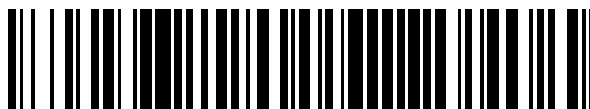


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 257**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 11/12 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

C08L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011** **E 15155375 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 2975115**

54 Título: **Material de cultivo celular derivado de plantas**

30 Prioridad:

27.10.2010 FI 20106121

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

08.05.2020

73 Titular/es:

UPM-KYMMENE CORPORATION (100.0%)
Alvar Aallon katu 1
00100 Helsinki , FI

72 Inventor/es:

YLIPERTTULA, MARJO;
LAUREN, PATRICK;
BHATTACHARYA, MADHUSHREE;
LOU, YANRU y
LAUKKANEN, ANTTI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 759 257 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

Material de cultivo celular derivado de plantas.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones de cultivo celular y de suministro de células derivadas de plantas, que comprenden nanofibras de celulosa y/o sus derivados.

10 Antecedentes de la invención

El cuidado de la salud sigue encontrándose en las fronteras principales para la investigación científica. La necesidad de descubrir y desarrollar medicamentos baratos y más seguros siempre crece. La capacidad para modelar de forma exacta la organización celular en un tejido u órgano particular es de suma importancia. Una réplica muy buena del sistema *in vivo* a *in vitro* requeriría el crecimiento celular en tres dimensiones (3D). La "intercomunicación" lograda entre las células en un cultivo celular 3D *in vitro* es un buen remedo del crecimiento celular en condiciones fisiológicas. De hecho, el cultivo celular 3D ha asumido importancia en los esfuerzos dirigidos hacia la medicina regenerativa, comprendiendo mejor las enfermedades crónicas y proporcionando un sistema modelo *in vitro* superior para identificar fármacos y ensayos toxicológicos. Su emergencia está siendo así publicitada acertadamente como "nueva dimensión de la biología".

Los esfuerzos de investigación intensos se encuentran en identificar y desarrollar "factores y armazones" que favorecerían el crecimiento celular 3D *in vitro*. Las células en condiciones fisiológicas no solo se "intercomunican" entre ellas sino que también interaccionan con el microentorno celular, la matriz extracelular (ECM), con la que residen. La ECM proporciona el soporte estructural a las células, y también contribuye a la señalización y direccionamiento del destino celular. Generalmente, la ECM está compuesta de glicosaminoglicanos y proteínas fibrosas tales como colágeno, elastina, laminina y fibronectina autoensambladas en una red nanofibrilar. Un armazón ideal para el crecimiento celular 3D debería de ser capaz de remedar el componente estructural de la ECM nativa, dar soporte al crecimiento celular y el mantenimiento, tener la red de tamaño correcto de poros interconectados para la migración celular eficiente, y transferir los nutrientes a las células. En esencia, las propiedades mecánicas y químicas del armazón deberían de conducir a la función celular como en el estado nativo.

Los hidrogeles, tanto de origen sintético como natural, han surgido como armazones adecuados para el cultivo celular 3D. La red de poros interconectados en hidrogeles permite la retención de una gran cantidad de fluido biológico, facilita el transporte de oxígeno, nutrientes y desechos. Además, la mayoría de los hidrogeles se pueden formar en condiciones citocompatibles suaves, y las propiedades biológicas se pueden modular mediante química de superficie. Los hidrogeles manipulados mediante ingeniería, con propiedades mecánicas, químicas y biológicas modificadas, tienen el potencial de imitar la ECM y establecer de este modo su utilidad en el cultivo 3D. Los productos comerciales para el cultivo celular 3D son, por ejemplo, PuraMatrix™ (3DM Inc.) y Matrigel (BD Biosciences). PuraMatrix™ es un hidrogel de nanofibras peptídicas autoensambladas que se asemeja a la estructura de colágeno fibrilar natural en la ECM, con un diámetro de fibras de 5-10 nm. También tiene un contenido elevado de agua, típicamente 99,5%. La patente US nº 7.449.180 y el documento WO 2004/007683 describen hidrogeles peptídicos. Matrigel es una mezcla de proteínas gelatinosa segregada por células tumorales de ratón. La mezcla se asemeja al entorno extracelular complejo encontrado en muchos tejidos, y se usa por biólogos celulares como sustrato para el cultivo celular. MaxGel™ ECM Matrix (Sigma-Aldrich), que incluye una mezcla de componentes de la ECM humana, forma un gel a temperatura ambiente.

La celulosa bacteriana se ha usado en membranas de curación de heridas y como armazón en cultivo celular. La limitación en la utilización de celulosa bacteriana en cultivo celular es la estructura inherente del material fermentado; con el cultivo, la BC se forma como membranas muy compactas en la interfaz de aire con agua en el fermentador. Las membranas formadas son demasiado compactas para muchas tareas de cultivo celular 3D, y son necesarias diversas modificaciones para mejorar la porosidad, que es necesaria para la penetración celular y formación de agrupamientos celulares.

Los materiales de hidrogel también se usan ampliamente en otros tipos de tareas de cultivo en las que es necesario material de soporte hidrófilo; por ejemplo, los hidrocoloides de tipo agar se usan ampliamente en el cultivo de células vegetales, bacterias y hongos para diversos fines microbiológicos.

La patente US nº 5.254.471 describe un portador para cultivar células hecho de fibras ultrafinas. El documento WO 2009/126980 describe hidrogel a base de celulosa, que contiene celulosa que muestra un grado medio de polimerización de 150-6200.

Se ha descubierto que las soluciones de la técnica anterior son más bien insatisfactorias en el cultivo celular. Todos los actuales métodos y matrices de cultivo celular 2D y 3D requieren el uso de sustancias químicas o compuestos a base de animales en los medios biomateriales a fin de que las células se mantengan y se multipliquen. El mantenimiento de células troncales es especialmente exigente, y no existen soluciones simples para la matriz

usada con el medio de cultivo celular que mantuviese vivas a las células troncales. La presencia de compuestos a base de animales en el entorno del cultivo celular genera un riesgo importante de inmunorreacciones, y diferentes tipos de aspectos de toxicidad, que finalmente exterminarán a las células cultivadas. Las matrices de cultivo celular que contienen aditivos a base de animales no son adecuadas para el uso con células troncales, especialmente si las células troncales se van a usar para el trasplante de tejidos y tecnología tisular (manipulación mediante ingeniería). Además, muchos de los polímeros propuestos para uso en los medios de cultivo celular no toleran una temperatura fisiológica, o son tóxicos para las células.

Breve descripción de la invención

Existe una clara necesidad de un material de cultivo celular mejorado que sea capaz de proporcionar soporte tri- o bidimensional para diversos tipos celulares. Esos modelos celulares 3D funcionales se pueden utilizar como herramientas en el descubrimiento de fármacos, sustituyendo a los experimentos con animales y siendo más avanzados que los modelos celulares 2D usados actualmente. El transporte de células cultivadas es también muy deseable, por ejemplo cuando el objetivo es la transferencia tisular o la terapia celular. La posibilidad de transferir agrupamientos de células cultivadas en matriz 3D es deseable cuando se están desarrollando diferentes modelos celulares *in vitro*. Los biomateriales de cultivo celular 3D existentes no permiten transferir la matriz de hidrogel con una aguja sin dañar seriamente a las células cultivadas.

Un objetivo de la presente invención es de este modo proporcionar un nuevo enfoque para resolver o aliviar al menos parcialmente los problemas mencionados anteriormente que surgen en la técnica anterior. Los objetivos de la invención se logran mediante una composición de cultivo celular o de suministro de células que comprende nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas que se caracteriza por lo que se manifiesta en las reivindicaciones independientes. Las formas de realización preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se basa en el uso de nanofibras de celulosa y/o sus derivados en matriz de cultivo celular 2D y 3D. La presente invención proporciona la utilización de nanofibras de celulosa y/o sus derivados en la matriz de cultivo celular. La utilización de nanofibras de celulosa y/o sus derivados como matriz de cultivo celular 2D y 3D elimina la necesidad de usar aditivos a base de animales para multiplicar y lograr la proliferación de células en una matriz que contiene las nanofibras de celulosa y/o sus derivados.

Se ha descubierto sorprendentemente que el hidrogel de CNF derivado de planta se puede usar sin ninguna modificación como ECM humana biomimética para cultivo celular 3D. Los datos de proliferación y viabilidad celulares sugieren que el hidrogel CNF es un biomaterial óptimo para armazones celulares 3D para ensayos de identificación de alto rendimiento a base de células funcionales avanzados en el desarrollo de fármacos, en pruebas de toxicidad de fármacos y en medicina regenerativa y además para el suministro de células *in vivo*.

Se describen por primera vez las propiedades físicas y de biocompatibilidad de hidrogel de CNF derivado de planta. La celulosa vegetal se usa ampliamente en la industria del papel y textil, y es abundante en la naturaleza. El hidrogel de nanofibra de celulosa nativa es opaco. La modificación química de la pasta de celulosa antes de la disgregación mecánica da lugar a hidrogeles ópticamente transparentes.

La presente invención se basa en estudios experimentales sobre hidrogeles compuestos de nanofibras de celulosa (CNF), que se dispersan en un entorno acuoso. Las nanofibras son muy hidrófilas debido a las funcionalidades hidroxílicas de los polímeros de celulosa y están cubiertas parcialmente con polisacáridos de hemicelulosa.

En consecuencia, la presente invención proporciona como un primer aspecto una composición de cultivo celular o de suministro de células que comprende nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas, en la que la nanofibra de celulosa está en una forma de un hidrogel o membrana.

Una ventaja significativa de la presente invención es que las células se pueden mantener (y se hacen proliferar) sobre y en el medio biomaterial sin sustancias químicas a base de animales o de seres humanos que se originan fuera de las células. Las células se dispersan uniformemente sobre y en el medio/matriz que contiene nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas. Las células se dividen en o en el medio, comienzan a proliferar, y los agrupamientos celulares comienzan a crecer espontáneamente sin la acumulación de células en la parte inferior de la plataforma del cultivo celular. La división homogénea de las células en las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas es un requisito previo para que el biomaterial funcione como medio de cultivo celular 3D.

Otras ventajas de la presente invención incluyen: las nanofibras de celulosa y/o sus derivados son inertes y no dan fondo fluorescente. El medio que comprende nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas se puede inyectar. La inyectabilidad se explica por las propiedades reológicas. La inyección se puede llevar a cabo de manera que las células permanecen estables dentro de la matriz y se distribuyen homogéneamente en la matriz tras la inyección.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa imágenes crio-TEM de hidrogeles de nanofibras de celulosa. CNF nativa está en el lado izquierdo (A) y CNF transparente está en el lado derecho (B).

La Figura 2 representa la viabilidad de células HepG2 en materiales de cultivo celular comerciales [MaxGel™ (Sigma-Aldrich), HydroMatrix™ (Sigma-Aldrich) y PuraMatrix™ (3DM Inc.)], en dos materiales de nanofibras de celulosa diferentes (CNF nativa y CNF transparente) y en CNF en la que se añadió fibronectina (FN). En el ensayo AB de proliferación, las células se cultivaron durante 48 h, y las células de control se cultivaron en condiciones idénticas en una superficie de plástico.

La Figura 3 representa la viabilidad de células ARPE-19 cultivadas en hidrogel de CNF nativa después de transferir las células con una aguja de jeringuilla de diferentes tamaños. La viabilidad se presenta como intensidad relativa de la fluorescencia.

La Figura 4 representa la difusión de dextranos de diferente peso molecular (20 kDa, 70 kDa, y 250 kDa) a través de hidrogel de nanofibra de celulosa nativa del 1%.

La Figura 5 representa imagen de microscopía óptica de células ARPE-19 sobre membrana de CNF nativa. La membrana de CNF soporta el crecimiento de las células en la parte superior de la imagen; en la parte inferior de la imagen, las células crecen en el plástico de cultivo celular. Aumento 20x.

La Figura 6 representa imágenes de sección de microscopía confocal de células HepG2 sobre un plástico de cultivo celular (A) y en el hidrogel de nanofibras de celulosa nativa (B).

La Figura 7 representa propiedades viscoelásticas de hidrogel de CNF del 0,5% por medidas reológicas oscilatorias dinámicas. Se representa la dependencia de G' (el módulo de almacenamiento) y G'' (el módulo de pérdida), con respecto a la frecuencia, de un hidrogel de CNF nativa del 0,5%.

La Figura 8 representa la viscosidad de hidrogeles de CNF del 0,5% como función del esfuerzo de cizallamiento aplicado, en comparación con una disolución al 0,5% de polímeros solubles en agua de poliácridamida (5000 kDa) y CMC (250 kDa).

La Figura 9 representa la viscosidad de hidrogeles de CNF del 0,5% como función de la velocidad de cizallamiento medida, en comparación con poliácridamida y CMC al 0,5%. Las regiones de velocidad de cizallamiento típicas de diferentes procesos físicos se han señalado en la figura con flechas.

La Figura 10 representa una presentación esquemática de una célula que contiene hidrogel de CNF que fluye en una aguja. La región de velocidad de cizallamiento elevada (baja viscosidad) está situada en la interfaz gel-aguja, y la región de velocidad de cizallamiento baja (viscosidad muy elevada) está situada en la mitad de la aguja.

