

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 661**

51 Int. Cl.:

**G01N 35/00** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)  
**C12M 1/36** (2006.01)  
**C12M 1/00** (2006.01)  
**C12M 3/06** (2006.01)  
**C12M 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2009 E 16185733 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021 EP 3173787**

54 Título: **Sistema de matriz de cultivo celular para ensayos automatizados y métodos de funcionamiento y de fabricación del mismo**

30 Prioridad:

**03.01.2008 US 18882 P**  
**17.03.2008 US 37297 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.12.2021**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)**  
**400 Summit Drive**  
**Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**HUNG, PAUL J. y**  
**LEE, PHILLIP J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 882 661 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**

Sistema de matriz de cultivo celular para ensayos automatizados y métodos de funcionamiento y de fabricación del mismo

5

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional 61/037.297 presentada el 17/03/2008 y de 61/018.882 presentada el 03/01/2008.

10

La presente solicitud trata tecnología relacionada con el documento U.S. 11/994.997, presentado el 11/08/2008, que es una entrada en fase nacional de PCT/US06126364, presentada el 06/07/2006 y que reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional 60/773.467 presentada el 14 de febrero de 2006 y de la solicitud de patente provisional 60/697.449 presentada el 7 de julio de 2005.

15

La presente solicitud trata tecnología relacionada con la solicitud de EE.UU. 12/019.857, presentada el 25/01/2008, que reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 60/900.651 presentada el 8 de febrero de 2007.

20

La presente solicitud trata tecnología relacionada con la solicitud de EE.UU. Número: 11/648207, presentada el 29/12/2006, que reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 60/756.399 presentada el 4 de enero de 2006.

**Campo de la invención**

25

La divulgación en diversas realizaciones se refiere a la manipulación de micro-objetos, tales como células, o las partículas micro-fabricadas son perlas, usando un sistema microfluídico y particularmente se refiere a una configuración que puede usarse con diversos sistemas de manipulación automatizados estándar. En realizaciones particulares, la divulgación implica un sistema automatizado para cultivo celular.

30

**Antecedentes de la invención**

35

La discusión de cualquier trabajo, publicación, venta o actividad en cualquier parte de esta presentación, incluidos los documentos presentados con esta solicitud, no se tomará como una admisión de que dicha obra constituye una técnica anterior. La discusión de cualquier actividad, trabajo o publicación en el presente documento no es una admisión de que dicha actividad, trabajo o publicación existiera o fuera conocida en una jurisdicción en particular.

40

El cultivo celular microfluídico es una tecnología prometedora para aplicaciones en la industria de la selección de fármacos. Los beneficios clave incluyen función biológica mejorada, datos basados en células de mayor calidad, consumo reducido de reactivos y coste más bajo. Las preparaciones de muestras moleculares y celulares de alta calidad son importantes para diversas aplicaciones clínicas, de investigación, y otras aplicaciones. Las muestras *in vitro* que representan estrechamente sus características *in vivo* pueden beneficiar posiblemente un amplio intervalo de aplicaciones moleculares y celulares. La manipulación, caracterización, cultivo y visualización de células u otros materiales biológica o químicamente activos (tales como perlas recubiertas con diversas moléculas biológicas) se ha valorado cada vez más en los campos de descubrimiento de fármacos, diagnóstico y análisis de enfermedades, y otros varios trabajos terapéuticos y experimentales.

45

50

El cultivo de células de mamífero es particularmente exigente, particularmente para mantener agregados sólidos eficaces de células en cultivo. Se han hecho avances adaptando diversas tecnologías de microfabricación y microfluídicas al cultivo celular, aunque sigue existiendo una necesidad continua de un dispositivo que pueda fabricarse económicamente y usarse para proporcionar cultivo celular eficaz.

55

Las publicaciones y/o los documentos de patente que tratan diversas estrategias relacionadas con el cultivo celular usando sistemas microfluídicos y actividades relacionadas incluyen las siguientes solicitudes de patente de EE.UU. y no de patente. Un listado de estas referencias aquí no indica que las referencias constituyan estado de la técnica.

60

Cytoplex, Inc. 6.653.124 "Array-based microenvironment for cell culturing, cell monitoring and drug-target validation".

Cellomics, Inc. 6.548.263 "Miniaturized cell array methods and apparatus for cell-based screening".

Fluidigm, Inc. Solicitud publicada 20040229349 (18 de noviembre de 2004) "Microfluidic particle-analysis systems".

**Otras referencias I**

65

1. T. H. Park and M. L. Shuler, *Biotechnol. Prog.*, 2003,19, 243.

2. G. M. Walker, H. C. Zeringue and D. J. Beebe, *Lab Chip*, 2004, 4, 91.

3. E. Leclerc, Y. Sakai and T. Fujii, *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20, 750.
4. M. J. Powers, K. Domansky, M. R. Kaazempur-Mofrad, A. Kalezi, A. Capitano, A. Upadhyaya, P. Kurzawski, K. E. Wack, D. B. Stolz, R. Kamm and L. G. Griffith, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 78, 257.
5. K. Viravaidya and M. L. Shuler, *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20, 590.
6. Y. Kostov, P. Harms, L. Randers-Eichhorn and G. Rao, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 72, 346.
7. N. Li Jeon, H. Baskaran, S. K. Dertinger, G. M. Whitesides, L. Van der Water and M. Toner, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 826.
8. T. Thorsen, S. J. Maerkl and S. R. Quake, *Science*, 2002, 298, 580.
9. H. Andersson and A. van den Berg, *Lab Chip*, 2004, 4, 98.

