

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 144**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**G01N 33/553** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2012 PCT/US2012/023859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012 E 12742728 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2670856**

54 Título: **Métodos y composiciones para la captura y liberación altamente específicas de materiales biológicos**

30 Prioridad:

**03.02.2011 US 201161439166 P**

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

**23.10.2018**

73 Titular/es:

**NORTHEASTERN UNIVERSITY (100.0%)  
360 Huntington Avenue 960 Renaissance Park  
Boston, MA 02115-5000, US**

72 Inventor/es:

**MURTHY, SHASHI, K.;  
HATCH, ADAM y  
HANSMANN, GEORGE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 687 144 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

Métodos y composiciones para la captura y liberación altamente específicas de materiales biológicos

## 5 Campo de la invención

La invención se dirige generalmente a la medicina y la ingeniería. Más específicamente, el campo se dirige al aislamiento de materiales biológicos, tales como las células, para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

## 10 Antecedentes de la invención

15 Las técnicas de aislamiento celular son un componente esencial en el estudio de poblaciones específicas, que permite las investigaciones de crecimiento, genómicas y proteómicas. El desprendimiento de las células adheridas a cualquier superficie requiere la aplicación de una fuerza que es de mayor magnitud que la de la adhesión. Se ha demostrado que las fuerzas de cizallamiento de fluidos constituyen un método simple para el desprendimiento de las células. Aunque este es un método local y simple para la liberación de células, la exposición excesiva a las fuerzas de cizallamiento de fluido resulta en daño celular y reducción de la viabilidad. Un enfoque alternativo es escindir el ligando proteico que se une a la superficie de captura mediante el uso de enzimas, tal como la tripsina. Sin embargo, la exposición enzimática puede causar cambios morfológicos debido a una discontinuidad de la membrana celular y del glicocálix, que conduce a pérdidas en la actividad celular. Además, se ha demostrado que la digestión enzimática afecta directamente el comportamiento y la composición química de las propias células.

25 Las técnicas actuales para el aislamiento celular, tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), tienen desventajas en campos tales como la ingeniería de tejidos. El método convencional de aislamiento celular, FACS, presenta un rendimiento limitado que puede ser perjudicial para la viabilidad celular. El método FACS se limita en su capacidad de multiplexar, que conduce a que el tiempo de procesamiento de la muestra disminuya sustancialmente.

30 Estas limitaciones ilustran la necesidad de establecer una técnica general para capturar y liberar materiales biológicos, tales como células, en dispositivos a microescala sin grandes perturbaciones físicas o químicas en el entorno celular. Persiste la necesidad de superficies y geles que tengan alta especificidad para células particulares y que permitan la liberación de las células capturadas sin alterar el comportamiento y la composición de las células. Plouffe, B.D.; Brown, M.A.; Iyer, R.K.; Radisic, M.; Murthy, S.K.; Lab on a Chip, 2009, 9, 1507-1510 describen el uso de hidrogeles funcionalizados con péptidos en combinación con el quelante divalente que ofrece una metodología eficaz para la captura y liberación de células dentro de canales microfluidicos.

40 Mahou, R.; Lacik, I.; Wandrey, C.; XVIIth International Conference on Bio encapsulation, 24 September 2009, cartel P 63, Groningen, Holanda, describen la síntesis y las propiedades físicas de un hidrogel de alginato-poli(etilenglicol) para la inmovilización y la administración.

45 El documento WO 98/12228 describe materiales que contienen cadenas de polisacáridos, particularmente, alginato o cadenas de alginato modificadas. Las cadenas de polisacáridos pueden incluirse como cadenas laterales o cadenas auxiliares a partir de un polímero de la cadena principal, que puede ser, además, un polisacárido. Además, las cadenas de polisacáridos pueden reticularse entre las cadenas laterales, las cadenas auxiliares y/o las cadenas principales. Estos materiales y los materiales de alginato no modificados, o modificados de cualquier otra manera, se modifican mediante el enlace covalente en un sitio de una molécula biológicamente activa para la adhesión celular u otra interacción celular. Además, se describen procesos para la preparación de estos materiales de alginato y los métodos para usarlos, particularmente para aplicaciones de trasplante de células e ingeniería de tejidos.

50 El documento WO 03/040235 describe el biomaterial que comprende una red polimérica tridimensional que se obtiene a partir de la reacción de al menos una primera y una segunda moléculas precursoras. La primera molécula precursora es al menos un componente ramificado trifuncional que comprende al menos tres brazos sustancialmente similares en peso molecular, y la segunda molécula precursora es al menos un componente bifuncional. La relación del peso equivalente de los grupos funcionales de la primera y segunda moléculas precursoras está en un intervalo de entre 0.9 y 1.1. El peso molecular de los brazos de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y la funcionalidad de los puntos de ramificación se seleccionan de manera que el contenido de agua de las redes poliméricas esté entre el % en peso de equilibrio y 92 % en peso del peso total de la red polimérica después que termina la absorción de agua. Las matrices sintéticas se describen por su utilidad en las aplicaciones de cicatrización de heridas.

60 El documento EP2177236 describe un método para la preparación de un hidrogel biocompatible de gelificación rápida. En donde, el hidrogel se forma por un rápido entrecruzamiento químico mediante el uso de la mezcla y de la reacción de reticulación química, en condiciones específicas, entre los diversos componentes del compuesto activo. El método de preparación comprende las siguientes etapas: (1) La solución que contiene derivados macromoleculares tiolados biocompatibles (componente A) y los agentes de reticulación con tiol reactivo biocompatibles (componente B) se mezclan mutuamente para formar una mezcla reactiva con las condiciones de reticulación especificadas; (2) la mezcla reactiva forma el hidrogel. Se describe, además, un método de preparación para un aerosol novedoso de hidrogel de gelificación

rápida, y una aplicación, en Yamaguchi, N.; Kiick, K.L.; *Biomacromol.*, 2005, 6(4), 1921-1930 se describe la síntesis de un copolímero en estrella de poli(etilenglicol) (PEG) modificado con heparina que puede usarse en el ensamblaje de redes de hidrogel bioactivo a través de estrategias múltiples y que es competente, además, para la administración de factores de crecimiento bioactivos.

5

El documento WO2010/124227 describe un método para capturar una Célula Tumoral Circulante (CTC) a partir de una muestra que incluye introducir una muestra en un dispositivo microfluídico que tiene una superficie de captura celular y una superficie de modificación de flujo en condiciones que le permiten a una CTC unirse a un agente inductor del rodamiento celular y a un agente de captura dispuesto en la superficie de captura de la célula. La superficie de modificación de flujo induce un flujo de rotación dentro de la muestra a medida que fluye a través del dispositivo microfluídico.

10

#### Resumen

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para la captura y liberación de materiales biológicos, tales como células. En algunas modalidades, la captura es altamente específica.

15

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un hidrogel de alginato en el que el ácido algínico está en presencia de cationes divalentes; en donde el hidrogel de alginato comprende polietilenglicol ramificado, en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga con agentes de unión, y en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga con moléculas de ácido algínico en el hidrogel.

20

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para separar células que comprende: permitir que un hidrogel de alginato que comprende moléculas de ácido algínico, polietilenglicol ramificado, cationes divalentes y un agente de unión se formen in situ en un dispositivo microfluídico, en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga con el agente de unión, y el polietilenglicol ramificado se conjuga con moléculas de ácido algínico en el hidrogel; pasar una muestra que comprende una célula de interés a través del dispositivo microfluídico; permitir que el agente de unión dentro del hidrogel capture la célula de interés; y liberar la célula de interés capturada mediante el uso de un agente liberador.

25

30

#### Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras se presentan solamente con fines de ilustración, y no se pretende que sean limitativas:

La Figura 1 es una representación diagramática de un espectro infrarrojo de hidrogeles funcionalizados con PEG y anticuerpos (Geles II-VII) en comparación con una solución estándar de anticuerpos (0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL de anticuerpos). Considere que la medición es una medición masiva.

35

La Figura 2 es una representación diagramática de una medición cualitativa de anticuerpos accesibles dentro de los dispositivos microfluídicos recubiertos con hidrogel.

La Figura 3A es una representación diagramática que muestra el rendimiento de células progenitoras endoteliales (EPC) capturadas a partir de sangre completa dentro de los dispositivos microfluídicos recubiertos con hidrogeles funcionalizados con PEG y anticuerpos.

40

La Figura 3B es una representación diagramática que muestra la pureza de las EPC capturadas a partir de sangre completa dentro de los dispositivos microfluídicos recubiertos con hidrogeles funcionalizados con PEG y anticuerpos.

Las Figuras 4A-C son representaciones gráficas que muestran las diferencias estructurales en los diferentes tipos de geles. En la Figura 4A, todos los reactivos (que incluyen PEG, anticuerpo, ácido algínico) se combinan juntos en los tipos de Geles II-IV. En la Figura 4B, el Tipo de Gel V usa un protocolo de dos etapas en el que el PEG, el anticuerpo, el EDC y el sulfo-NHS se combinan en una primera y única etapa. En la Figura 4C, en los Tipos de Geles VI-VII se mezclaron previamente el PEG y el anticuerpo antes de mezclar los otros componentes.

45

Las Figuras 5A-C ilustran representaciones cualitativas de la suspensión inyectada y liberada antes y después del arreglo microfluídico. La población inyectada (representada en la Figura 5A) se limitó a una concentración de 100,000-200,000 células/mL debido a los efectos de sedimentación dentro del chip (representado en la Figura 5B) a las concentraciones respectivas. En la Figura 5C, las células se liberaron en placas de 24 pocillos, y se observó una disminución notable en la densidad celular. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m.

50

Las Figuras 6A-D ilustran que la optimización del alginato funcionalizado con anticuerpos permitió una eficacia de captura y rendimientos de pureza mejorados. La Figura 6A expone que las muestras y las formulaciones se dividieron en cinco escenarios, en cada uno se modifica una variable. La Figura 6B compara el rendimiento de pureza de estos escenarios con relación al de la población inyectada. La cuantificación del porcentaje de pureza se realizó mediante citometría de flujo con respecto a las células inyectadas (Figura 6C) y las células liberadas (Figura 6D).

55

Las Figuras 7A-F muestran la progresión de la edad de las células liberadas con respecto a la población no enriquecida en ausencia de la proteína Wnt3a. La progresión de los organoides no enriquecidos (representada por las Figuras 7A-C) produjo organoides similares a quistes más grandes rodeados por poblaciones extrañas. Las Figuras 7D-F representan la progresión de 4 días de los organoides enriquecidos derivados de la suspensión de células individuales. La Figura 7D representan la expansión de una célula individual en el día 2, la Figura 7E representa la hiperplasia inducida en el día 3, y la Figura 7F representa la formación de una pequeña cavidad que se percibe con células apoptóticas secretadas circundantes, en el día 4.

60

65

Las Figuras 8A-D representan los organoides enriquecidos y no enriquecidos en presencia de los constituyentes de los medios basales Lgr5 y Wnt3a. La Figura 8A muestra que la población no enriquecida no tuvo ningún aumento en la eficacia del crecimiento en placa en la presencia de Wnt3a. La Figura 8C muestra que la mayoría de los organoides formados en el cultivo inyectado expresaban una estructura similar a un quiste que alberga células apoptóticas. La Figura 8B muestra que la población enriquecida tenía un aumento en la eficacia del crecimiento en placa que condujo a más organoides proliferantes derivados de células individuales. La Figura 8D muestra que las células enriquecidas exhibieron una morfología similar a las del estudio en ausencia de wnt3a (d) en puntos de tiempo análogos.

Las Figuras 9A-D muestran imágenes comprimidas confocales que ilustran el organoide enriquecido después de usar la técnica descrita de aislamiento microfluídico. La Figura 9C representa la cavidad formada indicativa de la naturaleza hueca en el organoide esférico. La Figura 9A representa la localización apical de CD24, que indica una expresión significativa de Sox9 que muestra un estado de quiescencia. La Figura 9B representa que el anticuerpo de captura para el aislamiento, GPCR49/Lgr5 (b), era prevalente dentro del dominio central, pero la expresión fue menor en comparación con CD24.

Las Figuras 10A-D representan imágenes confocales comprimidas de los organoides no enriquecidos en el plano z. El organoide se extrajo de Matrigel después de 4 días en cultivo. Se observan células apoptóticas dentro de la cavidad central (Figura 10C), mientras que la morfología del organoide es esférica y plana. La expresión de CD24 (Figura 10A) se localiza apicalmente en el dominio central y en niveles variables de intensidad. GPCR49/Lgr5 está presente en menor intensidad en localizaciones donde se expresa CD24, indicado por flechas. La presencia notable de la expresión GPCR49/Lgr5 fue superada por la superposición con CD24 (Figura 10D).

Las Figuras 11A-D representan la secuencia de los dispositivos para una modalidad de la separación microfluídica basada en la adhesión de células contra múltiples marcadores de superficie. Después de la captura y liberación a partir del dispositivo (Figura 11A), las células que expresan el marcador 1 entran en un dispositivo (Figura 11B) donde una solución de cloruro de calcio se coinyecta para neutralizar el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) presente en la suspensión celular. Otra porción del dispositivo (Figura 11C) mezcla la solución de cloruro de calcio y la suspensión celular. Finalmente, en la Figura 11D, la cámara captura las células contra el marcador 2, que después pueden extraerse mediante el uso de una inyección de solución de EDTA.

La Figura 12 representa el rendimiento del sistema del dispositivo de captura y liberación de múltiples etapas en la separación de doble marcador.

#### Descripción detallada

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para captura y liberación altamente específicas de materiales biológicos, tales como células. Se describen composiciones de hidrogel que comprenden una pluralidad de moléculas de ácido alginico conjugadas o mezcladas con moléculas de polímeros ramificados, o uno o más agentes de unión para formar un hidrogel.

En algunas modalidades, los métodos y composiciones descritos proporcionan el recubrimiento de superficies para la captura selectiva de un tipo de célula diana a partir de una suspensión heterogénea, con la capacidad adicional de liberar las células capturadas de forma no destructiva. Las formulaciones y técnicas descritas en la presente descripción permiten composiciones químicas modificadas de hidrogeles de alginato, que tienen la capacidad de unir y liberar células pero que son propensas a la adhesión celular inespecífica significativa, con poli(etilenglicol) (PEG) ramificado. La incorporación del polímero ramificado en la estructura del hidrogel se realiza de una manera que permite, además, la funcionalización del prepolímero de alginato con un agente de unión (*por ejemplo*, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, compuesto peptidomimético, péptido, molécula pequeña o ácido nucleico) para proporcionar la especificidad de captura.

En algunas modalidades, la técnica de síntesis se diseña para el ensamblaje *in situ* del hidrogel dentro de estructuras confinadas, tales como canales microfluídicos. Las técnicas de ensamblaje descritas en la presente descripción permiten el recubrimiento de canales hechos de cualquier material, sin un requisito para un tipo particular de material. Los análisis de citometría de flujo de células capturadas y separadas mediante el uso de este enfoque a partir de sangre completa indican que el proceso es químicamente y biológicamente no destructivo; específicamente, no hay, o hay pocos cambios en la viabilidad celular o en la identidad fenotípica. Además, la inclusión del PEG ramificado dentro de la estructura del hidrogel supera muchos de los problemas asociados con los sistemas de captura de hidrogel conocidos.