La Figura 11 representa la evolución de la velocidad de cizallamiento y de la viscosidad cuando un hidrogel de CNF nativa del 0,7% se cizalló en un reómetro en geometría de cilindro concéntrico a un esfuerzo constante de 40 Pa.

La Figura 12 representa la recuperación de la estructura de una dispersión de hidrogel de CNF nativa del 0,7% tras el cizallamiento a velocidad de cizallamiento elevada, en comparación con el mezclamiento suave con una varilla de vidrio.

La Figura 13 representa la estabilidad de dos suspensiones de grava en hidrogel de CNF nativa del 0,5% (fila superior) y en hidrogel de CNF transparente del 0,5% (fila inferior) durante un período de 17 días. La grava fue arena estándar CEN (EN 196-1), con un tamaño medio de partículas de 1-2 mm y 2-3 mm. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

La Figura 14 representa la influencia de la hidrólisis enzimática sobre la capacidad de suspensión de los geles de nanofibra de celulosa. La grava fue arena estándar CEN (EN 196-1), con un tamaño medio de partículas de 1-2 mm.

La Figura 15 representa una imagen de microscopía confocal de célula ES humana derivada de células progenitoras hepáticas, que están embebidas en hidrogel de CNF nativa. Barra de escala: 70 μm .

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición de cultivo o de suministro de células que comprende nanofibras de celulosa y/o sus derivados, en la que las nanofibras de celulosa o sus derivados están en forma de un hidrogel

o membrana. Las nanofibras de celulosa o sus derivados se pueden obtener a partir de un material no basado en animales, tal como una materia prima que comprende material vegetal.

5 Excepto que se especifique de otro modo, los términos, que se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, tienen los significados usados habitualmente en el cultivo celular. Específicamente, los siguientes términos tienen los significados indicados a continuación.

10 La expresión “composición de cultivo o suministro de células” se refiere a un material que comprende nanofibras de celulosa o derivados de nanofibras de celulosa y utilizándose dicho material como un medio de cultivo celular o para el suministro de células. Dicha composición también se puede usar para transferir células o agrupamientos celulares. Las nanofibras de celulosa pueden estar en forma de un hidrogel o membrana.

15 La expresión “materia prima de celulosa” se refiere a cualquier fuente de materia prima de celulosa que se puede usar en la producción de pasta de celulosa, pasta refinada, o nanofibras de celulosa. La materia prima se puede basar en cualquier material vegetal que contenga celulosa. El material vegetal puede ser madera. La madera puede ser de árbol de madera blanda tal como píceo, pino, abeto, alerce, abeto de Douglas o tsuga, o de árbol de madera dura tal como abedul, chopo temblón, álamo, aliso, eucalipto o acacia, o de una mezcla de maderas blandas y maderas duras. El material no maderero puede proceder de restos agrícolas, hierbas u otras sustancias vegetales tales como paja, hojas, corteza, semillas, vainas, flores, vegetales o frutos procedentes de algodón, maíz, trigo, 20 avena, centeno, cebada, arroz, lino, cáñamo, abacá, sisal, yute, ramio, kenaf, bagazo, bambú o junco.

25 La expresión “pasta de celulosa” se refiere a fibras de celulosa que se han aislado de cualquier materia prima de celulosa usando procedimientos químicos, mecánicos, termomecánicos, o quimtermomecánicos de fabricación de pasta. Típicamente, el diámetro de las fibras varía entre 15-25 μm , y la longitud supera 500 μm , pero la presente invención no está destinada a estar limitada a estos parámetros.

La celulosa en la presente invención es celulosa estructuralmente de tipo I.

30 La expresión “nanofibra de celulosa” se refiere a una colección de nanofibras de celulosa (CNF) aisladas o haces de nanofibras derivados de materia prima de celulosa o pasta de celulosa. Las nanofibras tienen típicamente una relación de aspecto elevada: la longitud puede exceder un micrómetro, mientras que el diámetro medio numérico está típicamente por debajo de 200 nm. El diámetro de los haces de nanofibras también puede ser mayor pero generalmente menor que 1 μm . Las nanofibras más pequeñas son similares a las denominadas fibrillas elementales, que tienen un diámetro típicamente de 2-12 nm. Las dimensiones de las fibrillas o haces de fibrillas dependen de la materia prima y del procedimiento de disgregación. Las nanofibras de celulosa también pueden 35 contener algunas hemicelulosas; la cantidad depende de la fuente vegetal.

40 La disgregación mecánica de las nanofibras de celulosa a partir de materia prima de celulosa, pasta de celulosa, o pasta refinada, se lleva a cabo con el equipo adecuado, tal como un refinador, triturador, homogeneizador, eliminador de coloide, triturador de fricción, sonicador de ultrasonidos, fluidizador tal como microfluidizador, macrofluidizador u homogeneizador de tipo fluidizador. Preferiblemente, las “nanofibras de celulosa” es material disgregado mecánicamente.

45 Las “nanofibras de celulosa” o “nanofibras de celulosa y/o sus derivados” también pueden ser cualquier derivado química o físicamente modificado de nanofibras de celulosa o haces de nanofibras. La modificación química se puede basar, por ejemplo, en reacción de carboximetilación, oxidación, tal como oxidación mediante TEMPO, esterificación, o eterificación de moléculas de celulosa. La modificación también se puede llevar a cabo mediante adsorción física de sustancias aniónicas, catiónicas, o no iónicas, o cualquier combinación de estas, sobre la superficie de celulosa. La modificación descrita se puede llevar a cabo antes, después, o durante la producción de 50 nanofibras de celulosa. Ciertas modificaciones pueden conducir a materiales de CNF que son degradables en el cuerpo humano.

55 De forma adecuada, la materia prima de celulosa, tal como pasta de celulosa, se pretrata con ácido y base antes de la disgregación mecánica. El pretratamiento se efectúa sometiendo la pasta de celulosa a tratamiento ácido, preferiblemente con ácido clorhídrico, para eliminar cualesquiera iones cargados positivamente que tienen una carga mayor de +1, seguido del tratamiento con una base inorgánica que contiene iones cargados positivamente que tienen una carga +1, preferiblemente NaOH, en el que los iones Na^+ sustituyen a los primeros iones. Este pretratamiento proporciona a las “nanofibras de celulosa” excelentes propiedades gelificantes y transparencia. Este producto pretratado se denomina como “nanofibras de celulosa” pretratadas con ácido-base o de iones 60 intercambiados.

65 La pureza microbiana de las “nanofibras de celulosa” es esencial para el comportamiento del cultivo celular. Por lo tanto, las “nanofibras de celulosa” se esterilizan antes de los experimentos de cultivo celular en una forma de hidrogel o membrana. Además de eso, es importante minimizar la contaminación microbiana del producto antes y durante la fibrilación. Antes de la fibrilación, es ventajoso recoger asépticamente la pasta de celulosa del molino de la pasta inmediatamente después de la etapa de blanqueado cuando la pasta todavía está estéril.

Existen varios sinónimos ampliamente usados para nanofibras de celulosa. Por ejemplo: nanocelulosa, celulosa nanofibrilada (CNF), celulosa nanofibrilar, nanofibra de celulosa, celulosa fibrilada de nanoescala, celulosa microfibrilar, celulosa microfibrilada (CNF), o microfibrillas de celulosa. Las nanofibras de celulosa producidas por ciertos microbios tienen varios sinónimos, tales como celulosa bacteriana, celulosa microbiana (MC), biocelulosa, nata de coco (NDC), o coco de nata.

Las nanofibras de celulosa descritas en esta invención no es el mismo material que los filamentos de celulosa, que también se conocen como: nanofilamentos de celulosa, nanocristales de celulosa, nanovarillas de celulosa, microcristales de celulosa semejantes a varillas, o nanoalambres de celulosa. En algunos casos, se usa una terminología similar para ambos materiales, por ejemplo por Kuthcarlapati et al. (Metals Materials and Processes 20(3):307-314, 2008), en el que el material estudiado se denominó "nanofibra de celulosa" aunque se refieren claramente a nanofilamentos de celulosa. Típicamente, estos materiales no tienen segmentos amorfos a lo largo de la estructura fibrilar como las nanofibras de celulosa, que conducen a una estructura más rígida. Los filamentos de celulosa son también más cortos que las nanofibras de celulosa; típicamente, la longitud es menor que un micrómetro.

Las dimensiones de las nanofibras de celulosa individuales están bastante próximas a las dimensiones mencionadas anteriormente de fibras de colágeno en ECM, es decir, 4-10 nm. Por lo tanto, los hidrogenes a base de CNF se pueden usar como matriz de cultivo celular 3D.

En los experimentos de cultivo celular de la presente invención, se usaron dos tipos de nanofibras de celulosa: CNF nativa opaca y CNF ópticamente transparente, que fue celulosa oxidada mediante TEMPO. La descripción detallada de los materiales se presenta en la sección de Ejemplo, materiales y métodos.

La expresión "hidrogel de nanofibra de celulosa" se refiere a dispersión acuosa de nanofibras de celulosa.

La expresión "membrana de nanofibra de celulosa" se refiere a la formación semejante a una lámina en seco o en húmedo de fibras de celulosa. Las membranas se producen típicamente mediante filtración de dispersión diluida de nanofibras de celulosa con aparato de filtración de vacío con un filtro apropiado. Para obtener las estructuras de membrana mencionadas anteriormente, también se puede usar el moldeo con disolventes. La membrana obtenida se puede usar como tal en estado húmedo, o se puede secar antes del uso.

Las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas de la presente invención pueden comprender derivados química o físicamente modificados de una nanofibra de celulosa o haces de nanofibras.

Las células pueden ser cualquier célula eucariota, tal como células de animales, células vegetales y células fúngicas, que están dentro del alcance de la presente invención.

Dependiendo de la estirpe celular, los experimentos se llevan a cabo en 2D o 3D, es decir, las células pueden cultivarse sobre las membranas o geles de CNF, o las células pueden dispersarse de forma homogénea en los hidrogeles de CNF o membranas de CNF. Los ejemplos específicos de la presente invención describen que las células epiteliales del pigmento retiniano (ARPE-19) que surgen espontáneamente forman monocapa, mientras que las células de carcinoma hepatocelular (HepG2) humanas producen colonias monocapa o colonias de células.

Las células se pueden detectar usando cualquier medio de detección conocido o colorante conocido en la técnica.

Una composición según las reivindicaciones puede producirse mediante un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar nanofibras de celulosa y/o sus derivados; opcionalmente mezclar juntos dichas nanofibras de celulosa y/o sus derivados con agua; y transferir o colocar las nanofibras de celulosa y/o sus derivados, o la mezcla obtenida, al entorno adecuado para el cultivo o suministro de células.

Los hidrogeles o membranas de nanofibras de celulosa o sus derivados, o la composición de la presente invención, se pueden usar como un material para el suministro de células.

Los hidrogeles o membranas de nanofibras de celulosa o sus derivados, o la composición de cultivo celular o de suministro de células, se pueden usar para suministrar material para uso clínico.

La presente invención se refiere a una utilización microbiológica de nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas o la composición según la presente invención con fines de laboratorio y/o industriales como un medio o un compuesto de un medio para mantener células *in vitro*.

La composición que comprende nanofibras de celulosa o sus derivados se puede usar para inmovilizar células o enzimas.

La composición puede utilizarse en un procedimiento para cultivar células, en el que el procedimiento comprende las etapas de proporcionar células; poner en contacto las células con la composición de cultivo celular que comprende nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas para formar una matriz; y cultivar las células en dicha matriz en una disposición tridimensional o bidimensional.

La presente invención se refiere además a una composición o utilización, en la que las células son células eucariotas.

La presente invención proporciona además una composición o utilización, en el que las células son células troncales.

La eliminación de nanofibras de celulosa se puede llevar a cabo por ejemplo con enzimas usando degradación enzimática de moléculas de celulosa. Las enzimas apropiadas son, por ejemplo, celulasas comercialmente disponibles. Las estirpes celulares cultivadas también se pueden manipular genéticamente mediante ingeniería para producir la proteína enzimática necesaria en el sistema de cultivo.

La eliminación de las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas del material de crecimiento celular o de cultivo celular puede realizarse mediante un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar material que comprende medio de crecimiento celular y células, y opcionalmente un medicamento; diluir dicho material con líquido acuoso o no acuoso; y eliminar las nanofibras de celulosa mediante decantación. La centrifugación moderada se puede usar para sedimentar las células y agregados celulares antes de la decantación.

Se ha descubierto sorprendentemente que el hidrogel de CNF derivado de planta se puede usar incluso sin ninguna modificación como ECM humana biomimética para el cultivo celular 3D. Los datos de proliferación y viabilidad celulares sugieren que el hidrogel de CNF es un biomaterial óptimo para armazones celulares 3D para ensayos de identificación sistemática de alto rendimiento a base de células funcionales avanzados en el desarrollo de fármacos, en estudios de toxicidad de fármacos y en medicina regenerativa y además en el suministro de células *in vivo*.