#### Otras referencias II

10. Dove, A. (2003) *Nature Biotechnology* 21, 859-864.
11. Entzeroth, M. (2003) *Current Opinion in Pharmacology* 3, 522-529.
12. Boess, F.; Kamber, M.; Romer, S.; Gasser, R.; Muller, D.; Albertini, S.; Suter, L. *Toxicol Sci* 2003, 73, (2), 386-402.
13. Rodriguez-Antona, C.; Donato, M. T.; Boobis, A.; Edwards, R. J.; Watts, P. S.; Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J. *Xenobiotica* 2002, 32, (6), 505-20.
14. Cukierman, E.; Pankov, R.; Stevens, D. R.; Yamada, K. M. *Science* 2001, 294, (5547), 1708-12.
15. Griffith, L. G.; Swartz, M. A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7, (3), 211-24.
16. Revzin, A.; Rajagopalan, P.; Tilles, A. W.; Berthiaume, F.; Yarmush, M. L.; Toner, M. *Langmuir* 2004, 20, (8), 2999-3005.
17. Flaim, C. J.; Chien, S.; Bhatia, S. N. *Nat Methods* 2005, 2, (2), 119-25.
18. Anderson, D. G.; Levenberg, S.; Langer, R. *Nat Biotechnol* 2004, 22, (7), 863-6.
19. Battle, T.; Stacey, G. *Cell Biol Toxicol* 2001, 17, (4-5), 287-99.
20. LeCluyse, E. L.; Bullock, P. L.; Parkinson, A. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996, (22), 133-186.
21. Ben-Ze'ev, A.; Robinson, G. S.; Bucher, N. L.; Farmer, S. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85, (7), 2161-5.
22. Bhatia, S. N.; Balis, U. J.; Yarmush, M. L.; Toner, M. *Faseb J* 1999, 13, (14), 1883-900.
23. Berthiaume, F.; Moghe, P. V.; Toner, M.; Yarmush, M. L. *Faseb J* 1996, 10, (13), 1471-84.
24. Stevens, M. M.; George, J. H. *Science* 2005, 310, (5751), 1135-8.
25. Bissell, M. J.; Rizki, A.; Mian, I. S. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15, (6), 753-62.
26. Allen, J. W.; Bhatia, S. N. *Biotechnol Bioeng* 2003, 82, (3), 253-62.
27. Hung, P. J.; Lee, P. J.; Sabounchi, P.; Aghdam, N.; Lin, R.; Lee, L. P. *Lab Chip* 2005, 5, (1), 44-8.
28. Lee, P. J.; Hung, P. J.; Rao, V. M.; Lee, L. P. *Biotechnol Bioeng* 2005.
29. Puhl, G.; Schaser, K. D.; Vollmar, B.; Menger, M. D.; Settmacher, U. *Transplantation* 2003, 75, (6), 756-61.
30. Park, J.; Berthiaume, F.; Toner, M.; Yarmush, M. L.; Tilles, A. W. *Biotechnol Bioeng* 2005, 90, (5), 632-44.
31. Anderson, K.; Wilkinson, R.; Grant, M. H. *Int J Artif Organs* 1998, 21, (6), 360-4.
32. Landry, J.; Bernier, D.; Ouellet, C.; Goyette, R.; Marceau, N. *J Cell Biol* 1985, 101, (3), 914-23.
33. A. Ben-Ze'ev, G. S. Robinson, N. L. Bucher, S. R. Farmer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2161 (Apr, 1988).
34. J. Landry, D. Bernier, C. Ouellet, R. Goyette, N. Marceau, *J Cell Biol* 101, 914 (Sep, 1985).
35. S. A. Stoehr, H. C. Isom, *Hepatology* 38, 1125 (Nov, 2003).
36. Zhang, X, Wang, W, Yu, W, Xie, Y, Zhang, X, Zhang, Y, Ma, X. *Biotechnol Prog* 2005, 21, 1289-96.
37. Kelm, J, Timmins, N, Brown, C, Fussenegger, M, Nielsen, L. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 83(2)173-180.
38. Kuns-Schughart, L, Freyer, J, Hofstaedter, F, Ebner, R. J. *Biomolecular Screening*. 2004, 9(4) 273-285.
39. Lee, P.J.; Hung, P.J.; Lee, P.L., *Biotechnol Bioeng* (2007), 97(5), 1340

Trabajo y solicitudes de patente previas como se citan anteriormente que implican a al menos uno de los presentes inventores tratan diversas configuraciones, métodos y sistemas relacionados con el cultivo celular microfluídico.

