Citoqueratina 8/18



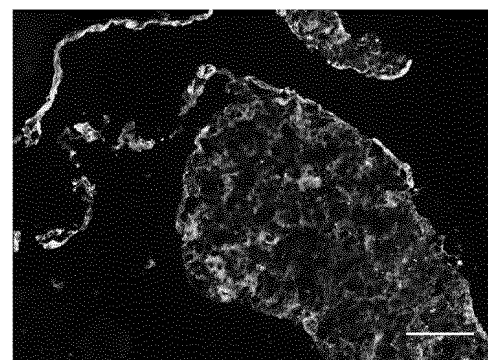
D: DAPI



E: ZO-1



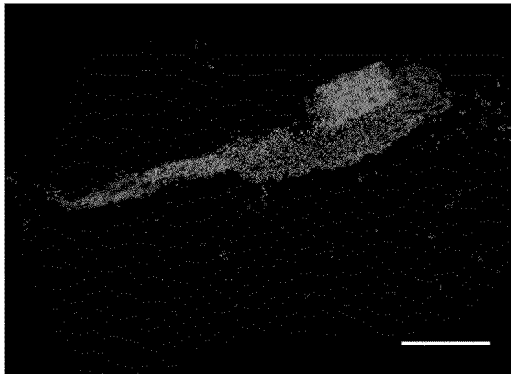
F: Albúmina



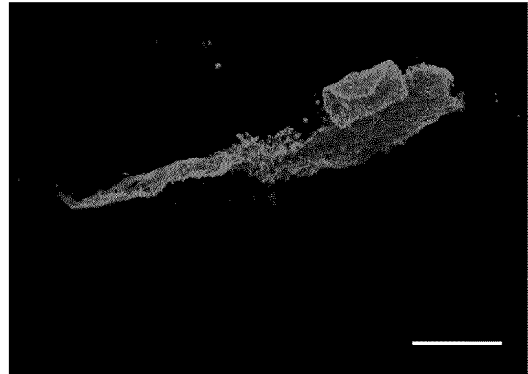
Escala: 100 μ m

Fig. 9: Examen inmunohistológico a modo de ejemplo de equivalentes neuronales derivados de iPSC cultivados durante dos semanas en el chip ADME-N (experimento 1.2). **A:** núcleo teñido con DAPI; **B:** células neuronales teñidas con b-tubulina III; **C:** célula endotelial primaria teñida con vWF (factor de von Willebrand); **D:** imagen de fondo claro de esferoides neuronales que se encuentran sobre hidrogel impreso que incluye células endoteliales primarias.

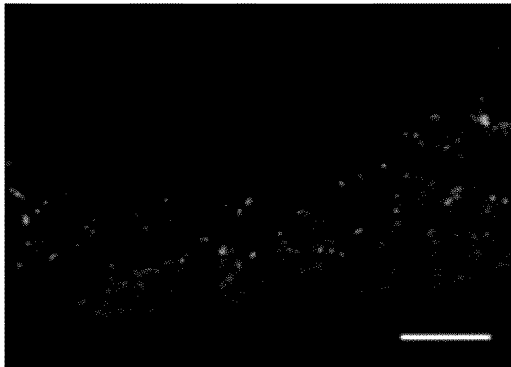
A: DAPI



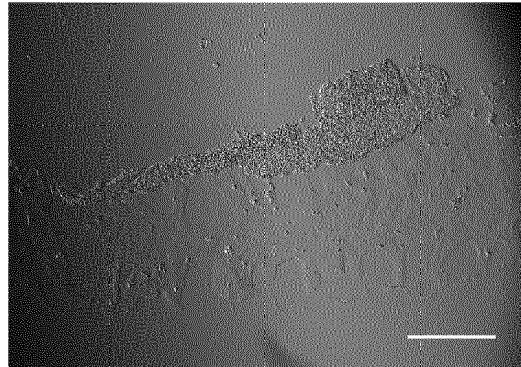
B: B-tubulina III



C: vWF



D: BF



Escala: 250 μ m

Fig. 10: Concentración de LDH medida en el compartimento apical del equivalente intestinal, en el circuito de sangre en el reservorio de medio 1 y en el circuito de orina en el reservorio de medio 2. Para el experimento 2. La función de barrera del equivalente de intestino y del equivalente renal se muestra mediante diferentes concentraciones de LDH en los tres compartimentos.

