

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 204**

51 Int. Cl.:

<b>D06M 15/03</b>	(2006.01)	<b>D01D 5/34</b>	(2006.01)
<b>D01F 4/00</b>	(2006.01)	<b>D01F 8/18</b>	(2006.01)
<b>D01F 4/02</b>	(2006.01)	<b>D01F 8/02</b>	(2006.01)
<b>D01F 9/00</b>	(2006.01)		
<b>D03D 15/00</b>	(2006.01)		
<b>D06M 101/14</b>	(2006.01)		
<b>D06M 15/13</b>	(2006.01)		
<b>D06M 15/277</b>	(2006.01)		
<b>D06M 15/576</b>	(2006.01)		
<b>D01D 5/06</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2010 PCT/JP2010/067852**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11046105**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2010 E 10823373 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2489779**

54 Título: **Fibras de microgel recubiertas**

30 Prioridad:

**14.10.2009 JP 2009237087**  
**24.06.2010 JP 2010143411**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2019**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)**  
**3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku**  
**Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**TAKEUCHI SHOJI;**  
**ONOE HIROAKI;**  
**MATSUNAGA YUKIKO;**  
**KIRIYA DAISUKE;**  
**GOJO RIHO y**  
**NEGISHI MIDORI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 716 204 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**

Fibras de microgel recubiertas

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una fibra de microgel recubierta con hidrogel de alta resistencia

**Antecedentes técnicos**

10 Las microperlas que utilizan hidrogel (Advanced Materials, 19, pp.2696, 2007; Lab on a Chip, 8, pp.259, 2008) y microfibras que utilizan el mismo (Lab on a Chip, 4, pp.576, 2004; Langmuir, 23, pp.9104, 2007; Lab on a Chip, 8, pp.1255, 2008) han estado en el foco debido a su aplicabilidad a investigaciones sobre células y proteínas. En particular, las microfibras que utilizan microgel como un material base son útiles para la construcción de sensores bioquímicos (Lab on a Chip, 4, pp.576, 2004) y tejidos artificiales (Langmuir, 23, pp.9104, 2007; Lab on a Chip, 8, pp.1255, 2008), y se espera que sean útiles para construir una estructura de tela tejida y mediante ello producir una estructura tridimensional complicada que tiene una gran área.

20 Entre las microfibras que comprenden hidrogel, las microfibras que comprenden gel de alginato como un material base tienen suficiente resistencia mecánica. Sin embargo, las microfibras preparadas a partir de otros materiales de hidrogel (por ejemplo, microfibras que comprenden hidrogel de péptido) tienen un problema que son débiles en resistencia mecánica, y no se pueden usar para producir telas tejidas que tienen una microestructura. Desde tales puntos de vista, se han deseado mucho, medios para mejorar la resistencia de microfibras, esas que utilizan hidrogeles diferentes de gel de alginato como un material base.

**25 Referencias del estado de la técnica**

Documento no de patente

30 Documento no de patente 1: Advanced Materials, 19, pp.2696, 2007  
Documento no de patente 2: Lab on a Chip, 8, pp.259, 2008  
Documento no de patente 3: Lab on a Chip, 4, pp.576, 2004  
Documento no de patente 4: Langmuir, 23, pp.9104, 2007  
Documento no de patente 5: Lab on a Chip, 8, pp.1255, 2008

35 El documento US 2006/0188487 A1 proporciona materiales e hidrogeles hinchables en agua mezclados adecuados para uso en aplicaciones biomédicas u otras. Los materiales e hidrogeles hinchables en agua mezclados tienen al menos un polímero hidrofílico y al menos otro polímero u oligómero que tienen unidades recurrentes tanto hidrofóbicas como hidrofílicas donde la fase mezcla se separa y es opaca e inmisible en presencia de agua.

40 El documento EP 2 180 027 A1 describe un hidrogelador que es capaz de formar un hidrogel con una cantidad extremadamente pequeña del mismo sobre una gama de propiedades líquidas de ácido a alcalino, y un hidrogel que tiene alta estabilidad medioambiental, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

45 CHIZUKA HENMI ET AL, en JAPANESE SOCIETY FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTS, páginas 689-692, 21-25 de agosto, 2007 describe el desarrollo de una técnica de fabricación tridimensional eficaz que usa tecnología de inyección de tinta para muestras de modelos de tejidos.

50 KWANG HO LEE ET AL, en, SMALL, vol. 5, no. 11, páginas 1264 - 1268, 2009 describe la síntesis de fibras huecas de alginato cargadas con células usando chips microfluídicos y aplicaciones de ingeniería de tejidos microvascularizada.

**Compendio de la invención**

55 Objeto que se va alcanzar mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una fibra de microgel que tiene resistencia mecánica mejorada.

Medios para alcanzar el objeto

60 Los inventores de la presente invención realizaron varias investigaciones para alcanzar el objeto anteriormente mencionado, y como resultado, encontraron que, cuando una fibra que utiliza hidrogel como un material base se cubría con gel de alginato, la resistencia mecánica de la microfibra resultante que tiene una estructura núcleo-cubierta estaba notablemente aumentada, y usando la microfibra recubierta obtenida como se ha descrito anteriormente, se construyeron con éxito una estructura tridimensional de una estructura de tela tejida, una estructura de cilindro o similares. La presente invención se logró en base a los descubrimientos anteriormente mencionados.

La presente invención, por tanto, proporciona una microfibrilla que comprende una fibra de microgel recubierta con un hidrogel de alta resistencia, teniendo el hidrogel de alta resistencia una resistencia mecánica mayor que la del hidrogel usado como el material base de la fibra de microgel que se va a recubrir.

5 Como formas de realización preferidas de la presente invención, se proporcionan la microfibrilla anteriormente mencionada, en donde el hidrogel de alta resistencia es gel de alginato o gel de agarosa; la microfibrilla anteriormente mencionada, en donde la fibra de microgel es una fibra que comprende un hidrogel como material base; la microfibrilla anteriormente mencionada, en donde la fibra de microgel es una fibra que comprenden un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en gel de quitosano, gel de colágeno, gelatina, gel de péptido, gel de fibrina, y una mezcla de los mismos como un material base; y la microfibrilla anteriormente mencionada, en donde la fibra de microgel que se va a recubrir tiene un diámetro externo en el intervalo de 100 nm a 1.000  $\mu$ m, y la fibra de microgel recubierta con el hidrogel de alta resistencia tiene un diámetro externo en el intervalo de 200 nm a 2.000  $\mu$ m.

15 Como formas de realización más preferidas, la presente invención proporciona la microfibrilla anteriormente mencionada, en donde células están contenidas en la fibra de microgel; la fibra de microgel anteriormente mencionada, en donde un factor de crecimiento está contenido en la fibra de microgel; una estructura que comprende cualquiera de las fibras de microgel anteriormente mencionadas; y la estructura tridimensional anteriormente mencionada, que tiene una estructura de tela tejida o una estructural helicoidal.

20 Además, la presente invención también proporciona una fibra obtenible eliminando de la microfibrilla que comprende una fibra de microgel recubierta con un hidrogel de alta resistencia, cualquiera del recubrimiento con el hidrogel de alta resistencia o la fibra de microgel recubierta.

25 Además, la presente invención también proporciona una estructura obtenible construyendo una estructura que comprende cualquiera de las microfibrillas anteriormente mencionadas, y después eliminando cualquiera del recubrimiento con el hidrogel de alta resistencia o la fibra de microgel recubierta de la estructura.

Desde otro aspecto, también se proporciona un método para producir una fibra de células, que comprende: (a) la etapa de preparar una microfibrilla que comprende una fibra de microgel recubierta con un hidrogel de alta resistencia en donde células están contenidas en la fibra de microgel; (b) la etapa de cultivar la microfibrilla para obtener una microfibrilla que contiene un cultivo celular en la fibra de microgel; y (c) la etapa de eliminar el hidrogel de alta resistencia de la microfibrilla que contiene el cultivo celular en la fibra de microgel. La fibra de microgel preferiblemente consiste en gel de colágeno, y el hidrogel de alta resistencia preferiblemente es gel de alginato.

35 Efecto de la invención

La microfibrilla de la presente invención tiene resistencia mecánica superior, y se puede usar adecuadamente para construir una estructura tridimensional, tal como una estructura de tela, una estructura de cilindro, o una estructura de tubo. Por ejemplo, al construir una estructura de tela tejida o una estructura de tubo usando la microfibrilla que contiene células en el hidrogel, se puede preparar fácilmente una estructura celular tal como una lámina de células o un bloque de células.

#### 45 Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Esta figura muestra un método para preparar una fibra que tiene una estructura de núcleo-cubierta usando un dispositivo de flujo laminar coaxial doble (Lab. Chip, 4, pp.576, 2004, Fig. 1). Se muestra (A) un esquema conceptual del método (velocidad de flujo:  $Q_{\text{núcleo}} + Q_{\text{cubierta}} = 100 \mu\text{l}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{envoltura}} = 3,6 \text{ ml}/\text{min}$ ), y (B) el estado de la fibra resultante que tiene una estructura de núcleo-cubierta. Se muestra en (C) y (D) que el diámetro del núcleo y el espesor del recubrimiento de la cubierta varían dependiendo de la proporción de velocidad de flujo del fluido de núcleo y el fluido de la cubierta ( $Q_{\text{núcleo}}/Q_{\text{cubierta}}$ ). Se muestra (E) un esquema conceptual del método para preparar una microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta usando una solución de colágeno que contiene fibroblastos 3T3 como el fluido del núcleo y una solución de arginato de sodio como el fluido de la cubierta, y (F) la microfibrilla resultante que tiene una estructura de núcleo-cubierta.

55 [Fig. 2] Esta figura muestra (A) microfibrillas succionadas en un tubo de silicona, y (B) una vista aumentada de las mismas.

[Fig. 3] Esta figura muestra hilos (estructura lineal), láminas (estructura de tela tejida) y cilindros (estructura cilíndrica) como ejemplos de una estructura tridimensional que se puede construir usando las microfibrillas.

60 [Fig. 4] Esta figura muestra esquemas conceptuales de un método para preparar una estructura de tela tejida usando gel en forma de microfibrilla y una estructura de tela tejida preparada. Se muestra (A) esquemas conceptuales del telar (izquierda) y el método de preparación de la tela tejida (derecha), y (B) un ejemplo específico del método para preparar una tela tejida usando gel en forma de microfibrillas. También se muestra (C) el gel preparado que tiene una estructura de tela tejida, (D) una imagen fluorescente de la tela tejida, (E) una vista aumentada de (D), y (F) una vista transversal

de la lámina. En los dibujos, hilo de gel de urdimbre indica el gel en forma de microfibras como la urdimbre y el hilo de gel trama indica el gel de microfibras como la trama.

5 [Fig. 5] Esta figura muestra un método para preparar una estructura tridimensional que tiene una estructura helicoidal. Se muestra (A) un esquema conceptual de la preparación de una estructura helicoidal usando dos tipos de microfibras, y un método de fabricar una estructura helicoidal doble que comprende dos microfibras diferentes recubriendo las dos microfibras enrolladas sobre un cilindro de vidrio que tiene un diámetro de 1 mm con agarosa por recubrimiento por inmersión, y después sacando el cilindro, (B) una vista aumentada de la estructura helicoidal, y (C) una vista transversal de la misma. Se muestra en (D) una imagen confocal de la superficie de la estructura tridimensional que  
10 tiene la estructura helicoidal preparada usando las microfibras que contienen fibroblastos 3T3, y un esquema conceptual de la sección transversal de la misma se muestra en el lado derecho.

[Fig. 6] Esta figura muestra un método para preparar fibras de hidrogel de alginato como diagramas esquemáticos.

15 [Fig. 7] Esta figura muestra (A) la gelación se produce en el punto de unión de la solución de arginato de sodio (azul) y la solución de cloruro de calcio, y el diámetro de la fibra varía dependiendo de la velocidad de flujo de la solución de cloruro de calcio ( $Q_{envoltura}$ ). Se muestra (B) la relación entre el diámetro de la fibra y la velocidad de flujo de la solución de cloruro de calcio (el diámetro de la fibra es 45  $\mu\text{m}$ ), y (C) el aspecto de la fibra de hidrogel de alginato resultante. La barra de escala muestra una longitud de 500  $\mu\text{m}$ .  
20

[Fig. 8] Esta figura muestra un estado en que una microfibras se estira a un capilar de vidrio (diámetro interno: 1 mm) usando un hilo de cobre (diámetro 50  $\mu\text{m}$ ). Se muestra (A) una vista esquemática del método anteriormente mencionado, y (B) un estado en que una microfibras se estira a un tubo de vidrio.

25 [Fig. 9] Esta figura muestra un estado en que una fibra de hidrogel de alginato se enrolla usando un tubo de vidrio que tiene un diámetro de 1 mm.