#### Sumario

La presente invención implica diversos componentes, sistemas y métodos relacionados con sistemas de cultivo celular microfluídico relacionados. En un aspecto, la invención implica novedosos dispositivos de cultivo celular microfluídico tal como se definen en las reivindicaciones que tienen ventajas con respecto a estructuras microfluídicas previamente propuestas. En otro aspecto, la divulgación implica novedosas estructuras y métodos para integrar múltiples sistemas de cultivo celular microfluídico a una estructura de placa de pocillos de microtítulo, tal como un formato de placa de pocillos de cultivo estándar (por ejemplo, una placa de cultivo SBS de 96 pocillos). En un aspecto adicional, la divulgación implica novedosos métodos de fabricación para crear una matriz de áreas de cultivo celular microfluídico adecuado para integración con una placa de pocillos. En otro aspecto, la divulgación implica novedosos sistemas, métodos y componentes para un cultivo celular de alto rendimiento automatizado mejorado y/o sistema de selección usando cultivos celulares microfluídicos.

En realizaciones particulares, características de diseño clave incluyen la eliminación de tubos y conectores a las propias placas, la capacidad de mantener cultivo celular en perfusión continuo a largo plazo usando un flujo accionado por gravedad pasivo y el análisis directo sobre los pocillos de salida y/o pocillos de observación celular de

la placa microfluídica.

Para fines de claridad, esta discusión se refiere a dispositivos, métodos y conceptos en términos de ejemplos específicos. Sin embargo, la invención y aspectos de los mismos pueden tener aplicaciones para varios tipos de dispositivos y sistemas. Por tanto, se pretende que la invención no se limite, excepto como se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Además, es muy sabido en la técnica que los sistemas y métodos tal como se describen en el presente documento pueden incluir varios diferentes componentes y diferentes funciones en un modo modular. Diferentes realizaciones de la invención pueden incluir diferentes mezclas de elementos y funciones y pueden agrupar diversas funciones como partes de diversos elementos. Para fines de claridad, la invención se describe en términos de sistemas que incluyen muchos componentes innovadores diferentes y combinaciones innovadoras de componentes innovadores y componentes conocidos. No debe hacerse inferencia para limitar la invención a combinaciones que contienen todos los componentes innovadores enumerados en cualquier realización ilustrativa en esta memoria descriptiva.

En algunos de los dibujos y descripción detallados más adelante, la presente invención se describe en términos de la realización independiente importante de un dispositivo de cultivo celular microfluídico completo, completamente automatizado, y componentes del mismo. No debe considerarse que esto limite los diversos aspectos novedosos de la invención que, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, pueden aplicarse a varias otras situaciones. En algunos de los dibujos y descripciones más adelante, la presente invención se describe en términos de varias realizaciones de ejemplos específicos que incluyen parámetros específicos relacionados con dimensiones de estructuras, presiones o volúmenes de líquidos, temperaturas, valores eléctricos, y similares. Excepto donde se proporcione así en las reivindicaciones adjuntas, estos parámetros se proporcionan como ejemplos y no limitan la invención a otros dispositivos con diferentes dimensiones. Para fines de proporcionar una descripción más esclarecedora, se dan como ejemplos etapas de fabricación conocidas particulares, etapas de manipulación de células, reactivos, proceso químico o mecánico, y otros componentes conocidos que pueden incluirse para hacer un sistema o fabricar un dispositivo según realizaciones específicas de la invención. Se entenderá para aquellos expertos en la materia que, excepto donde se indique específicamente en el presente documento de otro modo, pueden hacerse diversas sustituciones conocidas en los procesos descritos en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista desde arriba de una matriz de ejemplo de unidades de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención. En este ejemplo, se proporcionan 32 unidades de cultivo en una placa de 96 pocillos (tal como el esquema de matriz del biorreactor microfluídico estándar de la Society for Biomolecular Screening (SBS)), con pocillos dispuestos en 12 columnas (mostradas verticalmente) por 8 filas.

En este ejemplo, cada unidad de cultivo celular ocupa tres pocillos, uno para su uso como una entrada de medio, uno para su uso como una entrada de células/salida de medio y uno para su uso para la obtención de imágenes de células (que aparece como un rectángulo oscuro en los pocillos en la figura) y/o para proporcionar pasajes de aire a un área de cultivo celular. En realizaciones específicas, cada unidad puede usarse como una celda biomimética independiente.

La FIG. 2 es una vista desde abajo que muestra una unidad de cultivo que ocupa tres pocillos según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 3 es una vista desde abajo en primer plano que ilustra detalles de las áreas de cultivo celular microfluídico descritas anteriormente según realizaciones específicas de la invención. En esta figura, la entrada de células/salida de medio está a la izquierda, y la entrada de medio está a la derecha.