La literatura describe el diseño de recubrimientos de superficies que pueden facilitar el desprendimiento de células cuando se aplica un estímulo externo, tal como un potencial eléctrico o un pequeño cambio de temperatura. Un ejemplo de lo primero es un recubrimiento de superficie que consiste en ligandos unidos a la superficie a través de un grupo funcional químico electroactivo. El éster de quinoína electroactivo experimenta un cambio químico a lactona en el momento de aplicar un potencial eléctrico. Este enfoque requiere la incorporación de electrodos en el dispositivo de captura y la optimización cuidadosa de los parámetros de liberación. El uso de un polímero de respuesta térmica, tal como poli(N-isopropilacrilamida), que es hidrófobo a 37 °C e hidrófilo a 20 °C, es otro enfoque descrito recientemente. La superficie hidrófoba es adhesiva para las células y su transformación resulta en una liberación casi completa de las células.

Las deficiencias de tal método son la falta de especificidad de adhesión en un régimen de flujo bajo y los posibles efectos adversos de la disminución de la temperatura por debajo de la temperatura fisiológica de 37 °C. Los hidrogeles de alginato se han empleado para la captura y liberación de células en sistemas microfluídicos, pero sin modificación química con moléculas no adhesivas, estos hidrogeles son extremadamente propensos a la adhesión celular y proteica inespecífica y no tienen una alta eficiencia de liberación celular.

5 La ventaja de la presente descripción es que permite la captura selectiva a través de interacciones ligando-receptor. Además, los métodos y dispositivos descritos permiten la liberación de células diana a partir de sustratos, tanto en cultivo celular estático como en la separación celular basada en flujo. La presente descripción no requiere interfaces mecánicas, enzimáticas, eléctricas u ópticas para el desprendimiento de las células. Los métodos y dispositivos descritos pueden usarse sin perturbaciones físicas o químicas extensas para el entorno biológico. Por otra parte, las técnicas anteriores, requieren un estímulo externo o requieren perturbaciones físicas o químicas que comprometen, por ejemplo, el entorno celular.

10 La presente descripción puede usarse para capturar y liberar de manera selectiva los materiales biológicos para aislar, por ejemplo, poblaciones de células madre y progenitoras. Las poblaciones aisladas pueden usarse para sembrar en supercántigos modificados. Generalmente, la ingeniería de reemplazo de órganos, y la medicina regenerativa requieren poblaciones puras de células raras para producir un órgano funcional.

15 Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

20 Definiciones

25 Por conveniencia, determinados términos usados en la descripción, ejemplos y reivindicaciones se recogen en esta sección. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en esta descripción tienen el mismo significado que normalmente entiende el experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. La definición inicial proporcionada para un grupo o término proporcionado en esta descripción se aplica a ese grupo o término a lo largo de la presente descripción, individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique de otra forma.

30 Los términos "compuesto" y "compuestos" como se usan en esta descripción se refieren a los compuestos de esta descripción y a todos y cada uno de los posibles isómeros, estereoisómeros, enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de estos.

35 En general, las composiciones de la descripción pueden formularse alternativamente para que comprendan, consistan en, o consistan esencialmente en, cualquiera de los componentes apropiados descritos en esta descripción. Las composiciones de la descripción pueden formularse adicionalmente o alternativamente de manera que sean desprovistas, o sustancialmente libres, de cualquiera de los componentes, materiales, ingredientes, adyuvantes o especies usadas en las composiciones de la técnica anterior o que de cualquier otra manera no serían necesarias para el logro de la función y/u objetivos de la presente descripción.

40 Los artículos "un" y "uno" se usan en esta descripción para referirse a uno o a más de uno (*es decir*, para al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

45 El término "o" se usa en esta descripción para denotar, y se usa indistintamente con los términos "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera.

El término "aproximadamente" se usa en esta descripción para significar un valor numérico dado más o menos 20 % del valor numérico dado.

50 Un "hidrogel" es una red tridimensional y semisólida de una o más moléculas en las que está presente una cantidad relativamente grande de agua. En algunos casos, el hidrogel puede ser un polímero. Como se usa en la presente descripción, un "polímero" es una estructura compuesta de monómeros.

55 Los "monómeros" son moléculas que tienen uno o más grupos que pueden reaccionar entre sí o con otros tipos de monómeros para formar un polímero. Un ejemplo no limitante de un monómero es el cloruro de vinilo, que puede proporcionar un plástico conocido como "vinilo." Otro ejemplo no limitante de un monómero de vinilo es la acrilamida que puede proporcionar un gel conocido como un gel de poli(acrilamida).

60 General

65 La descripción proporciona, en parte, composiciones que comprenden hidrogeles de alginato en los que el ácido algínico está en presencia de cationes divalentes. Tales composiciones son capaces de disolverse fácilmente en presencia de quelantes. Además, los hidrogeles descritos en la presente descripción son biocompatibles y pueden funcionalizarse (*es decir*, conjugarse) con moléculas de adhesivo celular. Los hidrogeles de alginato pueden funcionalizarse con agentes de unión. Como se usa en la presente descripción, el término "agente de unión" significa una molécula que se une a otra molécula o estructura compleja. Los agentes de unión incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, compuestos

peptidomiméticos, péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. Los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos contra GPR49, LGR5, CD24, FLK1, CD45, CD31, CD34, sca-1, y diversas otras proteínas.

5 Los hidrogeles de alginato pueden incluir, además, polietilenglicol ramificado ("PEG"). El PEG se conjuga o se mezcla con agentes de unión (es decir, se funcionaliza). Además, el PEG se conjuga o se mezcla con moléculas de ácido algínico para formar un hidrogel. En determinadas modalidades, los hidrogeles usan moléculas de PEG de 4 brazos con terminaciones de grupos amino primarios en el extremo de cada brazo. Una molécula de PEG de 4 brazos tiene cuatro puntos de unión para la funcionalización con otros agentes tales como ácido algínico, agentes de unión o enlazadores. En modalidades particulares, un brazo de cada molécula de PEG de 4 brazos se une a un grupo de ácido carboxílico de la cadena principal de hidrogel de alginato, lo que deja hasta tres grupos de amino primarios para la funcionalización con un agente de unión. La disposición de 4 brazos del hidrogel permite triplicar el contenido del agente de unión (*por ejemplo*, el anticuerpo) y proporciona protección contra la unión celular inespecífica relacionada a los hidrogeles de alginato no pegilados.

15 Además, se describen los métodos para fabricar los hidrogeles descritos en la presente descripción. Los métodos para fabricar composiciones de hidrogel comprenden la reacción de las moléculas de polietilenglicol con uno o más agentes de unión en un tampón y la reacción de la solución del agente de unión de polietilenglicol con al menos una molécula de ácido algínico para formar un hidrogel funcionalizado, el hidrogel funcionalizado comprende cada una de las moléculas de polietilenglicol conjugadas a uno o más agentes de unión y conjugadas, adicionalmente, con al menos una molécula de ácido algínico.

20 Los métodos descritos en la presente descripción aseguran que al menos un punto de unión en un polímero ramificado, tal como una molécula de PEG, está disponible para unirse con una matriz de gel de alginato, lo que deja al menos otro punto de unión para la funcionalización con agentes de unión, tales como los anticuerpos. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra GPR49, LGR5, CD24, FLK1, CD45, CD31, CD34, sca-1, y otras diversas proteínas. En determinadas modalidades, los métodos implican conjugar el ácido algínico con un agente de unión, tal como un anticuerpo, y proporcionar el conjugado de anticuerpo/ácido algínico a un polímero ramificado, tal como el PEG, para formar un hidrogel. El conjugado de ácido algínico y anticuerpo reacciona con moléculas de PEG terminadas en grupos amino. En determinadas modalidades, la molécula de PEG terminada en grupos amino es una molécula de PEG de 4 brazos. En otras modalidades, el agente de unión, el anticuerpo y el PEG reaccionan al mismo tiempo para crear un hidrogel de anticuerpo/ácido algínico/PEG. Aún en otras modalidades, el PEG y el agente de unión se conjugan. En estas modalidades, el conjugado reacciona con el ácido algínico.

25 En algunos aspectos, los métodos comprenden, además, el uso de grupos protectores, tales como los grupos fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), para lograr el control sobre la conjugación del agente de unión con los grupos amino primarios. Los métodos comprenden, además, la adición de los hidrogeles de anticuerpos/ácido algínico/PEG a un dispositivo microfluídico para recubrir la superficie interior del dispositivo. En tales modalidades, se permite que el hidrogel se forme *in situ* y recubra la superficie interior de una o más cámaras del dispositivo.

35 Además, se describen los métodos para separar células de un medio complejo mediante el uso de un separador microfluídico descrito en la presente descripción. La descripción describe dispositivos microfluídicos que comprenden un sustrato; y una o más cámaras para recibir una muestra que comprende materiales biológicos diana, la una o más cámaras comprenden una superficie recubierta con una composición de hidrogel, la composición de hidrogel comprende una pluralidad de moléculas de ácido algínico y una pluralidad de moléculas de polietilenglicol en las que cada una de las moléculas de polietilenglicol comprende una pluralidad de grupos, al menos un grupo de cada molécula de polietilenglicol se conjuga con una molécula de ácido algínico y al menos otro grupo de cada molécula de polietilenglicol se conjuga con un agente de unión. Los dispositivos descritos en la presente descripción comprenden, además, una cámara de mezclado para mezclar los materiales biológicos diana unidos con un agente neutralizante y una o más superficies adicionales recubiertas con una composición de hidrogel. La composición de hidrogel comprende una pluralidad de moléculas de ácido algínico y una pluralidad de moléculas de polietilenglicol en las que cada una de las moléculas de polietilenglicol comprende una pluralidad de grupos y al menos un grupo de cada molécula de polietilenglicol se conjuga con una molécula de ácido algínico. Además, al menos un otro grupo de cada molécula de polietilenglicol se conjuga con un agente de unión que es diferente del agente de unión en la etapa (i).

40 En los dispositivos descritos pueden usarse diversos sustratos. En algunas modalidades, el sustrato es un material que contiene sílice (por ejemplo, vidrio, PDMS). En algunas modalidades, el sustrato es un material polimérico (tanto biocompatible como no biocompatible), y el polímero se une a sí mismo o a otros sustratos de sílice. En algunas modalidades, el sustrato es un plástico termoestable, tal como epóxico, que incluye los plásticos reforzados con fibra. En algunas modalidades, el sustrato es un metal (por ejemplo, oro, plata, platino, cobre, aluminio); aleación de metal; óxido metálico (óxido de cobre, óxido de aluminio, óxido de plata, óxido de indio y estaño, etcétera); un material inorgánico, que incluye, pero no se limita a semiconductores y materiales magnéticos. En algunas modalidades, el sustrato es una combinación de los materiales de sílice, poliméricos, metálicos o inorgánicos descritos en la presente descripción.

45 Los dispositivos microfluídicos conocidos en la técnica pueden usarse, además, para los métodos descritos en la presente descripción. Los métodos pueden usarse para separar, por ejemplo, las EPC de la sangre para usar posteriormente en ingeniería de tejidos vasculares o reparación regenerativa basada en células del tejido vascular *in vivo*. Los métodos

implican permitir que un hidrogel de ácido alginico/PEG se forme *in situ* en un dispositivo microfluidico. Además, los métodos implican proporcionar una muestra al dispositivo y permitir que el agente de unión conjugado en el hidrogel capture un material biológico diana, tal como un tipo de célula particular. La muestra se deja pasar a través del dispositivo y las células capturadas se liberan mediante el uso de un agente liberador. En determinadas modalidades, el agente liberador es un tampón liberador que incluye, por ejemplo, un quelante tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) y citrato de sodio. En estas modalidades, las muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, suero, saliva, linfa, bilis, orina y cualquier otro fluido biológico.

Las Figuras 11A-D ilustran los dispositivos y métodos que usan cámaras múltiples. En las Figuras 11A-D, se inyecta una muestra mediante una bomba de infusión de jeringa en la primera etapa de captura basada en alginato ("Aislamiento del marcador 1"/Figura 11A). Esta etapa se comunica con la etapa B, que consiste en una válvula de 2 vías. En su configuración "cerrada", esta válvula permite que los desechos de la etapa A pasen a través de un tubo de recolección. Después de que los desechos pasan, la corriente de desechos se cierra mediante el uso de, por ejemplo, una válvula de pellizco. (Figura 11 B). El objetivo del cloruro de calcio es neutralizar el EDTA en la suspensión celular que emerge de la etapa (Figura 11A). Para garantizar la mezcla de la solución de cloruro de calcio con esta suspensión celular, la salida combinada (que era en flujo laminar) se envía a una cámara de mezclado (Figura 11C) que contiene un arreglo de columnas hexagonal característico. Después, la solución mezclada entra en la etapa (Figura 11D), donde se capturan las células que expresan los receptores para la segunda molécula de captura. La etapa final en el proceso de separación es la inyección de una solución de EDTA en la entrada de la etapa A (Figura 11A), que libera las células capturadas a partir de la etapa B (Figura 11B). Esta solución se recolecta en un tubo que contiene un exceso de medio de cultivo para minimizar cualquier efecto perjudicial del EDTA sobre las células.

En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, la adición de medio de cultivo a los materiales biológicos liberados. En algunas modalidades, las etapas desde (d) a (f) pueden repetirse mediante el uso de un agente de unión diferente. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, la detección de los materiales biológicos diana después que se liberan de la composición de hidrogel. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, el mantenimiento de las células en condiciones eficaces para cultivar, detectar, analizar o transformar las células, que incluye las células vivas.

En algunas modalidades, las células son células raras, que incluyen, pero no se limitan a células madre adultas, células madre fetales, células progenitoras, células madre hematopoyéticas periféricas, células progenitoras endoteliales, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes maduras, células madre del líquido amniótico, células madre mesenquimatosas, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre intestinales, células madre de la piel, células madre neurales y células madre de cáncer. En algunas modalidades, la célula es una célula viva capturada a partir de la muestra. En algunas modalidades, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA, y citrato de sodio.

Las Figuras 4A-C ilustran diversos métodos sintéticos para la producción de hidrogeles (designados como Tipos de Geles I al VII). Se muestra la mejora progresiva en el rendimiento y la pureza de la captura de EPC a partir de los Tipos de Geles II-VII. En la Figura 4A, todos los reactivos (que incluyen PEG, anticuerpo, ácido alginico) se combinan juntos en los Tipos de Geles II-IV. En la Figura 4B, el Tipo de Gel V usa un protocolo de dos etapas en el que el PEG, el anticuerpo, el EDC y el sulfo-NHS se combinan en una primera y única etapa. En la Figura 4C, en los Tipos de Geles VI-VII se mezclaron previamente el PEG y el anticuerpo antes de mezclar los otros componentes. La mezcla previa permite una dispersión óptima de las moléculas del anticuerpo entre las cadenas del PEG.

El efecto adhesivo del anticuerpo anti-CD34 es evidente mediante la comparación de los Tipos de Geles I y II (Figura 3A). Las Figuras 3A-B representan los resultados después de que 300  $\mu$ L de sangre total recolectada en tubos de heparina se inyectaron directamente en dispositivos microfluidicos individuales, y se procesaron 10 dispositivos en paralelo. Las células liberadas de cada dispositivo se agruparon en una suspensión única para permitir el recuento mediante citometría de flujo. Los datos informados representan el rendimiento y la pureza de las EPC recuperadas a partir de un volumen total de sangre de 3 mL. Las barras de error indican las desviaciones estándar basadas en 3 mediciones independientes de las EPC y recuentos de células totales hechos con la misma muestra. Se observó un aumento del rendimiento y la pureza con la incorporación de PEG 10k PM (Tipos de Geles II versus IV). Los métodos y composiciones descritos pueden usarse, además, con PEG 20k PM, así como también otras moléculas de PEG de peso molecular siempre que las restricciones de tamaño, tales como el impedimento estérico, no afecten la eficacia de la unión de las células.