[Fig. 10] Esta figura muestra fibras de hidrogel de alginato (diámetro: 70  $\mu\text{m}$ ) que contienen microperlas fluorescentes (A) o células (B) preparadas añadiendo microperlas fluorescentes (azules, verdes y rojas, diámetro: de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) o células (fibroblastos 3T3 (rojo) y células Jurkat (verde)) a un fluido interno.  
30

[Fig. 11] Esta figura muestra un esquema conceptual de un método para formar una estructura en trenza tejiendo a mano usando tres fibras de hidrogel que contienen tres tipos de perlas, respectivamente (A), y una microfotografía de fluorescencia de la estructura de trenza resultante (B).  
35

[Fig. 12] Esta figura muestra la etapa de preparar una microfibras (1) que consiste en una fibra de macrogel de colágeno que contiene células y recubierta con un hidrogel de alta resistencia (arginina), y realizar un cultivo celular para preparar una microfibras (2) que contiene cultivo celular en la fibra de microgel, y la etapa de formar la microfibras (2) en una estructura bidimensional o tridimensional o la etapa de eliminar el gel de alginato de la microfibras (2) para preparar una fibra de células con cultivo celular expuesto.  
40

[Fig. 13] Esta figura muestra la preparación de una microfibras que consiste en gel de colágeno como núcleo y gel de alginato como cubierta, y que contiene fibroblastos 3T3 y perlas azules de poliestireno para la visualización en el núcleo (A), y los resultados de la observación óptica del estado de la microfibras después de incubación a 37°C durante 30 minutos (B y C).  
45

[Fig. 14] Esta figura muestra una microfibras que contiene cultivo de células HepG2 en un núcleo obtenida preparando una microfibras que contiene las células HepG2 en el núcleo e incubando la microfibras. Se muestran los resultados de (A) el día 0 del cultivo, (B) el día 3 del cultivo, (C) el día 11 del cultivo, y (D) un estado de una fibra de células obtenida eliminando el gel de alginato con un tratamiento enzimático.  
50

[Fig. 15] Esta figura muestra estados de fibras de células obtenidas fabricando fibras de gel que contienen (A) células HepG2 (día 14 de cultivo), (B) células Min6 (día 18 de cultivo), (C) células Hela (día 6 de cultivo), y (D) células de corteza cerebral primarias de cerebro de rata (día 8 de cultivo), y después eliminando el gel de alginato de la cubierta.  
55

[Fig. 16] Esta figura muestra los resultados de imagenología de  $\text{Ca}^{2+}$  de la fibra de células que contiene células primarias de corteza cerebral de cerebro de rata (día 14). Se muestra una imagen de contraste de fase de la fibra de células (A), una imagen fluorescente obtenida usando Fluo4-AM como reactivo de detección del ion calcio (B), y una imagen en pseudocolor de la fibra de células obtenida con Fluo-4 (C), para la que la intensidad de fluorescencia ( $\Delta F/\Delta F_0$ ) se siguió en cuatro puntos (1 a 4). Se muestra que se observó la sincronización de la vibración de calcio en todos los puntos de 1 a 4 (D).  
60

[Fig. 17] Esta figura muestra que la fibra de células que contiene células HepG2 secretaba ácido láctico después del cultivo.  
65

- 5 [Fig. 18] Esta figura muestra estados de una lámina de células fabricada construyendo una estructura celular que tiene una estructura de tela tejida con fibras de gel, que consiste en gel de colágeno que contiene cultivo de células Hela como núcleo y gel de alginato como cubierta, y después eliminando el gel de alginato. Se muestra (A) un esquema conceptual del método de fabricación de la estructura de tela tejida, y (B) una fotografía de la estructura de tela tejida de la lámina de células resultante. Se muestran imágenes microscópicas (C: imagen con luz visible, y D: imagen de fluorescencia) de la estructura de células que tiene la estructura de tela tejida que comprende seis urdimbres y cinco tramas, y (E) una estructura de células en la que fibras de células de aproximadamente 1,5 cm de longitud se organizan en paralelo.
- 10 [Fig. 19] Esta figura muestra una estructura de células que tiene una estructura espiral heterogénea formada enrollando dos fibras de gel diferentes, una fibra de gel consistente en gel de colágeno que contiene cultivo de células HepG2 como núcleo y gel de alginato como cubierta, y una fibra de gel consistente en gel de colágeno que contiene cultivo de células Min6 como núcleo y gel de alginato como cubierta, sobre un tubo de vidrio que tiene un diámetro de 1 mm. Se muestra (A) una imagen de luz visible y (B) una imagen fluorescente. También se muestra que (C) la estructura espiral se mantenía en un estado en que la estructura estaba embebida en el gel de colágeno después de que el gel de alginato como cubierta se eliminara y después se siguió con el cultivo.
- 15 [Fig. 20] Esta figura muestra un estado de una estructura bidimensional que tiene una estructura de tela tejida preparada con microfibras que consisten en fibras de gel de colágeno (núcleo, que contiene tres tipos de diferentes perlas fluorescentes) recubierta con gel de alginato (cubierta), que se recubrió escasamente con gel de agarosa en una película transparente.
- 20 [Fig. 21] Esta figura muestra un estado de una estructura bidimensional mostrada en la figura 20, que se sacó con un par de pinzas.
- 25 [Fig. 22] Esta figura muestra un estado de una estructura bidimensional que tiene una estructura de tela tejida, en la que se hizo un agujero (diámetro: 1,5 mm) en el centro.
- 30 [Fig. 23] Esta figura muestra un estado de una estructura bidimensional mostrada en la figura 22, en la que la estructura de tela se plegó poniendo una varilla de vidrio a través del agujero y colocando una de cada una de varilla de vidrio a la derecha y a la izquierda de modo que se cruzan perpendicularmente con la varilla de vidrio que pasa a través del agujero.
- 35 [Fig. 24] Esta figura muestra un estado de la estructura plegada, que se fijó con gel de agarosa.
- [Fig. 25] Esta figura muestra el corte del margen con un cúter después de haber eliminado las varillas de vidrio y la película transparente.
- 40 [Fig. 26] Esta figura muestra la estructura tridimensional con forma de camiseta resultante (longitud: 6 mm x anchura: 6 mm) en estado derecho.
- [Fig. 27] Esta figura muestra una imagen de fluorescencia de la estructura tridimensional con forma de camiseta resultante. Se observaron tres tipos de fluorescencia emitidos por las perlas fluorescentes.
- 45 [Fig. 28] Esta figura muestra los resultados de la proliferación celular en una microfibras en la que se añadió fibrina al gel de colágeno que contenía células (células Hela o células NIH/3T3) como núcleo y la cubierta como una proteína adherente (proteína ad) (Tipo B) y una microfibras en la que no se añadió fibrina (Tipo A).
- 50 [Fig. 29] Esta figura muestra los resultados de la comparación de la cantidad de albúmina secretada como resultado del cultivo de una microfibras que contiene una fibra de células de las células HepG2 en el núcleo (núcleo: gel de colágeno, cubierta: gel de alginato) con la secretada por células HepG2 cultivadas en una placa.
- [Fig. 30] Esta figura muestra (A) un esquema conceptual de un método para medir la resistencia mecánica de una microfibras antes y después de la eliminación del gel de alginato de la microfibras, y (B) un estado de la medida. La presión cargada en las microfibras se calculó midiendo la cantidad de curva de un tubo de vidrio fino (diámetro: 0,12 mm).
- 55 [Fig. 31] Esta figura muestra la resistencia mecánica de una microfibras que contiene una fibra de células 3T3 en el gel de colágeno del núcleo antes y después de la eliminación de una cubierta (gel de alginato) de la microfibras.
- 60 [Fig. 32] Esta figura muestra los resultados de la incubación de 7 días de una microfibras que consiste en gel de colágeno como núcleo y gel de alginato (1,5%) como cubierta en donde se introdujeron células madre neurales en el núcleo de la microfibras. La parte superior muestra un estado de la microfibras inmediatamente después de la preparación de la misma, y la parte inferior muestra un estado de la misma después del cultivo durante siete días.
- 65

**Modos de llevar a cabo la invención**

La microfibrilla de la presente invención se caracteriza por comprender una fibra de microgel recubierta con hidrogel de alta resistencia.

5 La microfibrilla de la presente invención típicamente tiene una estructura de núcleo-cubierta que comprende un núcleo que consiste en la fibra de microgel y una cubierta (recubrimiento) que contiene hidrogel de alta resistencia. En la especificación, la "fibra de microgel" significa una fibra que se va a recubrir, y la "microfibrilla" significa una fibra recubierta.

10 La microfibrilla de la presente invención abarca una microfibrilla en la que la fibra de microgel que se va a recubrir con el hidrogel de alta resistencia se forma como una fibra que tiene una estructura de núcleo-cubierta de dos tipos diferentes de geles, y una microfibrilla que tiene una estructura multicapa superior adicional. Además, la cubierta del hidrogel de alta resistencia también puede ser una cubierta consistente en una cubierta multicapa. Por ejemplo, se pueden formar dos o más capas de la cubierta con dos o más tipos de hidrogel de alta resistencia que tienen diferentes resistencias.

15 La forma de la microfibrilla significa, por ejemplo, una forma fibrosa que tiene un diámetro externo de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a 1 mm. Sin embargo, el diámetro externo no está particularmente limitado a ese en el intervalo anteriormente mencionado. La microfibrilla puede tener varias formas transversales, por ejemplo, una forma circular, una forma elíptica y una forma poligonal tal como una forma de cuadrilátero y una forma pentagonal, y similares. La forma transversal es preferiblemente una forma circular. Aunque la longitud de la microfibrilla no está particularmente limitada, la longitud puede ser desde aproximadamente varios milímetros hasta varias decenas de centímetros. Aunque el diámetro externo de la fibra de microgel que se va a recubrir tampoco está particularmente limitado, el diámetro externo puede estar, por ejemplo, en el intervalo desde aproximadamente 100 nm a 1.000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente en el intervalo de 10 a 500  $\mu\text{m}$ . Aunque el diámetro externo de la microfibrilla después de ser recubierta con el hidrogel de alta resistencia tampoco está particularmente limitado, el diámetro puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 200 nm a 2.000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente, en el intervalo de 50 a 1.000  $\mu\text{m}$ .

20 En la microfibrilla de la presente invención, un hidrogel que se puede usar como el hidrogel de alta resistencia puede ser un hidrogel que tiene una resistencia mecánica sustancialmente igual a o mayor que, preferiblemente mayor que, la del hidrogel usado como el material base de la fibra de microgel que se va a recubrir. Aunque el tipo del hidrogel de alta resistencia no está particularmente limitado, es preferible usar un hidrogel que tiene una resistencia mecánica sustancialmente igual a o mayor que la del hidrogel normalmente usado, por ejemplo, gel de colágeno o hidrogel de alcohol polivinílico. Un hidrogel que tiene una resistencia mecánica mayor que la del hidrogel normalmente usado tal como gel de colágeno o hidrogel de alcohol polivinílico se puede usar más preferiblemente. Los ejemplos de tal gel incluyen, por ejemplo, gel de alginato y gel de agarosa, sin embargo, los geles no de deben limitar a estos ejemplos. Además, como el hidrogel de alta resistencia, se puede usar preferiblemente hidrogel que tiene una propiedad de gelificar en presencia de iones metálicos tal como iones calcio. Desde tal punto de vista, el gel de alginato es preferido. Además, el gel de agarosa o gel fotocurable que se cura por irradiación UV o similar también se pueden usar. Respecto a la resistencia mecánica del gel, tensión de rotura, resistencia de carga, y similares se pueden medir por un método que usa un medidor de tracción en agua o similar según los métodos que conocen bien los expertos en la materia.

25 Respecto al material base para la fibra de microgel, se puede usar preferiblemente hidrogel. Por ejemplo, se puede usar hidrogel que comprende gel de quitosano, gel de colágeno, gelatina, gel de péptido, gel de fibrina o una mezcla de estos como material base, aunque el tipo de hidrogel no está particularmente limitado. Como productos comercialmente disponibles, por ejemplo, se puede usar Matrigel (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.), y similares. Además, también se puede usar hidrogel que se puede formar irradiando un polímero soluble en agua tal como alcohol polivinílico, óxido de polietileno o polivinilpirrolidona con rayos o radiación ultravioleta. Además, también se puede usar hidrogel supramolecular como el hidrogel. El hidrogel supramolecular es un hidrogel no covalente formado de moléculas de monómero autoensambladas y se explica específicamente en, por ejemplo, "Supramolecular hydrogel as smart biomaterial", Dojin News, 118, pp.1-17, 2006.

30 En la preparación de la fibra de microgel, se puede añadir un solvente orgánico que tiene una propiedad miscible en agua, por ejemplo, etanol, acetona, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, dimetilformamida, y dimetilsulfóxido. Para aumentar la resistencia del hidrogel, también se puede mezclar un ingrediente apropiado o un solvente. Desde tal punto de vista, por ejemplo, también es posible añadir dimetilsulfóxido como solvente para la preparación de hidrogel de alcohol polivinílico.

35 Se pueden añadir uno o más tipos de sustancias biogénicas tal como células, proteínas, lípidos, sacáridos, ácidos nucleicos, y anticuerpos a la fibra de microgel. El tipo de las células no está particularmente limitado, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, células ES y células iPS que tienen pluripotencia, varios tipos de células madre que tienen multipotencia (células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células madre mesenquimatosas y similares), células madre que tienen unipotencia (células madre de hígado, células madre reproductoras y similares), así como varios tipos de células diferenciadas, por ejemplo, miocitos tal como células de músculo esquelético y células de músculo cardíaco, células nerviosas tal como células de corteza cerebral, fibroblastos, células de epitelio, hepatocitos, células beta del páncreas, células de la piel, y similares. La fibra de microgel puede contener cultivo celular obtenido cultivando células en la fibra de microgel. Sin embargo, las células y sustancias biogénicas no están limitadas a las

ejemplificadas anteriormente. Varios tipos de factores de crecimiento adecuados para el cultivo de las células mencionadas anteriormente, mantenimiento y proliferación de las células, o expresión funcional de las células, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), y similares, se pueden añadir a la fibra de microgel. Cuando se usa un factor de crecimiento, se puede elegir una concentración adecuada según el tipo del factor de crecimiento. Además, se puede añadir una sustancia no biogénica a la fibra de microgel. Por ejemplo, también es posible añadir fibras tal como nanofibras de carbono, sustancias inorgánicas tal como sustancias catalíticas, perlas cubiertas con anticuerpos, o artefactos tal como microchips. También se pueden añadir sustancias biogénicas y no biogénicas al hidrogel de alta resistencia que constituye una cubierta, si se desea.