La FIG. 4 es una micrografía en primer plano de un área de cultivo celular que ilustra dos grandes orificios de aire a la izquierda de la figura cada uno conectado a un pasaje de aire que está dispuesto entre los bloques, teniendo cada bloque cuatro sinusoides de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención. En esta figura, la entrada de células/salida de medio está a la derecha, y la entrada de medio está a la izquierda. También están visibles en la foto estructuras de multiplexor de medio a la izquierda en cada bloque, y un multiplexor de entrada de células opcional a la derecha en cada bloque.

La FIG. 5 es una micrografía en primer plano de un área de cultivo celular que ilustra dos grandes orificios de aire a la izquierda de la figura cada uno conectado a un pasaje de aire que está dispuesto entre los bloques, teniendo cada bloque ocho sinusoides de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 6 ilustra canales de relación de aspecto alta que rodean las áreas de cultivo celular en los que los canales entre las estructuras sólidas tienen aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de anchura y 40  $\mu\text{m}$  de alto para prevenir que las células crezcan fuera. Los canales en este ejemplo están separados aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ .

La FIG. 7A ilustra una entrada de células/salida de medio de un área de cultivo celular modificada con una gran entrada de células rectangular para proporcionar carga de células más fácil y con un área de perfusión de la carga de células y un área de cultivo celular de pared sólida. Las flechas de la derecha indican la dirección de carga de las células.

La FIG. 7B ilustra la entrada de medio/área de cultivo celular de un sistema de cultivo celular microfluídico modificado según realizaciones específicas de la invención. En este ejemplo, la carga de células es desde la derecha y el flujo de medio, como se indica por las flechas, es desde la izquierda.

La FIG. 8 es un esquema que muestra tres bloques de cuatro sinusoides de cultivo celular largos, donde los

sinusoides celulares largos se extienden a través de dos pocillos, y además muestra una región de entrada de células / región de salida de flujo rectangular, y cuatro orificios de aire que conectan con cuatro canales de aire. Las FIG. 9A-B son diagramas esquemáticos simplificados que ilustran en tres dimensiones los componentes de un dispositivo de cultivo celular microfluídico multicélula (por ejemplo, 3) que incluye una representación del marco de pocillos según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 10 es una vista lateral simplificada que muestra una estructura según realizaciones específicas de la invención que ilustra dos pocillos que se usan en flujo de células y flujo de fluidos.

La FIG. 11 es una micrografía en primer plano que muestra células cargadas en cinco regiones sinusoides de cultivo celular con cuatro canales sinusoides intermedias según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 12 muestra cuatro micrografías en primer plano que muestran células cargadas en cuatro regiones de cultivo celular sinusoides diferentes dimensionadas según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 13 es un diagrama esquemático que muestra etapas de una región de cultivo vacía para realizar un ensayo celular según realizaciones específicas de la divulgación.

Las FIG. 14A-C muestran una vista desde arriba, vista lateral y vista en planta de un esquema de un colector de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación. En este ejemplo, las ocho líneas de tubos a la derecha son para aire comprimido, y cada una está configurada para proporcionar presión a una columna de entrada de pocillos de células en una matriz microfluídica. La línea más a la izquierda en la figura es para vacío y conecta con un anillo de vacío externo alrededor del colector. Cada columna de pocillos está generalmente conectada a una única línea de presión con pocillos encima de las regiones de obtención de imágenes omitidos.

La FIG. 15 es una gráfica que ilustra un ejemplo de diferencia de caudal entre un mecanismo de tensión superficial y un mecanismo accionado por gravedad según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 16 es una gráfica que ilustra un ejemplo del grado al que la tasa de perfusión de la gravedad es sensible a la diferencia de nivel de líquido entre los dos pocillos del reservorio superior según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 17A-B ilustra una plataforma de inclinación que puede usarse para controlar la diferencia de altura de líquido entre los pocillos de entrada/salida en un dispositivo según realizaciones específicas de la invención y un ejemplo de caudal frente al ángulo de inclinación de la placa.

La FIG. 18 ilustra una vista desde arriba esquemática de un sistema de automatización de cultivo celular de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 19 es una fotografía de un sistema de matriz de perfusión microfluídico automatizado de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 20 es un diagrama de flujo que ilustra el flujo de proceso de etapas de funcionamiento típicas.

La FIG. 21 ilustra cuatro áreas de cultivo microfluídico de una placa de matriz de ejemplo preparada en el sistema de ejemplo descrito anteriormente usando hepatocitos primarios de rata.

La FIG. 22 ilustra una porción de un área de cultivo microfluídico de una placa de matriz de ejemplo preparada en el sistema de ejemplo descrito anteriormente usando hepatocitos primarios humanos.

La FIG. 23 ilustra una disposición de otro tipo de matriz de cultivo celular diseñada para la automatización general del cultivo celular según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 24 ilustra un esquema de funcionamiento para realizar cultivo celular automatizado e inmunotinción sobre una matriz microfluídica con carga de células por gravedad como se ha descrito anteriormente. Aplicaciones de ejemplo incluyen cultivo de células madre y cultivo de células primarias con tinción por inmunofluorescencia y microscopía.