Experimento 2: Chips de iPSC - 21 chips

Concentración de LDH Experimento 2

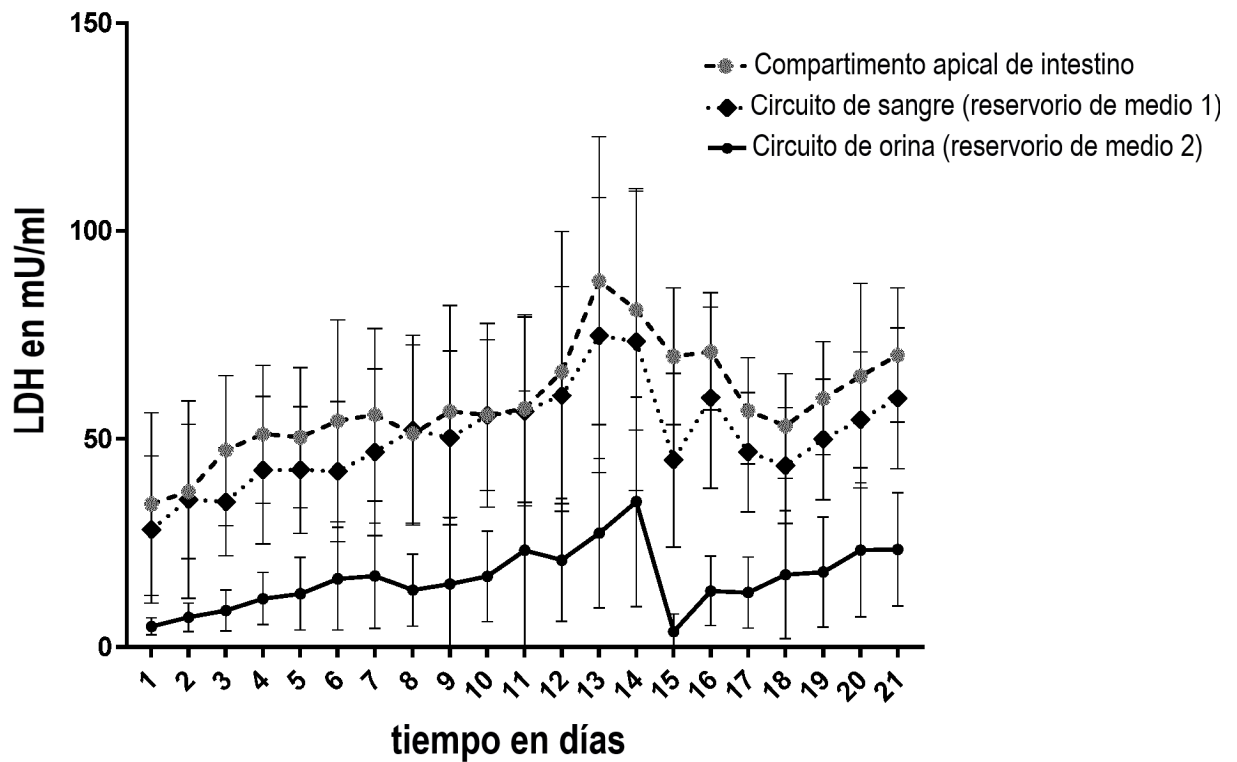
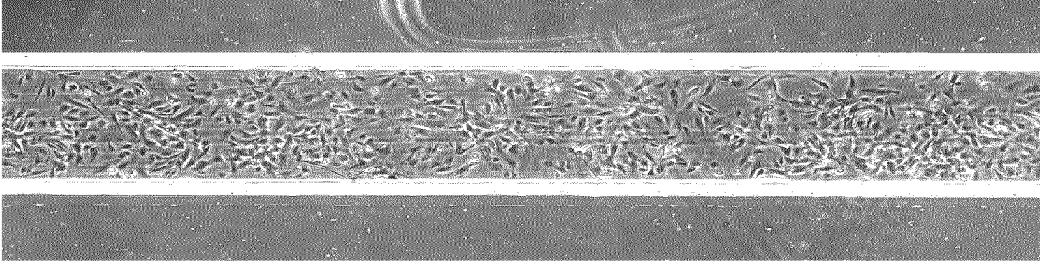
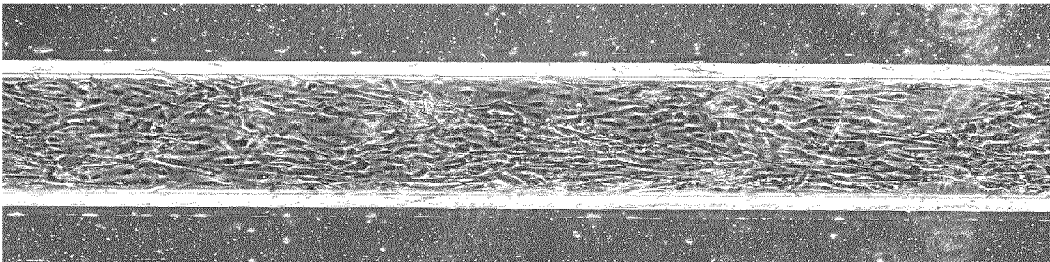


Fig. 11: Las células endoteliales derivadas de iPSC se elongan en los canales del chip de múltiples órganos. Alta expresión del marcador endotelial CD31 el día 8 de cultivo de chip.

Día 0



Día 8



Día 8:

DAPI

CD31 (Escala 100 μ m)

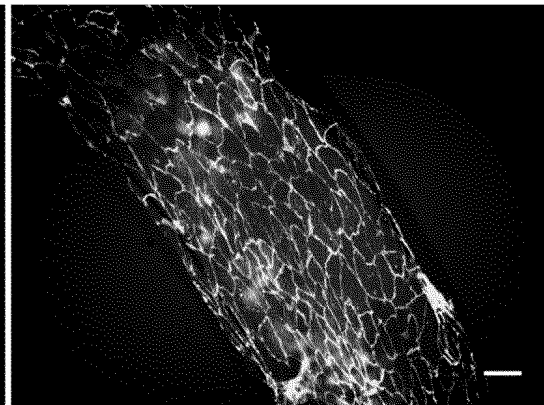
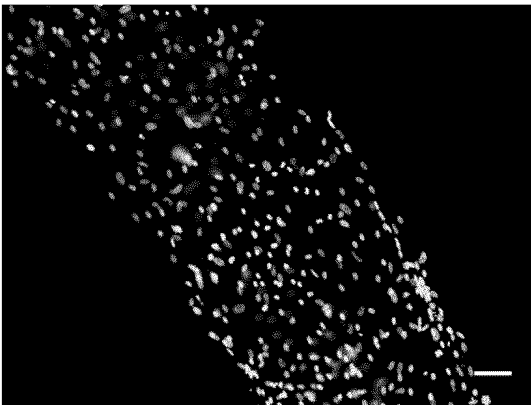


Fig. 12: Vista esquemática en sección transversal de un chip ADME. A = administración, D = distribución, M = metabolismo, E = excreción.