Aunque el método para preparar la microfibrilla de la presente invención no está particularmente limitado, la microfibrilla se puede preparar convenientemente usando, por ejemplo, un dispositivo microfluídico coaxial doble tal como el mostrado en la figura 1. El dispositivo microfluídico coaxial doble que puede inyectar por separado y coaxialmente dos tipos de fluidos como un núcleo y una cubierta se explica específicamente en, por ejemplo, Lab Chip, 4, pp.576-580, 2004, Fig. 1, y para la preparación de la microfibrilla de la presente invención, el dispositivo descrito en la publicación anteriormente mencionada se puede usar preferiblemente.

La figura 1, (A) como un esquema conceptual muestra un método para preparar una microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta que consiste en dos tipos de geles de alginato como un experimento modelo. Al inyectar por separado y coaxialmente soluciones de arginato de sodio para un núcleo y cubierta antes del entrecruzamiento para formar fluidos coaxiales de un estado de núcleo-cubierta, e introducir los fluidos en una solución acuosa que contiene  $\text{CaCl}_2$  para la gelación de los fluidos, se puede construir una microfibrilla que consiste en dos tipos de geles de la parte interna (núcleo) y la parte externa (cubierta como el recubrimiento). Aunque la velocidad de inyección no está particularmente limitada, cuando se usa un dispositivo microfluídico coaxial que tiene un tamaño en el que el calibre es de aproximadamente  $50 \mu\text{m}$  a  $2 \text{mm}$ , se pueden inyectar dos tipos de soluciones a una velocidad de aproximadamente  $10$  a  $500 \mu\text{m}/\text{minuto}$ . Controlando las velocidades de inyección de los dos tipos de soluciones, el diámetro del núcleo y el espesor del recubrimiento de la cubierta se pueden ajustar de forma apropiada (figuras 1, (C) y (D)). Aunque la velocidad de introducción en una solución acuosa que contiene iones calcio tampoco está particularmente limitada, la velocidad puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente  $1$  a  $10 \text{ml}/\text{minuto}$ .

Cuando se usa una solución de colágeno como una solución interna (núcleo) en este método, se puede preparar una microfibrilla de una estructura núcleo-cubierta que tiene el gel de colágeno como el núcleo y gel de alginato como la cubierta. En este caso, cuando se añaden células tal como fibroblastos a la solución de colágeno, se puede preparar una microfibrilla de una estructura de núcleo-cubierta que contiene fibroblastos en el núcleo (figura 1, (E)). Cuando se usa una solución de colágeno, al pasar la solución a través de una solución acuosa que contiene iones calcio y después calentar la solución de colágeno a aproximadamente  $37^\circ\text{C}$  durante de aproximadamente varios minutos a  $1$  hora, el colágeno puede gelificar. En general, el hidrogel de alta resistencia de la cubierta se puede formar primero, y después el núcleo interno se puede gelificar por calentamiento, irradiación ultravioleta, o irradiación de radiación. Sin embargo, cuando una solución de una cadena de polímero soluble en agua que se entrecruza con iones calcio, tal como monómeros de fibrina, se usa para la preparación del núcleo interno, y se usa una solución de arginato de sodio como la solución de la cubierta externa, la gelación de la cubierta y el núcleo también se puede realizar simultáneamente por contacto con iones calcio.

Si se desea, también se puede preparar una fibra con fibra de microgel expuesta eliminando el hidrogel de alta resistencia de la cubierta de la microfibrilla de la estructura de núcleo-cubierta obtenida como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, al preparar una microfibrilla de una estructura de núcleo-cubierta usando gel de alginato como un hidrogel de alta resistencia y colágeno como un gel de material base de la fibra de microgel, y después dejar un agente quelante tal como EDTA que actúe en la microfibrilla a una concentración adecuada para eliminar iones calcio y de esta manera eliminar solo el hidrogel de alta resistencia, se puede preparar una fibra que consiste en el gel de colágeno. La operación de eliminación anteriormente mencionada se puede realizar después de preparar la microfibrilla.

Además, también es posible preparar una fibra hueca consistente en gel de alta resistencia eliminando el hidrogel que es el núcleo de la microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta, si se desea. Por ejemplo, después de preparar una microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta usando gel de agarosa como el hidrogel de alta resistencia y gel de alginato como un gel material base de la fibra de microgel, el gel de alginato del núcleo se puede eliminar solamente dejando actuar un agente quelante tal como EDTA en la microfibrilla a una concentración adecuada para eliminar iones calcio, y de esta manera preparar una fibra de gel de agarosa hueca. La eliminación anteriormente mencionada se puede realizar después de moldear la fibra.

La microfibrilla obtenida como se ha descrito anteriormente se puede succionar en un tubo de silicona y almacenar en un estado en que el gel está estirado a lo largo de la dirección longitudinal del tubo. En general es difícil mantener una microfibrilla gelificada en una forma lineal cuando la microfibrilla gelificada se almacena en agua, tampón o similar. Sin embargo, cuando la microfibrilla se pone en un medio acuoso tal como agua y mantequilla, y se succiona a través de un tubo de silicona que tiene un diámetro interno de aproximadamente  $100 \mu\text{m}$  a varios milímetros, del cual un extremo está sumergido en el medio acuoso, la microfibrilla se succiona en el tubo de silicona desde un extremo de la misma en

un estado en que la microfibrilla se estira a lo largo de la dirección longitudinal del tubo. Este estado se muestra en la figura 2. El gel se puede almacenar en este estado, y tras el uso, el tubo de silicona se puede cortar a una longitud apropiada para preparar el gel de una longitud deseada. Para el almacenamiento, se pueden añadir agentes apropiados tal como conservante, modificador de pH y agente tamponante, al medio en el tubo, según se requiera.

La microfibrilla de la presente invención tiene resistencia mecánica superior, y se puede usar preferiblemente para construir, por ejemplo, una estructura de trenza tal como una estructura de trenza de doble o triple hélice, una estructura de tela tejida, una estructura tridimensional tal como una estructura de cilindro, una estructura helicoidal, y una estructura de tubo. El término "estructura" usado en esta especificación significa cualquier estructura obtenible por moldeado de una microfibrilla, y cualquier estructura que se puede construir con dos o más microfibrillas, y se debe interpretar en el sentido más amplio del mismo incluyendo una estructura en trenza que tiene una forma lineal de aspecto, y una estructura tal como una lámina que se puede ver como un plano en aspecto, y estos términos no se deben interpretar en ningún modo limitante. En particular, cuando se pretende una estructura tridimensional, la estructura se puede denominar como una "estructura tridimensional". Se muestran esquemas conceptuales de la estructura tridimensional en la figura 3.

Además, también se puede usar una pluralidad de microfibrillas de la presente invención como un manojo. Por ejemplo, se puede preparar una pluralidad de microfibrillas que contienen células en las fibras de microgel, y organizar a lo largo de la dirección transversal como un manojo para formar una lámina consistente en las microfibrillas en líneas, y la lámina se puede cultivar para preparar un cultivo celular en forma de una lámina (denominada como una "lámina de células" en la especificación). Además, una pluralidad de las láminas anteriormente mencionadas también se puede apilar en la forma de un bloque y cultivar para preparar un cultivo celular en la forma de un bloque (denominado como un "bloque de células" en la especificación).

Por ejemplo, para preparar una estructura tridimensional que tiene una estructura de tela tejida, se puede preparar un gel que tiene una estructura de tela tejida usando un microtelar que proporciona intervalos de urdimbre de aproximadamente 1 a 5 mm y las microfibrillas anteriormente mencionadas como urdumbres y/o tramas. Se muestran esquemas conceptuales de este método y ejemplos del gel que tiene una estructura de tela tejida en la figura 4. En la estructura de tela tejida mostrada en la figura 4, (C), la microfibrilla de la presente invención se puede usar como la urdimbre y la trama, o una microfibrilla de alginato o similar también se puede usar como la urdimbre o la trama. La microfibrilla de alginato se puede preparar, por ejemplo, usando una solución de alginato de sodio como un fluido interno, y una solución de  $\text{CaCl}_2$  como un fluido externo en el dispositivo de microflujo coaxial anteriormente mencionado. Por ejemplo, para mantener una estructura de una estructura bidimensional o una estructura tridimensional incluyendo una estructura de tela tejida y similares, puede ser preferible recubrir ligeramente la estructura con gel de agarosa o similar.

La microfibrilla usada como la trama y la urdimbre preferiblemente se ajusta en un telar en tal estado en que la microfibrilla se almacena en un tubo de silicona como se ha explicado anteriormente, de modo que la microfibrilla se suministra desde el interior del tubo de silicona. La figura 4, (A) incluye esquemas conceptuales que muestran que la urdimbre se suministra desde el interior del tubo de silicona.

Además, para preparar una estructura tridimensional que tiene una estructura de tubo, por ejemplo, se puede formar una estructura tubular enrollando una microfibrilla usando un cilindro tal como un tubo de vidrio como se muestra en la figura 5, (A), recubriendo el exterior con gel de agarosa, gel de alginato, o similar, y después sacando el cilindro. En este método, también es posible formar una estructura tubular heterogénea usando dos tipos de microfibrillas diferentes de la presente invención, o también es posible formar una estructura tubular que tiene resistencia superior usando una microfibrilla de la presente invención y una microfibrilla de alginato para refuerzo. La figura 5, (A) es un diagrama esquemático que muestra las operaciones de enrollar dos tipos de microfibrillas diferentes de la presente invención, y fijar la estructura helicoidal con agarosa.

Además, al construir una estructura arbitraria, preferiblemente una estructura tridimensional, usando la microfibrilla de la presente invención, y después eliminar el hidrogel de alta resistencia de la cubierta para exponer la fibra de microgel, según se requiera, se puede fabricar una estructura tridimensional construida con la fibra de microgel. Por ejemplo, después de construir una estructura tridimensional usando la microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta usando gel de alginato como el hidrogel de alta resistencia y colágeno como un gel de material base de la fibra de microgel, permitir un agente quelante tal como EDTA que actúe en la microfibrilla a una concentración apropiada para eliminar iones calcio, y de esta manera eliminar solamente el hidrogel de alta resistencia, se puede preparar una estructura tridimensional construida con gel de colágeno. La estructura tridimensional de gel de colágeno obtenida como se ha descrito anteriormente se puede usar preferiblemente para, por ejemplo, cultivo celular.

Alternativamente, también es posible preparar una estructura tridimensional construida con una fibra hueca consistente en gel de alta resistencia construyendo una estructura arbitraria, preferiblemente una estructura tridimensional, usando la microfibrilla de la presente invención, y después eliminando el hidrogel del núcleo, según se requiera. Por ejemplo, después de construir una estructura tridimensional usando la microfibrilla que tiene una estructura de núcleo-cubierta usando gel de agarosa como el hidrogel de alta resistencia y gel alginato como gel de material base para la fibra de microgel, dejar que un agente quelante tal como EDTA actúe en la estructura a una concentración adecuada para

eliminar iones calcio, y de esta manera eliminar solamente el gel de alginato del núcleo, se puede preparar una estructura tridimensional construida con una fibra de agarosa hueca.

5 Al preparar la microfibrilla anteriormente mencionada que contiene células en la fibra de microgel, cultivar de forma apropiada la microfibrilla para formar un cultivo celular en la fibra de microgel, y después eliminar el recubrimiento de hidrogel de alta resistencia para exponer el cultivo celular, se puede obtener una fibra de células que consiste en el cultivo celular. Por ejemplo, es preferible usar fibra de gel de colágeno como la fibra de microgel, y gel de alginato como el hidrogel de alta resistencia. La fibra de células obtenida como se ha descrito anteriormente es una fibra que contiene agregados celulares en la fibra de microgel, y tiene un rasgo característico de que la fibra puede mantener la forma de fibra tal como está. Al gel de colágeno del núcleo que contiene células y el gel de alginato de la cubierta, se puede añadir de antemano una proteína para aumentar la propiedad adherente, tal como fibrina, según se requiera. La proteína se puede añadir solo al núcleo, o la proteína se puede añadir preferiblemente tanto al núcleo como a la cubierta. Por ejemplo, si se añade fibrina tanto al núcleo como a la cubierta, las células pueden proliferar uniformemente para formar una fibra de células sin agregarse para formar racimos. El tipo y la cantidad de la proteína que se va a añadir no están particularmente limitados, y se eligen apropiadamente según el tipo de las células que se van a cultivar.

Además, después de preparar la microfibrilla anteriormente mencionada que contiene células en la fibra de microgel, y cultivarla apropiadamente para formar un cultivo celular en la fibra de microgel, se puede formar una estructura bidimensional o tridimensional arbitraria usando la microfibrilla resultante. Alternativamente, después de preparar la microfibrilla anteriormente mencionada que contiene células en la fibra de microgel, se puede formar una estructura bidimensional o tridimensional arbitraria. Después, eliminando el hidrogel de alta resistencia de la estructura bidimensional o tridimensional resultante para exponer el cultivo celular, se puede fabricar una lámina de células bidimensional o un bloque de células tridimensional construidos con la fibra de células anteriormente mencionada. Se muestra un esquema conceptual de este método en la figura 12. Después de formar una estructura bidimensional o tridimensional usando dos o más tipos de microfibrillas que contienen células diferentes, respectivamente, el hidrogel de alta resistencia también se puede eliminar, si se requiere. Mediante este método, se puede formar una lámina de células bidimensional o un bloque de células tridimensional que contienen dos o más tipos de fibras de células diferentes.

30

### Ejemplos

La presente invención se explicará ahora de forma más específica con referencia a los ejemplos. Sin embargo, el ámbito de la presente invención no está limitado a los siguientes ejemplos.