La FIG. 25 ilustra un esquema de matriz de biorreactor microfluídico estándar SBS (Society for Biomolecular Screening) de ejemplo alternativo.

Las FIG. 26A-B ilustran un ensamblaje de sistema de cultivo celular alternativo según realizaciones específicas de la presente divulgación que muestran (A) un diseño microfluídico esquemático de ejemplo para tres unidades de célula; (B) una fabricación de litografía suave de este diseño con mecanizado láser de cuatro aberturas por unidad de cultivo.

La FIG. 27 ilustra etapas de funcionamiento de un sistema menos automatizado o prototipo según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 28 ilustra un molde microfluídico fijado sobre una placa de vidrio con imanes según realizaciones específicas de la divulgación. En realizaciones de ejemplo, cada imán usado es: 3/4" (1,9 cm) de diámetro x 1/16" (0,16 cm) de espesor fabricado, por ejemplo, de un neodimio-hierro-boro (NdFeB) sinterizado con un chapado/recubrimiento de Ni-Cu-Ni (níquel) y un grado: N40 con una fuerza de tracción de: 4,0 lbs (1814 g).

La FIG. 29 ilustra una pila de moldes mantenidos juntos con pinzas magnéticas (por ejemplo, pila de moldes microfluídicos auto-alineados) para formar estructuras micro-moldeadas de polímero según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 30 es un diagrama de bloques que muestra un proceso de moldeo suave directo de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación.

La FIG. 31A ilustra las dos piezas en posición antes de montar un vidrio y recubrimiento. Debido a que la pieza superior es moldeada por inyección, el fondo de los pocillos puede ser plano, redondeado o cónico. Una característica deseada particular es que el fondo de la parte superior, que cubre las estructuras microfluídicas, debe ser plano para garantizar el moldeo uniforme a través de la matriz. Esta parte superior puede ser tanto una parte superior patentada con pocillos como se muestra como, alternativamente, puede ser una placa multi-pocillo SBS estándar.

La FIG. 31B ilustra un ejemplo en el que el fondo de la placa superior está químicamente modificado por un

reactivo (Silgard Primecoat) de manera que los polímeros blandos se adhieran al fondo de la parte superior después del proceso de moldeo e ilustra una cantidad apropiada de polímero blando vertido sobre el centro del molde (normalmente algunos mililitros, dependiendo del área que vaya a cubrirse, además del espesor del polímero blando después del moldeo).

5 La FIG. 31C ilustra un ejemplo en el que la parte superior y el molde están intercalados entre dos piezas de superficies planas (normalmente placas de vidrio) con mecanismos de sujeción (en este caso imanes) y el mecanismo de sujeción mantiene la pieza superior y el molde juntos con marcas de alineamiento ajustadas entre sí.

10 La FIG. 31D ilustra un ejemplo en el que después de desprender la matriz de cultivo celular microfluídico moldeada con la pieza superior, se usa un cortador láser para crear conexiones fluidicas entre las estructuras microfluídicas y los pocillos en localizaciones específicas (entradas/salidas de células/reactivos).

La FIG. 31E ilustra un ejemplo en el que la matriz de cultivo celular microfluídico está unida a una pieza de vidrio rectangular. El vidrio y/o la matriz pueden someterse a tratamiento por plasma de oxígeno antes de la unión.

15 La FIG. 31F ilustra un ejemplo en el que usando un dispensador de líquido, la matriz de cultivo celular microfluídico se llena con soluciones de imprimación para mantener su química superficial modificada. Si parece que burbujas están atrapadas dentro de la matriz, se usan etapas de vacío adicionales para eliminar las burbujas.

La FIG. 31G ilustra un ejemplo en el que para prevenir la evaporación de líquido, la matriz se sella con una cinta.

20 La FIG. 31H ilustra un ejemplo en el que la matriz se ajusta opcionalmente en un marco de manera que la matriz acabada pueda tratarse como una placa de microtitulación estándar con las dimensiones externas correctas. En el caso en el que la parte superior sea una placa de pocillos de microtítulo estándar, esta etapa puede ser innecesaria.

Las FIG. 32A-D ilustra cuatro componentes de un proceso de moldeo suave directo según realizaciones específicas de la divulgación.

25 La FIG. 33A ilustra una etapa en la que una cantidad apropiada de polímero blando se vierte sobre el centro del molde (normalmente algunos mililitros, dependiendo del área que va a cubrirse, además del espesor del espaciador) Por ejemplo, para un molde de 6" (15,2 cm) de diámetro y un espaciador de 150 micrómetros, la cantidad mínima requerida es  $\pi \times 7,62 \text{ cm} \times 7,62 \text{ cm} \times 0,015 \text{ cm} \sim 2,75 \text{ ml}$ .