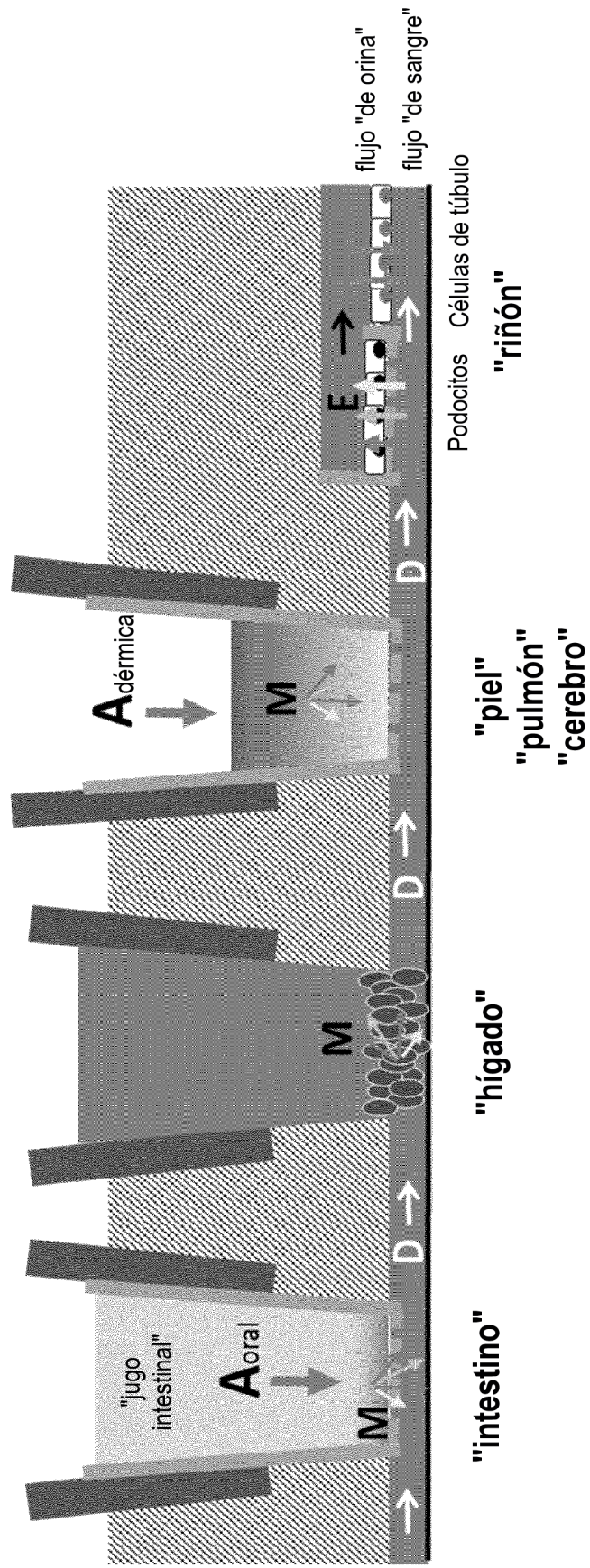


Fig. 13: Imágenes de inmunofluorescencia tras la diferenciación de hepatocitos derivados de iPSC y la formación de esferoides 3D con fibroblasto derivado de iPSC y células endoteliales derivadas de iPSC (equivalentes de hígado). "*Vimentina*": hepatocitos derivados de iPSC con fibroblastos derivados de iPSC (tinción de vimentina). "*CD31*": hepatocitos derivados de iPSC con células endoteliales derivadas de iPSC (tinción de CD31). Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. Escala = 100 μ m.