La presente invención describe por primera vez las propiedades físicas y de biocompatibilidad del hidrogel de CNF derivado de planta. La celulosa vegetal se usa ampliamente en la industria del papel y textil, y abunda de forma natural. El hidrogel de nanofibra de celulosa nativa es opaco. La modificación química de la pasta de celulosa antes de la disgregación mecánica da lugar a hidrogeles ópticamente transparentes.

Las nanofibras de celulosa de la presente invención se pueden usar en forma de hidrogel o de membrana seca o húmeda. La concentración de gel del hidrogel de CNF se puede alterar por dilución. Las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas que tienen propiedades similares no son tóxicas para las células.

Si los hidrogeles de nanofibras de celulosa se comparan con hidrogeles de cultivo celular reticulables mediante UV, como ácido hialurónico o hidrogeles de PEG, los materiales de CNF son considerados mucho menos tóxicos. En geles reticulables mediante UV se necesitan fotoiniciadores dañinos para iniciar la gelación, mientras que los hidrogeles de CNF se forman espontáneamente. La naturaleza no covalente de los hidrogeles de CNF permite también el ajuste de la porosidad mediante dilución.

Las células se extienden de manera uniforme en los hidrogeles de nanofibra de celulosa y pueden comenzar automáticamente a duplicarse y crecer en agrupamientos celulares 3D sin sedimentar en el fondo de la plataforma de cultivo celular. Todos los medios de cultivo celular 3D comerciales actualmente usados requieren la adición de péptido de adhesión de manera que las células formen estructuras 3D en la plataforma del cultivo celular.

Las nanofibras de celulosa según la presente invención o un derivado de las mismas se pueden usar sin péptido de adhesión. Las células se fijan a la plataforma y se distribuyen espontáneamente de forma homogénea en el hidrogel de nanofibra de celulosa. Las células se suspenden homogéneamente en la fase continua debido al soporte mecánico proporcionado por las fibras de nanofibras de celulosa. El límite elástico notablemente elevado estabiliza a las células y a los agrupamientos celulares que han crecido frente a la sedimentación.

Los hidrogeles de nanofibra de celulosa de origen vegetal funcionan sin péptido de adhesión y/o porosidad hecha a medida, mientras que las nanofibras de celulosa bacteriana requieren péptido de adhesión. La celulosa bacteriana se ha usado directamente tras la fermentación, en cuyo caso la estructura de membrana resultante es considerablemente más firme que el hidrogel de la presente invención, es decir, un hidrogel de nanofibras de celulosa. Por lo tanto, los métodos de la técnica anterior han necesitado procedimientos adicionales para hacer más porosa a la matriz de hidrogel.

La firmeza del medio de cultivo celular que contiene nanofibras de celulosa en forma de gel se puede ajustar sin influir en las propiedades del cultivo celular. Las nanofibras de celulosa que se originan a partir de bacterias también son más gruesas que las nanofibras de celulosa procedentes de otras fuentes, y por lo tanto no son modificables libremente para el cultivo celular.

Las células crecen en la matriz 3D o sobre la matriz. Dicho material puede ser membrana inyectable o semejante a una lámina con topología superficial apropiada.

5 Las propiedades de CNF están próximas a las óptimas para el cultivo celular 3D: transparente, no tóxica, muy viscosa, alto poder de suspensión, retención acuosa elevada, buena adhesión mecánica, no basada en animales, imita a las dimensiones de la ECM, es insensible a sales, temperatura o pH, no degradable, no autofluorescente. La CNF tiene un fondo fluorescente insignificante debido a la estructura química del material. Además, el gel de CNF no es tóxico para las células.

10 Las células se pueden cultivar o se pueden hacer crecer en geles de CNF durante un tiempo prolongado, por ejemplo 2 a 7 días, o incluso un tiempo más largo. Las células también se pueden cultivar o se pueden suspender solamente en el hidrogel durante un tiempo corto, por ejemplo minutos a varias horas. Las células usan la matriz de fibras de nanocelulosa como armazón/soporte de crecimiento usado como plataforma. Las células forman agrupamientos, indicando así la utilidad de las nanofibras de celulosa como armazón de cultivo celular 3D. Las células crecen como capas o agregados celulares sobre o en el gel de CNF, dependiendo del procedimiento de deposición y el tipo de células.

15 El hidrogel de CNF no tóxico es una ECM igualmente buena para las células estudiadas como el MaxGel™ a base de ECM humana. La viabilidad de las células es incluso mayor que en PuraMatrix™ o HydroMatrix™. A los hidrogeles de CNF no se añaden componentes de ECM ni humanos ni a base de animales. Sin embargo, la adición de fibronectina o colágeno IV en sistemas a base de CNF puede ser beneficiosa en algunos casos. Sobre la base de los estudios de difusión, el hidrogel de CNF es muy permeable y facilita libremente el intercambio de oxígeno, nutrientes y metabolitos de las células solubles en agua.

20 La criomicroscopía electrónica de transmisión muestra que el hidrogel de CNF está compuesto de una mezcla de nanofibrillas de celulosa individuales y haces de fibras. Las dimensiones de CNF son parecidas al colágeno humano nativo, que es un componente de la ECM natural y se usa habitualmente como un soporte de células. La resistencia (elasticidad) del hidrogel de CNF permanece casi constante en función de la frecuencia usada de 0,01 a 1 Hz. Los datos de reología revelan la viscosidad de cizallamiento de aproximadamente varios centenares de kilopascals en reposo (esfuerzo de cizallamiento bajo) para caer hasta unos pocos pascals en un esfuerzo de cizallamiento de un pascal. Ese comportamiento es más bien único para hidrogeles de biomaterial. Permite la capacidad de suspensión extremadamente buena y el soporte de células, y mediante el comportamiento pseudoplástico, permite la dispensación e inyección fáciles deseadas de células en hidrogel de CNF independientemente del tamaño de las agujas usadas, comportamientos los cuales no se obtenían previamente para otros hidrogeles de biomaterial de cultivo celular. Las propiedades mecánicas de elasticidad y rigidez son óptimas para hidrogeles de CNF para el crecimiento de cultivo celular 3D e inyección de células.

30 La ventaja de la presente invención es que las dimensiones de la red fibrilar de nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas son muy parecidas a la red de ECM natural de nanofibras de colágeno. Además, las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas es un material no basado en animal, es decir, no hay riesgo de transferencia de enfermedades. Actualmente, la mayoría de los productos comerciales se aíslan de animales. Además, la invención proporciona la posibilidad de ajustar la forma física, puesto que se pueden utilizar materiales de CNF desde hidrogeles hasta membranas.

35 El hidrogel inyectable forma la matriz de soporte alrededor de las células debido al límite elástico muy elevado. Las membranas de CNF son transparentes y muy porosas. La producción en masa es fácil en comparación con las alternativas.

40 Las nanofibras de celulosa nativa no son tóxicas para las células. La proliferación celular es casi el doble en el caso de nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas en comparación con el control (células solamente). Las células se pueden controlar sobre hidrogeles de CNF durante un tiempo prolongado (por ejemplo durante 2-7 días). Las células usan matriz de nanofibras de celulosa como una plataforma de crecimiento. Las células forman agrupamientos, lo que indica la utilidad de las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas como un armazón de cultivo celular 3D. Las células crecen como capas en el gel de CNF. Las nanofibras de celulosa o un derivado de las mismas tienen un fondo de fluorescencia insignificante. El hidrogel de nanofibras de celulosa tiene elasticidad óptima, rigidez, esfuerzo de cizallamiento, adhesión mecánica y porosidad a usar como matriz de cultivo celular 3D y 2D.

45 En entorno acuoso, las nanofibras de celulosa forman una red de hidrogel continua de nanofibras dispersas o haces de nanofibras. El gel está formado por fibrillas muy hidratadas que están enmarañadas entre sí, incluso a concentraciones muy bajas. Las fibrillas pueden interactuar también vía enlaces de hidrógeno. La estructura macroscópica se destruye fácilmente con agitación mecánica, es decir, el gel comienza a fluir a esfuerzos elevados de cizallamiento. Los hidrogeles de nanofibra de celulosa y/o sus derivados no se han descrito previamente para el uso como material de cultivo celular.

Las aplicaciones de la presente invención incluyen proporcionar material de cultivo celular para investigación biotecnológica. El medio de crecimiento celular o de cultivo celular que contiene CNF se puede usar para mantener y hacer crecer células, así como para transferir células. La presente invención proporciona un medio de cultivo celular que se puede utilizar, por ejemplo, en ingeniería de tejidos y curación de heridas. Otras aplicaciones incluyen, por ejemplo, aplicaciones de dosificaciones de fármaco, medicamentos biotecnológicos o biológicos y su dosis, así como ensayos de estudio de células funcionales de fármacos 3D. Las propiedades reológicas únicas del hidrogel de CNF permiten varias aplicaciones que se basan en la inyectabilidad del hidrogel, como la inyección de células o fármacos en hidrogel de CNF en tratamientos intraoculares, intramusculares, o subcutáneos.

Los siguientes ejemplos son proporcionados para ilustrar adicionalmente la invención, y no están destinados a limitar su alcance. A partir de la descripción, un experto en la materia podrá modificar la invención de muchas maneras.

Ejemplos

Materiales y métodos

Preparación de hidrogeles de CNF

El hidrogel de CNF nativa opaco (1,7% en peso) se obtuvo mediante homogeneización a alta presión de fibras de pasta de celulosa húmedas. De este modo, el producto directo del procedimiento es un hidrogel de nanofibra de celulosa diluido. El hidrogel de CNF transparente (0,9% en peso) se obtuvo mediante un procedimiento de homogeneización similar de una pasta de celulosa modificada químicamente (pasta de celulosa oxidada mediante TEMPO). Las muestras se esterilizaron mediante autoclave. Para los estudios celulares, el hidrogel de CNF se diluyó hasta la concentración apropiada y se homogeneizó con mezclamiento mecánico o tratamiento con ultrasonidos. En la Figura 1 se presentan imágenes de crio-TEM de CNF nativa y CNF transparente. El hidrogel de nanofibra de celulosa nativa está compuesto de una mezcla de nanofibrillas de celulosa individuales y haces de fibras (Figura 1A). El diámetro de las fibras más pequeñas es aproximadamente 7 nm; sin embargo, la mayoría del material celulósico está formado por estructuras en haces de 50-100 nm. La escala de longitud exacta no se puede estimar a partir de las imágenes debido a la naturaleza enmarañada y en forma de haz del material, pero parece claro que las nanofibras individuales tienen varios micrómetros de longitud. La imagen de crio-TEM del hidrogel de CNF ópticamente transparente muestra una red de nanofibras de celulosa individuales homogéneamente distribuidas. El diámetro de estas nanofibras es aproximadamente 7 nm y la longitud supera el micrómetro. Las nanofibras tienen segmentos lineales de 100-200 nm de longitud, seguidos de retorceduras bruscas a lo largo del eje de la fibra. Estos segmentos lineales están compuestos de dominios de celulosa muy cristalinos – los sitios de curvaturas están formados por las partes amorfas.

Preparación de membranas de CNF

Las membranas de CNF se prepararon mediante filtración a vacío de una dispersión de CNF nativa al 0,2% en peso acuosa. Tras la filtración, las membranas húmedas se secaron bajo peso en un horno a 55°C durante 48 h. Las películas secas fueron lisas y opacas, con el gramaje de 70-80 g/m².

Hidrólisis enzimática

La degradación enzimática de hidrogeles de CNF se demostró hidrolizando grava que contiene hidrogeles al 0,5% con Celluclast 1.5 LFG, CCN0367 (Novozymes, pHopt 5), Prot. 90 mg/ml. La degradación de CNF nativa se llevó a cabo a pH 5 a 50°C durante 4 días, y la degradación de CNF transparente a pH 7 a 21°C durante una hora. La dosis de la enzima fue 5 mg de enzima por un gramo de CNF.

Células HepG2

Origen de las células HepG2

Las células de carcinoma hepatocelular (HepG2) humanas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Cultivo de mantenimiento de las células HepG2

Las células HepG2 se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), piruvato de sodio 100 mM (Gibco). Las células se mantuvieron en matraces de cultivo de 75 cm² a 37°C en una incubadora con una humedad a RT del 95% en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se hicieron pasar 1:10 mediante tripsinización dos veces a la semana con una relación de división 1:4. El medio se cambió cada 48 h, y las células se cultivaron a una confluencia del 90%.

Cultivo 3D de células HepG2 en hidrogel de CNF

El hidrogel de nanofibra de celulosa se colocó en la parte inferior de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y se sembró una suspensión de células HepG2 en medio de crecimiento, que contiene 25.000-50.000 de células por pocillo, bien en la parte superior del hidrogel de CNF o bien mezclado con él. La concentración de hidrogel de CNF oscila desde 0,01% hasta 1%.

Células ARPE-19

Origen de las células ARPE-19

Las células epiteliales de pigmento de la retina que surgen espontáneamente (ARPE-19) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Cultivo de mantenimiento de las células ARPE-19

Las células ARPE-19 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM): mezcla nutriente F12, mezcla 1:1 suplementada con 10% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 U/ml. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 7% de CO₂. El medio de crecimiento se cambió cada 2-3 días, y los cultivos se usaron en la pasada 24-30.