30 La FIG. 33B ilustra una etapa en la que la hoja acrílica se intercala entre dos piezas de las placas de vidrio de manera que los imanes presionen la hoja acrílica (con la superficie modificada por la imprimación orientada hacia el molde) contra el molde hasta que la hoja acrílica choque con el espaciador. El polímero blando llenará entonces el espacio entre la hoja acrílica y el molde para repetir las estructuras microfluídicas. En realizaciones particulares, el mecanismo de sujeción asistido por imán mantiene las piezas juntas mientras que el polímero blando se cura a temperatura elevada (60 °C) durante al menos 2 horas.

35 La FIG. 33C ilustra que después de enfriarse los compartimentos hasta aproximadamente temperatura ambiente, la hoja acrílica con el polímero blando se desprende del molde. La matriz de cultivo celular microfluídico se moldea fielmente sobre el polímero blando. Para proteger la superficie del polímero blando de contaminaciones de los siguientes procesos, puede aplicarse una cinta de protección de la superficie (Ultron Blue Adhesive Plastic Film 80 micrómetros) encima de la superficie del elastómero por un rodillo.

40 La FIG. 33D ilustra que después de la separación del molde se usa un cortador láser de CO<sub>2</sub> (modelo VersaLaser, 25W) para crear conexiones fluidicas entre las estructuras microfluídicas y los pocillos moldeados por inyección (entrada de células y entrada de medio). Como el polímero blando usado en el proceso es permeable al gas, pueden cortarse "orificios de aire" cerca de las áreas de cultivo celular para promover la difusión de aire para el mejor cultivo celular. La pieza superior circular puede cortarse a la forma rectangular en esta etapa.

45 La FIG. 33E ilustra que después de quitar la cinta de protección de la superficie y de opcionalmente limpiar ultrasónicamente la matriz (o se limpia con chorro de agua) para sacudir cualquier polvo creado por la etapa de corte láser y opcionalmente aplicar una nueva cinta de protección de la superficie, la matriz de cultivo celular microfluídico se pega a la placa moldeada por inyección con un adhesivo curable por ultra-violeta (UV) que también es bio-compatible (Loctite 3301). La placa con la matriz de cultivo celular microfluídico se cura en una cámara de UV durante 30 minutos. Después de quitar la cinta de protección superficial, tanto un sustrato de vidrio (por ejemplo, White Float Glass) como la matriz de cultivo celular microfluídico se someten a tratamiento por plasma de oxígeno para activar la superficie y el sustrato de vidrio encierra la matriz de cultivo celular microfluídico mediante enlace covalente, como se muestra en la FIG. 33F.

50 La FIG. 33G ilustra que usando un dispensador de líquido, la matriz de cultivo celular microfluídico se llena con soluciones de imprimación, ya que las burbujas pueden estar dentro de la matriz; y la matriz puede ponerse dentro de una cámara de vacío para la eliminación de burbujas y también puede ponerse dentro de una cámara de UV/ozono (Novascan) para esterilización.

55 La FIG. 33H ilustra que para prevenir la evaporación de líquido, la matriz se sella con una cinta (Excel Scientific, AlumaSeal).

60 La FIG. 34 es un diagrama de bloques que muestra un dispositivo lógico de ejemplo representativo en el que pueden incorporarse diversos aspectos de la presente divulgación.

65 La FIG. 35 (Tabla 1) ilustra un ejemplos de enfermedades, afecciones o estados que se pueden evaluar para los que los fármacos u otras terapias se pueden probar de acuerdo con realizaciones específicas de la presente invención.

## Descripción detallada de realizaciones específicas

### 1. Visión general

#### 5 **Definiciones**

Una "partícula" se refiere a células biológicas, tales como células de mamífero o bacterianas, partículas virales, o partículas liposomales u otras que pueden someterse a ensayo según la invención. Tales partículas tienen dimensiones mínimas entre aproximadamente 50-100 nm, y puede ser de hasta 20 micrómetros o más. Cuando se usa para describir un ensayo celular según la divulgación, los términos "partículas" y "células" pueden usarse indistintamente.

Un "micropocillo" se refiere a una cámara de escala micrométrica capaz de acomodar una pluralidad de partículas. Un micropocillo normalmente es de forma cilíndrica y tiene dimensiones de diámetro y profundidad en una realización preferida de entre 100 y 1500 micrómetros, y 10 y 500 micrómetros, respectivamente. Cuando se usa para referirse a un micropocillo dentro del dispositivo de cultivo celular microfluídico de la invención, el término "pocillo" y "micropocillo" se usan indistintamente.

Un "microcanal" se refiere a un canal de escala micrométrica que se usa para conectar una estación en el dispositivo de la invención, con un micropocillo, o una estación y una válvula asociadas al micropocillo. Un microcanal normalmente tiene una sección transversal rectangular, por ejemplo, cuadrada, con dimensiones laterales y de profundidad en una realización preferida de entre 10 y 500 micrómetros, y 10 y 500 micrómetros, respectivamente. Los fluidos que circulan en los microcanales pueden presentar comportamiento microfluídico. Cuando se usa para referirse a un microcanal dentro del dispositivo de cultivo celular microfluídico de la invención, el término "microcanal" y "canal" se usan indistintamente.