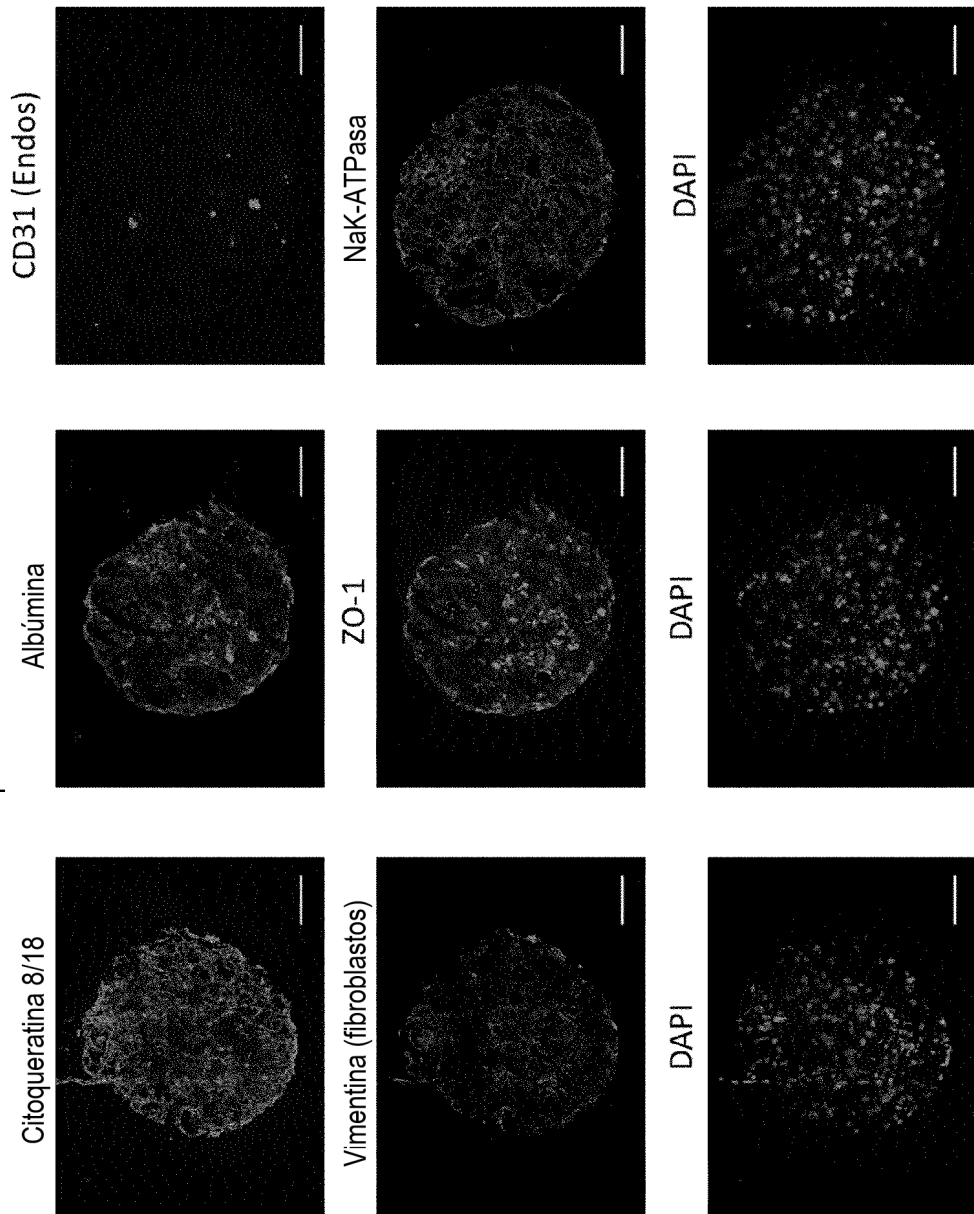


Fig. 14: Niveles de transcripción de genes marcadores hepáticos seleccionados en equivalentes de hígado derivados de iPSC (hepatocitos derivados de iPSC). Niveles de transcripción analizados mediante qPCR.

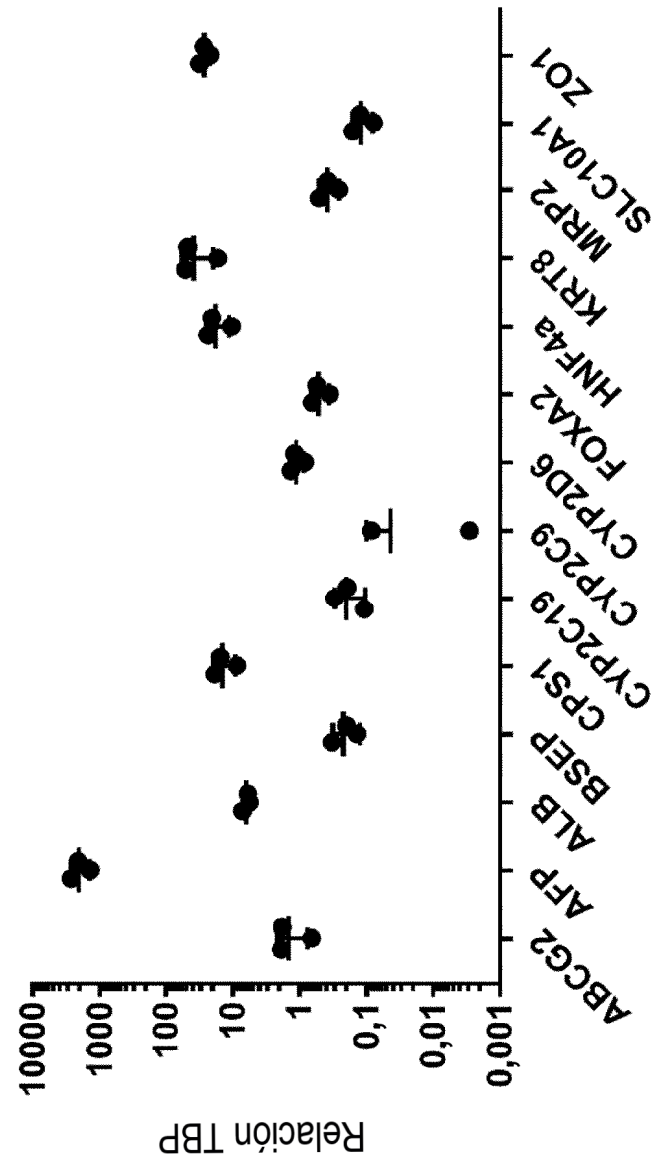


Fig. 15: Capacidad de metabolización de equivalentes de hígado 3D derivados de iPSC para metabolizar propranolol para dar glucurónido de propranolol y ácido alfa-naftoxiláctico en un único cultivo.