En la Figura 4B, la primera etapa en la síntesis fue la combinación de PEG y anticuerpos con los agentes de acoplamiento EDC y sulfo-NHS, antes de la adición de ácido alginico en la segunda etapa. En comparación con el Tipo de Gel IV, el Tipo de Gel V proporciona una captura de EPC ligeramente mayor, pero con un grado de dispersión menor, que indica una mejor mezcla de las moléculas del anticuerpo con el PEG. El contenido de anticuerpo accesible del Tipo de Gel V es similar al del Tipo de Gel IV (Figura 2), lo que demuestra que el factor distintivo es una mejor mezcla del PEG y el anticuerpo. En la Figura 2, se usó un kit de ensayo de ácido bicinconínico (BCA) para medir la cantidad relativa de anticuerpos accesibles a una solución que fluye a través de cada dispositivo. Una menor absorbancia se asocia con una mayor cantidad de anticuerpos accesibles. Las barras de error indican errores estándar basados en 8 mediciones independientes para cada tipo de gel. Una mejor mezcla permite, además, una dispersión más eficaz de las moléculas de PEG y anticuerpos en la superficie del hidrogel, lo que es consistente con la mayor pureza de las EPC obtenida con el

Tipo de Gel V en comparación con el Tipo de Gel IV. En la solución de ácido algínico funcionalizado con PEG y anticuerpos se observaron menos partículas de PEG y anticuerpos, lo que es consistente con una mejor mezcla del PEG y los anticuerpos.

- 5 El protocolo de síntesis en dos etapas para los Tipos de Geles VI y VII permite la mezcla previa porque proporciona el tiempo para que las moléculas de anticuerpos y PEG se mezclen "sin perturbaciones" sin la presencia restrictiva de EDC y sulfo-NHS. Aunque para los métodos y composiciones descritos en la presente descripción la mezcla previa no es necesariamente requerida, un tiempo de mezcla más largo puede mejorar la realización de captura de las EPC en términos de rendimiento y pureza, como puede verse mediante la comparación de los Tipos de Geles VI y VII con respecto al Tipo de Gel V. Los tiempos mayores de mezclado e incubación proporcionados para el Tipo de Gel VII con respecto al Tipo de Gel VI proporcionaron un buen rendimiento ( $\sim 10^4$  EPC recuperadas) y también pureza (74 %).

## EJEMPLOS

- 15 Ejemplo 1 - Diseño de captura y liberación microfluidicos

El Ejemplo 1 describe métodos y composiciones para la captura y liberación altamente específicas de materiales biológicos, tales como células.

- 20 Materiales e instrumentación

Se adquirieron portaobjetos de vidrio, EDC, Sulfo-NHS, EDTA, tampón MES, un micro kit de Ensayo de Proteína de ácido bicinonónico (BCA) y tubos de vacío con heparina de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Para la fabricación del dispositivo microfluidico, el fotoresist SU-8 y el revelador se adquirieron de MicroChem (Newton, MA); el elastómero de silicona y el agente de curado se adquirieron de Dow Corning (Midland, MI). La solución salina tamponada con fosfatos (PBS; IX, sin calcio o magnesio) se adquirió de Mediatech (Herndon, VA). El anticuerpo de captura, el monoclonal de ratón anti-CD34 humano, y el anti-FLK-1 humano generado en cabra se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-CD133-PE humano, anti-CD45-FITC humano, y anti-IgG-PerCP de cabra se adquirieron de eBioscience (San Diego, CA). La IgG de conejo se adquirió de Vector Labs (Burlingame, CA). El dihidrato de cloruro de calcio y el ácido algínico se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO). El PEG de 4 brazos terminados en grupos amino (PEG-NH<sub>2</sub>) con pesos moleculares de 10,000 (10k PM) y 20,000 (20k PM) se adquirieron de Laysan Bio (Arab, AL).

Diseño del dispositivo microfluidico de captura de células

- 35 El dispositivo usó un diseño de arreglo de columnas similar al usado por Nagrat y otros, Nature, 450 (7173), 123-U10 (2007). Para lograr la interrupción de las corrientes de flujo y lograr una captura óptima, las columnas se organizaron en un diseño hexagonal como se describe por Gleghorn y otros, Lap Chip, 10(1), 27-29 (2010). Las columnas tenían un diámetro de 100  $\mu\text{m}$  y una separación transversal de 150  $\mu\text{m}$  de centro a centro. Las filas tenían una separación de centro a centro de 125  $\mu\text{m}$  y cada una está separada por 50  $\mu\text{m}$ . El arreglo de columnas es de 0.7 cm de largo y 0.5 cm de ancho. La altura de las columnas fue de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  para los dispositivos fabricados mediante litografía suave como se describe más abajo.

45 Para la fabricación de los dispositivos de poli(dimetil siloxano) (PDMS), se mezclaron los elastómeros de silicona y los agentes de curado en una relación de 10:1 (p/p) y se vertieron sobre las tabletas maestras negativas, se desgasificaron y se dejaron en el proceso de curado durante toda la noche a 65 °C. Las réplicas de PDMS se sacaron de las tabletas antes de perforar los orificios de entrada y salida con una aguja de punta roma de calibre 19. Las réplicas y los portaobjetos de vidrio se expusieron a plasma de oxígeno (100 mW con 8 % de oxígeno durante 30 segundos) en una cámara de plasma PX-250 (March Instruments, Concord, MA) e inmediatamente se ubicaron en contacto de unas con otras. La unión irreversible entre el PDMS y el vidrio se completó mediante cocción durante 5 minutos a 65 °C.

- 50 Síntesis de hidrogel funcionalizado con anticuerpo/PEG

En este estudio se investigaron siete formulaciones de hidrogel diferentes, y se designaron como Tipos de Geles I-VII. Para el Tipo de Gel I, 45 mg de ácido algínico, 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, y 20  $\mu\text{L}$  de IgG inactiva (1 g/mL) se adicionaron a 2 mL de la solución de tampón MES y se mezclaron mediante el uso de un Dispensador de Tubo IKA Ultra Turrax durante 29 minutos y se dejó en incubación durante 60 minutos. Para el Tipo de Gel II, 45 mg de ácido algínico, 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, y 100  $\mu\text{L}$  de anti-CD34 humano (200 $\mu\text{g/mL}$ ) se adicionaron a 2 mL de tampón MES, se mezclaron como anteriormente, y se incubaron durante 60 minutos. Para el Tipo de Gel III, 45 mg de ácido algínico, 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, 22.5 mg de PEG 20k PM, y 100  $\mu\text{L}$  de anti-CD34 de carnero se adicionaron a 2 mL de tampón MES, se mezclaron durante 29 minutos, y se dejó en incubación durante 60 minutos. El tipo de Gel IV consiste en 45 mg de ácido algínico, 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, 22.5 mg de PEG 10k PM, y 100  $\mu\text{L}$  de anti-CD34 de carnero adicionados a 2 mL de tampón MES, mezclados durante 29 minutos e incubados durante 60 minutos. El Tipo de Gel V se creó mediante la mezcla de 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, 22.5 mg de PEG 10k PM, y 100  $\mu\text{L}$  de anti CD34 de carnero en 2 mL de tampón MES durante 29 minutos y la adición posterior de 45 mg de ácido algínico seguido de 29 minutos de mezclado y 60 minutos de incubación. Los Geles VI y VII se formaron mediante la mezcla de 22.5 mg de PEG 10k PM con 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo en 2 mL de tampón MES y el mezclado durante 10

minutos y 29 minutos, respectivamente, y la incubación durante un período adicional de 15 minutos y 60 minutos, respectivamente. Después, a la mezcla se añadieron 4.8 mg de EDC, 13.2 mg de sulfo-NHS, y 45 mg de ácido algínico, se mezclaron durante 29 minutos y se dejó en incubación durante 60 minutos.

5 Después de la etapa de incubación, cada solución de ácido algínico funcionalizado para cada tipo de gel se inyectó en un Casete de Diálisis de lámina -A con un umbral peso molecular de 10,000 PM (Fisher) y se dializó contra el tampón MES durante 48 horas para eliminar el sulfo-NHS y el EDC que no reaccionaron. La Tabla 1 resume las etapas y componentes de la síntesis para cada tipo de gel. Las etapas 1 y 2 indican la naturaleza secuencial del protocolo seguido para combinar los reactivos respectivos.

10 Tabla 1. Sumario de los protocolos de síntesis para diferentes formulaciones de hidrogel.

Tipo de Gel	PM del PEG [kDa]	Componentes en Cada Secuencia de Mezcla <sup>†</sup>				Tiempos de Mezclado/Incubación [minutos]	
		Ácido algínico	EDC & Sulfo-NHS	PEG	Anticuerpo*	Etapas 1	Etapas 2
I	ninguno	1	1	-	1	29/60	N/A
II.	ninguno	1	1	-	1	29/60	N/A
III	20	1	1	1	1	29/60	N/A
IV	10	1	1	1	1	29/60	N/A
V	10	2	1	1	1	29/0	29/60
VI	10	2	2	1	1	10/15	29/60
VII	10	2	2	1	1	29/60	29/60

15  
20  
25  
30  
35

<sup>†</sup>"1" indica los reactivos que se adicionan en la etapa 1; "2" indica los reactivos que se adicionan en la etapa 2.

\* Para el Tipo de Gel I se usó IgG inactiva; el anti-CD34 humano se usó en todos los otros tipos de geles.

Espectroscopía infrarroja

Las muestras de ácido algínico funcionalizado se extendieron sobre tarjetas de muestra de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) (Crystal Labs, Garfield, NJ) mediante el uso de una espátula y se dejaron espesar durante 4 horas. Después, las tarjetas se insertaron en un espectrómetro 1000 Fourier-transform Infrared (FTIR) Perkin Elmer. Para cada tipo de gel se analizó y se comparó la absorbancia a 638 cm<sup>-1</sup>. Este pico, que se asocia con los enlaces amida formados cuando las moléculas de anticuerpos se conjugan exitosamente con el PEG-NH<sub>2</sub>, es una medida de la carga de anticuerpos en los hidrogeles.

Formación in situ de hidrogel dentro de dispositivos microfluídicos

45 En cada dispositivo se inyectó una solución de CaCl<sub>2</sub> 1 g/mL en agua desionizada (manualmente, mediante el uso de una jeringuilla de 1 mL) y se dejó en incubación durante toda la noche. Después, la solución de CaCl<sub>2</sub> se eliminó manualmente, mediante el uso de una jeringuilla de 1 mL. Después, la solución de alginato funcionalizado con PEG y anticuerpos preparada para cada tipo de gel se inyectó manualmente en los dispositivos y se dejó adsorber durante 1 hora. A continuación, los dispositivos se lavaron con tampón MES a 10 µL/minutos durante 10 minutos mediante el uso de una bomba de infusión de jeringa de Harvard Apparatus PHD 2000 (Holliston, MA), seguido por una solución de CaCl<sub>2</sub> 100 mM en tampón MES a 10 µL/minutos durante 10 minutos para formar una capa fina de hidrogel sobre las paredes de los microcanales. Finalmente, los dispositivos se lavaron con tampón MES a 5 µL/minuto durante 10 minutos para eliminar el CaCl<sub>2</sub> que no reaccionó.

55 Ensayo de proteína BCA

La solución para el ensayo de proteínas de BCA se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, la solución se inyectó en cada dispositivo a 5 µL/minutos durante 40 minutos. La salida se recolectó en una microplaca y se midió la absorción a 562 nm mediante el uso de un espectrómetro Bio-Tek Powerwave XS.

Extracción de sangre

65 Se extrajo sangre humana completa de voluntarios sanos en tubos de recolección con heparina según un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad del Nordeste.

## Experimentos de captura de las EPC

Se inyectó sangre completa en los dispositivos de captura microfluídicos a 5  $\mu$ L/minutos durante 60 minutos. A continuación, cada dispositivo se lavó con tampón MES a 10  $\mu$ L/minutos durante 5 minutos. Para la liberación de las células capturadas, se inyectó una solución de EDTA 50 mM en PBS a 10  $\mu$ L/minutos durante 10 minutos y la salida se recolectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Cada experimento individual incluyó 10 dispositivos microfluídicos. Se pasaron 300  $\mu$ L de sangre a través de cada dispositivo, a la velocidad especificada anteriormente. Las células liberadas de cada dispositivo se agruparon en una sola suspensión para permitir el recuento mediante citometría de flujo. Los datos informados en la Figura 3A-B representan el rendimiento y la pureza de las EPC recuperadas de un volumen total de sangre de 3 mL.

## Citometría de flujo

Para el recuento de las EPC, las células liberadas de cada dispositivo se mezclaron con 10  $\mu$ L de cada uno de anti-CD133 PE humano, anti-CD45 FITC humano, anti-FLK-1 de cabra, y anti-IgG PerCP. La mezcla se guardó en la oscuridad durante 30 minutos y se centrifugó a 130 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y las células se suspendieron en 200  $\mu$ L de PBS para el recuento mediante el uso de un citómetro de flujo Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC. Las células que fueron CD133+, CD45-, y FLK-1+ se contabilizaron como EPC.

## Resultados

La Figura 1 muestra datos de espectroscopía infrarroja para la cuantificación de la carga de anticuerpos dentro de las soluciones de ácido algínico funcionalizado que surgen del protocolo de síntesis de una o dos etapas. Cuando se comparan con las soluciones estándar de concentración conocida de anti-CD34, todas las soluciones de ácido algínico tienen un contenido de anticuerpos comparable, entre 0.05 y 0.06 mg/mL.

La Figura 2 muestra las mediciones de proteínas totales relativas que se realizaron mediante el uso de un kit de ensayo BCA. La solución de BCA se vuelve más transparente al entrar en contacto con proteínas tales como los anticuerpos. Por lo tanto, mediante el flujo de esta solución a través de los dispositivos microfluídicos recubiertos con hidrogel, puede compararse la cantidad de anticuerpos accesibles en cada tipo de gel. El contenido de proteínas de las soluciones que salen de los dispositivos se muestra como una función del tipo de gel en la Figura 2 y se expresa en unidades arbitrarias de absorbancia más que como una masa o concentración calibrada. Las mediciones relativas permiten la comparación del anticuerpo de captura anti-CD34 accesible entre cada tipo de gel. La Figura 2 muestra un aumento en el anticuerpo accesible de los tipos de geles I-VII mientras que la cantidad total de anticuerpo añadido a la mezcla permanece constante (Figura 1), lo que indica un aumento en la eficacia de conjugación entre la superficie gelificada y el anticuerpo.

La Figura 3 muestra los datos de rendimiento y pureza para la captura de las EPC de sangre completa mediante el uso de los dispositivos microfluídicos recubiertos con hidrogel. En la Figura 3A, el Tipo de Gel I, que tiene un anticuerpo inactivo conjugado a él, muestra una adhesión insignificante de las EPC, como se esperaba. El Tipo de Gel II, que contiene el anticuerpo anti-CD34, muestra una adhesión de las EPC significativamente mayor con relación al Tipo de Gel I ( $p < 0.005$ ), aunque con un alto grado de dispersión. La pureza de la captura lograda con el Tipo de Gel II es, sin embargo, relativamente baja (~23 %; Figura 3B). El efecto de adicionar el PEG de 4 brazos a la estructura del hidrogel se muestra claramente mediante la comparación de los Tipos de Geles II y IV, cuyo protocolo de síntesis es de cualquier otra manera idéntico. Las terminaciones de grupos amino de las moléculas ramificadas de PEG 10k PM de 4 brazos proporcionan una oportunidad para un mayor nivel de conjugación del anticuerpo, como se refleja en la mayor adhesión global de las EPC (Figura 3A). La supresión de las uniones inespecíficas resulta en un aumento de la pureza (Figura 3B; Tipo de Gel IV). Curiosamente, el uso de PEG 20k PM (Tipo de Gel III) resultó en un rendimiento de la captura de las EPC significativamente menor en comparación con el PEG 10k PM (Tipo de Gel IV;  $p < 0.005$ ) en las mismas condiciones de síntesis, y los niveles de pureza fueron comparables.