Un "dispositivo microfluídico" se refiere a un dispositivo que tiene diversas estaciones o pocillos conectados por microcanales de escala micrométrica en los que los fluidos presentarán comportamiento microfluídico en su flujo a través de los canales.

Una "matriz de micropocillos" se refiere a una matriz de dos o más micropocillos formados sobre un sustrato.

Un "dispositivo" es un término ampliamente usado en la materia y engloba un amplio intervalo de significados. Por ejemplo, a su nivel más básico y menos elaborado, "dispositivo" puede significar simplemente un sustrato con características tales como canales, cámaras y puertos. A niveles de elaboración cada vez mayores, el "dispositivo" puede comprender además un sustrato que encierra dichas características, u otras capas que tienen características microfluídicas que funcionan en sintonía o independientemente. A su nivel más elaborado, el "dispositivo" puede comprender un sustrato completamente funcional emparejado con un objeto que facilita la interacción entre el mundo externo y las características microfluídicas del sustrato. Un objeto tal puede llamarse de diversas maneras un reservorio, recinto, carcasa, o término similar, como se trata más adelante. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo" se refiere a cualquiera de estas realizaciones o niveles de elaboración que el contexto puede indicar.

Sistemas microfluídicos proporcionan una poderosa herramienta para realizar experimentos biológicos. Recientemente, microfluídicos basados en elastómeros han ganado especialmente popularidad debido a su transparencia óptica, permeabilidad a los gases y métodos de fabricación simples. Sin embargo, la interfaz con los usuarios finales requiere una laboriosa perforación de orificios a través del elastómero, y etapas adicionales de conexión de tubos y bomba de jeringa.

La presente divulgación implica microfluídicos basados en elastómeros integrados en placas de pocillos estándar, con especial atención a aplicaciones de cultivo de hepatocitos. La divulgación implica además métodos de fabricación de tales placas y componentes y un sistema para automatizar el cultivo celular usando tales placas. Ventajas de realizaciones específicas incluyen el uso de un formato de placa de microtitulación estándar, cultivo celular libre de tubos y un microentorno de hígado biomimético.

Un sistema según realizaciones específicas de la divulgación (por ejemplo, usando placas estándar de 96 pocillos) puede funcionar usando técnicas y equipos convencionales para manipular placas de microtitulación estándar, como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, la dispensación de líquido se logra con mecánica de pipeta estándar, y el cultivo y análisis celular pueden hacerse compatibles con estufas de incubación y lectores de placas existentes.

Según realizaciones adicionales de la divulgación, un sistema de carga de células novedoso usa un colector neumático y presión neumática para poner las células en el área de microcultivo. Con la adición de este sistema de carga de células, el cultivo celular microfluídico y el análisis pueden automatizarse completamente usando otro equipo automatizado que existe para manipular placas de título estándar.

En realizaciones adicionales, la configuración de cultivo de flujo accionado por gravedad utiliza la diferencia de nivel

de medio entre el pocillo de entrada y de salida, además de manipular las resistencias fluídicas para lograr el caudal deseable en el régimen de nl/min. Esto proporciona la ventaja significativa de ser capaz de hacer circular "pasivamente" el medio de cultivo durante largos periodos de tiempo (hasta 4 días) sin el uso de bombas o tubos externos voluminosos.

5 En realizaciones adicionales, la divulgación implica un sistema microfluídico para permitir el control del entorno del cultivo celular para la microscopía de lapso de tiempo a largo plazo de células adherentes. Como continúa la tendencia hacia "biología de sistemas", será cada vez más importante estudiar el comportamiento dinámico en células vivas individuales, además de para mejorar la funcionalidad y economía de la selección de células vivas de alto rendimiento. Según realizaciones específicas de la invención, la invención proporciona una cámara de flujo microfluídico multiplexada que permite experimentación de microscopía de lapso de tiempo, entre otros ensayos. La cámara microfluídica usa una barrera endotelial artificial para separar células de canales de flujo. Al dispositivo se le da la forma de una placa de pocillos estándar, que permite que muestras de líquido y de células sean directamente pipeteadas en los reservorios de entrada apropiados usando equipo estándar. Entonces se usa un controlador de flujo neumático a medida para cargar las células en las regiones de cultivo, además de para cambiar entre diferentes soluciones de exposición. Puede usarse una interfaz de software digital para permitir que un usuario programe entradas específicas (pulsos, rampas, etc.) con el tiempo para exponer las células a funciones complejas durante la obtención de imágenes de lapso de tiempo.

20 Respuestas dinámicas en células vivas son la base de fenómenos tales como el procesamiento de señales biológicas, regulación de la expresión génica, diferenciación y división celular. En realizaciones específicas, la divulgación implica un sistema capaz de controlar el microentorno celular en un formato multiplexado compatible con los actuales métodos de cultivo celular. La respuesta de la célula puede cuantificarse usando microscopía de fluorescencia de alto aumento para derivar información cinética con resolución sub-celular. Esta capacidad tiene amplias aplicaciones en la biología de sistemas celulares donde los experimentos de respuesta dinámica de una sola célula no son actualmente prácticos.