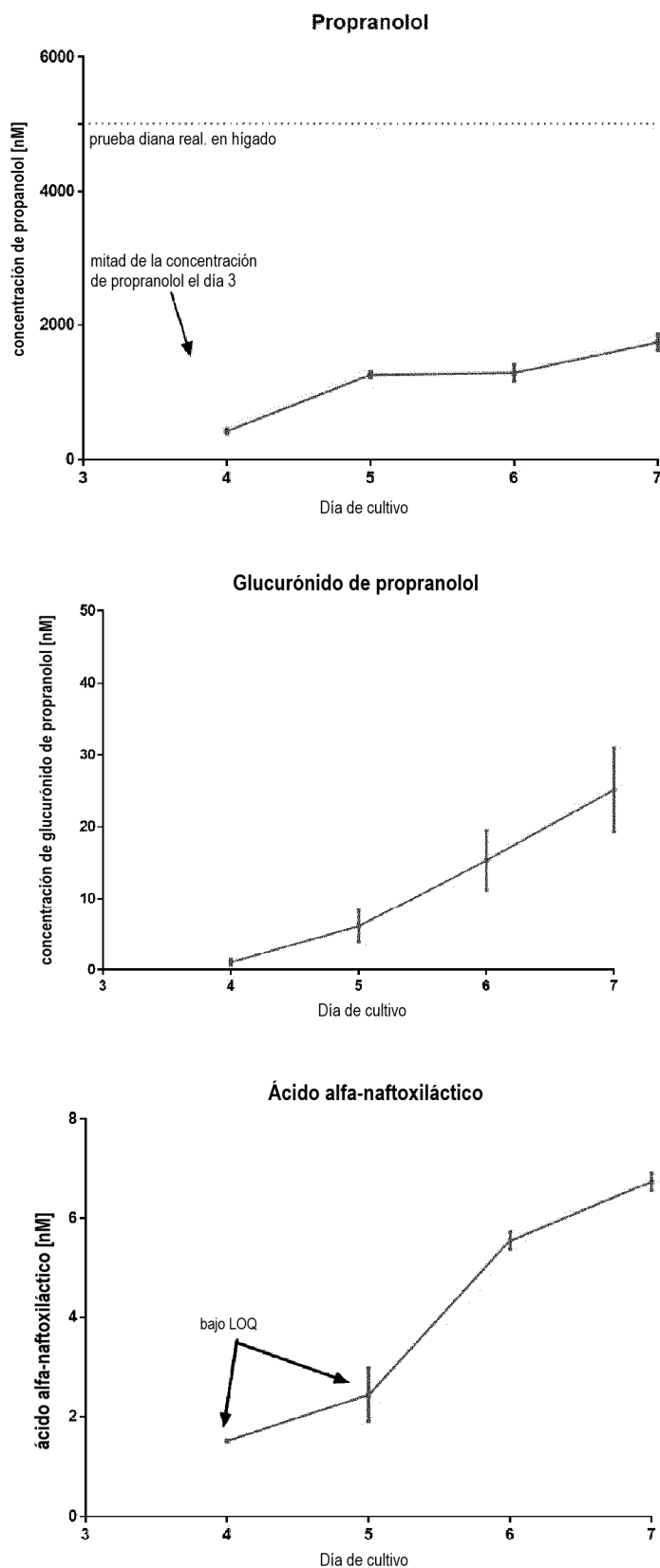


Fig. 16: Desarrollo de modelo de inserto intestinal. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. Escala: 500 μ m.

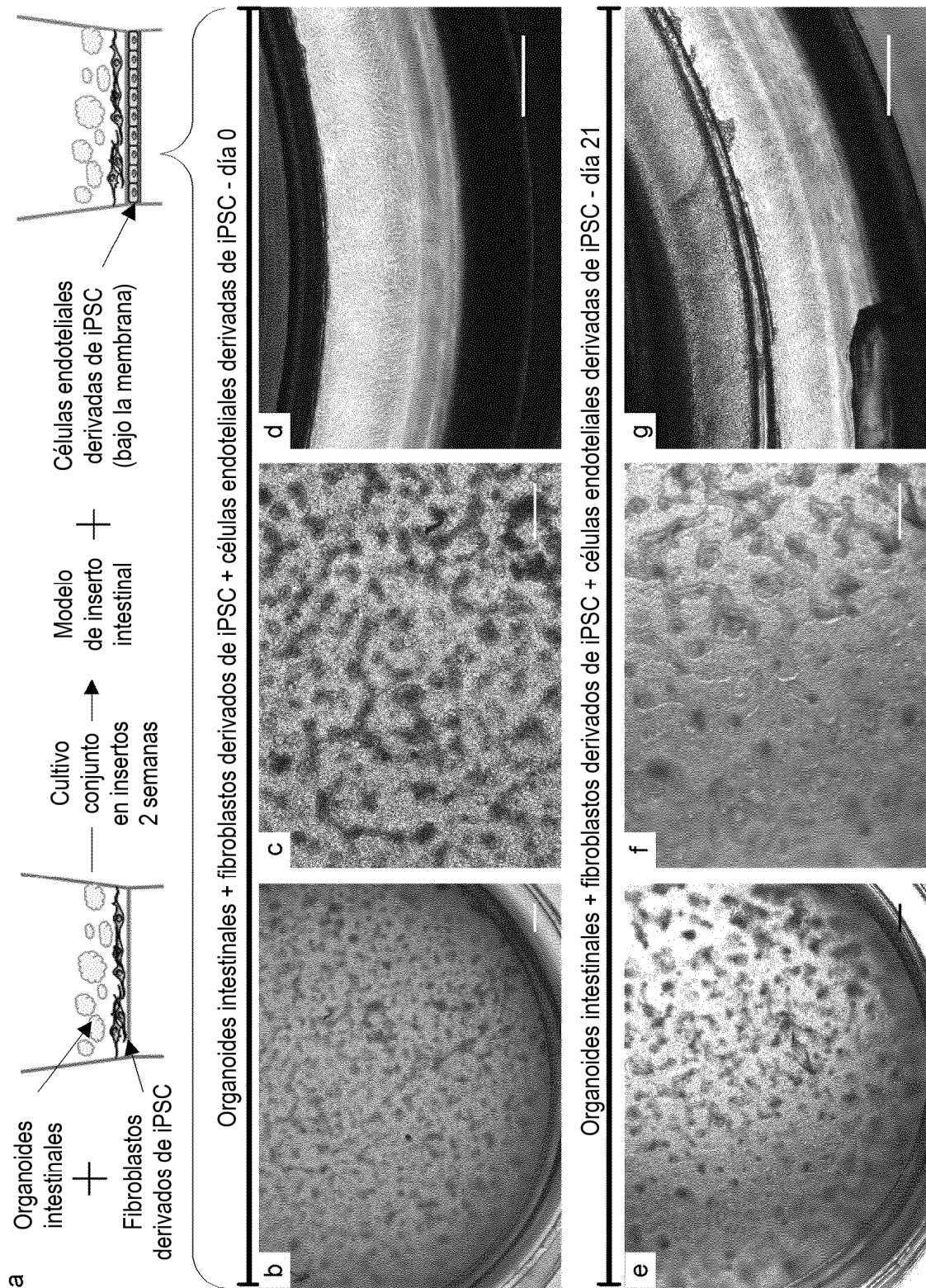
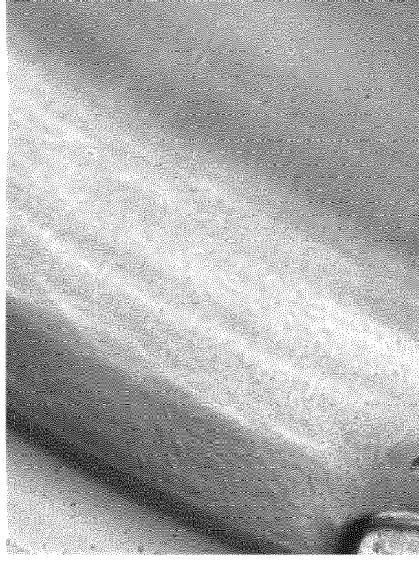
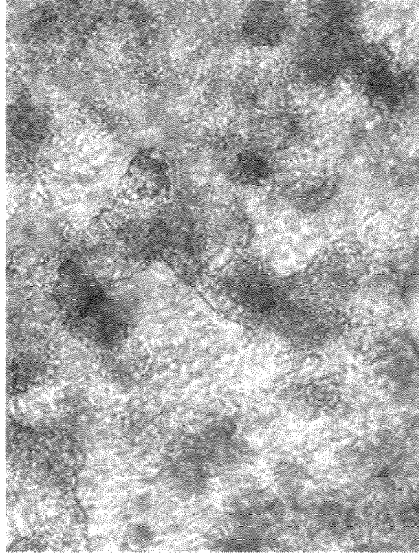