Cultivo de células ARPE-19 sobre membrana de CNF

El hidrogel de nanofibra de celulosa se colocó en la parte inferior de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y la suspensión de células ARPE-19 en medio de crecimiento que contiene 25.000-50.000 células por pocillo se sembró bien sobre la parte superior del hidrogel o bien mezclado con él. La concentración de hidrogel oscila desde 0,01% hasta 1%.

Células progenitoras hepáticas derivadas de células ES humanas (no forman parte de la invención)

Cultivo de mantenimiento de células troncales embrionicas humanas

Para los presentes estudios, se usó la estirpe celular de embriocitos indiferenciados humanos (hES) H9 (Wisconsin International Stem Cell Bank, the "WISC Bank" c/o WiCell research Institute, Madison, WI, USA). Las células H9 se cultivaron de forma habitual sobre placas de cultivo tisular revestidas con Matrigel en medio mTeSR1, y se hicieron pasar usando Dispase 1 mg/ml (StemCell Technologies). En esta condición, las células troncales forman colonias monocapa bidimensionales (2D).

Cultivo 3D de células hES en CNF

Las colonias de células H9 se mezclaron con 0,3% de CNF nativa o 0,3% de CNF transparente, y se cultivaron en medio mTeSR1. Las células hES en CNF forman agrupamientos celulares 3D. En algunos experimentos, CNF al 0,3% se mezcló con fibronectina humana 58 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Cultivo 3D de progenitores hepáticos derivados de células H9 en CNF

Las células H9 se diferenciaron en células progenitoras hepáticas durante 11 días siguiendo el protocolo publicado [Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriguen A, Black JR, Elcombe C, Ross JA, Wolf R, Cui W. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. Stem Cells. Abril de 2008; 26(4):894-902]. Las células progenitoras hepáticas derivadas se cultivaron en entorno 3D usando CNF nativa al 0,3% o CNF transparente al 0,3%, durante 7 días. En algunos experimentos, CNF al 0,3% se mezcló con colágeno de ratón tipo IV 13 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Tinción de vivas/muertas

Los agrupamientos de células H9 y los progenitores hepáticos en CNF se cotiñeron con CellTracker Blue CMAC (20 µM) para células vivas y con yoduro de propidio (25 µg/ml) para células muertas. Las imágenes de las células se adquirieron mediante microscopía de barrido por láser confocal (Leica TCS SP5 MP SMD FLIM) a una longitud de onda de excitación de 405 nm para CellTracker Blue CMAC y 514 nm para yoduro de propidio.

Ensayo AlamarBlue para viabilidad/proliferación celular

La viabilidad celular se cuantificó mediante el kit de ensayo de viabilidad celular AlamarBlue™ (Biotium Inc., Hayward, CA, USA). El hidrogel de nanofibra de celulosa se colocó en la parte inferior de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y la suspensión de células HepG2/ARPE-19 en medio de crecimiento que contiene 25.000-50.000 células por pocillo se sembró bien en la parte superior del hidrogel o bien mezclado con él. La concentración

de hidrogel oscila desde 1 hasta 0,01%. La viabilidad y proliferación celulares se midieron como una función de días tras cultivar las células sobre el hidrogel de nanofibra de celulosa en un incubador a 37°C en CO₂ al 5% y humedad relativa del 95%.

Después de 48 horas, AlamarBlue se añadió directamente al medio de cultivo en placas de 96 pocillos, a una concentración final de 10%. Las placas se incubaron durante 5 h y se expusieron a una longitud de onda de excitación de 530 nm, y la emisión a 590 nm para medir la fluorescencia. El porcentaje de viabilidad se expresó como recuentos de fluorescencia en presencia de hidrogel de CNF como un porcentaje de aquella en ausencia de hidrogel de nanofibra de celulosa (células que crecen sobre la superficie de plástico).

Las medidas de la fluorescencia de fondo (control negativo) se determinaron a partir de pocillos que contienen hidrogel y reactivo colorante en medio de cultivo, pero no células. La media y la desviación estándar de todas las medidas de fluorescencia se calcularon y se corrigieron subsiguientemente para el fondo, y se expresaron como fluorescencia relativa.

Microscopía de láser confocal

La viabilidad de células HepG2 cultivadas sobre hidrogel, y la formación de esferoides de HepG2 3D, se evaluó con el kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead® (Invitrogen) que consiste en calceína AM y homodímero de etidio.

De forma breve, se suspendieron células HepG2 en hidrogel de CNF nativa y transparente al 1% con o sin fibronectina. La suspensión celular en hidrogel se transfirió a cada pocillo con células. El medio de cultivo celular se añadió a cada pocillo. Las células HepG2 encapsuladas por el hidrogel se cultivaron durante 5 días, y el medio se renovó cada 48 h. Después de 5 días, el medio se eliminó de los pocillos, y las células encapsuladas se lavaron con PBS y se incubaron en disolución "Live/Dead" que contiene calceína AM 0,2 µM y homodímero de etidio 1,0 µM durante alrededor de 45 min. a temperatura ambiente. Las células vivas se visualizaron usando un microscopio de barrido por láser confocal (microscopio invertido CLSM, Leica SP2, Zurich, Suiza) equipado con un láser de argón (488 nm/35 mW), objetivos HC PL APO 10x/0,4 CS y HC PL APO 20x/0,7 CS (aire), caja incubadora con un sistema calentador de aire (Life Imaging/Services, Suiza), y mezclador de CO₂ (Okolab). Las imágenes se adquirieron de dos detectores (uno para calceína y otro para homodímero de etidio). Las imágenes se crearon y se editaron con Imaris 7.0 (Bitplane). No se realizó desconvolución.

Ejemplo 1

Comparación de la viabilidad celular de células HepG2 en diferentes materiales de cultivo celular

Los hidrogeles de nanofibra de celulosa se colocaron en la parte inferior de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y la suspensión de células HepG2 en medio de crecimiento de mantenimiento que contiene 25.000-50.000 células por pocillo se sembró bien sobre la parte superior del hidrogel o se mezcló con él. La concentración de hidrogel oscila de 1-0,01%. La intensidad de la fluorescencia que indica la viabilidad y proliferación celulares se midió como una función de días tras cultivar las células sobre el hidrogel de nanofibra de celulosa en una incubadora a 37°C en CO₂ al 5% y humedad relativa del 95%.

Como materiales de cultivo 3D de referencia, se usaron tres materiales de cultivo celular comercialmente disponibles: MaxGel™ (Sigma-Aldrich), HydroMatrix™ (Sigma-Aldrich) y PuraMatrix™ (3DM Inc.). El montaje experimental fue idéntico para todos los materiales estudiados.

La viabilidad de las células HepG2 se cuantificó mediante el kit de ensayo de viabilidad celular AlamarBlue™ (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) como se presenta anteriormente en Materiales y métodos, ensayo de AlamarBlue para viabilidad para proliferación celular.

El porcentaje de viabilidad de células HepG2 para los materiales estudiados se presenta en la Figura 2. Ambos tipos de hidrogeles de nanofibra de celulosa, es decir, CNF nativa y transparente, muestran valores de viabilidad mayores que los materiales de referencia Hydromatrix™ o PuraMatrix™ comerciales. Si se añade fibronectina a los hidrogeles de CNF, la viabilidad está próxima a MaxGel™ comercial. Además, la proliferación y la viabilidad celular aumentan linealmente como una función de la concentración celular en ambos hidrogeles. Esta observación apoya la hipótesis de que el hidrogel imita a los componentes de la ECM humana. Tiene toda la composición clave de ECM.

Ejemplo 2

Transferencia de células ARPE-19 con una aguja de jeringuilla

Se sembraron células ARPE-19 (25000 células por pocillo) y se cultivaron en matriz de CNF en la parte inferior de la placa de 96 pocillos. La viabilidad de células ARPE-19 después de transferir las células con una aguja de

jeringuilla de diferentes tamaños se presenta en la Figura 3. También se puede obtener el mismo fenómeno con otros tipos celulares como células HepG2 y ES.

Una explicación más detallada de la transferencia de células ARPE-19 con una aguja de jeringuilla es la siguiente: en la Transferencia 1 en la Figura 3, las células se incubaron durante 48 horas con CNF al 1,66%, y después de eso, las células se transfirieron con una jeringuilla (20G-27G), alrededor de 100 μ l, a una placa de 96 pocillos. Después de la transferencia con la jeringuilla, las células se incubaron durante 24 horas, y se midió la viabilidad de las células en CNF.

En la Transferencia 2, las células incubadas durante 24 horas en CNF al 1,66% se transfirieron con una jeringuilla 27G (alrededor de 2 ml) a un medio reciente. Las células se incubaron durante 24 horas después de la transferencia, tras lo cual las células se transfirieron nuevamente con una jeringuilla (20G-27G), alrededor de 100 μ l, a una placa de 96 pocillos, se incubaron nuevamente durante 24 horas, y se midió la viabilidad de las células doblemente transferidas en CNF al 1,66%.

Estos experimentos demuestran que es posible transferir las células en hidrogel de CNF, el proceso de transferencia tuvo éxito, y las células estaban vivas y permanecieron vivas durante la transferencia con una jeringuilla. Ese fenómeno se obtuvo incluso con el tamaño más pequeño de aguja de 27G, y no se obtuvo ningún corte con respecto al tamaño de la aguja usada en el proceso de transferencia. Las muestras que se transfirieron dos veces (Transferencia 2) mostraron menores tasas de proliferación, muy probablemente debido al tiempo de incubación más corto de 24 horas al comienzo del experimento. La transferencia de células en hidrogel de CNF demuestra que las células estaban de hecho dentro del hidrogel y permanecieron allí, ya que las células que se adhirieron a la placa no se transferirán (ausencia de tripsinación). Estos experimentos mostraron que las células permanecieron viables durante la transferencia.

Ejemplo de referencia 3

Células troncales

Tinción de vivas/muertas de células progenitoras hepáticas derivadas de células hES

Unas células progenitoras hepáticas derivadas de células ES humanas se embebieron en hidrogel de CNF nativa (Figura 15) y se cultivaron durante 7 días con y sin colágeno IV. No se detectó fondo. Células progenitoras hepáticas derivadas de células ES humanas se embebieron en hidrogel de CNF transparente y se cultivaron durante 7 días con y sin colágeno IV. No se detectó fondo, lo que hace a este material extremadamente fácil de usar en este contexto. Habitualmente, otros materiales usados, por ejemplo Matrigel y MaxGel, tienen un fondo fluorescente significativo, y por lo tanto es difícil de trabajar con esas matrices. Las células ES se pueden mantener en hidrogel de CNF, sobreviven, y de este modo este material es capaz de mantenerlas vivas. Además, las células ES forman también estructura 3D, que no se ha observado previamente con ningún otro material.

Ejemplo 4

Difusión de dextranos a través de hidrogeles de CNF

El conocimiento detallado sobre las propiedades de difusión de un material de cultivo celular es importante. El material de cultivo celular debe ser suficientemente poroso para permitir la difusión de nutrientes y oxígeno a las células cultivadas, así como para permitir la difusión eficiente de metabolitos desde las células. Las propiedades de difusión de hidrogel de CNF se demostraron con dextranos de diferentes pesos moleculares, de la siguiente manera:

se plantaron 400 μ l de CNF transparente u opaca (1%) por filtro en el compartimento apical en placas de pocillos de filtro Transwell™ (tamaño de poros del filtro 0,4 μ m). Se añadió 1 ml de PBS al lado basolateral, y se añadieron 100 μ l (25 μ g) de dextranos marcados fluorescentemente encima de los hidrogeles (MW de 20k, 70k y 250k). La placa se fijó firmemente y se dejó sin perturbar sobre una mecedora de placas de pocillos. Se tomaron muestras de 100 μ l desde el lado basolateral, y se sustituyó una cantidad igual con PBS. Las primeras muestras se tomaron con intervalos de 15 minutos, otras muestras se tomaron con diferentes puntos de tiempo, que oscilan de 30 minutos a 2 horas, y las muestras finales a 24 horas. Se tomó un total de 168 muestras. La placa diana (OptiPlate™-96 F) se midió a longitudes de onda de excitación y de emisión de 490 nm y 520 nm, respectivamente.

En la Figura 4 se presenta la difusión de dextranos de diferentes pesos moleculares a través de gel de nanofibra de celulosa nativa al 1%. La difusión de los compuestos modelo tiene lugar a velocidad constante y depende enormemente del peso molecular (tamaño) del compuesto. Está claro que las moléculas de hidrogeles de CNF son capaces de difundirse eficazmente, aunque la estructura del gel es suficientemente firme para estabilizar la suspensión celular.

El perfil de difusión observado también se puede utilizar en diversas formulaciones y aplicaciones de suministro de fármacos. La difusión de fármacos se puede controlar como una función del tamaño de la molécula farmacéutica o proteína (usada como fármaco), o como una concentración de hidrogel de CNF. El perfil de liberación sostenido claro es especialmente beneficioso para ciertos tratamientos en los que se prefiere una liberación más prolongada, especialmente en el caso de fármacos peptídicos o proteicos.