35

#### Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

Se preparó una fibra de hidrogel de alginato usando un dispositivo de flujo laminar coaxial (Lab. Chip, 4, pp.576, 2004; Langmuir, 23, pp.9104, 2007) según el método mostrado en la figura 6, (A). La fibra de hidrogel de alginato se preparó usando arginato de sodio al 1,5% p/v (velocidad de flujo,  $Q_{\text{interno}} = 9 \mu\text{l}/\text{min}$ ) como el fluido interno y una solución de cloruro de calcio 780 mM ( $Q_{\text{envoltura}} = 0,2$  a  $1,0 \text{ ml}/\text{min}$ ) como el fluido externo (Fig. 6). La gelación se produjo en el punto de unión de los dos tipos de fluidos, y el diámetro de la fibra resultante era de 30 a 95  $\mu\text{m}$  dependiendo de la velocidad de flujo del fluido externo (Fig. 7, (A) y (B)). La fibra de hidrogel de alginato gelificado se recibió en una placa de Petri que contenía agua desionizada (Fig. 7, (C)).

45

Se pasó un hilo de cobre (diámetro: 50  $\mu\text{m}$ ) a través de un capilar de vidrio (diámetro interno: 1 mm) de modo que la parte de la punta formara un bucle, y la fibra de hidrogel de alginato se atrapó con el bucle y se arrastró al tubo de vidrio. La figura 8, (A) es una vista esquemática del arrastre y la figura 8, (B) muestra la fibra de hidrogel de alginato arrastrada en el tubo de vidrio como se ha descrito anteriormente. Este método permite sujetar firmemente el extremo de la fibra de hidrogel. La fibra de hidrogel de alginato tenía resistencia mecánica superior, y la fibra se enrolló con éxito alrededor de un tubo de vidrio que tenía un diámetro de 1 mm (Fig. 9).

50

Se añadieron microperlas fluorescentes (azules, verdes, y rojas, diámetro: de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) y células (fibroblastos 3T3 (rojos) y células Jurkat (verdes)) al fluido interno, respectivamente, y se prepararon fibras de hidrogel de alginato (diámetro: 70  $\mu\text{m}$ ) que contenían microperlas fluorescentes (Fig. 10, (A)), o células (Fig. 10, (B)) de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Las fibras de hidrogel a las que se añadieron esas microperlas y células tenían una resistencia mecánica del mismo nivel. Se formó manualmente una estructura de trenza usando tres fibras de hidrogel que contenían tres tipos de las perlas mencionadas anteriormente, respectivamente. Se muestra un esquema conceptual de la estructura en la figura 11, (A), y una microfotografía de fluorescencia de la estructura de trenza resultante se muestra en la figura 11, (B).

60

#### Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia)

Se preparó una fibra que tenía una estructura núcleo-cubierta de la misma que la del ejemplo 1, excepto que se usó un dispositivo de flujo laminar coaxial doble (Lab. Chip, 4, pp.576, 2004, Fig. 1). Como el fluido para el núcleo, se usó arginato de sodio al 1,5% p/v (coloreado en naranja), como el fluido para la cubierta, se usó arginato de sodio al 1,5%

65

p/v (coloreado en verde), y como fluido para la envuelta, se usó una solución de cloruro de calcio 780 mM ( $Q_{\text{envoltura}} = 3,6 \text{ ml/min}$ ) (Fig. 1, (A)). La fibra resultante que tenía estructura de núcleo-cubierta se muestra en la figura 1, (B). El diámetro del núcleo y el espesor de la cubierta de la fibra resultante variaron dependiendo de la proporción de velocidad de flujo del fluido del núcleo y el fluido de la cubierta ( $Q_{\text{núcleo}}/Q_{\text{cubierta}}$ ) (Fig. 1, (C) y (D)).

5

## Ejemplo 3

Se preparó una microfibrilla consistente en una fibra de microgel de colágeno recubierta con gel de alginato como el hidrogel de alta resistencia de la misma manera que la del ejemplo 2 usando una solución de colágeno (concentración: 2 mg/ml) que contenía fibroblastos 3T3 (número de células: de 1 a  $10 \times 10^6$  células/ml) como el fluido para el núcleo. Se muestra un esquema conceptual del método en la figura 1, (E). La microfibrilla resultante era una fibra que tenía una estructura de núcleo-cubierta en la que el gel de colágeno como el núcleo contenía células 3T3 y que tenía suficiente resistencia mecánica (Fig. 1, (F)).

10

## Ejemplo 4 (ejemplo de referencia)

Se preparó una estructura tridimensional que tenía una estructura de tela tejida mediante el método mostrado en la figura 4, (A) y (B). Usando las fibras de hidrogel de alginato (diámetro: 230  $\mu\text{m}$ ) obtenidas en el ejemplo 1 como las urdimbres y tramas, se tejó la estructura de tela tejida mostrada en la figura 4, (C). De la misma manera, se preparó una estructura tridimensional que tenía una estructura de tela tejida usando las fibras de hidrogel de alginato de diferente color de fluorescencia como parte de las urdimbres y las tramas (Fig. 4, (D)). La figura 4, (E) es una vista aumentada, y (F) es una vista transversal.

20

## Ejemplo 5

De la misma manera que en el ejemplo 4, se preparó una estructura tridimensional que tenía una estructura de tela tejida usando las microfibrillas obtenidas en el ejemplo 3 (diámetro del núcleo: 40  $\mu\text{m}$ , diámetro externo: 140  $\mu\text{m}$ , densidad de fibroblastos 3T3:  $10^7$  células/ml) como las urdimbres y las fibras de hidrogel de alginato obtenidas en el ejemplo 1 como las tramas.

25

30

## Ejemplo 6

Dos tipos de microfibrillas (microfibrilla A, diámetro del núcleo: 40  $\mu\text{m}$ , diámetro externo: 140  $\mu\text{m}$ , coloreada con fluorescencia verde; microfibrilla B, diámetro del núcleo: 40  $\mu\text{m}$ , diámetro externo: 140  $\mu\text{m}$ , coloreada con fluorescencia naranja) se enrollaron alrededor de un tubo de vidrio (diámetro: 1 mm) en tal estado que los dos tipos de microfibrillas se organizaron estrechamente sin ningún hueco entre ellas como se muestra en la figura 5, (A), y la superficie externa de la estructura helicoidal resultante se recubrió con gel de agarosa (3%) para preparar una estructura tridimensional que tenía una estructura helicoidal. La figura 5, (B) es una vista aumentada de la estructura helicoidal, y la figura 5, (C) es una vista transversal de la misma.

35

40

## Ejemplo 7

De la misma manera que la del ejemplo 6, una microfibrilla que contenía fibroblastos 3T3 (diámetro del núcleo: 40  $\mu\text{m}$ , diámetro externo: 140  $\mu\text{m}$ , densidad celular:  $10^7$  células/ml) se enrolló alrededor de un tubo de vidrio para preparar una estructura tridimensional que tenía una estructura helicoidal. La figura 5, (D) muestra una imagen confocal de la superficie de la estructura helicoidal resultante, y un esquema conceptual de la vista transversal se muestra en el lado derecho de la misma.

45

## Ejemplo 8

De la misma manera que la del ejemplo 3, se preparó una microfibrilla que consistía en gel de colágeno como el núcleo y gel de alginato como la cubierta, y contenía fibroblastos 3T3 (número de células: de 1 a  $10 \times 10^6$  células/ml) y perlas azules de poliestireno para la visualización (diámetro: 15  $\mu\text{m}$ ) en el núcleo (diámetro del núcleo: 80  $\mu\text{m}$ , diámetro externo: 150  $\mu\text{m}$ , densidad celular:  $10^7$  células/ml, densidad de perlas: 0,5% (p/v)), y se cultivó a 37°C durante 30 minutos, y después el aspecto de la microfibrilla se observó ópticamente. Se confirmó con éxito que las células 3T3 y el gel de colágeno del núcleo estaban recubiertos con el gel de alginato de la cubierta (Fig. 13).

50

55

## Ejemplo 9

Se preparó una microfibrilla que contenía células HepG2 en el núcleo de la misma manera que en el ejemplo 3 y se cultivó para fabricar una microfibrilla que contenía cultivo de células HepG2 en el núcleo. Según siguió el cultivo, el núcleo que consistía en el gel de colágeno se llenó con las células que proliferaron, y se obtuvo una microfibrilla cuyo núcleo estaba completamente lleno con las células (microfibrilla que contenía gel de colágeno y el cultivo celular en núcleo y recubierta con gel de alginato) el día 11 (Fig. 14, (A) a (C)). Cuando el cultivo celular en forma de una fibra (fibra de células) se expuso a partir de la microfibrilla anterior eliminando el gel de alginato con un tratamiento enzimático,

60

65

la forma de la fibra de células se mantuvo como estaba, y se estimó que las células estaban unidas firmemente unas a otras (Fig. 14, (D)).

De la misma manera, se prepararon fibras de gel que contenía cultivo celular en el gel de colágeno del núcleo usando células HepG2 (cultivo el día 14), células Min6 (cultivo el día 18), células Hela (cultivo el día 6) y células primarias de corteza cerebral de cerebro de rata (cultivo el día 8) (Fig. 15, (A) a (D)). En el cultivo de las células primarias de corteza cerebral, se añadieron B-29 y G-5 (Gibco) al núcleo como factores de crecimiento a las concentraciones estándar especificadas por el fabricante. A continuación, el gel de alginato de la cubierta se eliminó para preparar cada fibra de células.

#### Ejemplo 10

Se examinaron las funciones de la fibra de células de las células primarias de corteza cerebral derivadas de cerebro de rata (cultivo el día 8) obtenidas en el ejemplo 9. Como resultado, se observó vibración de  $Ca^{2+}$  espontánea en un gran número de neuronas de corteza cerebral, y se demostró que se formó una red nerviosa en la fibra de células de corteza cerebral (Fig. 16, (D)). Además, se confirmó que la fibra de células de las células HepG2 obtenida en el ejemplo 9 secretaba ácido láctico cuando la fibra se cultivó (Fig. 17).

#### Ejemplo 11

Se construyó una estructura celular que tiene una estructura de tela tejida con fibras de gel en las que el cultivo celular de las células Hela estaba contenido en el gel de colágeno del núcleo, y la cubierta era gel de alginato. Se muestra un esquema conceptual del método para preparar una lámina de células que tiene una estructura de tela tejida en la figura 18, (A). La lámina de células que tiene una estructura de tela tejida resultante era una estructura celular que tenía un tamaño del orden de centímetros (aproximadamente de 1 a 2 cm) (Fig. 18, (B)). Se muestra una estructura celular que tiene una estructura de tela tejida que consiste en seis urdimbres y cinco tramas en la figura 18, (C) (imagen de luz visible) y la figura 18, (D) (Imagen de fluorescencia). Además, se fabricó una estructura celular que consistía en las fibras de células que tienen una longitud de aproximadamente 1,5 cm y organizadas en paralelo (Fig. 18, (E)).

#### Ejemplo 12

Se formó una estructura celular que tenía una estructura espiral heterogénea usando una fibra de gel en la que el cultivo celular de las células HepG2 estaba contenido en el gel de colágeno del núcleo y la cubierta consistía en gel de alginato, y una microfibrilla en la que el cultivo celular de las células Min6 estaba contenido en el gel de colágeno del núcleo y la cubierta consistía en gel de alginato (Fig. 19). Las células contenidas en la estructura celular resultante que tenía una estructura espiral siguieron proliferando incluso después de que el gel de alginato se eliminara, y por tanto se demostró que las células contenidas en la estructura celular mantenían funciones biológicas (Fig. 19, (C)).

#### Ejemplo 13

Se preparó una estructura bidimensional en forma de tela usando microfibrillas que tienen una estructura de núcleo-cubierta en la que una fibra de gel de colágeno (núcleo, que contiene tres tipos de perlas fluorescentes diferentes) se recubrió con gel de alginato (cubierta), y una estructura tridimensional en forma de camiseta se fabricó usando la fibra. Se fabricó una estructura bidimensional que tiene forma de tela tejida usando las microfibrillas, se colocó en una película transparente, y se recubrió ligeramente con gel de agarosa para mantener la estructura de tela tejida (Fig. 20). La estructura de tela tejida recubierta con agarosa tenía suficiente resistencia mecánica, y la estructura se subió con éxito con un par de pinzas (Fig. 21). Se hizo un agujero (diámetro: 1,5 mm) en el centro de la estructura en forma de tela tejida con un punzón (Fig. 22), una varilla de vidrio que tenía un diámetro de 1 mm se pasó a través del agujero proporcionado, se puso una varilla de vidrio cada una en los lados derecho e izquierdo de modo que estas varillas de vidrio se cruzaran perpendicularmente con la varilla de vidrio anterior, y la estructura de tela se plegó (Fig. 23). Después de plegar, se echó gel de agarosa en el hueco y gelificó para fijar la estructura de tela en el estado plegado (Fig. 24). Las varillas de vidrio y la película transparente se eliminaron, y el margen excesivo se cortó con un cúter para preparar una estructura tridimensional en forma de camiseta (Fig. 25). La estructura tridimensional resultante (longitud: 6 mm x anchura: 6 mm) en estado erguido se muestra en la figura 26. Se puede observar que se obtuvo una estructura tridimensional en forma de camiseta que tiene agujeros para la cabeza y los brazos. La figura 27 es una imagen fluorescente de la estructura tridimensional anteriormente mencionada. Se observaron tres tipos de fluorescencia que se originan en las perlas fluorescentes.

#### Ejemplo 14

Una microfibrilla en la que se añadió fibrina como proteína adherente (cantidad de fibrinógeno añadido: 1 mg/ml) a gel de colágeno del núcleo que contenía células (células Hela o células NIH/3T3) y gel de alginato de la cubierta (tipo B) y una microfibrilla sin fibrina (tipo A) se prepararon y cultivaron. El método y los resultados se muestran en la figura 28. En la microfibrilla de tipo A, las células Hela proliferaron favorablemente ((C), izquierda), mientras las células 3T3 no proliferaron y formaron una fibra de células, sino que formaron racimos de células ((C), centro). Por otra parte, en la microfibrilla de tipo B a la que se añadió fibrina, se observaron proliferación favorable y formación de una fibra de células

también para las células 3T3 ((C), derecha). En la microfibrilla de tipo A, se observó una diferencia en la velocidad de proliferación dependiendo del tipo de las células ((E)).