Fig. 17: Barrera de hidrogel bioimpresa con organoides intestinales derivados de iPSC, fibroblastos derivados de iPSC y células endoteliales primarias.

+ células endoteliales



+ fibroblastos derivados de iPSC en hidrogel



organoides intestinales derivados de iPSC

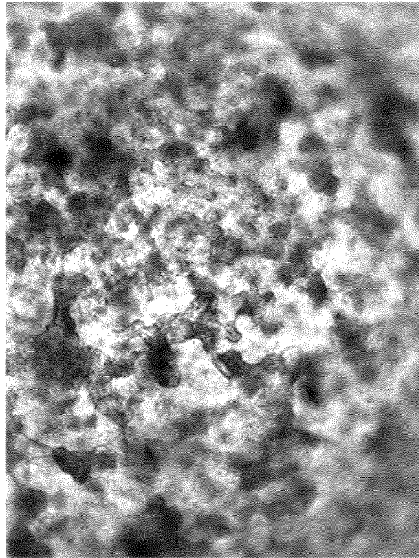
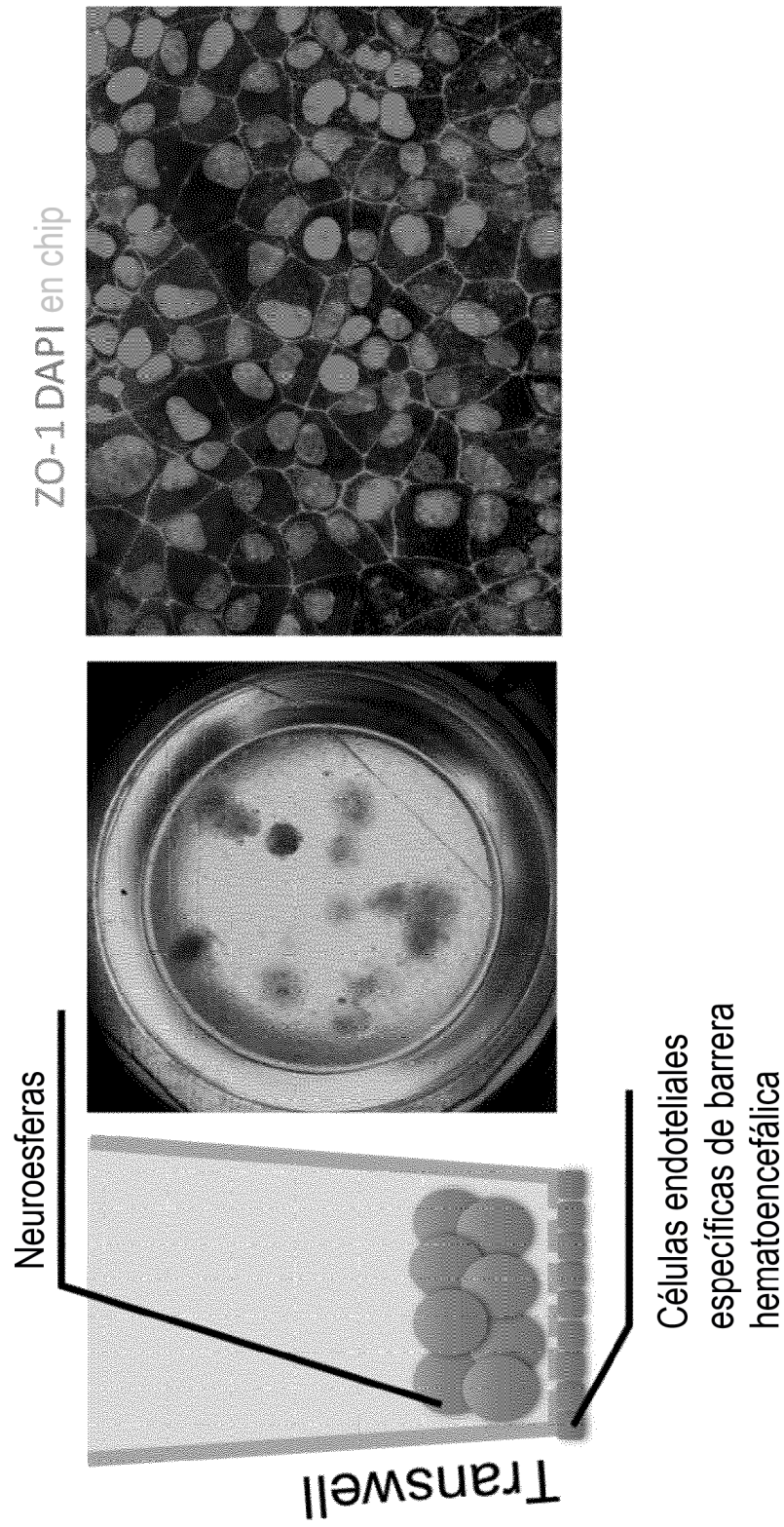