En los Tipos de Geles V-VII, se siguió un protocolo de dos etapas para la combinación de los reactivos. En el Tipo de Gel V, la conjugación de las moléculas de anticuerpos al PEG de 4 brazos se realiza primero, antes de introducir el ácido algínico. Esta formulación mejora el rendimiento y la pureza de la captura de las EPC con respecto al Tipo de Gel IV. El protocolo de dos etapas se modificó de manera que el EDC y el sulfo-NHS se adicionaron en la segunda etapa con el ácido algínico, y la primera etapa se limitó a la mezcla conjunta del PEG y los anticuerpos. Cuando se proporcionaron tiempos cortos para la mezcla y la incubación en la primera etapa (10 minutos y 15 minutos, respectivamente, para el Tipo de Gel VI), el rendimiento no mejoró con respecto al Tipo de Gel V, pero la pureza fue mayor. Posteriormente, se examinaron tiempos mayores de mezcla e incubación (29 y 60 minutos, respectivamente, para el Tipo de Gel VII) para lograr una mayor mezcla y enmarañamiento de las moléculas de PEG con las moléculas de los anticuerpos. Esta formulación proporcionó un rendimiento y una pureza significativamente mayores con respecto a los Tipos de Geles VI y VII ( $p < 0.005$  y  $p < 0.01$ , respectivamente).

## Ejemplo 2 - Captura y liberación microfluídica de células madre mediante el uso de los receptores GPR49/Lgr5

El Ejemplo 2 describe los dispositivos y métodos para la captura y liberación microfluídica de células madre intestinales mediante el uso de dos agentes de unión, específicamente, los anticuerpos que reconocen los receptores GPR49 y Lgr5.

El impulso hacia la investigación de células madre multipotentes y quiescentes dentro del sistema intestinal ha prevalecido en los últimos años. (David, H.S. y otros, Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology* 2008, 134 (3), 849-864.; Montgomery, R. K. y otros, Prominin1 (CD133) as an Intestinal Stem Cell Marker: Promise and Nuance. *Gastroenterology* 2009, 136 (7), 2051-2054.). Sin embargo, los métodos actuales se han basado en modelos de ratones híbridos y marcadores fluorescentes. Esta descripción elude la necesidad de marcadores fluorescentes y máquinas clasificadoras de células mediante la implementación de dispositivos microfluídicos acoplados a la captura por afinidad.

La caracterización e identificación de células madre intestinales han estado bajo un gran escrutinio dentro de la comunidad de gastroenterólogos. (Sangiorgi, E., y otros, Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008, 40 (7), 915-920; Snippert, H. J. y otros, Prominin-1/CD133 Marks Stem Cells and Early Progenitors in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* 2009, 136 (7), 2187-2194; Bjerknes, M. y otros, Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Method Enzymol* 2006, 419, 337-383; Barker, N., y otros, The intestinal stem cell. *Gene Dev* 2008, 22 (14), 1856-1864.)

Los modelos contradictorios sobre dónde residen estas células en la zona de la cripta se han limitado a un modelo de célula que retiene el marcaje +4 (LRC) y a un modelo de células columnares de la base de la cripta (CBC). Hasta hace poco, los marcadores de caracterización de las poblaciones de células madre intestinales se basaban en BMI-1, Mushashi-1 y otros marcadores de ciclo celular activo y quiescente limitados al dominio intracelular. Barker y otros, descubrieron un gen que codifica para un receptor de células madre intestinales de ciclo celular activo, que radica en un receptor conocido como receptor acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (Lgr5). (Barker, N., y otros, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007, 449 (7165), 1003-U1). La sobreexpresión de estos genes en ratones híbridos junto con la clasificación de GFP-FACS, permitió el desarrollo de sistemas de cultivo in vitro y el análisis genómico de estos tipos de células. Sato, T., y otros, Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009, 459 (7244), 262-U147). El uso de estos anticuerpos disponibles comercialmente permite la tinción extracelular de estos subtipos de células madre mediante el direccionamiento al receptor Lgr5. (Olsen Hult, L. T., y otros, EP Receptor Expression in Human Intestinal Epithelium and Localization Relative to the Stem Cell Zone of the Crypts. *PLoS One* 2011, 6 (10), e26816). La implementación de estos anticuerpos permite la captura y liberación selectiva de estas células diana mediante el uso del alginato funcionalizado con anticuerpos, a partir de tejido de rata silvestre.

Por el contrario, este Ejemplo permite la multiplexación y el procesamiento de un mayor volumen de muestra, al tiempo que se conserva la viabilidad de la población diana que se extrae. En estudios anteriores realizados por otros grupos, se han desarrollado métodos de cultivo para inducir hiperplasia y unidades de formación de organoides derivados de células individuales. (Sato, T. y otros, Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009, 459 (7244), 262-U147). Estas células no requieren un nicho mesenquimatoso para desarrollarse en estas unidades y dependen de factores de crecimiento para inducir señales de diferenciación. Se ha informado que las células lgr5 en cultivo tienen una eficiencia del crecimiento en placa de 6 % (Sato 2009); desarrollos recientes sugieren que la señalización wnt es necesaria a través de las células Paneth para mejorar el crecimiento en placa. (Sato y otros, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011, 469 (7330), 415-+).

En este Ejemplo, las poblaciones lgr5 positivas enriquecidas se capturan y liberan mediante el uso de los métodos descritos, y las células produjeron respuestas morfológicas similares a las producidas por los grupos anteriores. Además, la adición de wnt3a en el cultivo facilitó un aumento en la eficiencia del crecimiento en placa. El análisis inmunohistoquímico acoplado a la microscopía confocal clarificó la expresión de lgr5 y cd24 dentro de la cavidad central, que coincide con informes recientes. (Ver Gracz, A. D. y otros, Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol-Gastr L* 2010, 298 (5), G590-G600.).

En este Ejemplo, con el hidrogel de alginato que tiene unido covalentemente antagonistas GPR49/Lgr5, los mecanismos de captura y liberación radican en formar reticulaciones en el hidrogel con calcio con una liberación por quelación. Este ejemplo demuestra la capacidad de capturar y liberar selectivamente células GPR49/Lgr5 positivas a partir del homogenado digerido de criptas de colon de rata de tipo silvestre. Mediante un enfoque de un solo pase, se obtuvo un enriquecimiento de 24 veces desde la suspensión de partida hasta una pureza final de 49 % de células GPR49/Lgr5. La plataforma de dispositivos microfluídicos presentada conserva la viabilidad de las células diana, al tiempo que proporciona al usuario final la capacidad de multiplexar muestras. La descripción permite el aislamiento de células madre intestinales que tiene el potencial de avanzar en el campo de la ingeniería de tejidos y aplicaciones con cocultivos.

#### Métodos

#### Animales

Se usaron ratas Lewis machos y hembras recién nacidos (Charles River) y se alojaron en condiciones de temperatura ambiente con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas según la hora estándar del este de los EE.UU. Para los estudios de aislamiento de células progenitoras, se usaron ratas recién nacidas entre las edades de 2 a 5 días y se sacrificaron mediante decapitación. Todos los estudios y protocolos se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en la Universidad del Nordeste.

## Digestión de tejidos

Se obtuvieron muestras de tejido intestinal a partir de ratas Lewis recién nacidas. Se extrajo el intestino grueso, se dividió lateralmente, y se fragmentó en segmentos de 1 mm. El tejido fragmentado se incubó en EDTA 2 mM a 4 °C durante 30 minutos. Las muestras de tejido se separaron de la solución y se colocaron en 20 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco) durante 10 minutos de agitación. Después, el fluido sobrenadante se recolectó y se centrifugó a 150xg durante tres minutos; se recolectó el gránulo, se suspendió en 10 mL de medio de Eagle modificado de Dulbecco sin suero (DMEM, Cellgrow) y se centrifugó nuevamente a 150xg. El gránulo se suspendió en 5 mL de solución de DMEM libre de suero y se filtró a través de un filtro de células de 100 µm. Después, la solución se filtró a través de un filtro de células de 20 µm en tubos Eppendorf de 1 mL.

## Fabricación del dispositivo microfluídico para el aislamiento de células

Los dispositivos microfluídicos se fabricaron mediante el uso de la litografía suave tradicional en el Centro de Investigación de Tecnología y Fabricación a Nanoescala George J. Kostas en la Universidad del Nordeste. Las dimensiones físicas y el diseño de los dispositivos fueron idénticos a los de los dispositivos descritos por Hatch y otros. Estos dispositivos consisten en polidimetilsiloxano (PDMS) modelado con columnas de 100 µm de diámetro unidos a portaobjetos de vidrio.

## Formulación de alginato

La reacción del alginato funcionalizado con anticuerpos se realizó en seis escenarios diferentes pero las relaciones estequiométricas de los reactivos permanecieron constantes a lo largo de cada esquema. Se mezclaron durante 30 minutos MES 1940µE (Thermo-fisher), Anti-GPCR GPR49 0.04 mg (Abcam), y PEG estrella de 4 brazos 10 KD 22.5 mg (). El pH del MES se modificó para cada escenario respectivo que se mantuvo, ya sea a pH 4.7 o a pH 6.0; el pH se tituló con NaOH hasta un pH de 6.0. La amalgama se dejó incubar durante 60 minutos en el escenario II, pero los reactivos posteriores se adicionaron inmediatamente en los escenarios restantes. Se adicionaron sulfo-NHS 13.8 mg (pierce), EDC 4.8 mg (pierce), y alginato 45 mg (thermo), se dejaron mezclar durante 60 minutos y se incubaron durante otros 60 minutos en el escenario II. El alginato funcionalizado se inyectó en un casete de diálisis de 10 KD (Thermo) y se suspendió en su extensión, MES, en su pH de escenario respectivo durante 48 horas.

## Formación de canales, inyección y liberación

Para la separación celular se usaron los dispositivos microfluídicos con un arreglo de columnas hexagonales. Cada dispositivo se llenó con alginato funcionalizado con Anti-GPCR GPR49 y se dejó incubar durante 60 minutos. Los canales se formaron mediante el flujo de 100 µL de tampón MES pH 6 a 10µL/minuto, 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM a 10µL/minuto, y 100 µL albúmina de suero bovino 0.1 % a 10µL/minuto. Para obtener una velocidad de flujo exacta se usó una bomba de infusión de jeringa de Harvard Apparatus. Las soluciones celulares obtenidas se mezclaron para garantizar una suspensión homogénea y se extrajeron 200 µL en jeringas de 1 mL. Para el lavado, se bombearon 100 µL de solución celular a través de cada dispositivo a una velocidad de 3 µL/minuto seguido de 100 µL de tampón MES pH 6 a 3 µL/min. Después, para liberar las células del dispositivo se bombearon 100 µL de solución de EDTA 100 mM a través del dispositivo a 10 µL/minuto. Para el cultivo, las células se liberaron en tubos eppendorf que contenían 50 µL de Matrigel (BD Bioscience) en hielo.

## Citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo, tanto de las suspensiones celulares de partida (es decir, el homogenado tisular digerido) como de las células aisladas, se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo Beckman Coulter Quanta SC. Para cuantificar las poblaciones inyectadas y liberadas se usó el Anti-GPCR GPR49-RPE. Los primarios y secundarios se diluyeron 1:50 en PBS, respectivamente.

## Cultivo de células

La población de células madre enriquecidas se mezcló con el matrigel después de la liberación y cada muestra se sembró en una placa de pocillos y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. El medio basal Lgr5 contenía los siguientes componentes: DMEM F-12 avanzado, suplemento N2 5 mL, B27 10 mL sin vit. A, HEPES 5mL, glutamax 6.25 mL. Cada muestra se lavó con 350 µL de medio basal Lgr5 para eliminar el EDTA del cultivo celular. Después, 17 µL del inhibidor ROCK (y-27632, Sigma-Aldrich) se adicionaron a 10 mL de medio Lgr5. A cada pocillo de la placa se adicionaron 486 µL de esta solución junto con factores de crecimiento a las siguientes concentraciones: Noggin murino 100 ng/mL (Peprotech), Wnt3A murino 100 ng/mL (Peprotech), EGF de rata 50 ng/mL (Peprotech), y Rspodin-1 1 µg/mL (R&D Biosciences). Después de adicionar cada factor de crecimiento, las muestras se trasladaron hacia una cámara húmeda que se mantuvo a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Después de dos días de crecimiento celular, se realizó un cambio de medio. El medio usado se elimina y el medio Lgr5, sin el inhibidor ROCK, se adicionó a cada pocillo de la placa. Los factores de crecimiento se adicionaron a las siguientes concentraciones: Noggin murino 100 ng/mL, Wnt3A murino 100 ng/mL, EGF 50 ng/mL y Rspodin-1 500 ng/mL.

## Tinción inmunohistoquímica de organoides

Los organoides enriquecidos se fijaron con paraformaldehído 4 % y se lavaron con glicina 2 mM en PBS. Se adicionó dispasa 6 U/mL (tecnologías de células madre) y se incubó durante 1 hora para liberar los organoides del matrigel. Los organoides se pipetearon en 200  $\mu$ L de la solución bloqueadora del medio Lgr5 que contiene: BSA 3 %, suero de cabra 10 %, tritón X-100 0.1 %, HEPES 10mM, y glicina 10 mM. A la solución de bloqueo se añadieron los respectivos anticuerpos, anti-GPCR GPR49 y anti-CD24, a una dilución 1:50, y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Se pipetearon los organoides de la solución y se incubaron en 200  $\mu$ L de la solución de bloqueo que contiene concentraciones normalizadas de Alexa flúor 488, Alexa flúor 568, y 0.5 $\mu$ g/mL DAPI, durante 3 horas. Los organoides se montaron en cubreobjetos de vidrio y se tomaron imágenes confocales a través del microscopio confocal Nikon.

## 10 Resultados

### Enriquecimiento microfluídico de células madre intestinales

Para aumentar el enriquecimiento y la pureza de las células Lgr5 se necesitaron modificaciones a los parámetros experimentales, que incluyen el ajuste del pH y la pacificación de la reacción (Figura 6A). Las muestras y las formulaciones se dividieron en cinco escenarios (Figura 6A), en cada uno se modifica una variable. El rendimiento de pureza de estos escenarios se comparó con respecto a la población inyectada. Mediante citometría de flujo se cuantificó el porcentaje de pureza de la población celular liberada (Figura 6C) con respecto al de la población celular inyectada (Figura 6C). Cada histograma se seleccionó a partir del régimen de EV versus la rugosidad celular para mitigar el ruido, y cada parámetro de selección se propagó a través de cada muestra. \*P < 0.0005, \*\*P < 0.001, \*\*\*P > 0.05; n=3. Las optimizaciones para la captura de Lgr5 abarcaron cuatro variables, que incluyen la velocidad de flujo, la pacificación, el pH y el tiempo de reacción. La albúmina de suero bovino (BSA), un agente de pacificación, permitió una disminución en la suciedad dentro de los canales microfluídicos, lo que facilitó el establecimiento del flujo constante a través del canal y la inhibición de las uniones inespecíficas al conjugado alginato/anticuerpo. La concentración de BSA, modificada en los procedimientos IV y V, tuvo poco efecto sobre el sistema y no afectó los rendimientos de pureza (Figura 6B). Las velocidades de flujo, ajustadas entre 3 y 5  $\mu$ L/minuto (escenarios III y IV), resultaron en una disparidad bastante significativa en la que se sugieren posibles efectos de cizallamiento sobre las células diana a velocidades de flujo mayores (Figura 6B).