Ejemplo 15

5 Una microfibrilla que consistía en gel de colágeno como el núcleo que contenía células HepG2 y la cubierta de gel de alginato de preparó y cultivó para obtener una microfibrilla que contenía una fibra de células de las células HepG2 en el núcleo. Cuando la cantidad de albúmina secretada de esta microfibrilla por incubación se comparó con la cantidad de albúmina secretada por las células HepG2 cultivadas en una placa, la cantidad de albúmina secretada de la microfibrilla era mayor que la cantidad observada por el cultivo en una placa. Los resultados se muestran en la figura 29. Se consideró que las células HepG2 encapsuladas en el núcleo se mantuvieron en un medio tridimensional óptimo, y como resultado, las células secretaron con éxito albúmina en una cantidad mayor comparada con la observada con la condición de cultivo bidimensional en una placa.

15 Ejemplo 16

Se preparó una microfibrilla en la que se añadió fibrina como proteína adherente a gel de colágeno del núcleo que contenía células NIH/3T3 y gel de alginato de la cubierta (tipo B) por el método del ejemplo 14 y se cultivó para obtener una microfibrilla que contenía las células NIH/3T3 en el núcleo. La resistencia mecánica de esta microfibrilla se midió por el método mostrado en la figura 30 antes y después de la eliminación del gel de alginato para confirmar el efecto potenciador de la resistencia mecánica del gel de alginato de la cubierta. Al medir la cantidad de curva de un tubo de vidrio fino (diámetro: 0,12 mm) según el método mostrado en la figura 30, (A) y (B), se calculó la tensión cargada en la microfibrilla. La tensión cargada cuando la microfibrilla se rompió se consideró como la resistencia mecánica. Como resultado, la microfibrilla que tiene la cubierta dio mayor resistencia mecánica comparada con la microfibrilla de la que se eliminó la cubierta (Fig. 31, gráfico superior y gráfico inferior).

Ejemplo 17

30 Se preparó una microfibrilla consistente en gel de colágeno como el núcleo y gel de alginato (1,5%) como la cubierta en la que se introdujeron células madre neurales en el núcleo de la microfibrilla. Al núcleo se añadieron 0,5 µl de EGF, 5 µl de FGF, y 10 µl de B27 por 500 µl de colágeno, la microfibrilla se preparó de modo que la densidad celular se volviera  $6,8 \times 10^7$  células/ml, y el cultivo siguió durante 7 días usando un medio que consistía en 10 ml de Neurobasal A al que se añadieron antibióticos (penicilina y estreptomycin) al 1%, 2 µl de EGF, 20 µl de FGF, y 200 µl de B27. Los resultados se muestran en la figura 32. La fotografía superior muestra la microfibrilla inmediatamente después de la fabricación, y la fotografía inferior muestra la microfibrilla después de cultivo de 7 días. Las células madre neurales proliferaron en el núcleo de la microfibrilla, y llenaron el núcleo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una microfibrilla que contiene una fibra de microgel recubierta con hidrogel de alta resistencia, teniendo el hidrogel de alta resistencia una resistencia mecánica mayor que la del hidrogel usado como el material base de la fibra de microgel que se va a recubrir.
2. La microfibrilla según la reivindicación 1, en donde el hidrogel de alta resistencia es gel de alginato o gel de agarosa.
- 10 3. La microfibrilla según la reivindicación 1 o 2, en donde la fibra de microgel es una fibra que comprende hidrogel seleccionado del grupo que consiste en gel de quitosano, gel de colágeno, gelatina, gel de péptido, gel de fibrina, y una mezcla de los mismos como un material base.
- 15 4. La microfibrilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la fibra de microgel que se va a recubrir tiene un diámetro externo en el intervalo desde 100 nm a 1.000 µm, y la fibra de microgel recubierta con el hidrogel de alta resistencia tiene un diámetro externo en el intervalo desde 200 nm a 2.000 µm.
- 20 5. La microfibrilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde una célula o cultivo celular está contenido en la fibra de microgel.
6. La microfibrilla según la reivindicación 5, en donde un factor de crecimiento está contenido en la fibra de microgel.
7. Una estructura que comprende la microfibrilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 8. La estructura según la reivindicación 7, que tiene una estructura de tela tejida o una estructura helicoidal.
9. Proceso para la preparación de una fibra eliminando la cubierta de hidrogel de alta resistencia de la microfibrilla según las reivindicaciones 1 a 4 o eliminando la fibra de microgel según las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 10. Proceso para la preparación de una fibra de células que comprende las siguientes etapas:
- (a) preparar una microfibrilla según las reivindicaciones 5 a 6,
- (b) cultivar la microfibrilla para obtener una microfibrilla que contiene un cultivo celular en la fibra de microgel,
- 35 (c) eliminar el hidrogel de alta resistencia de la microfibrilla que contiene el cultivo celular en la fibra de microgel.