Ejemplo 5

Proliferación de células ARPE19 sobre membrana de CNF

La membrana de CNF nativa se colocó en la parte inferior de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y la suspensión celular en medio de crecimiento de mantenimiento que contiene 25.000-50.000 células por pocillo se sembró encima de la membrana. La concentración de la membrana oscila desde 1,6 hasta 0,01%. La viabilidad y proliferación celulares se midieron como una función de días tras cultivar las células sobre la membrana de CNF nativa en una incubadora a 37 C en 5% de CO₂ y humedad relativa del 95%.

Las células ARPE-19 sobre la membrana de CNF nativa se visualizaron con microscopía óptica. La membrana de CNF soporta el crecimiento de las células en la parte superior de la imagen (Figura 5), mostrando que las células ARPE-19 se pueden hacer crecer 2D sobre membrana de CNF, y que la membrana de CNF es útil como matriz de crecimiento celular 2D.

Las células ARPE-19 proliferaron bien en hidrogeles, independientemente de la concentración celular usada. No hay diferencia significativa entre los hidrogeles. La proliferación celular aumentó ~2 veces cuando se cultivaron sobre hidrogel, en comparación con células cultivadas en ausencia de hidrogel.

Ejemplo 6

Morfología de agrupamientos de células HepG2 cultivados 3D

Microscopía por láser confocal

Se usó microscopía confocal por láser para la visualización de imágenes de células vivas. La forma esferoidea de las células HepG2 encapsuladas en el hidrogel de CNF sugiere claramente que las células están atrapadas en el hidrogel y crecen en tres dimensiones (Figura 6). Las imágenes tomadas de células después de 5 días de cultivo se presentan en las Figuras 6, que muestran que las células son viables en los esferoides 3D en ambos hidrogeles. La viabilidad de las células fue independiente de la concentración de células en hidrogeles, y el tamaño de los esferoides aumentó como una función del tiempo en todos los cultivos (Figura 6).

El medio se renovó después de cada 48 h, y el tamaño de los esferoides aumentó como una función del tiempo en el cultivo. Cuando se añadió fibronectina al hidrogel de CNF, la viabilidad de células en el esferoide 3D aumentó. Las imágenes de microscopía confocal con tinción de vivas/muertas revelaron que las células permanecieron viables durante el período de cultivo de 5 días. Estos hallazgos están en relación con los resultados del ensayo de proliferación celular de Alamarblue (Figura 2). Esta observación apoya nuestra hipótesis de que el hidrogel de CNF imita los componentes de la ECM humana. Tiene todas las composiciones claves de la ECM excepto fibronectina. Por lo tanto, la adición de fibronectina mejora la viabilidad celular en agrupamientos 3D. La fibronectina facilitó la adhesión y viabilidad de células HepG2. Se ha mostrado previamente que la fibronectina incrementa la supervivencia de hepatocitos y disminuye la apoptosis vía la unión a integrina $\beta 1$.

De este modo, es posible mostrar la estructura 3D de las células HepG2 obtenida sin ningún otro material de soporte o componentes de la ECM distinto de hidrogel de CNF solamente. Esto demuestra la utilidad y facilidad de uso del hidrogel de CNF como matriz de cultivo celular 3D.

Ejemplo 7

Resistencia del gel

Una función importante de un medio de cultivo celular 3D es mantener las células suspendidas homogéneamente en la matriz y evitar la sedimentación. CNF satisface esta demanda por su capacidad para formar una red de gel a concentración muy baja (0,5%). La estructura semejante a gel de CNF se mostró determinando sus propiedades viscoelásticas mediante medidas reológicas oscilatorias dinámicas. Los resultados de los barridos de frecuencia muestran un comportamiento típico semejante a gel. El módulo de almacenamiento (G') es varios órdenes de magnitud mayor que el módulo de pérdida (G'') y casi independiente de la frecuencia, lo que significa que las propiedades elásticas (semejantes a un sólido) son más pronunciadas que las características viscosas (semejantes a un líquido) (Figura 7). Típico para geles es también que tanto G' como G'' son relativamente independientes de

la frecuencia. Las propiedades viscoelásticas de los geles de CNF se determinaron con una medida de barrido de frecuencia oscilatoria en un reómetro (AR-G2, TA Instruments) a una deformación de 0,1%.

Ejemplo 8

Propiedades de flujo de hidrogel de CNF

Las propiedades de flujo reológicas de hidrogeles de CNF muestran varios rasgos que son beneficiosos en el uso de cultivo celular. Los hidrogeles tienen una viscosidad elevada a bajo cizallamiento (o reposo) para la capacidad de suspensión óptima de las células, pero también muestran un comportamiento pseudoplástico a mayores velocidades de cizallamiento, para permitir una dispensación e inyección fáciles. La capacidad de CNF para proporcionar estos tipos de propiedades reológicas se demostró en una serie de ensayos en los que la viscosidad de dispersiones de CNF se midió a lo largo de un amplio intervalo de esfuerzo (velocidad) de cizallamiento en un reómetro rotacional (AR-G2, TA Instruments, UK).

Las dispersiones de CNF muestran viscosidades a cizallamiento cero (la región de viscosidad constante a esfuerzos de cizallamiento pequeños) mucho mayores que otros polímeros solubles en agua, como se muestra en la Figura 8. La viscosidad a cizallamiento cero de CNF está enormemente incrementada por el diámetro de nanofibrillas más pequeño inducido por el pretratamiento químico precedente del material de partida. El esfuerzo al que comienza el comportamiento pseudoplástico ("límite elástico") es también considerablemente elevado para las dispersiones de CNF. La capacidad de suspensión de un material es la mejor cuanto mayor sea el límite elástico. Las células se estabilizan eficazmente frente a la sedimentación por los efectos combinados de una viscosidad elevada a cizallamiento cero y un límite elástico elevado y un módulo de almacenamiento elevado. La fuerza gravitacional aplicada por las células es mucho más débil que el límite elástico. De este modo, las células suspendidas están "congeladas" en el interior de la matriz del gel si se mezclan con CNF, o "congeladas" sobre el gel si se depositan encima del gel.

En la Figura 9, la viscosidad se presenta como una función de la velocidad de cizallamiento medida. A partir de esta Figura 9, es obvio que la viscosidad de las dispersiones de CNF cae a velocidades de cizallamiento relativamente pequeñas y alcanza un nivel similar a aquel medido para los materiales de referencia a velocidades de cizallamiento de alrededor de 200 s⁻¹.

La estructura de red de CNF se rompe con el cizallamiento (Figura 7). Al aplicar cierto esfuerzo, la viscosidad del sistema cae drásticamente y se produce la transición desde el comportamiento similar a un sólido a un comportamiento similar a un líquido. Este tipo de comportamiento es beneficioso ya que permite mezclar las células homogéneamente en la suspensión de CNF mediante cizallamiento mecánico moderado. Cuando líquidos bifásicos, tales como dispersiones de CNF floculadas, se cizallan (por ejemplo, en un reómetro o en un tubo), la fase dispersa tiende a moverse lejos de las fronteras del sólido, lo que conduce a la creación de una capa de menor viscosidad de líquido en las paredes del recipiente (Figura 10). Este fenómeno significa que la resistencia a fluir, es decir, la viscosidad, es menor en las fronteras que en el grueso de la dispersión (Barnes, 1995). Respectivamente, la inyección del hidrogel de CNF con una jeringuilla y una aguja o con una pipeta es fácil incluso a concentraciones elevadas (1-4%). Este fenómeno permite también la dispensación fácil de suspensiones de células con perturbación mínima de las células, es decir, la mayoría de las células están situadas en el centro de la aguja y están prácticamente en reposo (Figura 10).

Una fácil inyectabilidad de los hidrogeles de CNF es también un rasgo importante cuando se consideran formulaciones inyectables. Como se describió en el Ejemplo 6, los hidrogeles de CNF tienen perfiles de liberación que se podrían utilizar en aplicaciones de liberación sostenida y controlada de fármacos. Estos dos hallazgos para los hidrogeles de CNF permiten diversas aplicaciones potenciales de tratamiento farmacéutico, como tratamientos intraoculares, intramusculares, subcutáneos, o por ejemplo formulaciones de colirios viscoelásticas.

Ejemplo 9

Recuperación de la estructura después de que ha cesado el cizallamiento

Una propiedad reológica importante adicional de los hidrogeles de CNF es que el nivel elevado de viscosidad se retiene después de que ha cesado el cizallamiento (por ejemplo, inyección o mezclamiento). La recuperación de la estructura de una dispersión de CNF se demostró mediante una serie de ensayos en los que el material se cizalló en primer lugar en un reómetro (StressTech, Reologica Instruments Ab) a una velocidad de cizallamiento elevada y, después de detener el cizallamiento, se monitorizó la recuperación de la resistencia del gel (G') con una medida de barrido de tiempo oscilatoria. El ciclo de cizallamiento se llevó a cabo en una geometría de cilindro concéntrico a un esfuerzo constante de 40 Pa durante 61 s. La evolución de la velocidad de cizallamiento y de la viscosidad durante este ensayo se muestra en la Figura 10. El material se cizalló a una velocidad de cizallamiento relativamente elevada (100 s⁻¹) durante un período de tiempo de al menos 40 s, durante el cual la viscosidad del material cayó por debajo de 40 mPa s.

Después de detener el cizallamiento, la evolución de G' (una medida de la resistencia del gel) fue seguida de una medida oscilatoria a frecuencia constante (1 Hz) y pequeño esfuerzo (0,5 Pa). La medida se inició exactamente 10 s después de que se detuvo el cizallamiento. A partir de la Figura 11, es obvio que una red de gel se forma muy rápidamente cuando se permite que la dispersión de CNF descanse después de que se ha cizallado a velocidades de cizallamiento elevadas. Se observa recuperación sustancial de la estructura ya 10 s después del cese del cizallamiento (igual a tiempo cero en la Figura 11). Se alcanza un nivel de módulo de almacenamiento (G') constante tras mantener la dispersión de CNF en reposo durante menos de 10 min. El nivel de G' que desarrolló la dispersión de CNF ampliamente cizallada fue comparable al de una dispersión de CNF que solamente se mezcló suavemente con una varilla de vidrio antes del ensayo de recuperación de la estructura.

En la Figura 11 se presenta la evolución de la velocidad de cizallamiento y de la viscosidad cuando se cizalló una dispersión de CNF nativa al 0,7% en un reómetro en geometría de cilindro concéntrico a un esfuerzo constante de 40 Pa.

En la Figura 12 se presenta la recuperación de la estructura de una dispersión de CNF nativa al 0,7% tras el cizallamiento a una velocidad de cizallamiento elevada en comparación con después del mezclamiento suave con una varilla de vidrio.

La rápida recuperación de la estructura es importante para materiales de cultivo celular de tipo hidrogel por dos razones. En primer lugar, permite que las células se distribuyan homogéneamente en los hidrogeles de CNF después de mezclarlas con el hidrogel. En segundo lugar, si los hidrogeles de CNF se usan para transportar células cultivadas, la recuperación rápida de la estructura de gel atrapa efectivamente a las células al lugar deseado y la migración es mínima, por ejemplo cuando se considera en el trasplante de células. La recuperación rápida es esencial también en las formulaciones inyectables de liberación de fármacos.

Ejemplo 10

Estabilidad

Como se mostró en el Ejemplo 1, incluso las dispersiones muy diluidas de CNF tienen una viscosidad muy elevada a velocidades de cizallamiento bajas. La estructura de hidrogel también se recupera cuando se detiene el cizallamiento, tal como inyección. En condiciones estáticas, CNF forma una red de hidrogel con módulo elástico elevado y límite elástico excepcionalmente elevado. Debido a estas propiedades, CNF tiene un poder de suspensión muy elevado de las partículas sólidas incluso a concentración muy baja.

La capacidad de suspensión en condiciones estáticas se demostró con suspensiones de grava. Las dispersiones al 0,5% de CNF nativa y CNF transparente son capaces de estabilizar partículas de grava incluso del tamaño de 2-3 mm durante períodos de tiempo muy prolongados; véase la Figura 13. Se debería observar que el CNF transparente es capaz de estabilizar suspensiones de partículas a concentración menor que CNF nativa.

Ejemplo 11

Hidrólisis enzimática

Es conocido normalmente que ciertas enzimas, celulasas, son capaces de hidrolizar enlaces β -(1-4) en celulosa. Por ejemplo, endo-1,4- β -glucanasas (EGs) que seleccionan a cadenas de celulosa en localizaciones aleatorias lejos de los extremos de la cadena; exoglucanasas o exocelobiohidrolasas (CBHs) que degradan la celulosa dividiendo las moléculas de ambos extremos de la cadena produciendo dímeros de celobiosa; y β -glucosidasas (BGLs) que hidrolizan las unidades de celobiosa (producidas durante el ataque de EG y CBH) a glucosa. Respectivamente, las nanofibras de celulosa se pueden hidrolizar enzimáticamente a glucosa con la ayuda de celulasas (Ahola, S., Turon, X., Osterberg, M., Laine, J., Rojas, O.J., Langmuir, 2008, 24, 11592-11599).

La hidrólisis enzimática de celulosa se puede utilizar en sistemas de cultivo celular que contienen nanofibras de celulosa por diversas razones. Con la hidrólisis del hidrogel de CNF, la viscosidad del medio se reduce drásticamente y las estructuras de células cultivadas son fácilmente accesibles, por ejemplo, para la tinción. También, después de la hidrólisis, las estructuras celulares se pueden transferir o transplantar sin el material que contiene celulosa. El producto de la degradación, glucosa, generalmente no es tóxico para las células y se puede utilizar como un nutriente en el cultivo celular.