Se investigaron los efectos del pH dentro de la reacción de alginato para mejorar las interacciones entre PEG estrella de 4 brazos, el EDC y los anticuerpos. Al comparar los escenarios III y VI, es evidente que un cambio de pH de 4.7 a 6.0 tuvo un efecto general significativo sobre la eficacia del hidrogel de alginato en la captura de células Lgr5 positivas (p < .001). El aumento del pH elimina los protones de los sitios de reacción, por lo tanto, permite un aumento de las reacciones potenciales de los conjugados anticuerpo-PEG y alginato-EDC, y se promueve la terminación de la reacción global. Los tiempos de mezcla e incubación no tuvieron un efecto estadísticamente significativo en el enriquecimiento. El Escenario III resultó en el mayor rendimiento de pureza, con aproximadamente un 49 % de población pura de células Lgr5 positivas liberadas; esta formulación facilitó un enriquecimiento de Lgr5 de 24 veces a partir de la suspensión inyectada (Figura 6B). La viabilidad se evaluó con el enfoque microfluídico y produjo aproximadamente 85 % de retención viable (datos no mostrados).

### 40 Validación y recuento de células Lgr5 positivas mediante citometría de flujo

Para determinar las capacidades de enriquecimiento y los rendimientos de pureza del dispositivo microfluídico de columnas, se usó la citometría de flujo para el recuento de las poblaciones positivas con respecto a diferentes formulaciones de alginato/anticuerpo. La selección inicial dentro del régimen de dispersión por tamaño y rugosidad celular permitió mitigar los desechos extraños. Las suspensiones de homogenado intestinal digerido inyectadas y liberadas se conjugaron con anti-GPCR GPR49-RPE en PBS. Las poblaciones de control, carentes de un marcaje de anticuerpo, se seleccionaron de la misma manera para permitir la mediación del ruido y la autofluorescencia. Las poblaciones inyectadas y liberadas se seleccionaron de la misma manera y se sobrepusieron al control para compensar el ruido. Las muestras inyectadas comprendían aproximadamente 2.3 % de células Lgr5 positivas del homogenado intestinal digerido (Figura 6C). El análisis de citometría de flujo demostró un enriquecimiento de 24 veces de la población diana Lgr5 positiva con respecto a la población liberada en el escenario III (Figura 6D).

Las células enriquecidas indujeron hiperplasia y organoides derivados de células individuales

Las células Lgr5 positivas enriquecidas liberadas se sumergieron en Matrigel y crecieron en condiciones similares como se describe en Sato y otros; Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature 2009, 459 (7244), 262-U147. Las técnicas de cultivo para las células Lgr5 positivas incluyeron componentes de factores de crecimiento que se modificaron ligeramente al considerar los factores dependientes de las especies. Se usaron factor de crecimiento endotelial de rata (EGF) y rspondin-1 murino, en contraste a las fuentes de la literatura que han implementado un modelo de ratón híbrido. El inhibidor de rock, Y-26743, se usó para mejorar la estabilidad del cultivo y evitar la anoikis en una suspensión unicelular. El inhibidor se usó, además, simultáneamente en las técnicas de enriquecimiento microfluídico, y se observó que resultó en un aumento en la eficacia del crecimiento en placa (datos no mostrados), pero exhibió poco efecto en los cultivos no enriquecidos (Figura 7A-C). La progresión de organoides, a partir de células Lgr5 individuales enriquecidas, se observó hasta 4 días y se comparó con una población no enriquecida (Figura 7D-E). El crecimiento se observó en el día 2 y progresó a la etapa de hiperplasia en el día 3. La formación de una cavidad pequeña junto con un aumento de la hiperplasia se observó el día 4.

Las Figuras 7A-C muestran que la progresión de organoides no enriquecidos produjo organoides similares a quistes significativamente más grandes rodeados por poblaciones extrañas. Las Figuras 7D-F muestran la progresión de cuatro días de organoides enriquecidos derivado de la suspensión de células individuales. Se muestran la expansión de una célula individual (Figura 7D) en el día 2, la hiperplasia inducida en el día 3 (Figura 7E), y la formación de una cavidad pequeña observada con las células apoptóticas secretadas circundantes, en el día 4 (Figura 7F). Las barras de escala representan 100  $\mu\text{m}$

Las progresiones diarias de las células *Lgr5* positivas liberadas se cultivaron en paralelo frente a una población no enriquecida. La suspensión no enriquecida se sembró en el mismo volumen que la población liberada y se cultivó en las mismas condiciones. En el cultivo no enriquecido aparecieron morfologías múltiples, que abarcan desde organoides con cavidad central, que albergan células apoptóticas (Figuras 7C y 8C), hasta morfologías fibroblásticas. La velocidad de crecimiento de la suspensión no enriquecida fue más acelerada en comparación con la población enriquecida. La eficacia del crecimiento en placa se mejoró en la población enriquecida mediante la adición de *Wnt3a* al sistema de cultivo (Figura 8B). La adición de *wnt3a* al medio de cultivo mantiene la viabilidad y la independencia de las células de Paneth (Figura 8D).

La población no enriquecida (Figura 8A) no tuvo ningún aumento en la eficacia del crecimiento en placa en presencia de la proteína *Wnt3a*. La mayoría de los organoides formados en el cultivo inyectado expresaron una estructura similar a un quiste que alberga células apoptóticas (Figura 8C). Por el contrario, la población enriquecida (Figura 8B) tuvo un aumento en la eficacia del crecimiento en placa que condujo a más organoides proliferantes derivados de células individuales. Las células enriquecidas exhibieron una morfología similar al estudio de la carencia de *wnt3a* (Figura 8D) en puntos de tiempo análogos. Las imágenes se tomaron a los 3 días en cultivo; la barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

Inmuntinción de organoides enriquecidos y no enriquecidos mediante microscopía confocal

Los organoides enriquecidos y no enriquecidos se liberaron del cultivo el día 4 mediante un tratamiento con dispasa para degradar el Matrigel. Los organoides teñidos se expusieron a anti-GPCR49, anti-CD24 y DAPI, cada uno conjugado con alexa flúor 488 (verde) y 524 (rojo) (Figuras 9 y 10). La microscopía confocal facilitó la determinación de la morfología de los organoides y la expresión de proteínas. Los organoides no enriquecidos (Figura 10) tenían una población de células apoptóticas significativa dentro del dominio central. El organoide no experimentó hiperplasia durante la duración del cultivo y exhibió una señal brillante de CD-24 en un patrón elíptico. La expresión de Anti-*Lgr5*/GPCR49 era débil (Figura 10b), y la expresión se limitaba al dominio de la cavidad del organoide. La localización de anti-*Lgr5*/GPCR49 disminuyó en las poblaciones de CD24 significativamente bajas (Figura 10A-B).

La topografía del cultivo no enriquecido exhibió una morfología elíptica plana (Figura 10D) en contraste con el organoide enriquecido, que era esférico (Figura 9D). El dominio central expresó CD-24 (verde) y anti-*Lgr5*/GPCR49 (rojo), localizados en la membrana apical (Figura 9A-B). La expresión de CD-24 se localizó a lo largo de 4 membranas diferentes (Figura 9A), y la expresión fue de menor intensidad en comparación con el organoide no enriquecido. El anti-*Lgr5*/GPCR49 localizado fue centrado en la membrana apical y se expresó en 2 membranas (Figura 9B). La expresión de ambos marcadores se limitó estrictamente al dominio central, que coincide con las tendencias genómicas de *Sox9* (CD-24) y *Lgr5*. (Gracz, A. D. y otros, *Sox9* expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol-Gastr L* 2010, 298 (5), G590-G600; 14; Sei, Y. y otros, A stem cell marker-expressing subset of enteroendocrine cells resides at the crypt base in the small intestine. *Am J Physiol-Gastr L* 2011, 300 (2), G345-G356).

#### Discusión

La presente descripción satisface la necesidad de desarrollar dispositivos y métodos de aislamiento de células rentables y libres de fluorescencia para sus aplicaciones, tales como ingeniería de tejidos. Los métodos convencionales en el aislamiento de células madre intestinales se basan en modelos de ratones híbridos e instrumentación compleja, tal como FACS. El presente Ejemplo describe un método microfluídico que enriquece las poblaciones de células madre intestinales mediante el uso de alginato acoplado con anti-GPCR49/*Lgr5*. Además, las células enriquecidas *Lgr5* se cultivaron en un medio de cultivo apropiado. Después de adicionar las células en el medio, se investigó la expresión de CD24 que coincide con la expresión de *Lgr5* en el dominio central de los organoides. Este ejemplo describe métodos y dispositivos que enriquecen una población diana seleccionada a la vez que conservan la viabilidad, la expresión y la morfología del crecimiento.

Este Ejemplo describe un modelo microfluídico de captura y liberación de alginato, de una etapa, capaz de un enriquecimiento de 24 veces hasta una pureza de GPCR49/*Lgr5* del 49 %. El uso de un agente pacificante, la BSA, permitió una disminución de las uniones inespecíficas. El fenómeno genera un efecto de cascada en el que los tipos de células coaguladas que contienen células *Lgr5* positivas se adhieren al recubrimiento de alginato; se realizó una inyección inmediata de células filtradas para facilitar la dispersión. Las interacciones químicas y la estabilidad entre el alginato, el EDC, el PEG estrella de 4 brazos, el Anti-GPCR49/*Lgr5* aumentaron a medida que el pH de la reacción se hizo más básico.

Aún sin estar sujeto a ninguna teoría, al aumentar el pH de la reacción se eliminan los protones de los sitios activos en el PEG estrella-4, lo que puede limitar las interacciones de los anticuerpos a los 4 sitios activos, por lo tanto, se inhibe la unión covalente con la matriz de alginato que produce un efecto de adsorción. La probabilidad de las interacciones puede reducirse mediante la introducción de un reactivo de remate para inhibir las reacciones secundarias no deseadas. A diferencia de los métodos convencionales, los métodos descritos pueden usarse para la multiplexación, lo que permite que muchos dispositivos se ejecuten en paralelo y se aumente el rendimiento. Además, los métodos descritos permitieron el aislamiento de células madre intestinales libres de marca fluorescente mientras que conservan una morfología similar al crecimiento *in situ*.

El cultivo de las poblaciones celulares inyectadas y aisladas proporcionó información sobre la composición celular, la morfología y el efecto de los factores solubles, específicamente, Wnt3a. Las muestras inyectadas y liberadas se cultivaron de manera similar a como se informó previamente en la literatura. Para investigar el crecimiento morfológico de la población Lgr5 enriquecida y el homogenado digerido inalterado, se realizaron cultivos en paralelo para evaluar las diferencias en la proliferación y la morfología. El crecimiento dentro de la población no enriquecida tuvo variaciones morfológicas significativas entre los organoides. Muchos de los organoides no experimentaron hiperplasia y se mantuvieron en un estado similar a quiste, mientras que otros formaron capas fibroblásticas monolíticas. Ya sea que Wnt3a estuviera presente o ausente dentro del cultivo, los organoides no enriquecidos no se vieron afectados y mantuvieron morfologías similares. La población no enriquecida contiene dobletes de células Lgr5 positivas-Paneth, que sostienen la señalización Wnt necesaria; por lo tanto, se notó un efecto nulo en presencia del cofactor. En ausencia de Wnt3a, se observó que la eficacia del crecimiento en placa entre la población no enriquecida era ligeramente mayor con respecto a la suspensión enriquecida; esto es indicativo de que la señalización del nicho de células Paneth permite una viabilidad mejorada de organoides a largo plazo. Los organoides enriquecidos se sembraron de forma similar a la suspensión inyectada, pero la diferencia significativa radicó en los cambios morfológicos y en la eficacia del crecimiento en placa de las células positivas GPCR49/Lgr5 liberadas.

En ausencia de Wnt3a, la eficacia del crecimiento en placa de la población enriquecida estaba dentro del intervalo del 6 % como se informó anteriormente. La progresión de la edad de las células deficientes de Wnt3a exhibió la formación de cavidades y un posible inicio hiperplásico. Esto está en línea con la morfología informada previamente de organoides derivados de células Lgr5 individuales. Las células apoptóticas secretadas rodeaban el organoide enriquecido, lo que indica una naturaleza autosostenida, que imita la proliferación *in vivo*. La presencia de Wnt3a condujo a un aumento en la eficacia del crecimiento en placa, así como también a cambios morfológicos. En puntos de tiempo similares, en los cultivos deficientes en Wnt3a, la morfología era similar a un quiste y exhibía un fenotipo progenitor. La adición de este componente facilita la activación de rspondin-1 y sostiene el nicho de las células Paneth sin contacto directo.

La literatura reciente sugiere que las células madre intestinales potencialmente radican en dos genes codificados, Sox9 y Lgr5. Estas tendencias de expresión se unen a los dominios intra y extracelulares de las células, que pueden identificarse con CD24 y GPCR49, respectivamente. Para investigar las tendencias de expresión dentro de los organoides, la inmunohistoquímica acoplada con la microscopía confocal proporcionó una idea de estos patrones. El órgano no enriquecido exhibe una morfología similar a quiste que alberga células apoptóticas dentro del dominio central. La expresión de CD24 se demostró en la membrana apical dentro de la cavidad central, mientras que GPCR49/Lgr5 exhibió una expresión positiva en regiones de baja expresión de CD24; esta tendencia es similar a la expresión genómica descubierta previamente. Por el contrario, el organoide enriquecido exhibió una morfología ligeramente diferente, pero con patrones de inmunexpresión similares. Las imágenes indican un organoide más pequeño con una cavidad central pequeña formada, no obstante, para albergar cualquier célula apoptótica. La expresión de CD24 y GPCR49/Lgr5 se une al dominio central con patrones de expresión similares a este último. Las imágenes presentadas sugieren que el proceso de enriquecimiento microfluídico conserva los resultados morfológicos similares como se informó anteriormente.

El ejemplo describe los métodos y dispositivos que pueden usarse para la clasificación de células y la ingeniería de tejidos. El Ejemplo describe una técnica de aislamiento de células madre intestinales a partir del homogenado intestinal digerido de tipo silvestre. La convención actual para aislar estas células se limita a los modelos de ratones transgénicos y a la instrumentación compleja. Los métodos descritos permiten que el usuario final aisle los subtipos celulares en un proceso rápido mientras se conserva la viabilidad celular.

### Ejemplo 3 - Dispositivos y métodos de captura y liberación de múltiples etapas

Este ejemplo se refiere a composiciones y métodos para una captura y liberación altamente específica de múltiples etapas de materiales biológicos, tales como células.

La primera etapa en la separación de células diana cuya identidad se define por dos receptores de superficie diferentes (por ejemplo, poblaciones de células de sangre completa que son CD31+ y FLK1+). Las Figuras 11A-D representan una configuración de dispositivos a base de hidrogel de alginato que incluye etapas de captura para cada uno de los dos anticuerpos. En algunas modalidades, se contemplan más de dos anticuerpos.