Fig. 1

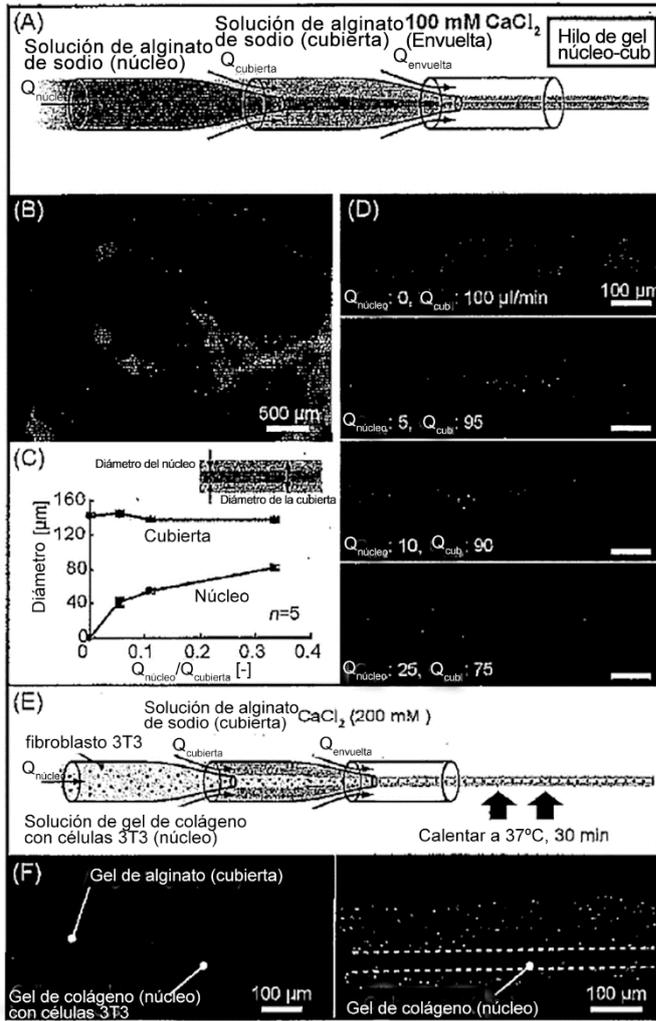


Fig. 2

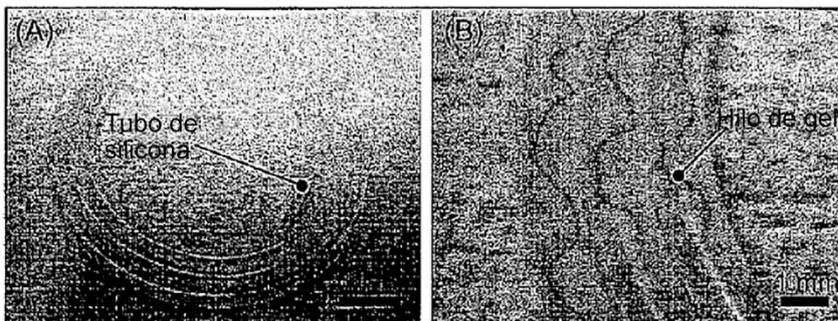


Fig. 3

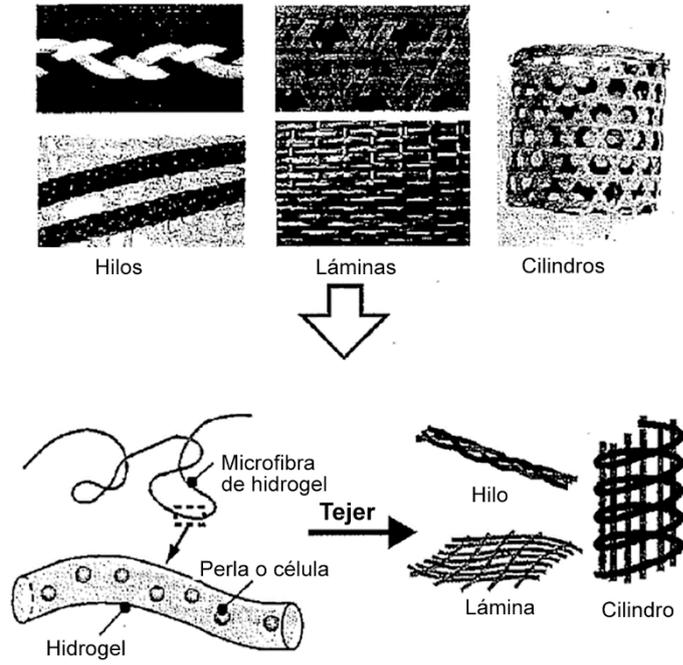


Fig. 4

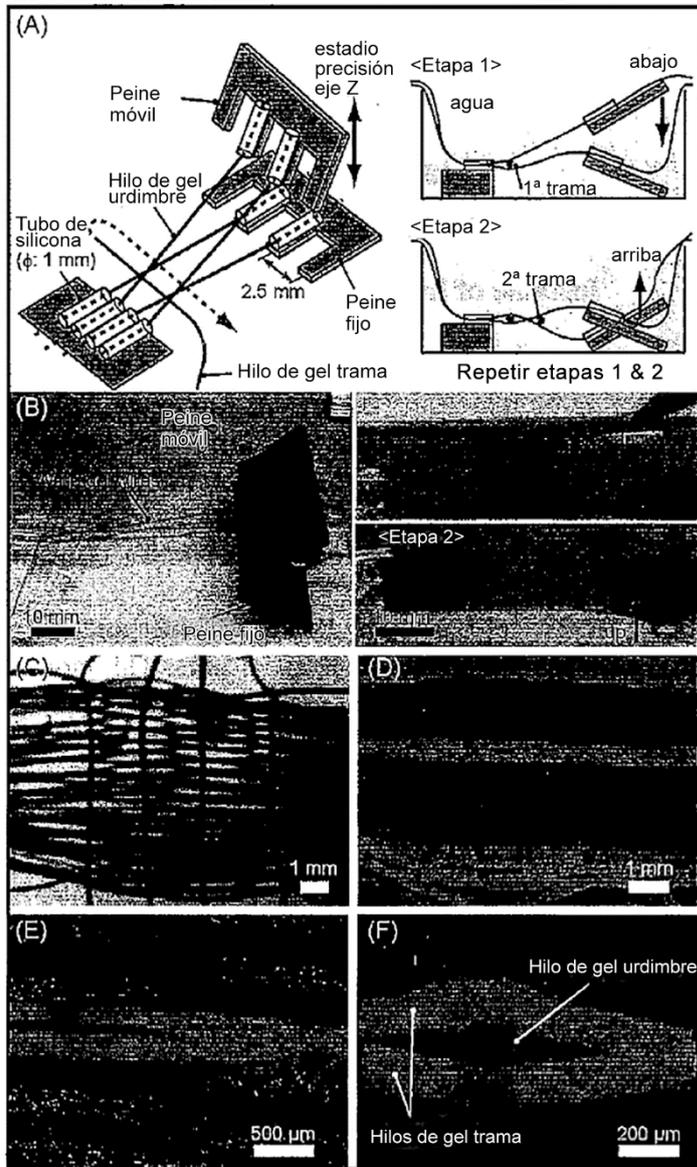


Fig. 5

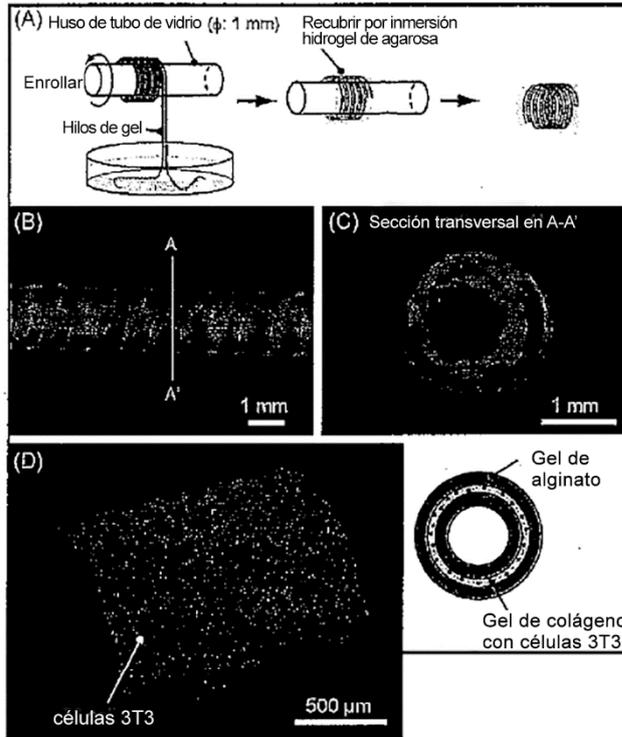


Fig. 6

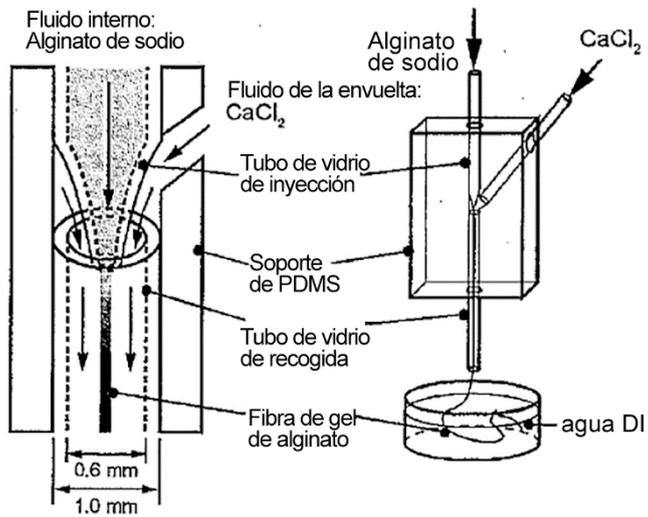


Fig. 7

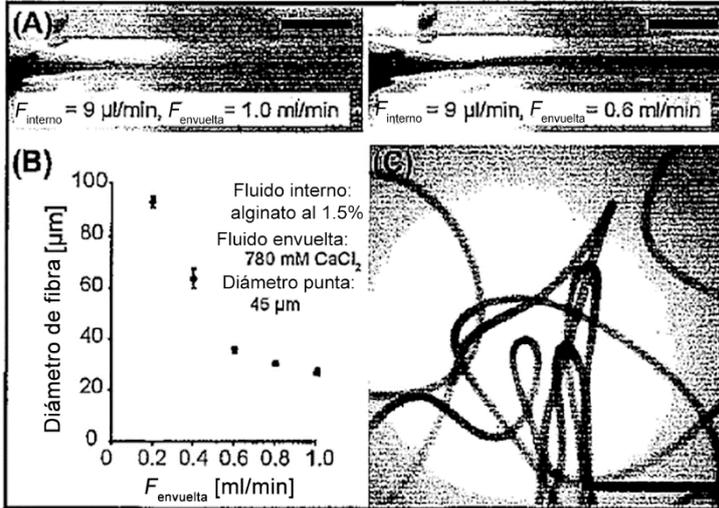


Fig. 8

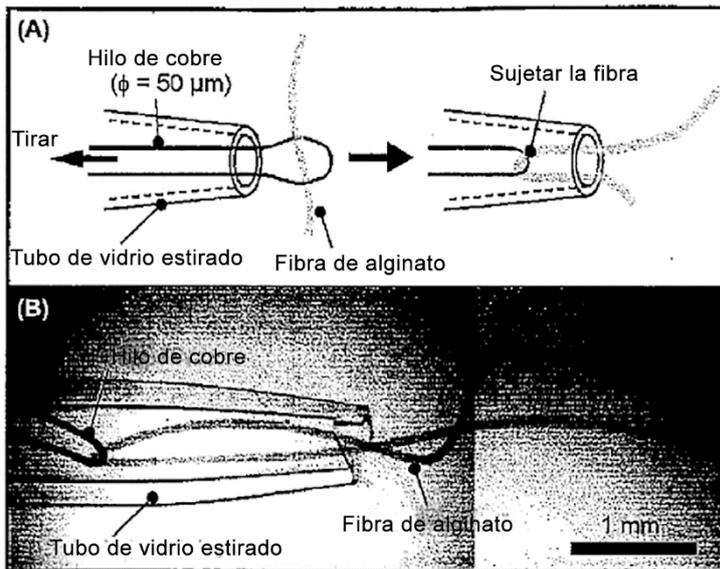


Fig. 9

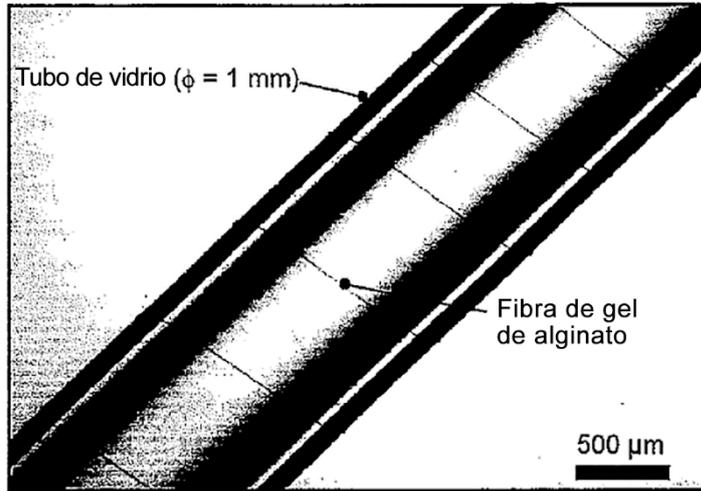


Fig. 10

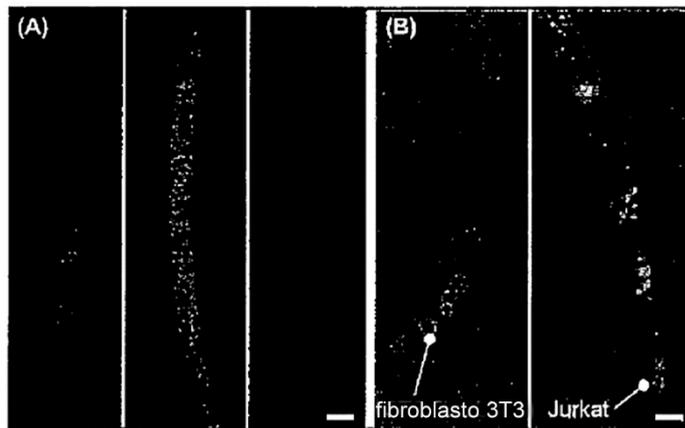


Fig. 11

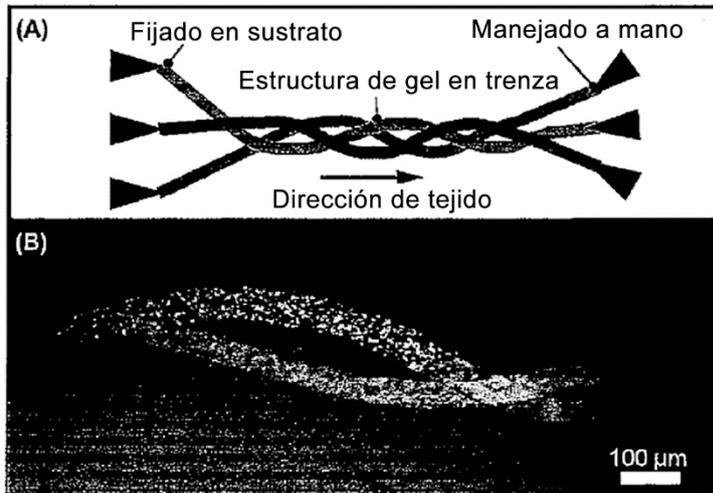