Fig. 18: Barrera hematoencefálica derivada de iPSC constituida por neuroesferas y células endoteliales. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC.



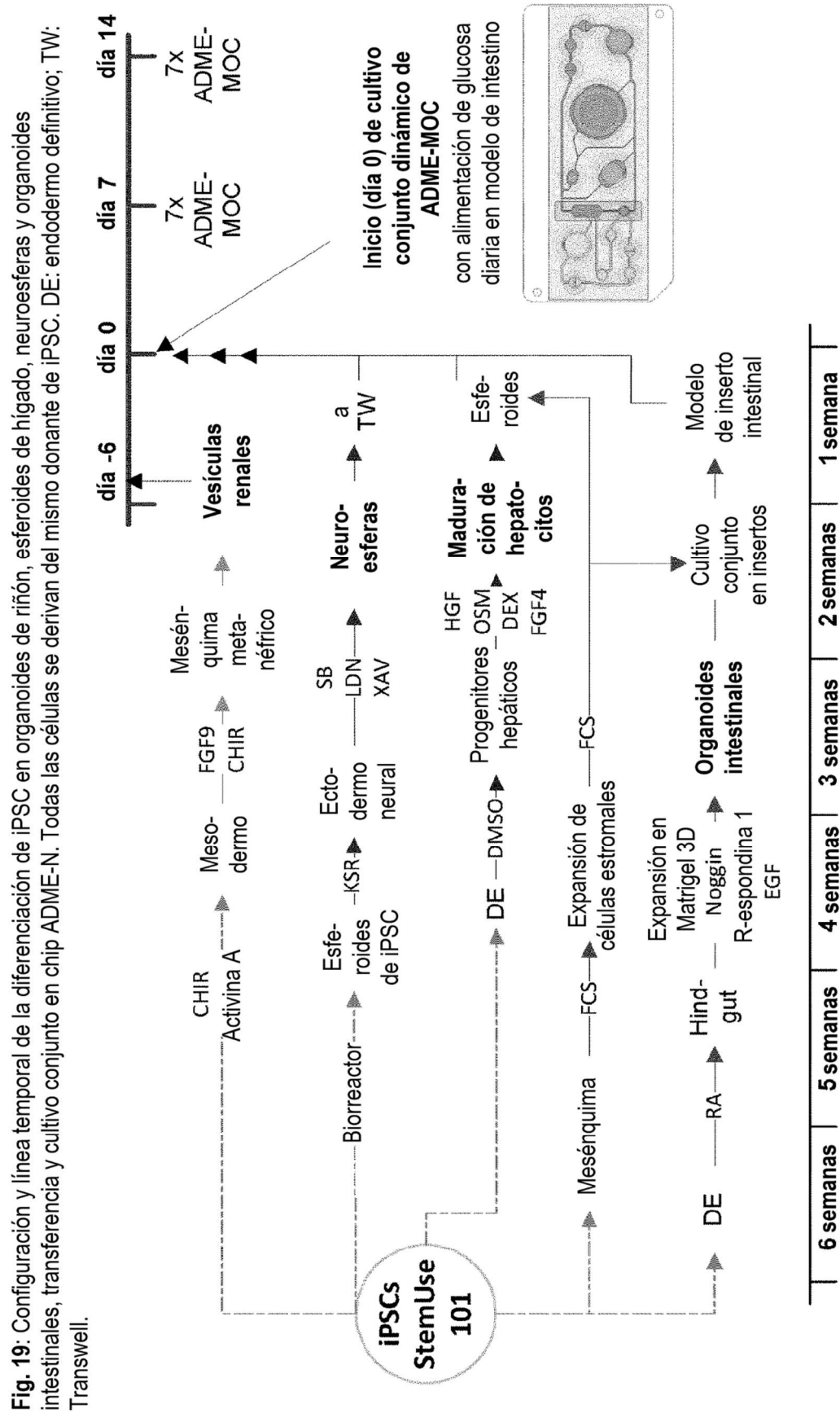


Fig. 20: Caracterización por inmunotinción del modelo de hígado, intestinal, renal y neuronal cultivado conjuntamente en el chip ADME-N durante 14 días (véase el exp. 2). Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. **a - c:** modelo de hígado: a: albúmina, ZO-1, b: HNF4 α , SLC10A1, y c: Ki67, TUNEL; **d - f:** modelo intestinal: d: CDX2, Na⁺/K⁺-ATPasa, e: citoqueratina 8/18, vimentina, y f: Ki67, TUNEL; **g - i:** modelo renal: g: citoqueratina 8/18, vimentina, h: acuaporina 1, Na⁺/K⁺-ATPasa, e i: Ki67, TUNEL; **j - l:** modelo neuronal: j: TUBB3, PAX6, k: nestina, y l: Ki67, TUNEL. Escala = 50 μ m. Las líneas de puntos ilustran la membrana de inserto permeable.