En las Figuras 11A-D, se inyecta una muestra mediante una bomba de infusión de jeringa en la primera etapa de captura basada en alginato ("Aislamiento del marcador 1"/Figura 11A). Esta etapa se comunica con la etapa B, que consiste en una válvula de 2 vías. En su configuración "cerrada", esta válvula permite que los desechos de la etapa A pasen a través

de un tubo de recolección. Después de que los desechos pasan, la corriente de desechos se cierra mediante el uso de, por ejemplo, una válvula de pellizco. (Figura 11 B). El objetivo del cloruro de calcio es neutralizar el EDTA en la suspensión celular que emerge de la etapa (Figura 11A). Para garantizar la mezcla de la solución de cloruro de calcio con esta suspensión celular, la salida combinada (que era en flujo laminar) se envía a una cámara de mezclado (Figura 11C) que contiene un arreglo de columnas hexagonal característico. Después, la solución mezclada entra en la etapa (Figura 11D), donde se capturan las células que expresan los receptores para la segunda molécula de captura. La etapa final en el proceso de separación es la inyección de una solución de EDTA en la entrada de la etapa A (Figura 11A), que libera las células capturadas a partir de la etapa B (Figura 11B). Esta solución se recolecta en un tubo que contiene un exceso de medio de cultivo para minimizar cualquier efecto perjudicial del EDTA sobre las células.

Este ejemplo muestra la capacidad de este sistema de captura de dos etapas para aislar las células progenitoras endoteliales (CPE) a partir de sangre completa no tratada. El objetivo era capturar células que son CD34+/ FLK1+. La Figura 12 muestra recuentos celulares (obtenidos mediante citometría de flujo) de las células que emergen de la etapa A y de la etapa B. En la Figura 12, las diversas poblaciones mostradas representan categorías de células CD34+ y la columna "total" representa el número total de células liberadas. El objetivo del segundo dispositivo de captura era eliminar las células CD34+ que no expresan el segundo marcador, FLK-1, específicamente, las células CD34+ que, además, son CD45+. La disminución evidente en el número de células CD45+ que salen de la segunda etapa de captura, con respecto a la primera etapa de captura, muestra este enriquecimiento.

Otros aspectos, modificaciones, y modalidades están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende un hidrogel de alginato en el que el ácido algínico está en presencia de cationes divalentes; en donde el hidrogel de alginato comprende polietilenglicol ramificado, en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga a agentes de unión, y en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga a moléculas de ácido algínico en el hidrogel.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agentes de unión se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, compuestos peptidomiméticos, péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el hidrogel usa moléculas de PEG de 4 brazos con terminaciones de grupos amino primario en los extremos de cada brazo.
- 20 4. Un método de separación de células que comprende:  
permitir que un hidrogel de alginato que comprende moléculas de ácido algínico, polietilenglicol ramificado, cationes divalentes y un agente de unión se formen, in situ, en un dispositivo microfluídico, en donde el polietilenglicol ramificado se conjuga al agente de unión, y el polietilenglicol ramificado se conjuga a moléculas de ácido algínico en el hidrogel;  
pasar una muestra que comprende una célula de interés a través del dispositivo microfluídico;  
permitir que el agente de unión dentro del hidrogel capture la célula de interés; y  
liberar la célula de interés capturada mediante el uso de un agente liberador.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente liberador es un quelante.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el quelante es EDTA.
- 30 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la muestra es sangre completa, suero, saliva, linfa, bilis, orina y cualquier otro fluido biológico.

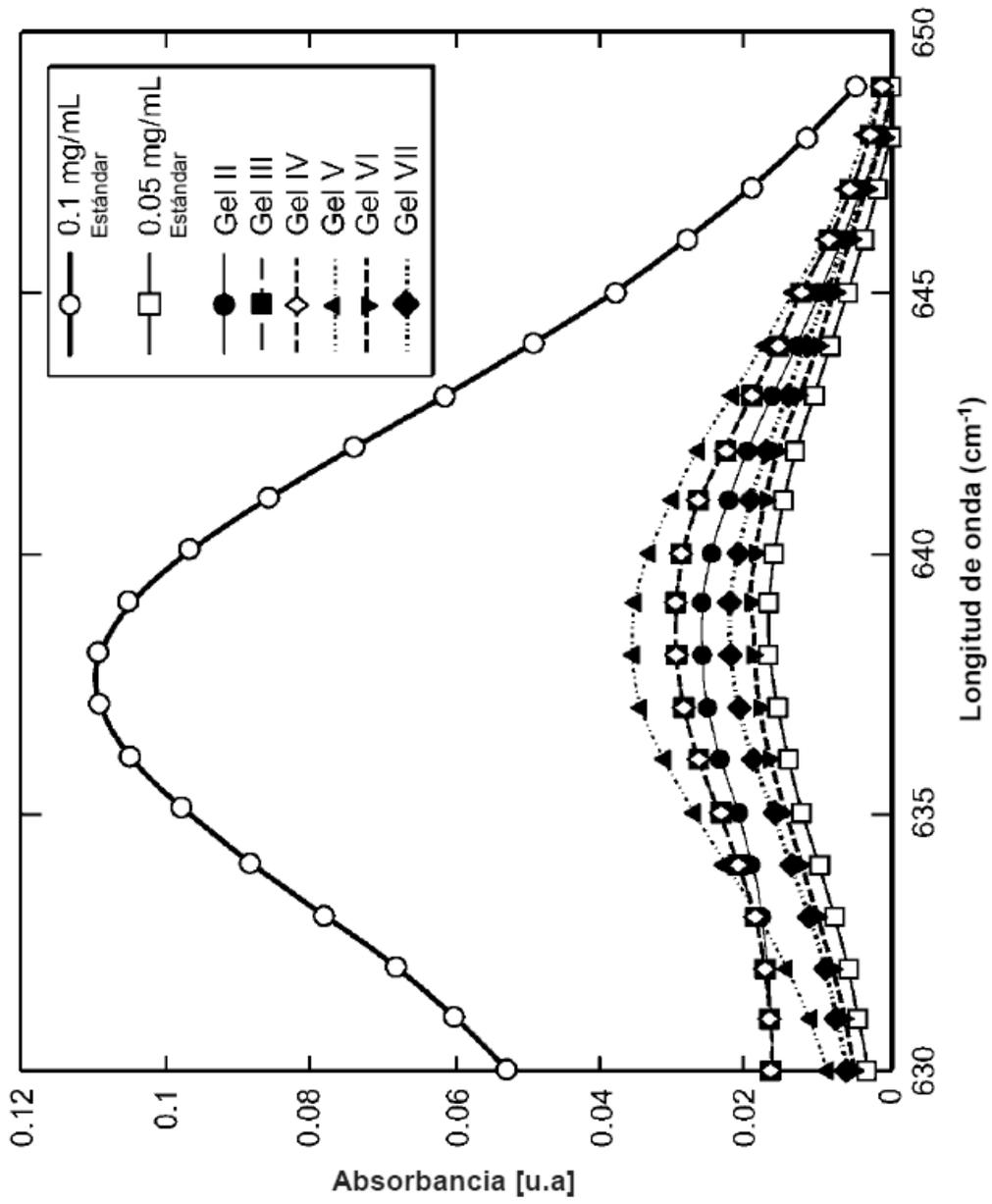


Figura 1

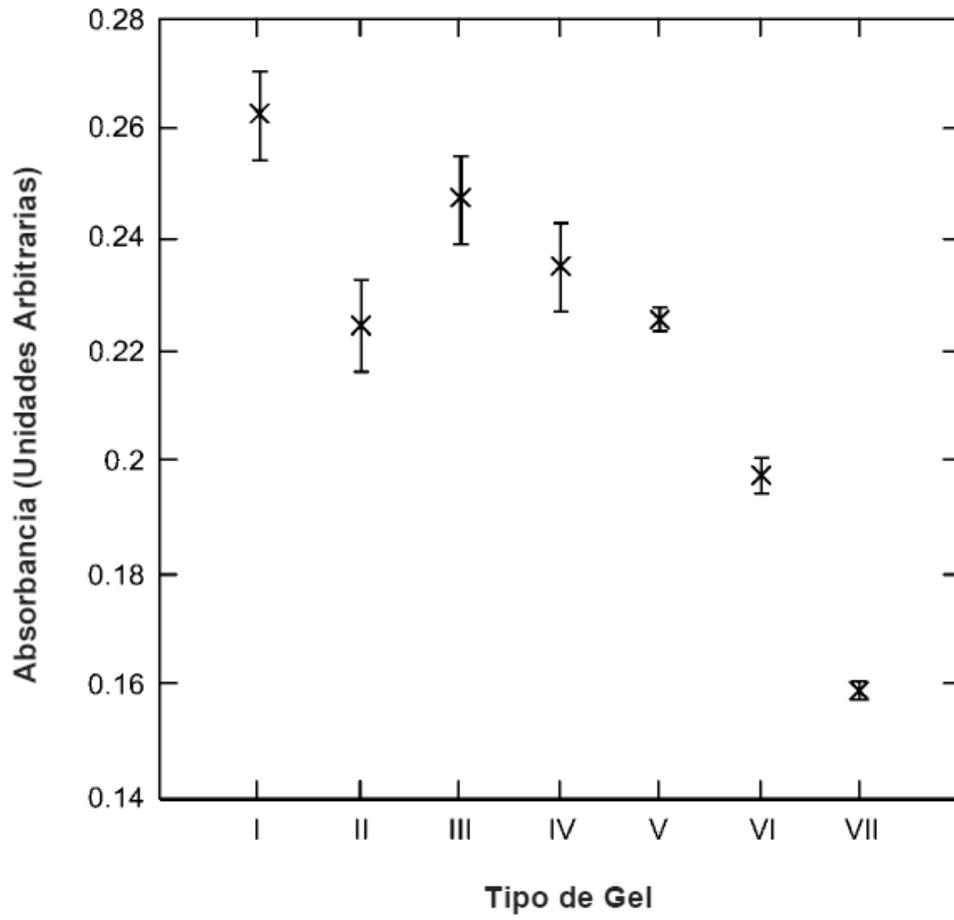


Figura 2

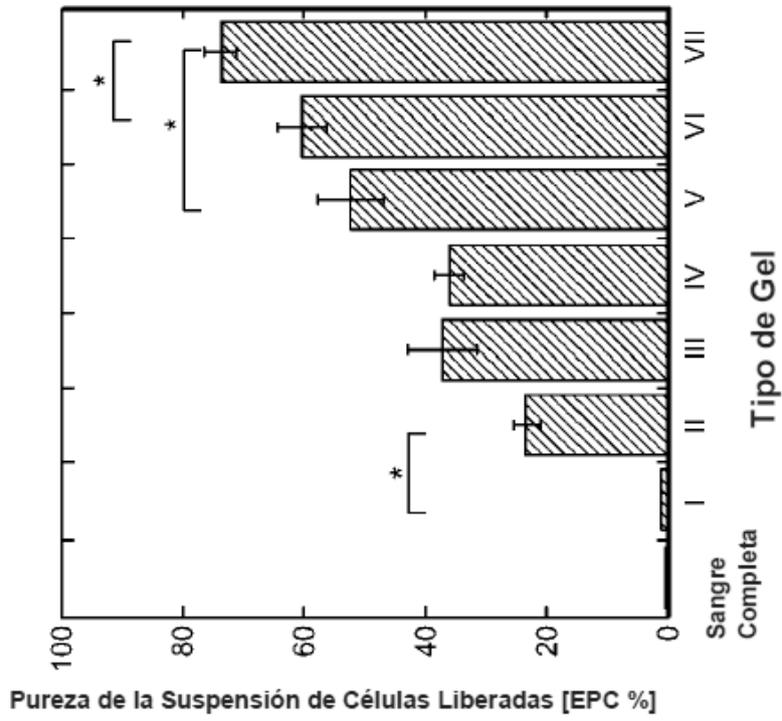


Figura 3b

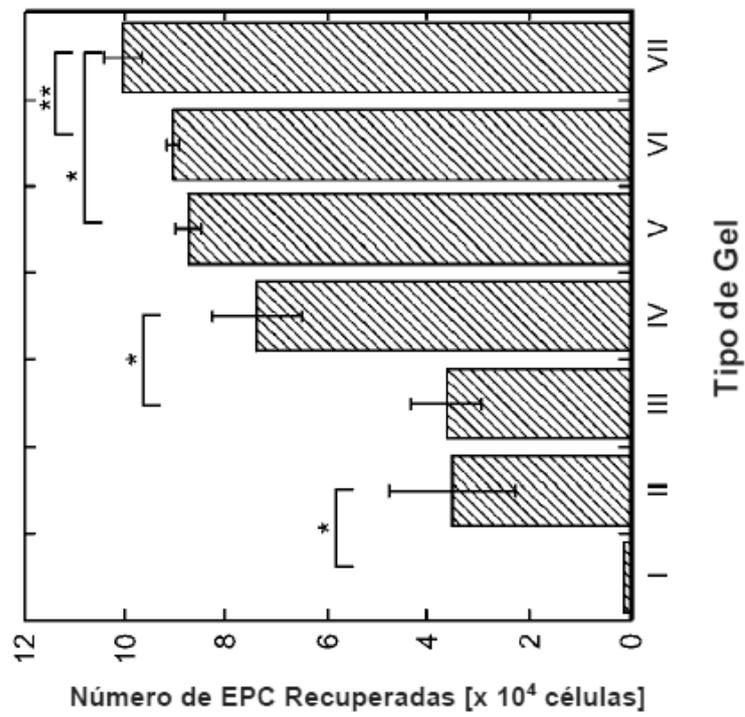
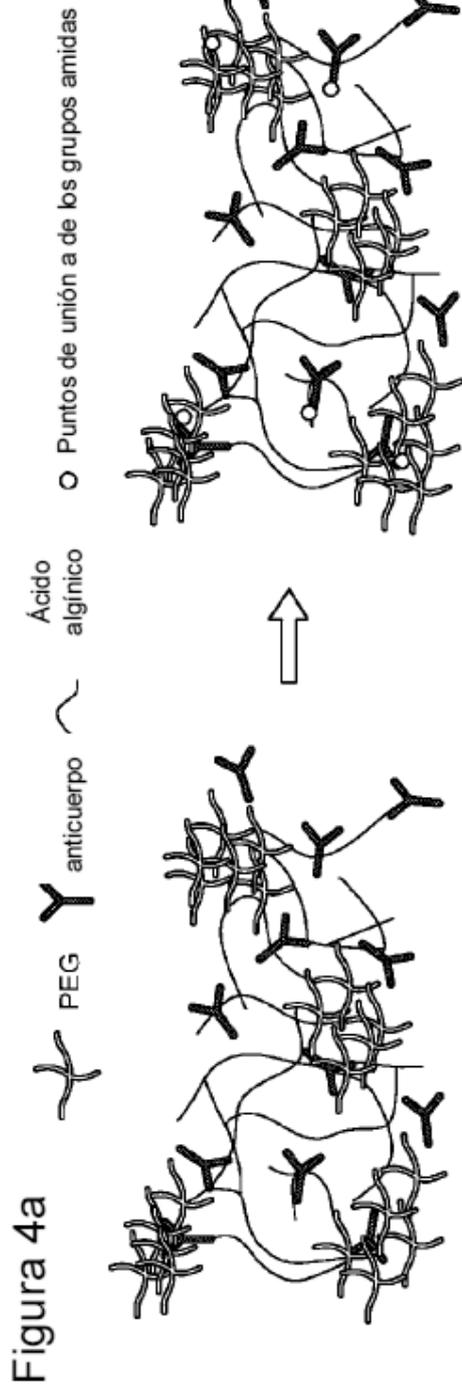
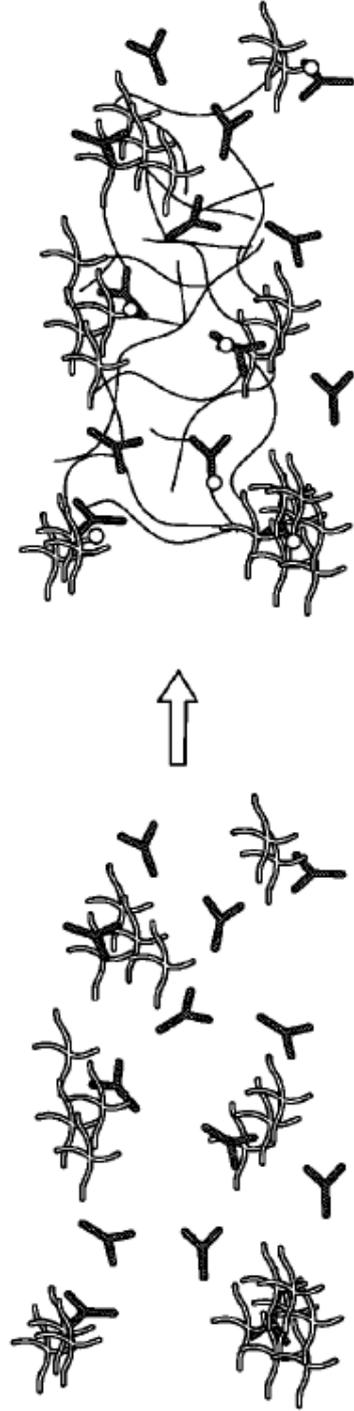