Fig. 12

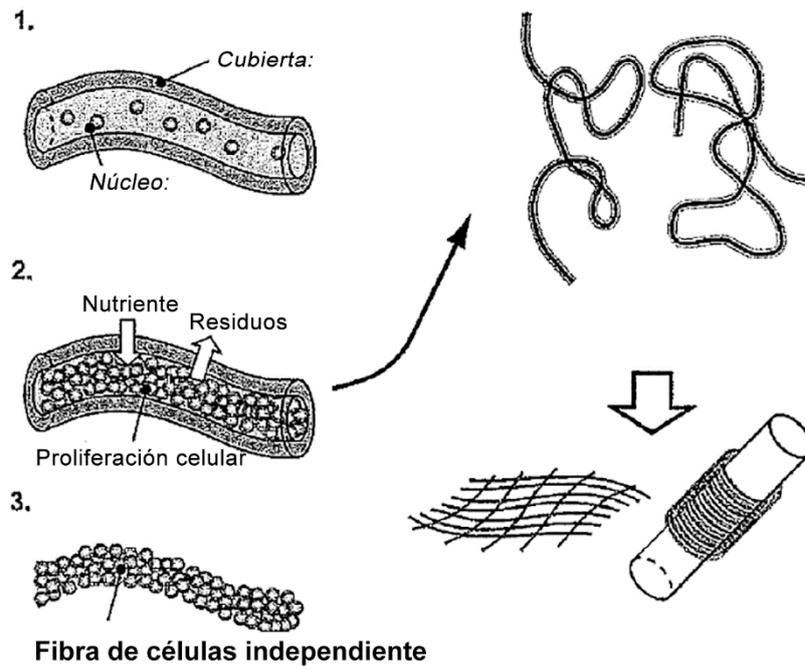


Fig. 13

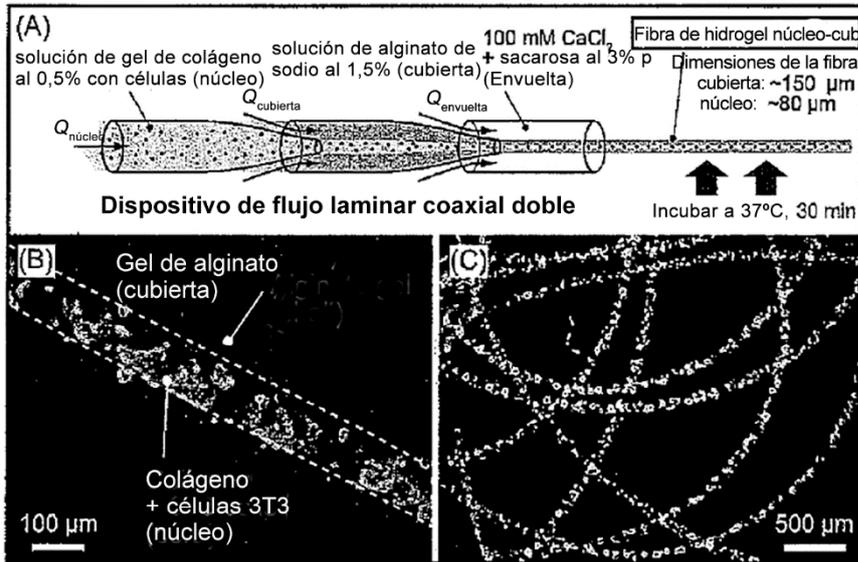


Fig. 14

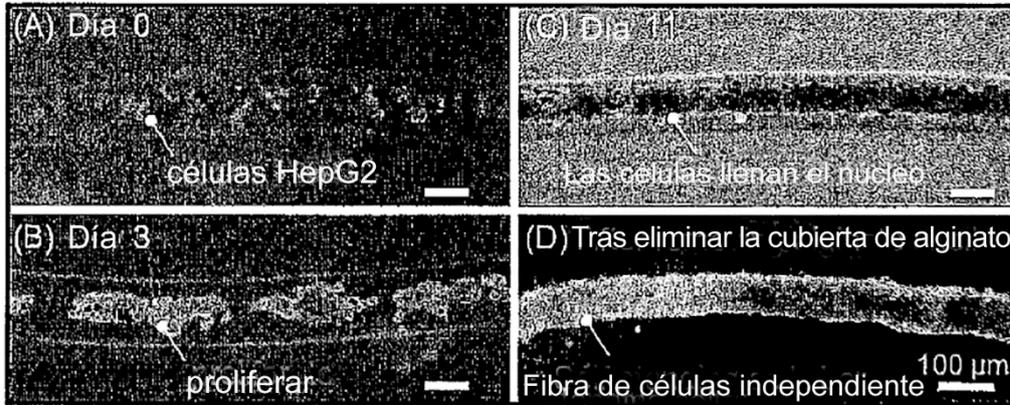


Fig. 15

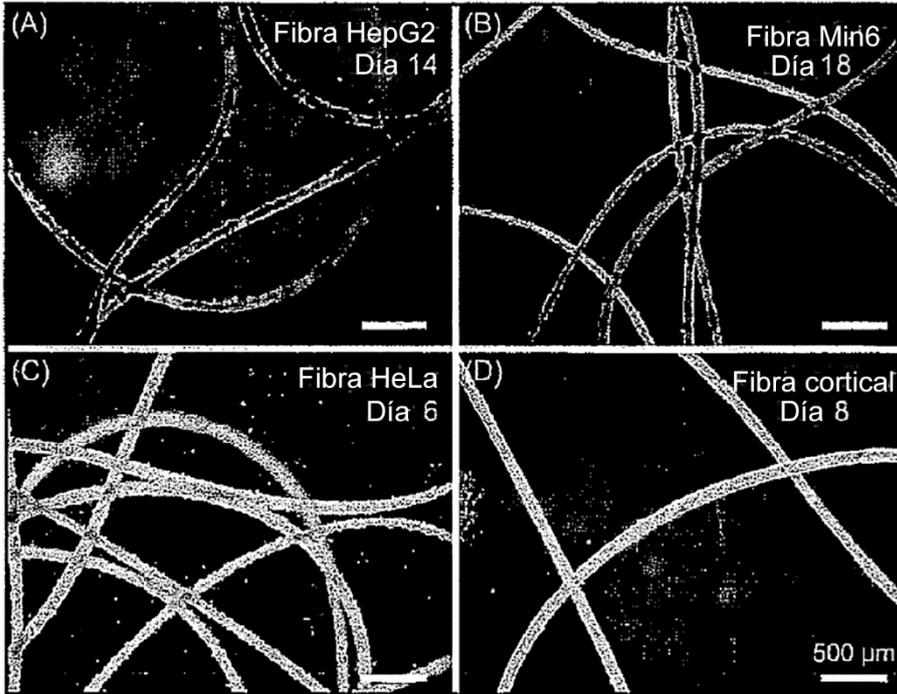


Fig. 16

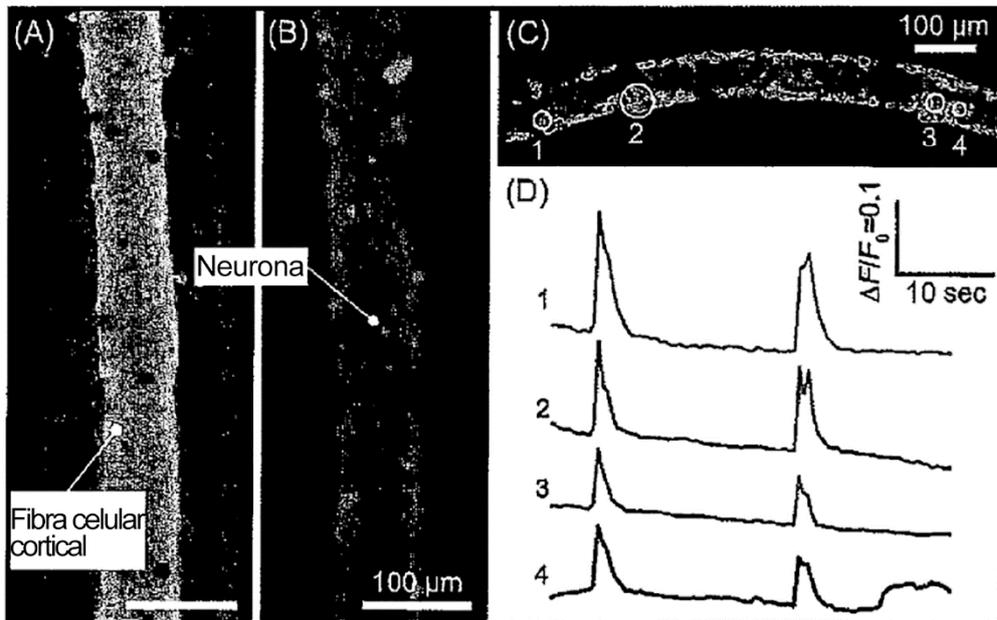


Fig. 17

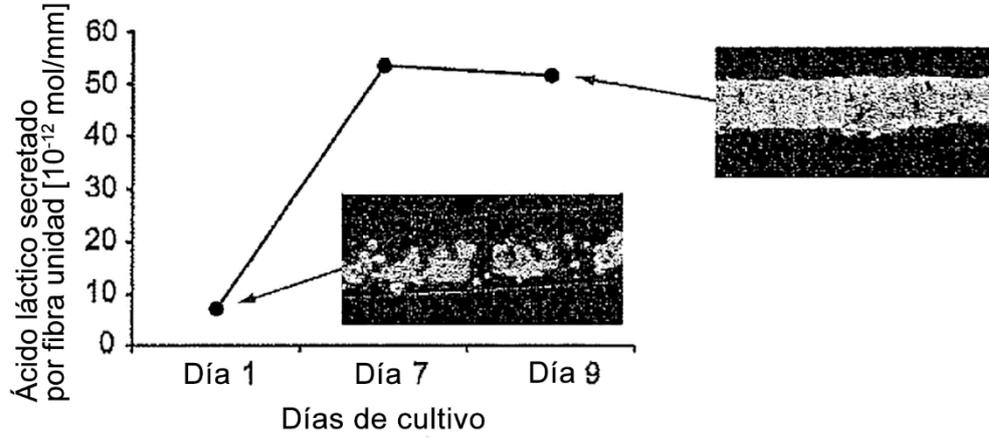


Fig. 18

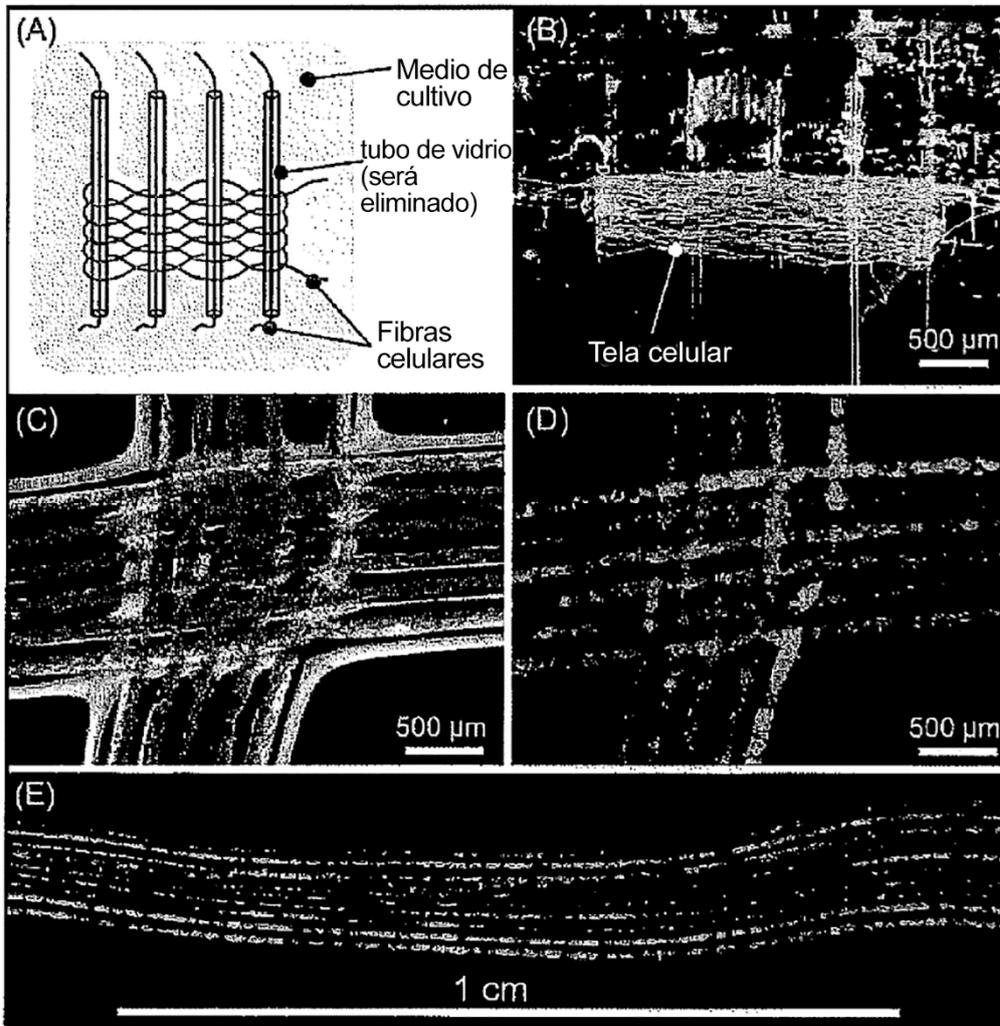


Fig. 19

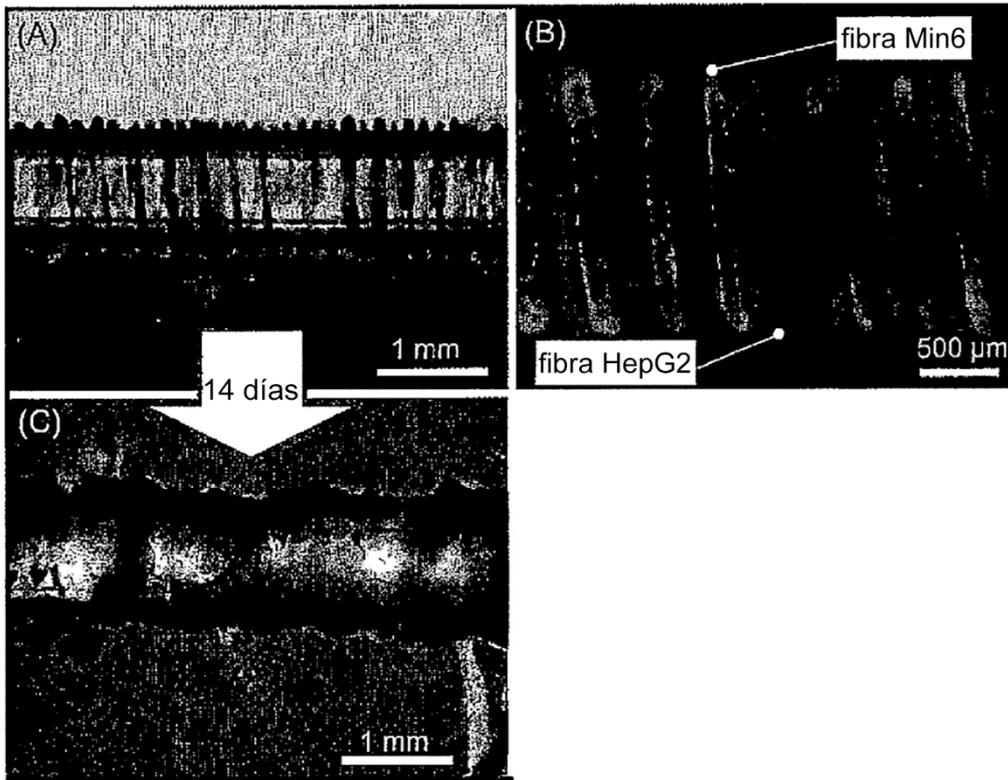


Fig. 20

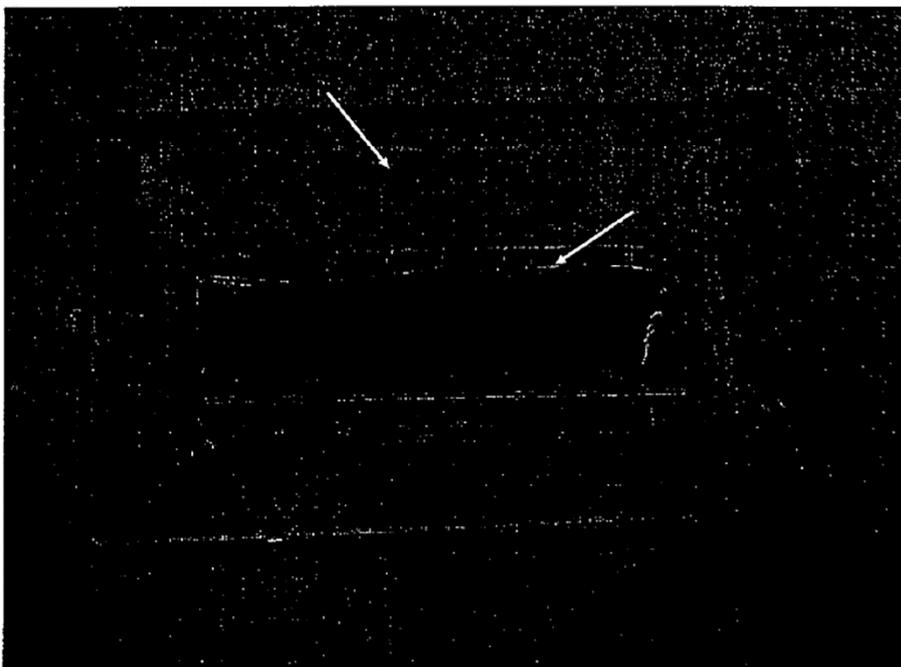


Fig. 21



Fig. 22



Fig. 23

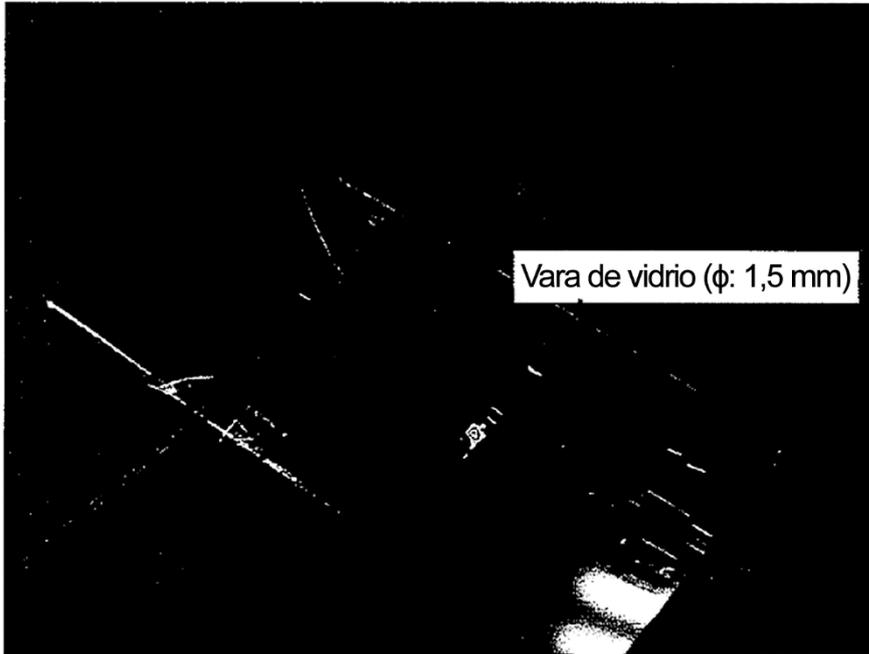


Fig. 24