La hidrólisis enzimática de nanofibras de celulosa se puede llevar a cabo con la ayuda de diferentes celulasas en diferente entorno. En la Figura 14, se demuestra el efecto de las enzimas Celluclast comerciales sobre el poder de suspensión de los geles. Los hidrogeles de CNF tanto nativa como transparente pierden el poder de suspensión debido a la degradación enzimática de la estructura de gel. Las estirpes de células cultivadas también se pueden manipular genéticamente mediante ingeniería para producir la proteína enzimática necesaria en el sistema de cultivo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de cultivo celular o de suministro de células, caracterizada por que la composición consiste en nanofibras de celulosa derivadas de plantas, disgregadas mecánicamente, y/o sus derivados, en forma de membrana, en la que las células son células eucariotas.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el diámetro de nanofibras de celulosa o haces de nanofibras en las nanofibras de celulosa y/o sus derivados es inferior a 1 μm , preferentemente inferior a 200 nm, más preferentemente inferior a 100 nm.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que las nanofibras de celulosa y/o sus derivados comprenden derivados modificados química o físicamente de una nanofibra de celulosa o haces de nanofibras.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que las células son células vivas.
5. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para inmovilizar células o enzimas.
- 20 6. Composición o utilización según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las células son células troncales.

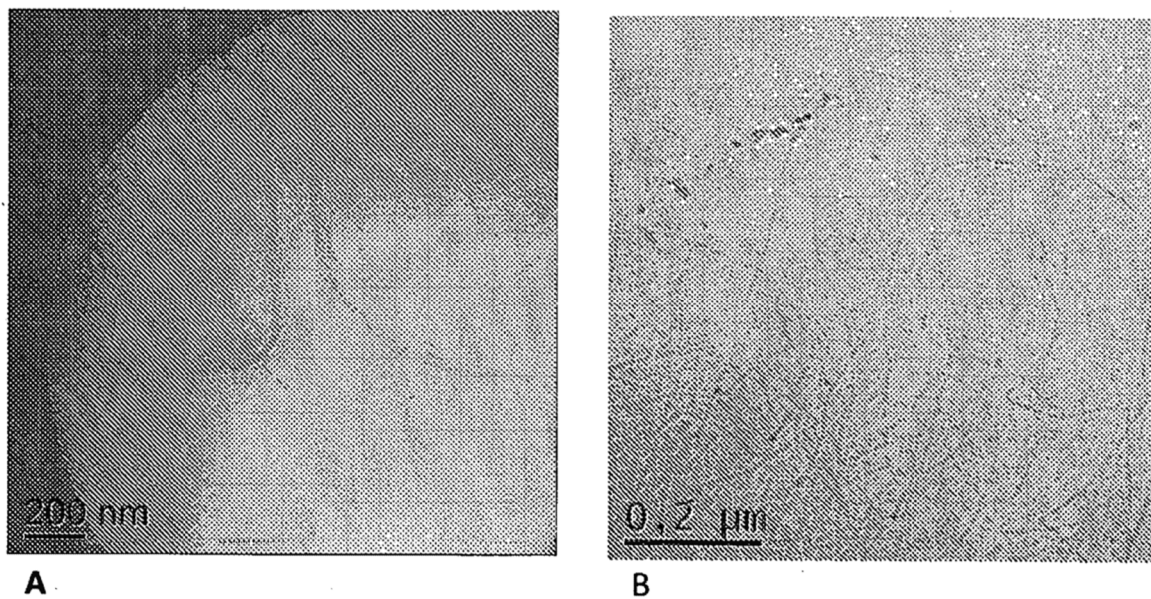


Fig. 1

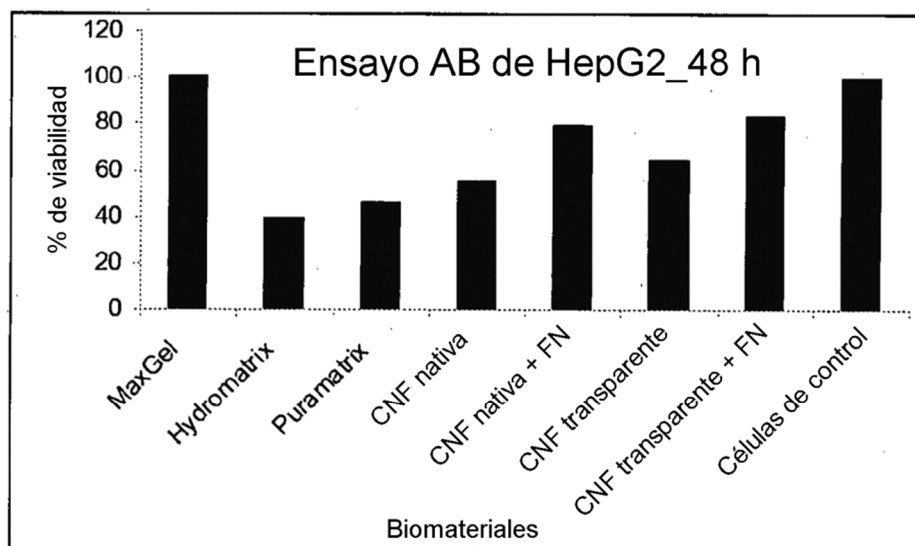


Fig. 2

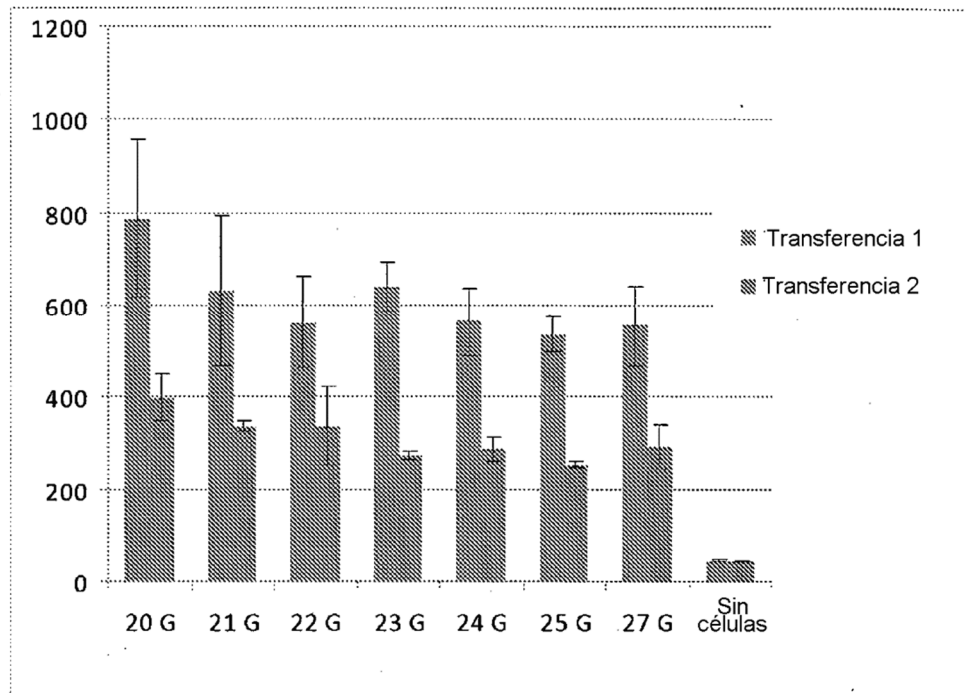


Fig. 3

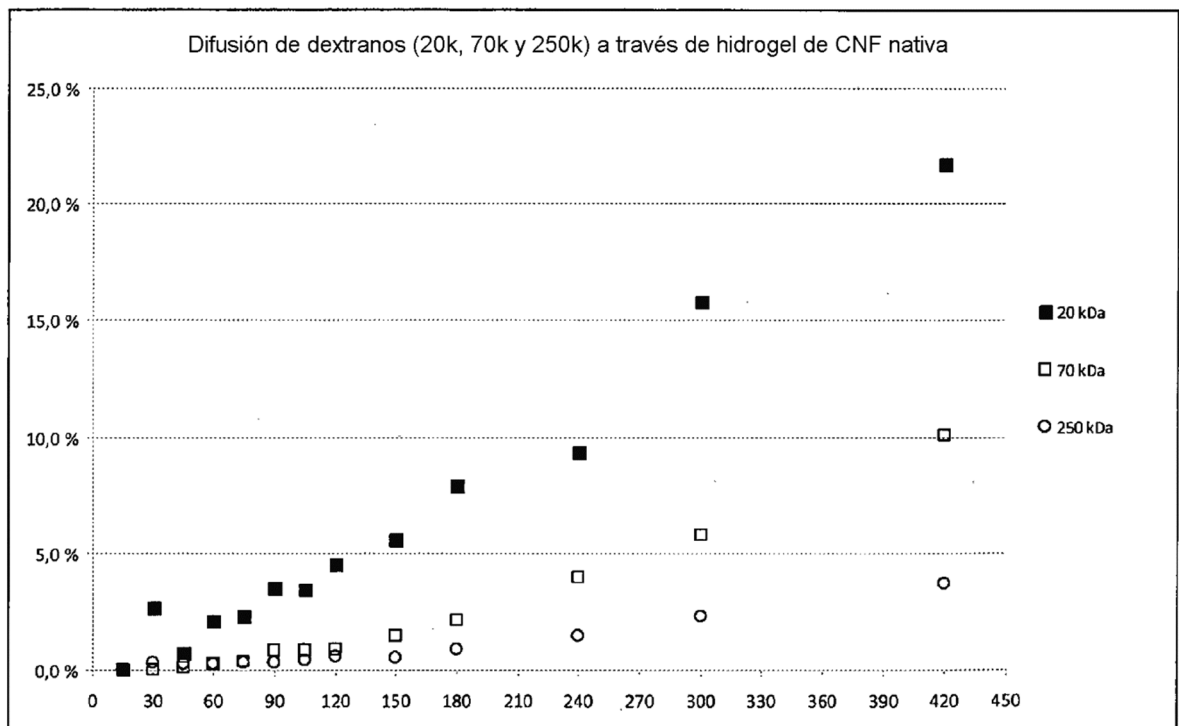


Fig. 4

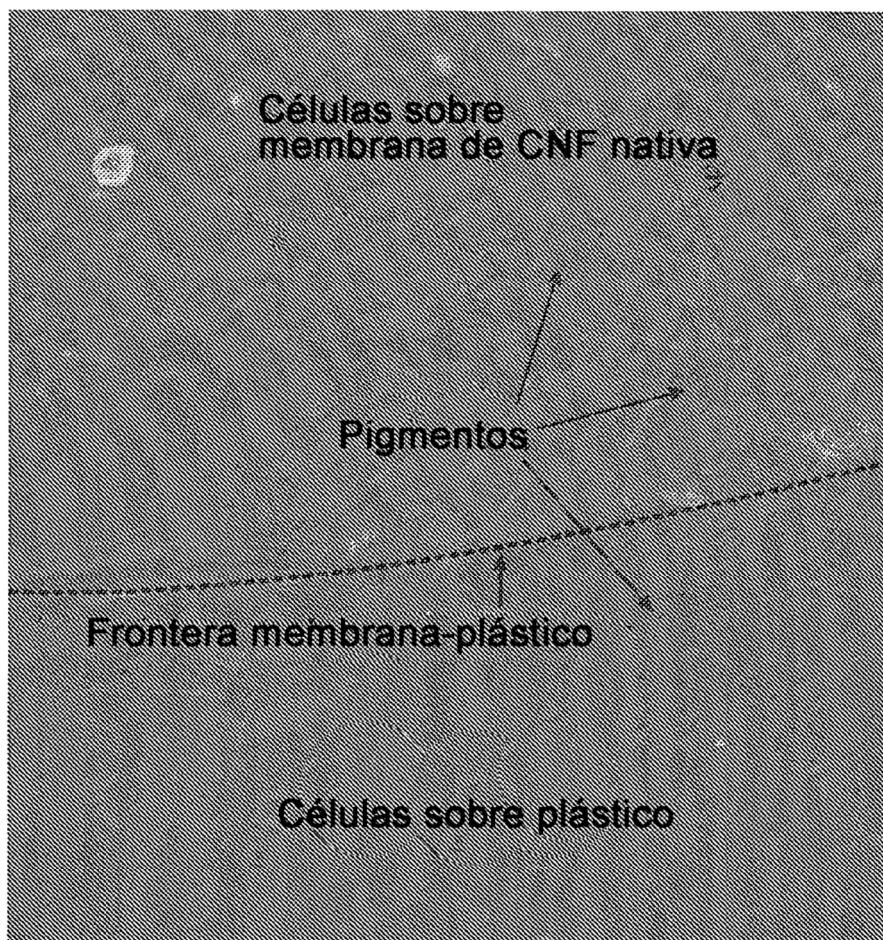


Fig. 5

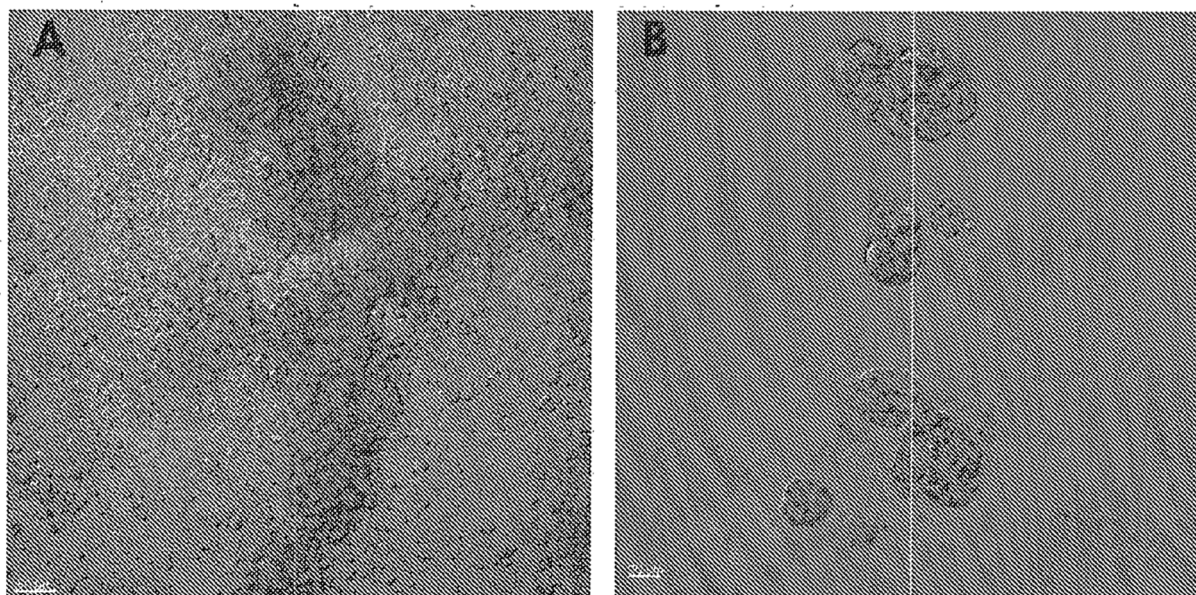


Fig. 6

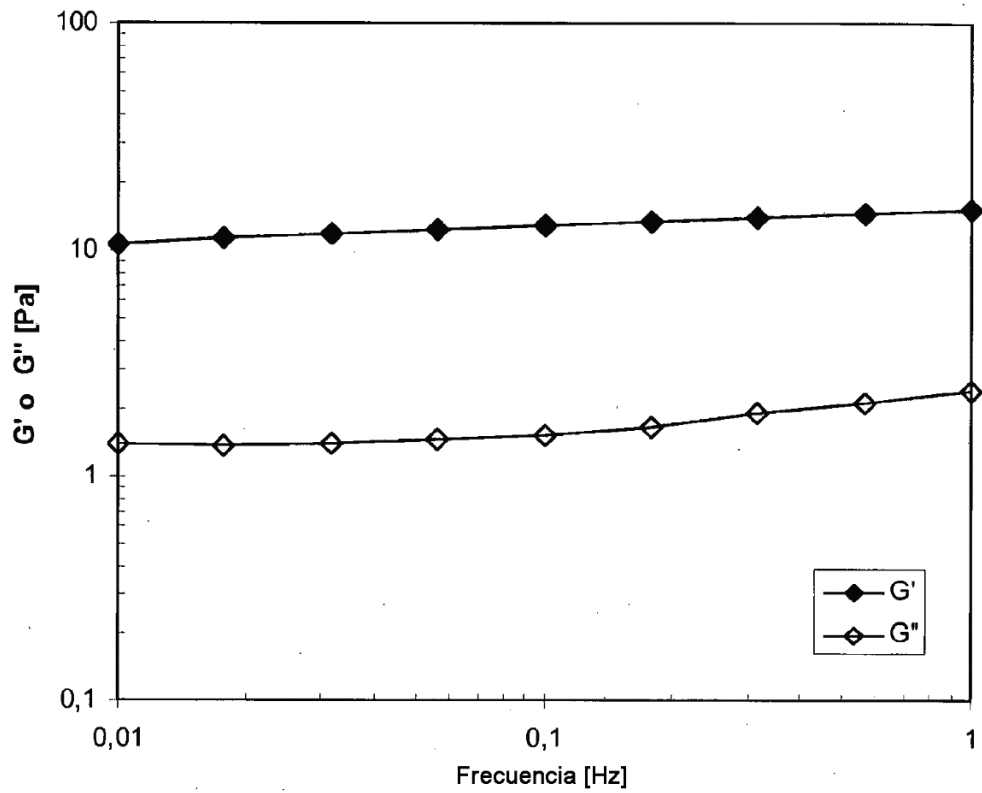


Fig. 7

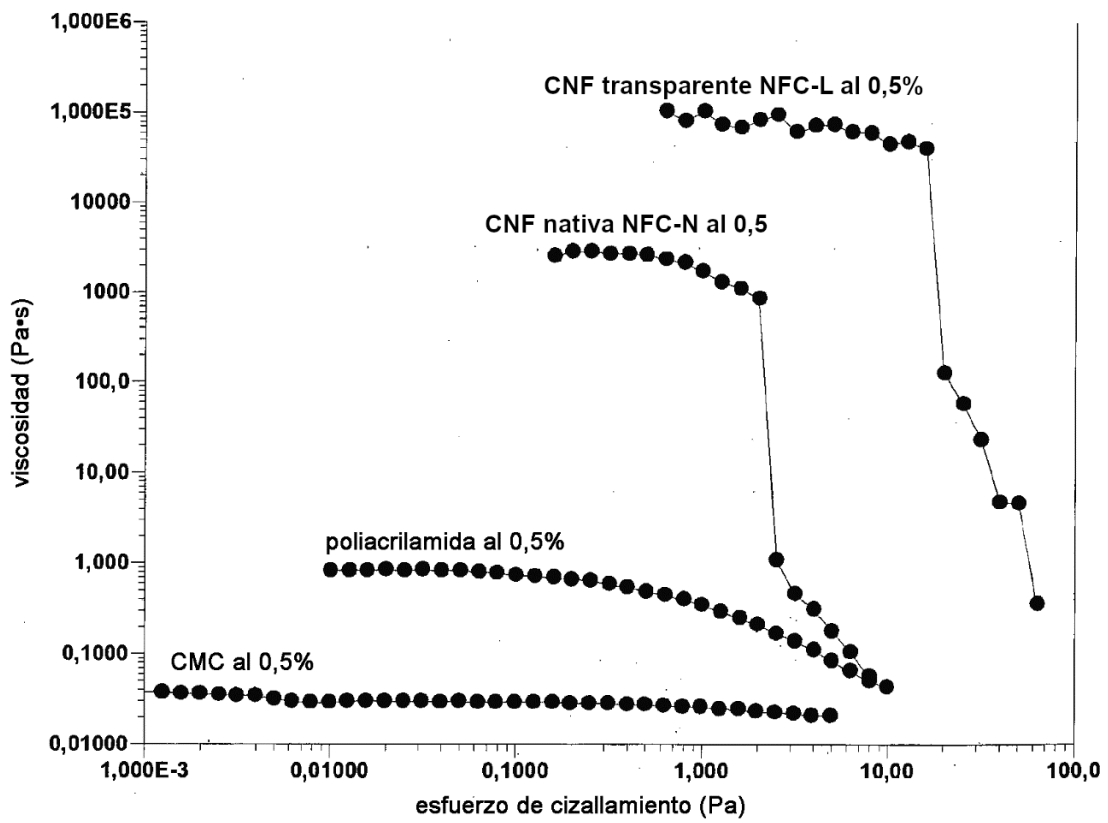


Fig. 8

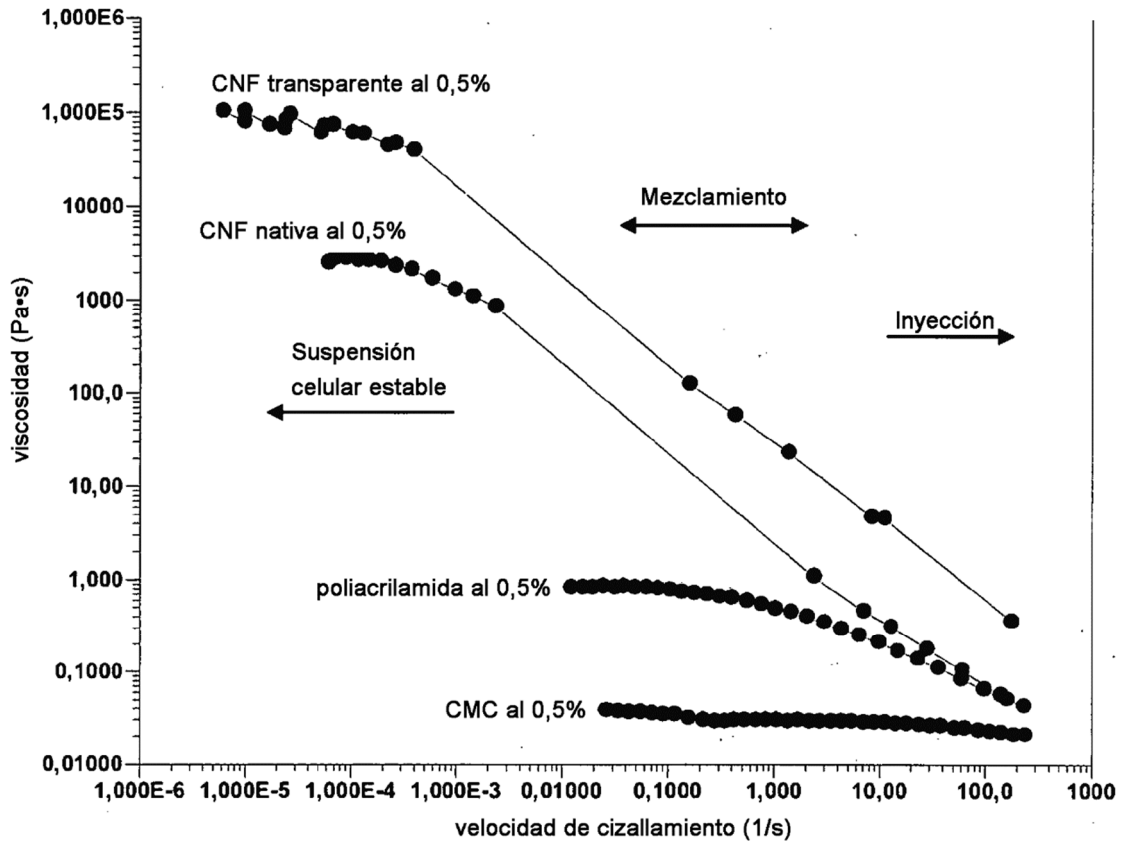


Fig. 9

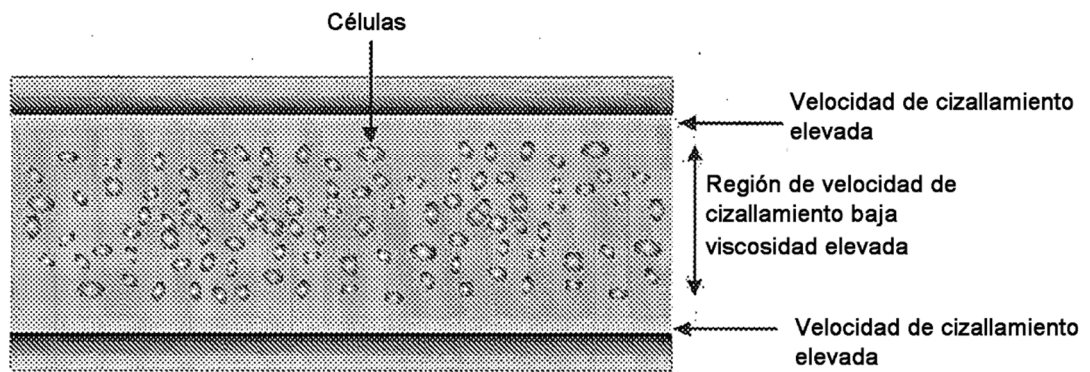


Fig. 10

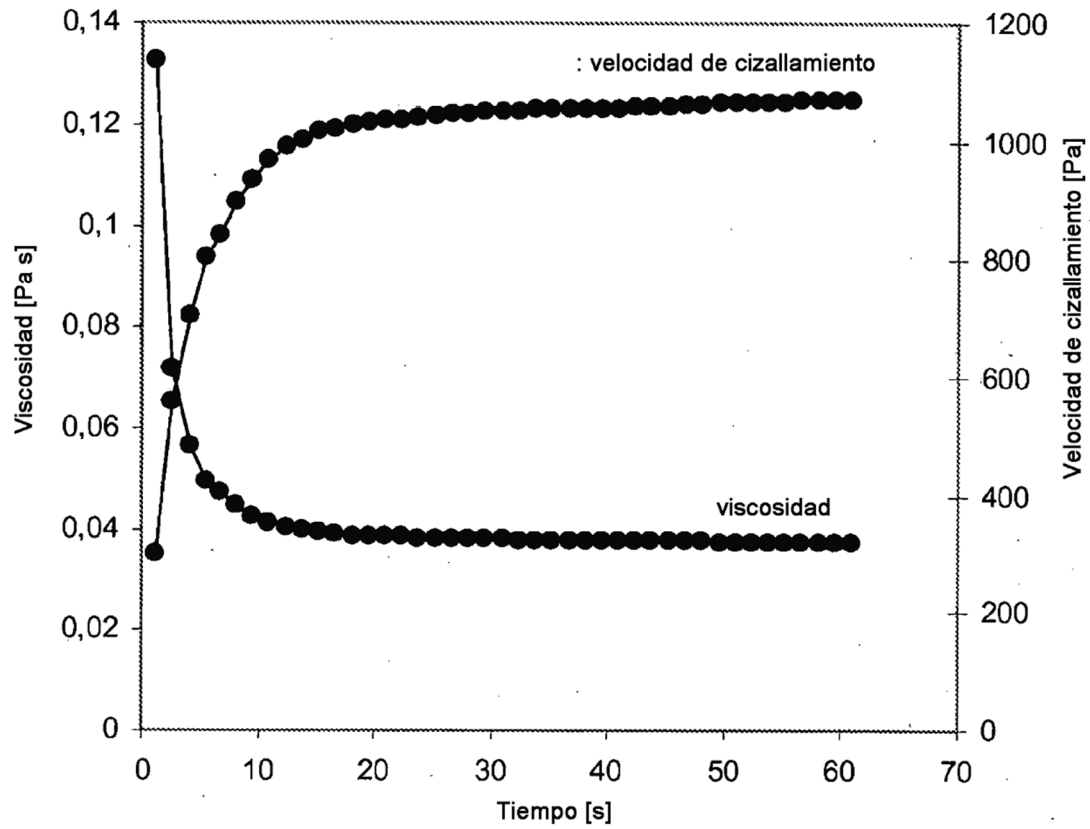


Fig. 11

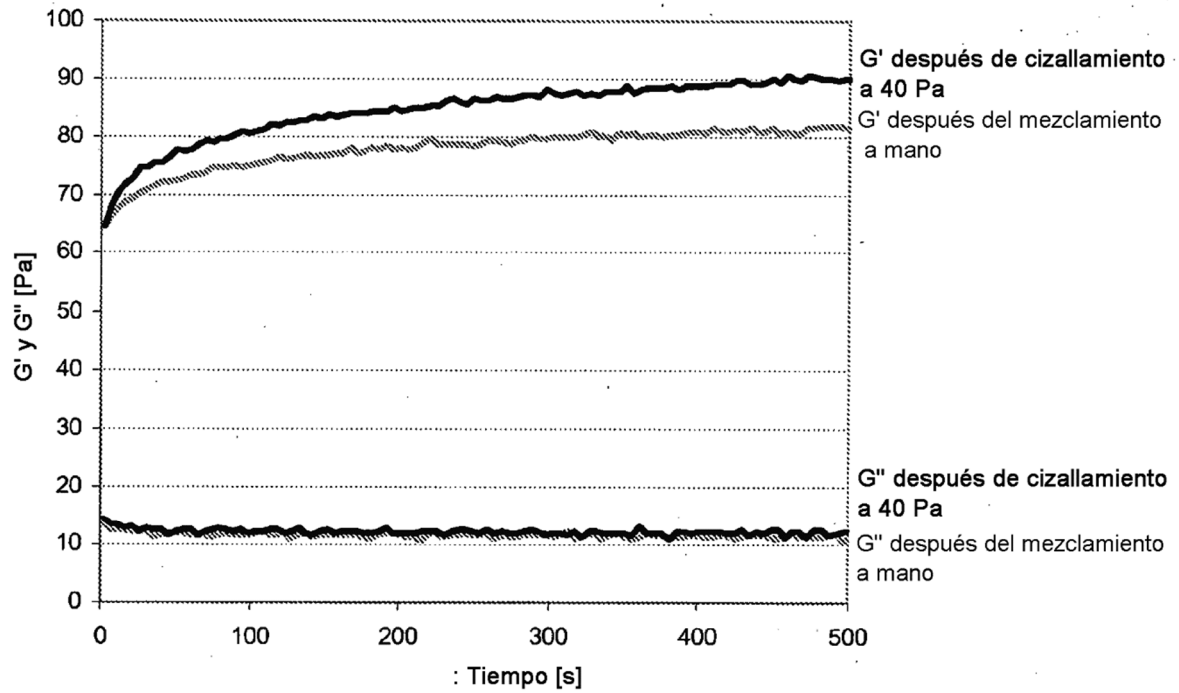


Fig. 12

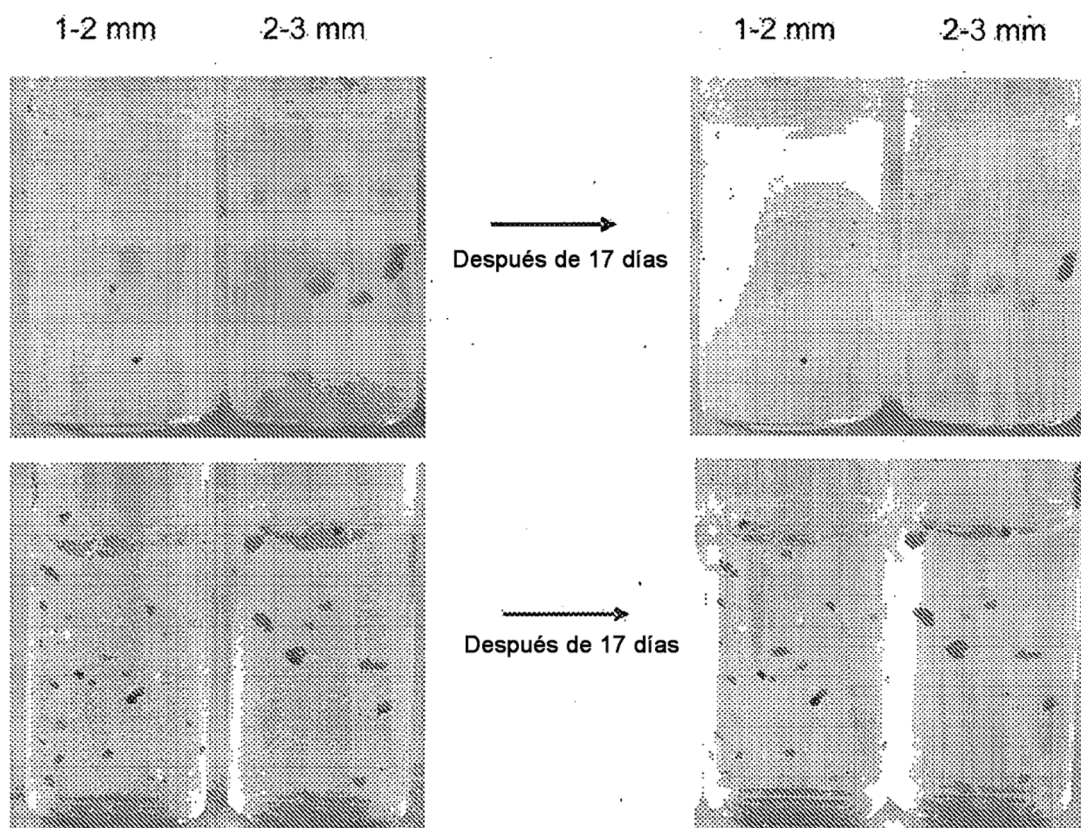


Fig. 13

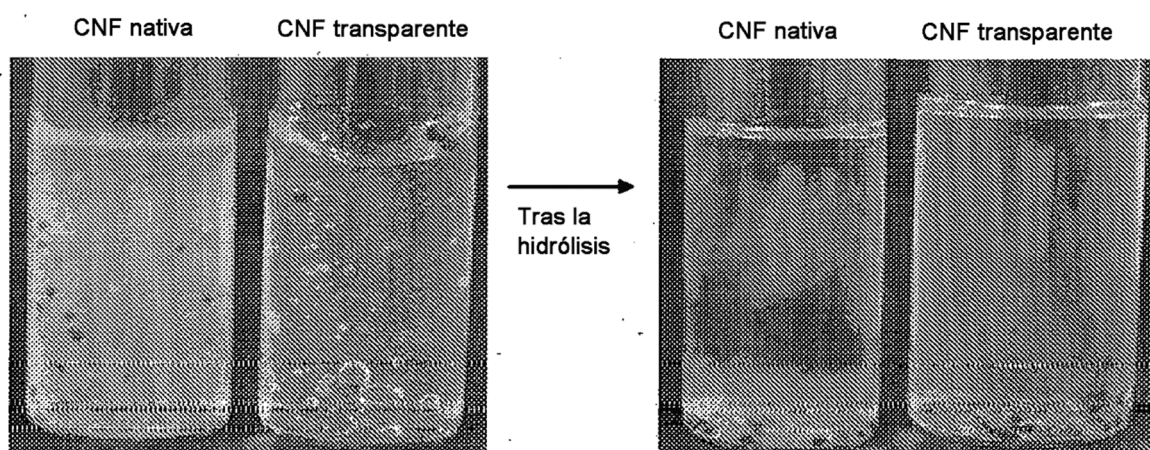


Fig. 14

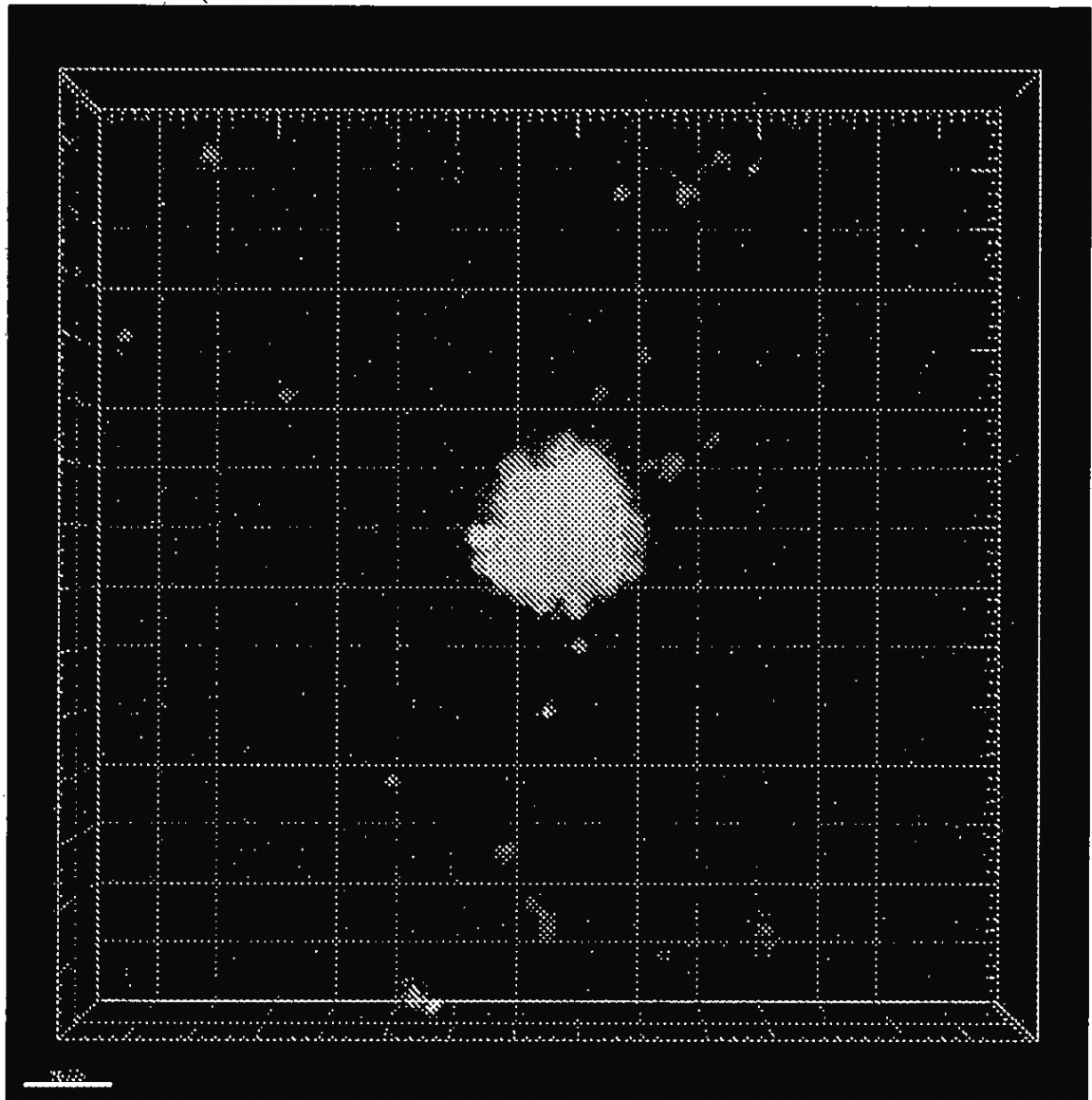


Fig. 15