Figura 3a



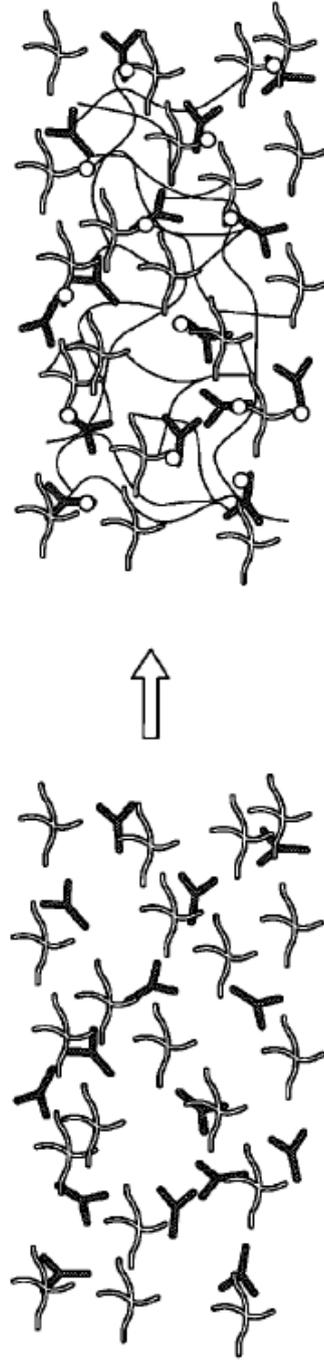
Tipos de Geles II-IV; todos los reactivos se combinan juntos

**Figura 4b**



Tipo de Gel V; protocolo de mezclado de dos etapas con PEG, anticuerpos, EDC y sulfo NHS en la primera etapa

Figura 4c



Tipos de Geles VI-VII; se mezclan previamente el PEG y los anticuerpos

Figura 5a

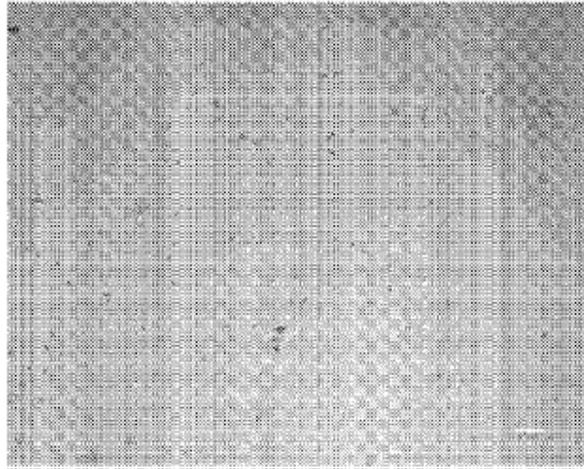


Figura 5b

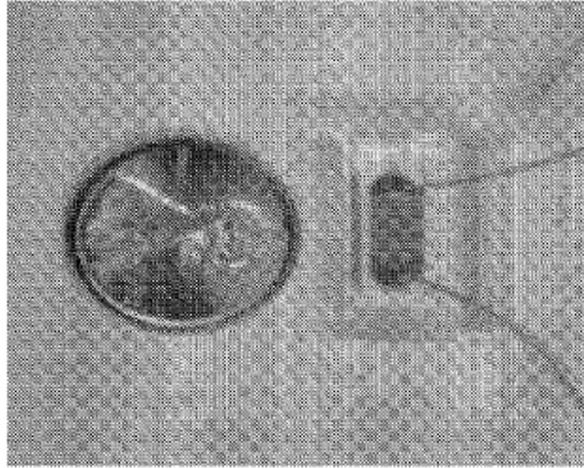
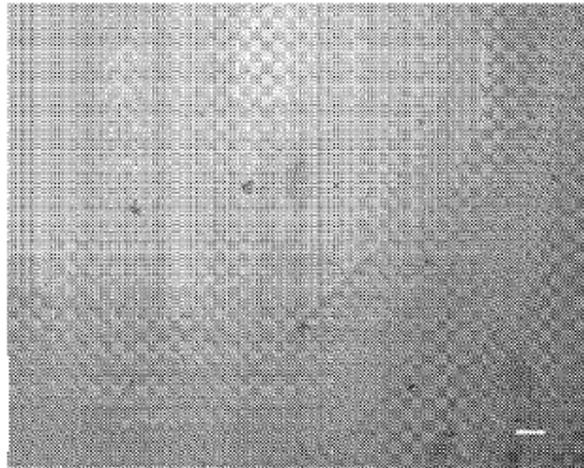


Figura 5c



Muestra	Velocidad de inyección	Porcentaje de BSA	pH	Formulación de Alginato Etapa I (Mezcla/Incubación)	Formulación de Alginato Etapa II (Mezcla/Incubación)
I-Inyectado	-	-	-	-	-
II	3µL/min	0.1%	6.0	29/60	29/60
III	3µL/min	0.1%	6.0	29/0	60/0
IV	5µL/min	0.1%	6.0	29/0	60/0
V	5µL/min	1.0%	6.0	29/0	60/0
VI	3µL/min	0.1%	4.7	29/0	60/0