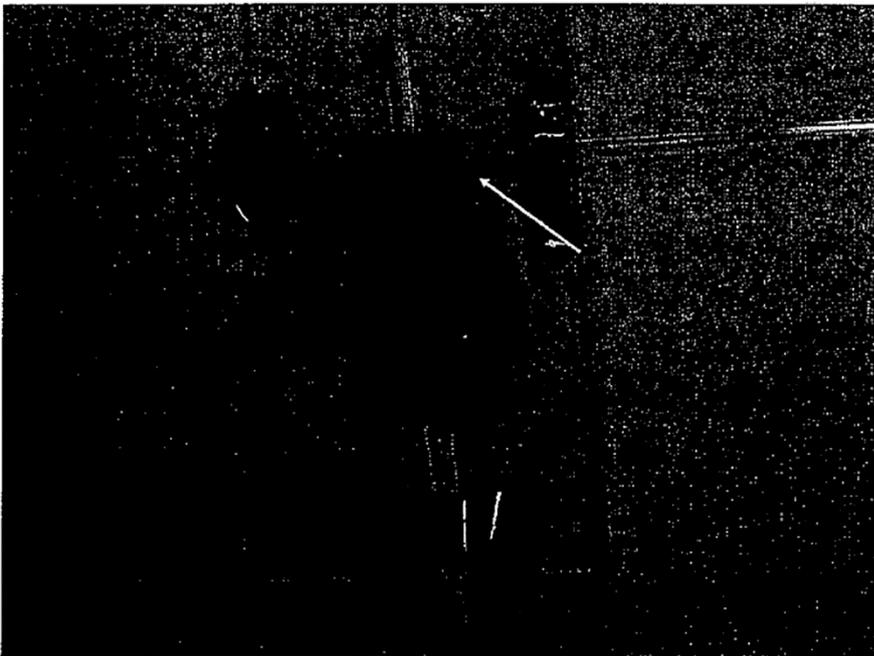


Fig. 25



Fig. 26

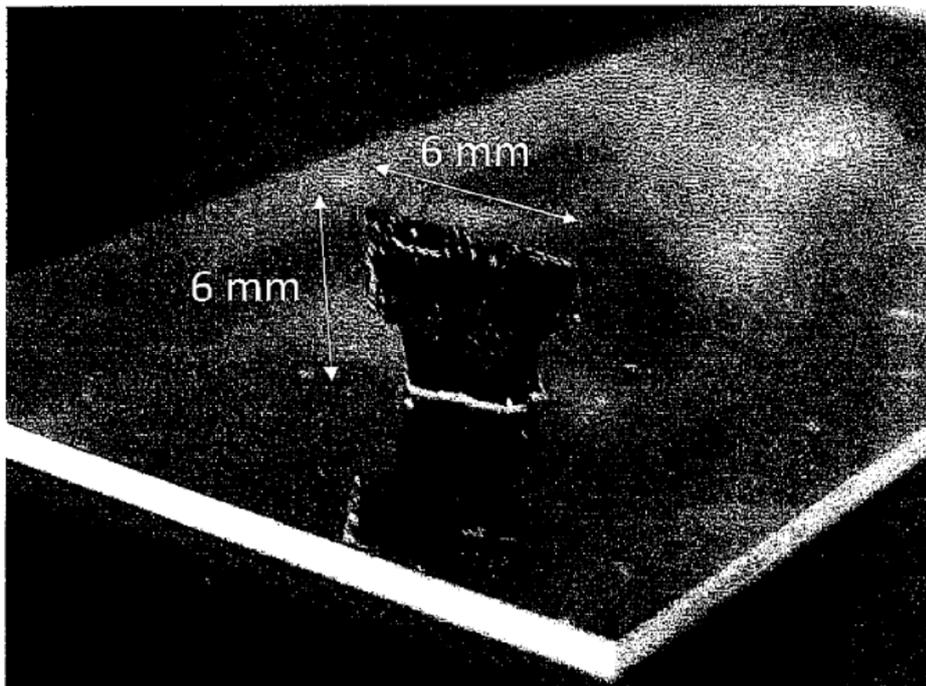


Fig. 27

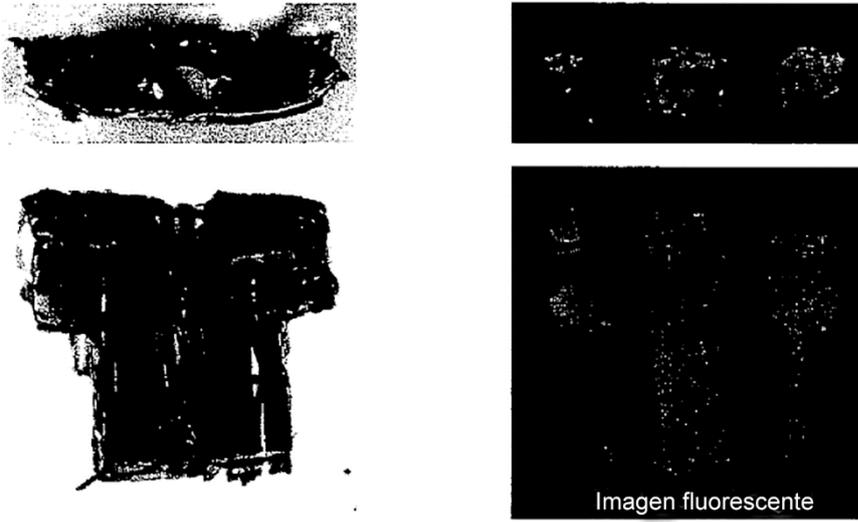


Fig. 28

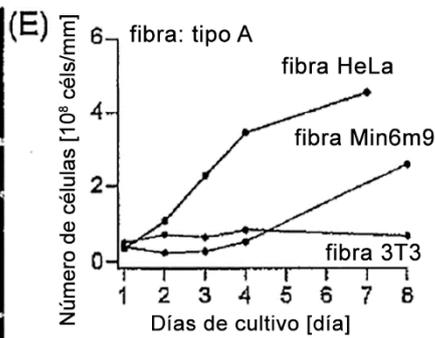
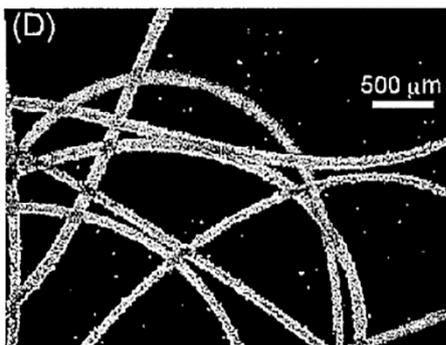
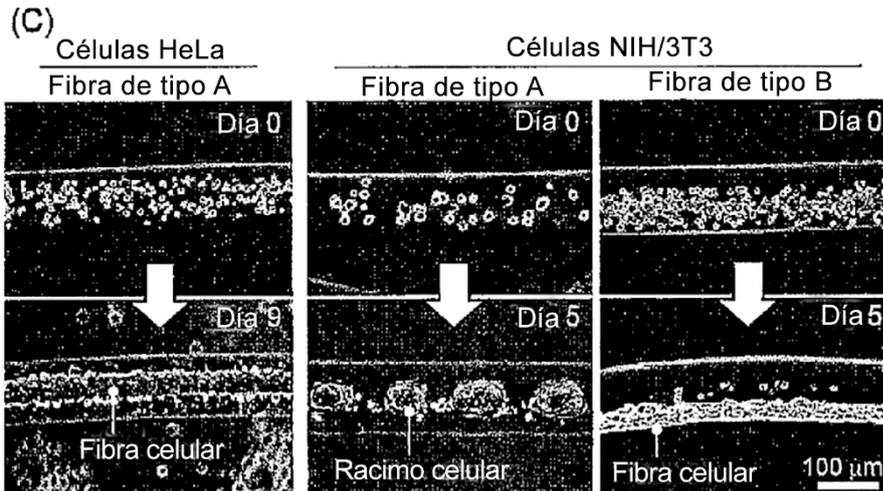
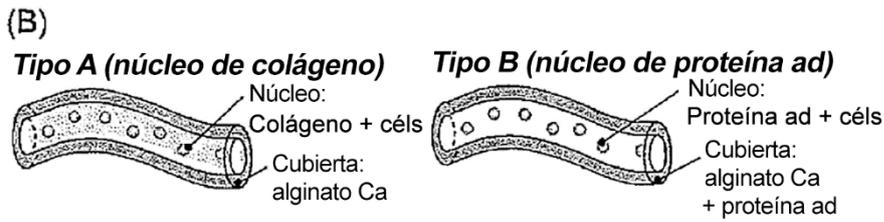
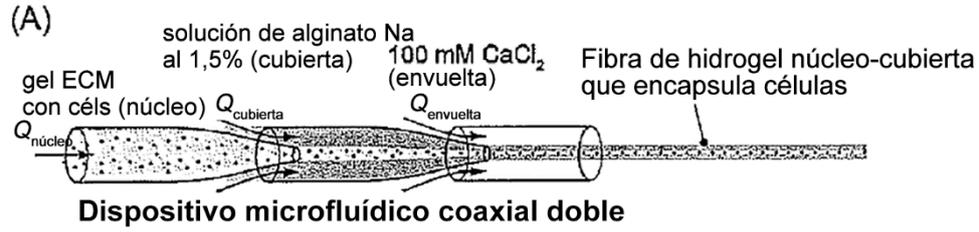


Fig. 29

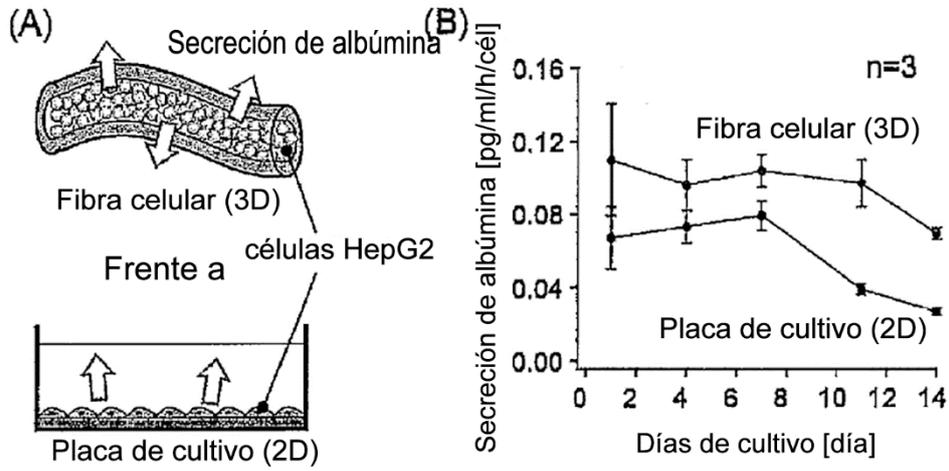


Fig. 30

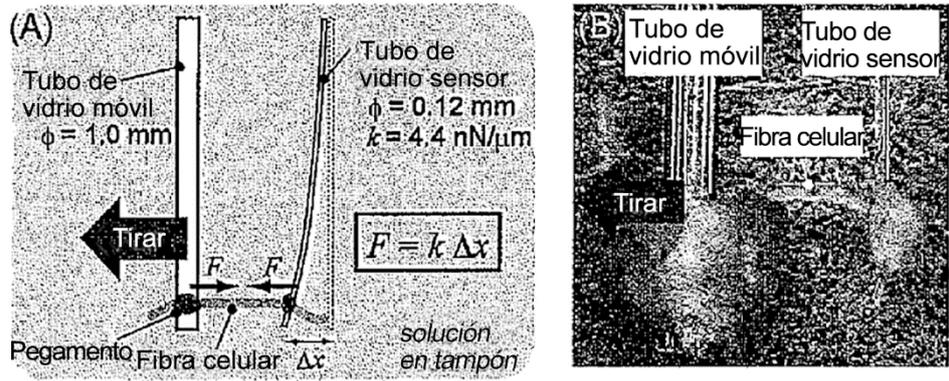


Fig. 31

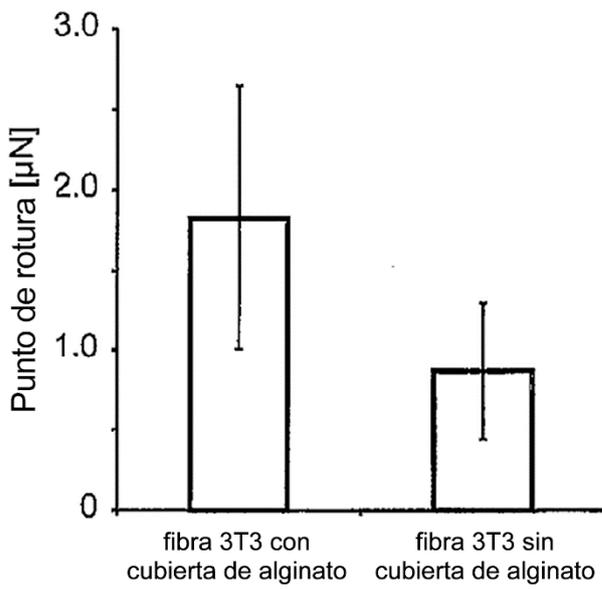
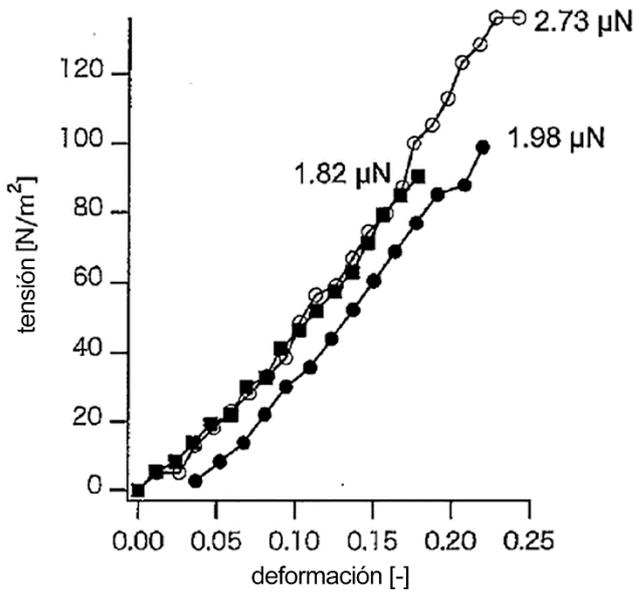


Fig. 32