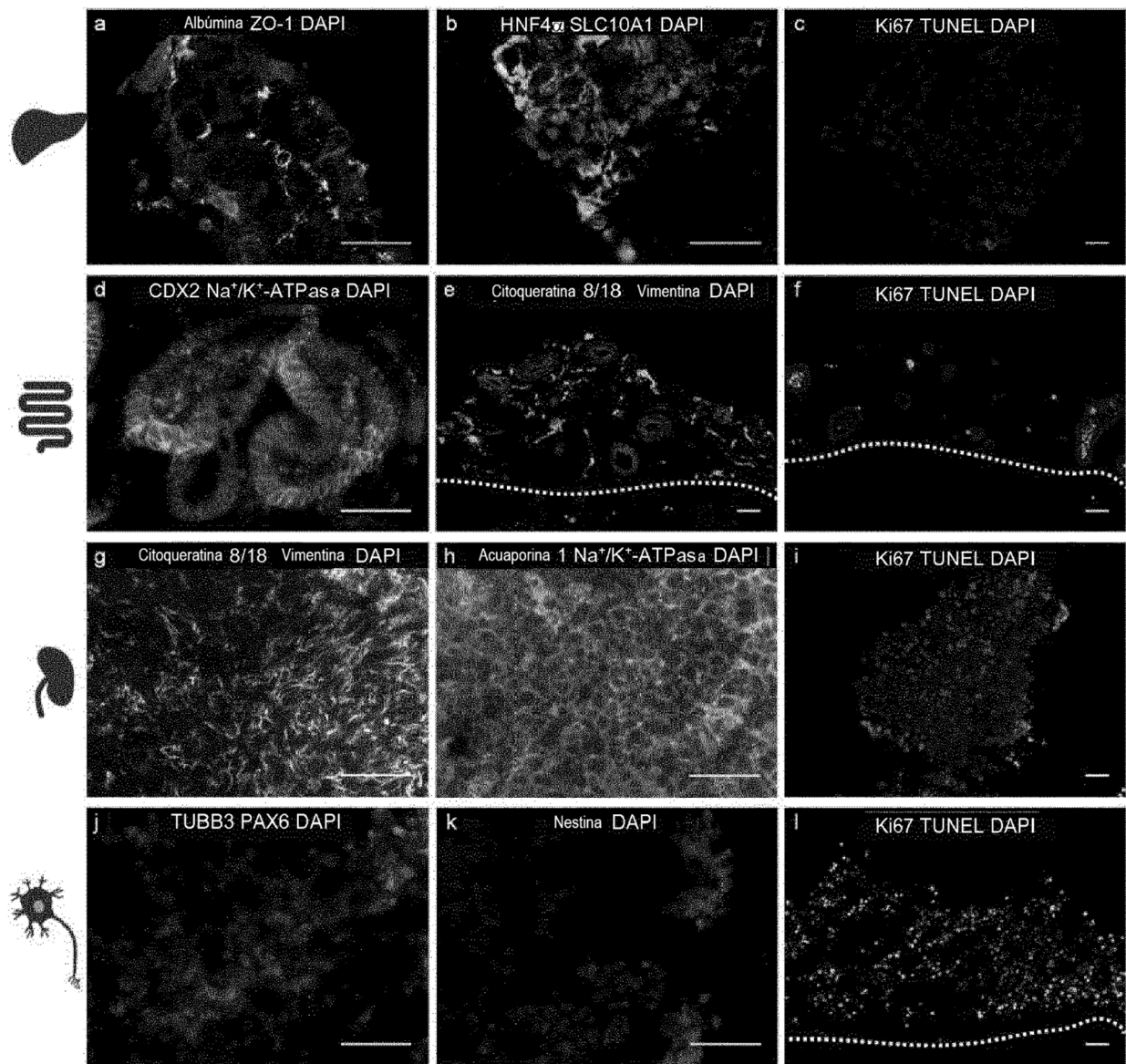


Fig. 21: Resultados de qPCR del cultivo conjunto en el chip ADME-N del modelo intestinal, de hígado, renal y de cerebro derivado de iPSC. Todas las células se derivan del mismo donante de iPSC. Los datos están normalizados con respecto a la EF1 (a, c) o TBP (b, d) de mantenimiento. N = 3 - 6 para el día 0, 7 y 14; N = 1 - 3 para iPSC, y N = 1 para los controles positivos representados. ND: ninguna señal detectada. Se usó ANOVA unidireccional ordinario con prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el análisis estadístico. En cada uno de a) a d): las barras de izquierda a derecha son "iPSC", "día 0", "día 7", "día 14" y el respectivo "control positivo".