Figura 6a

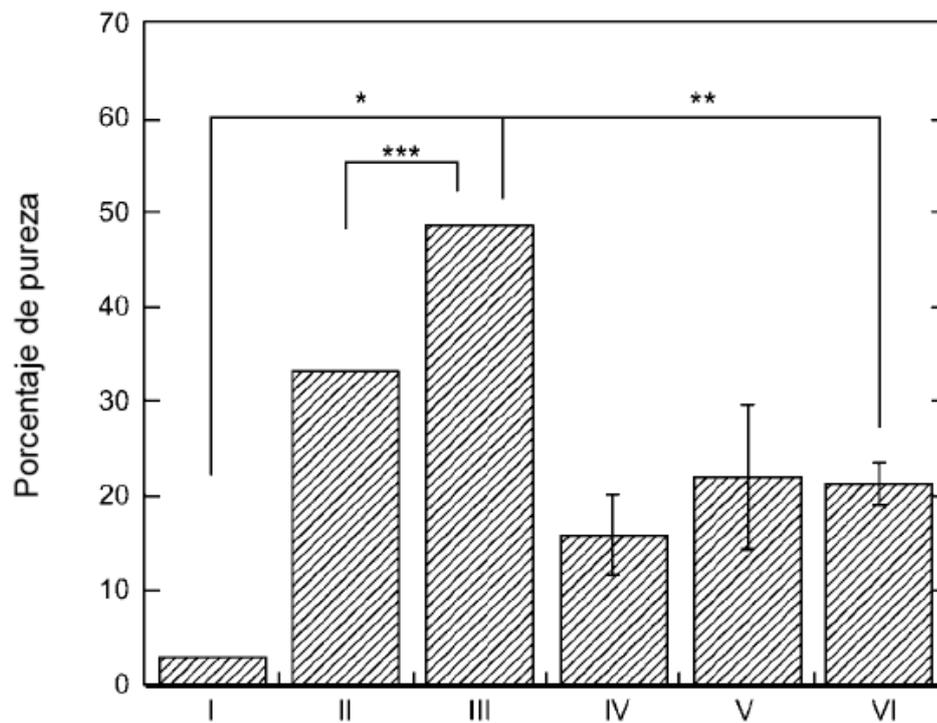


Figura 6b

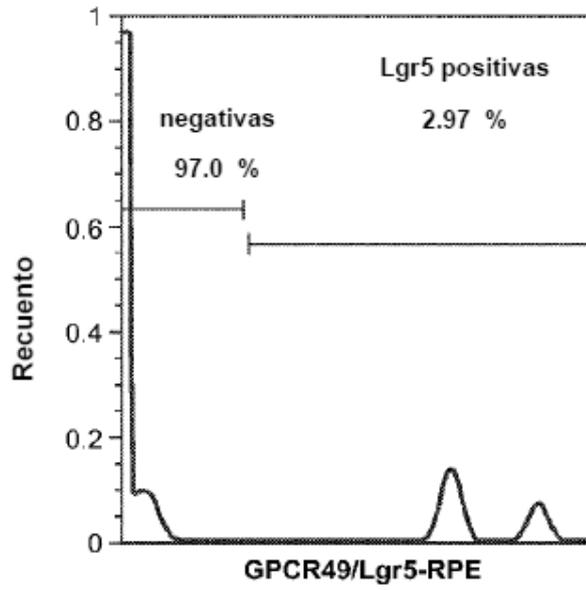


Figura 6c

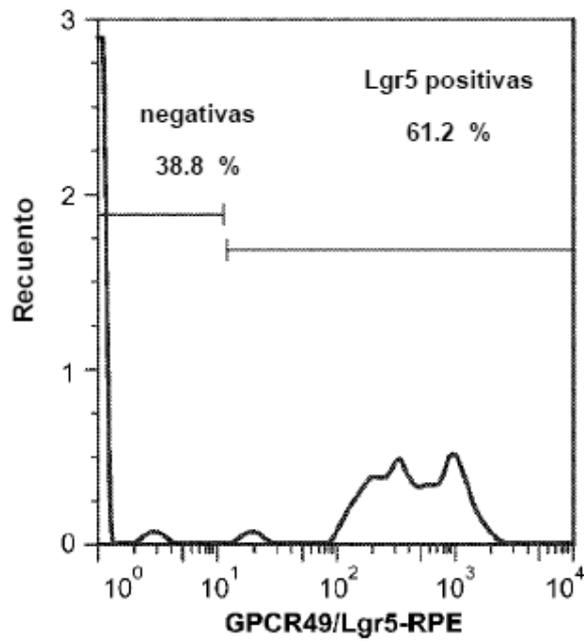


Figura 6d

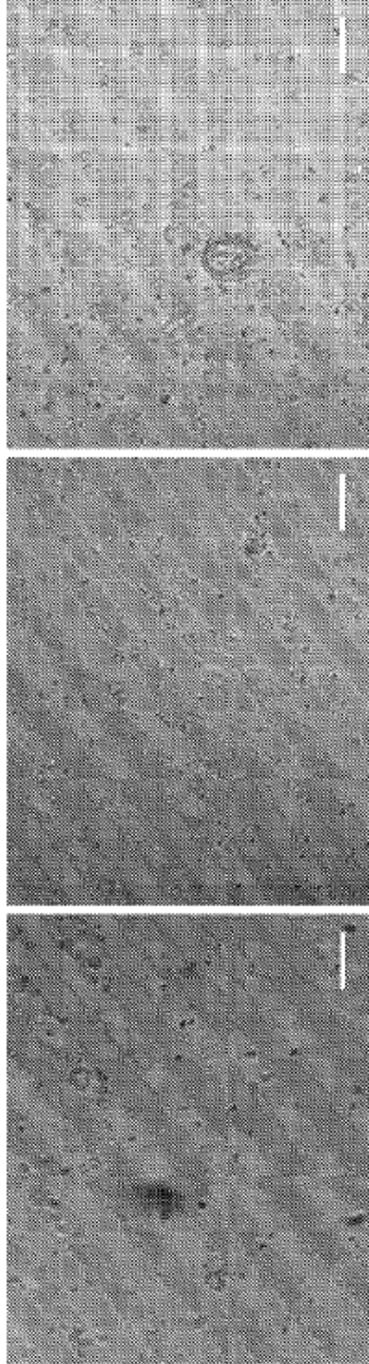


Figura 7a

Figura 7b

Figura 7c

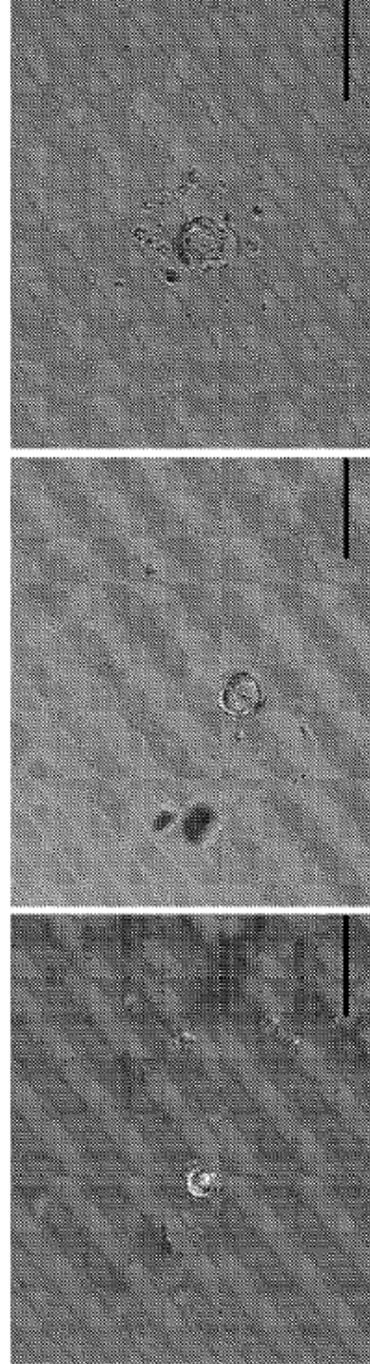


Figura 7d

Figura 7e

Figura 7f

Figura 8b

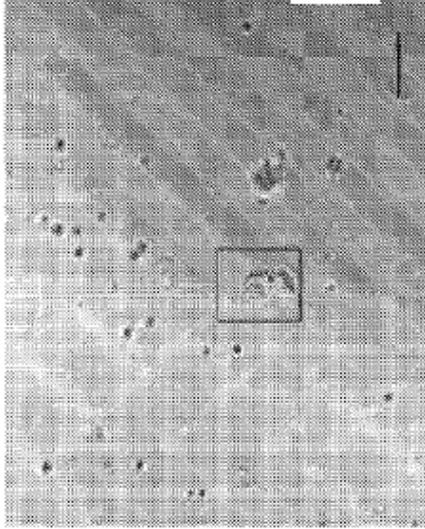


Figura 8d

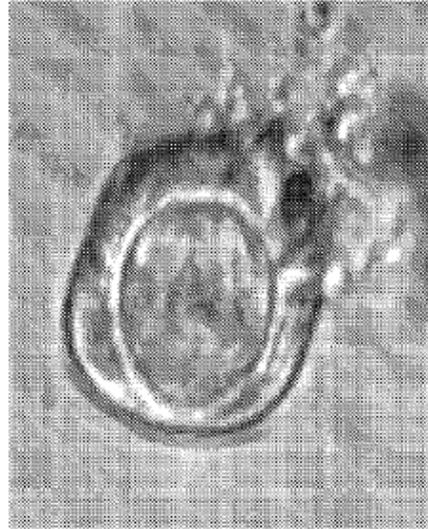


Figura 8a

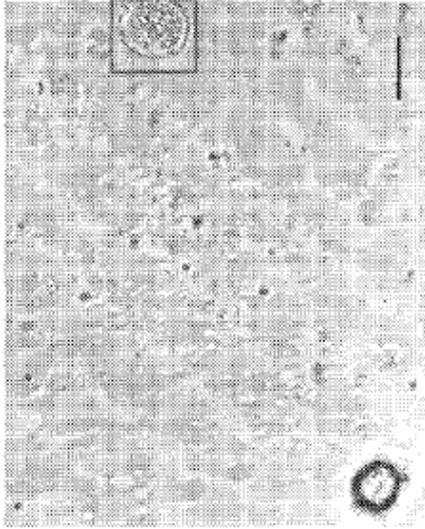


Figura 8c



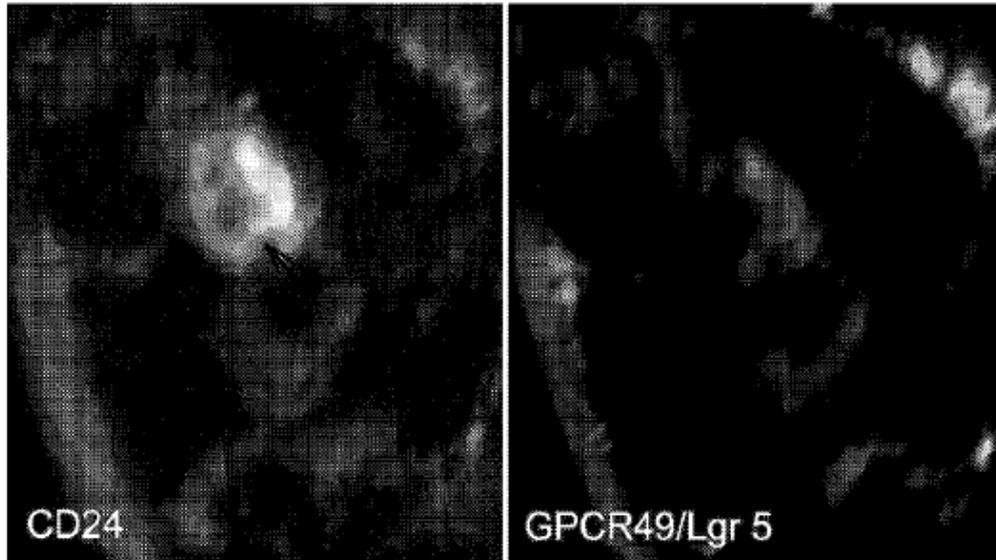


Figura 9a

Figura 9b

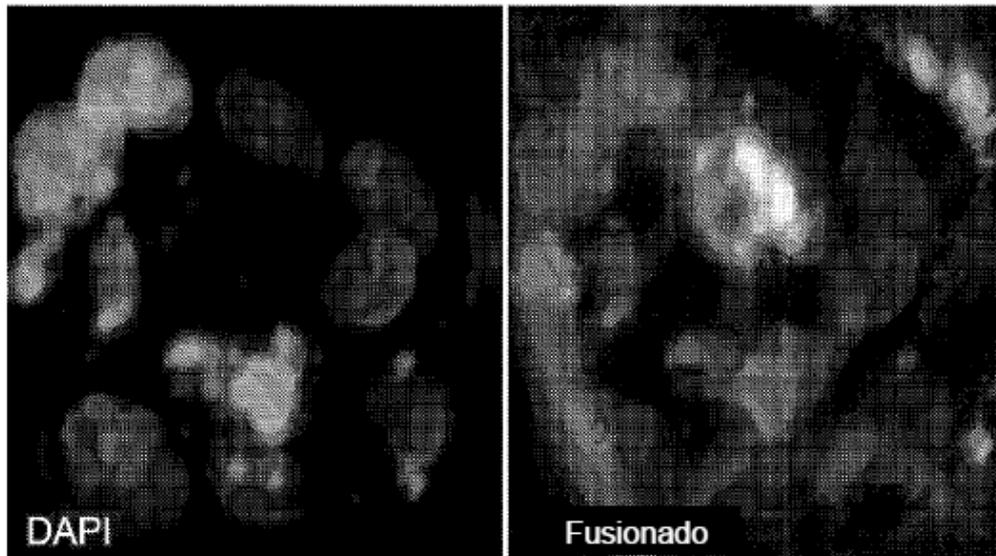


Figura 9c

Figura 9d

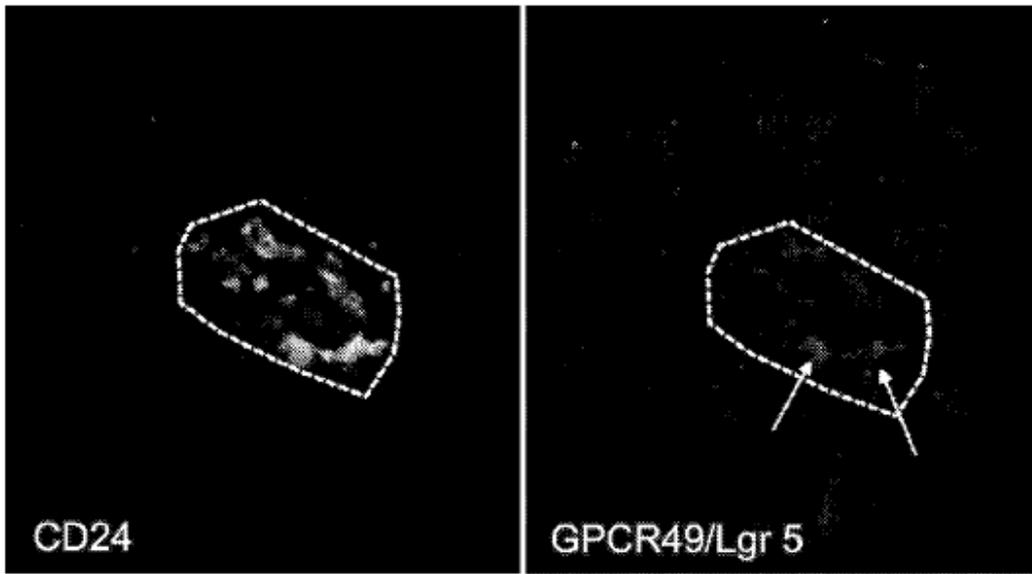


Figura 10a

Figura 10b

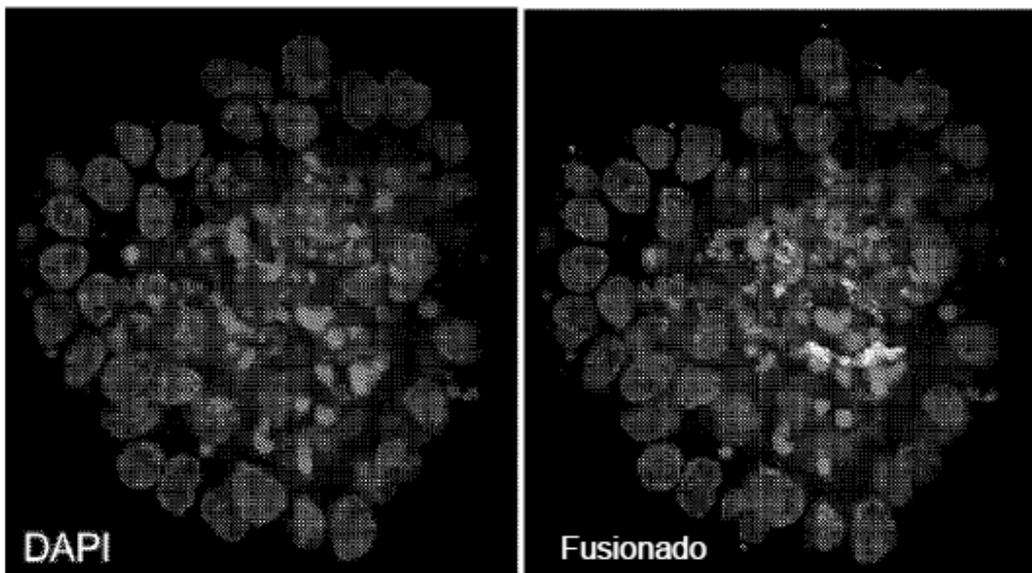


Figura 10c

Figura 10d

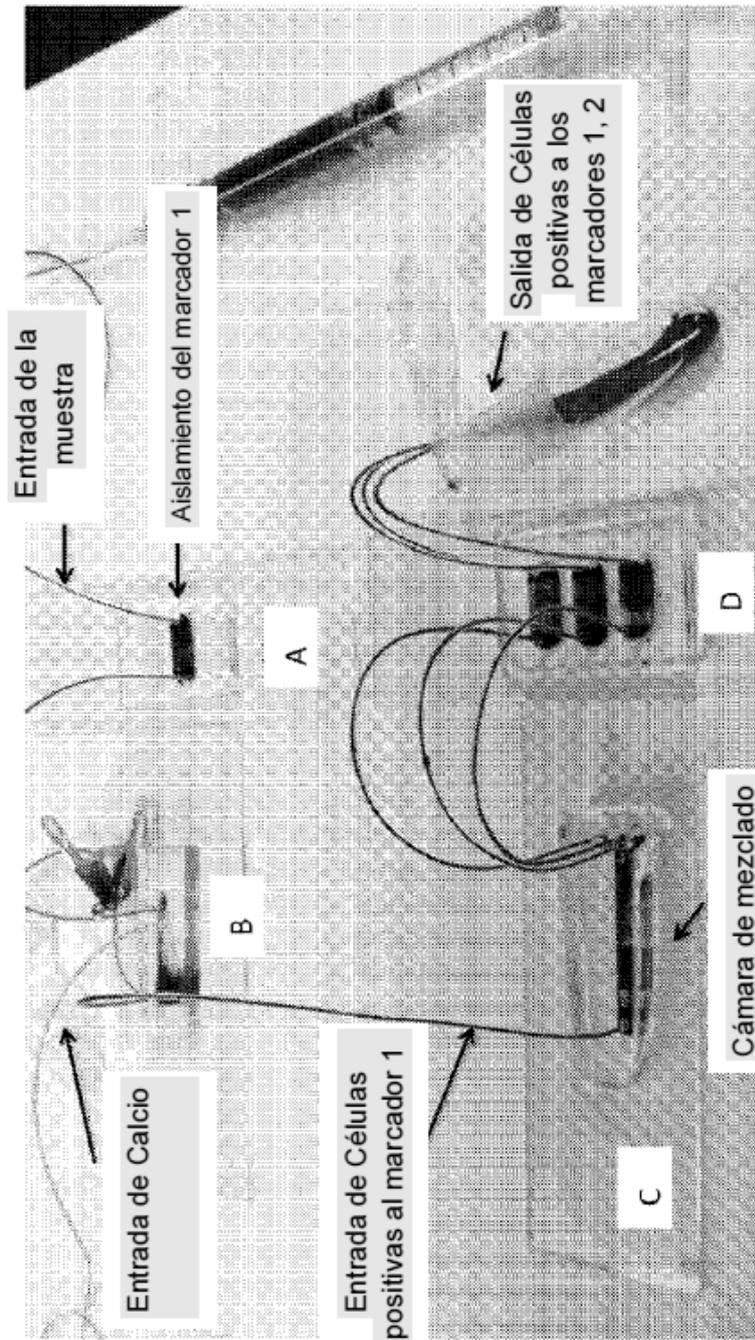


Figura 11

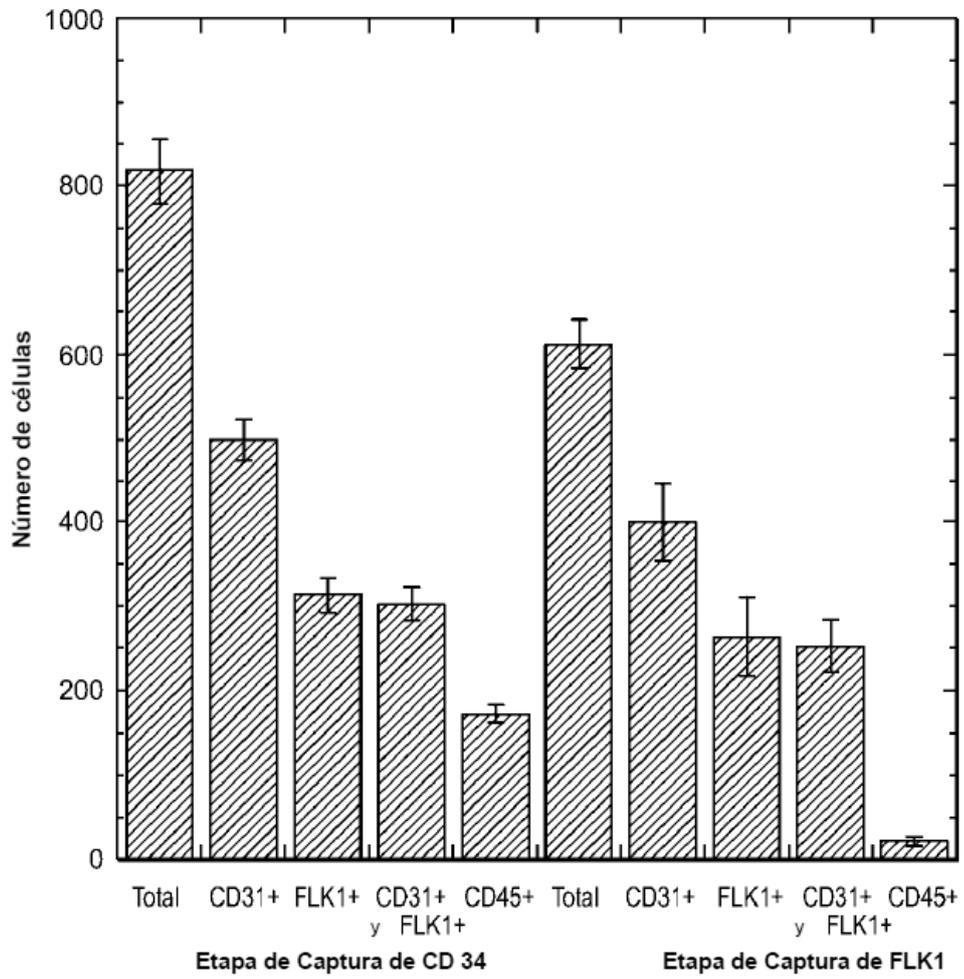


Figura 12