## 2. Sistema y matriz de cultivo microfluídico

30 La solicitud citada anteriormente (documento U.S. 11/994.997) trató varias diferentes configuraciones de cultivo celular y técnicas de fabricación. Porciones del funcionamiento de las áreas de cultivo celular y materiales son útiles como antecedentes para la presente discusión. En algunos ejemplos en el presente documento, una o más áreas de microcultivo están conectadas a un canal de medio o reactivo mediante una rejilla de pasajes fluídicos (o entradas o conductos de difusión), en el que la rejilla comprende una pluralidad de pasajes de alta resistencia microfluídica de intersección. En un ejemplo tratado, los pasajes en la rejilla tienen aproximadamente 1 a 4  $\mu\text{m}$  de altura, 25 a 50  $\mu\text{m}$  de longitud y 5 a 10  $\mu\text{m}$  de anchura, permitiendo la rejilla una difusión más uniforme entre canales de medio o reactivo y el área de cultivo y permitiendo fabricación más fácil y difusión más uniforme. La anterior solicitud trató además que la relación de resistencia fluídica alta entre la microcámara y los pasajes de perfusión/difusión o rejilla (por ejemplo, relaciones en el intervalo de aproximadamente 10:1, 20:1 a 30:1) ofrece muchas ventajas para el cultivo celular tales como: (1) exclusión por tamaño de células; (2) localización de células dentro de una microcámara; (3) promoción de un entorno fluídico uniforme para el crecimiento celular; (4) capacidad para configurar matrices de microcámaras o áreas de cultivo; (4) facilidad de fabricación, y (5) manipulación de reactivos sin una amplia red de válvulas. Se ilustraron ejemplos en los que una barrera de perfusión tipo rejilla puede ser mucho más corta que el área de cultivo o puede estar cerca de o a la misma altura, según realizaciones específicas de la invención, y adicionalmente en los que se ilustraron diversas configuraciones para los dispositivos de cultivo. La solicitud también trató un dibujo de CAD de un biorreactor microfluídico de 96 unidades propuesto en el que cada pocillo era un tamaño estándar SBS (3,5 mm de diámetro) con el fin de ser compatible con los sistemas de manipulación de líquidos robóticos y lectores de placas existentes. La solicitud también trató varias configuraciones diferentes para un senoide artificial, usando tanto pasajes cortados como rejillas y con un diseño de perfusión alrededor del flujo.

La FIG. 1 es una vista desde arriba de una matriz de ejemplo de unidades de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención. En este ejemplo, se proporcionan 32 unidades de cultivo en una placa de 96 pocillos (tal como el esquema de matriz del biorreactor microfluídico estándar de la Society for Biomolecular Screening (SBS)), con pocillos dispuestos en 12 columnas (mostradas verticalmente) por 8 filas. En este ejemplo, cada unidad de cultivo celular ocupa tres pocillos, uno para su uso como una entrada fluídica de medio, uno para su uso como una entrada fluídica de células/salida de medio y uno para su uso para la obtención de imágenes de células (que aparece como un rectángulo oscuro en los pocillos en la figura) y/o para proporcionar pasajes de aire a un área de cultivo celular. En realizaciones específicas, cada unidad puede usarse como una celda biomimética independiente.

La FIG. 2 es una vista desde abajo que muestra una unidad de cultivo que ocupa tres pocillos según realizaciones específicas de la invención. En este ejemplo, la porción de cultivo celular visible en el pocillo central se divide en cuatro bloques, teniendo cada bloque cuatro canales de cultivo celular separados rodeados por canales de medio usados para el pasaje fluídico de medio. En realizaciones particulares, estos cuatro canales de cultivo celular separados pueden denominarse sinusoides o sinusoides artificiales, independientemente de si el extremo lejano de las áreas tiene una forma redondeada. La separación en cuatro bloques facilita la difusión de aire a través del



material que define la estructura de canales microfluídicos (tal como el elastómero de silicona polidimetilsiloxano (PDMS)) en las áreas de cultivo. Se muestran seis orificios de aire para facilitar el pasaje de aire.

5 La FIG. 3 es una vista desde abajo en primer plano que ilustra detalles de las áreas de cultivo celular microfluídico descritas anteriormente según realizaciones específicas de la invención.

10 La FIG. 4 es una micrografía en primer plano de un área de cultivo celular que ilustra dos grandes orificios de aire a la izquierda de la figura cada uno conectado a un pasaje de aire que está dispuesto entre los bloques, teniendo cada bloque cuatro sinusoides de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 5 es una micrografía en primer plano de un área de cultivo celular que ilustra dos grandes orificios de aire a la izquierda de la figura cada uno conectado a un pasaje de aire que está dispuesto entre los bloques, teniendo cada bloque ocho sinusoides de cultivo celular según realizaciones específicas de la invención.

15 La FIG. 6 ilustra canales de relación de aspecto alta que rodean las áreas de cultivo celular en los que los canales entre las estructuras sólidas tienen aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de anchura y 40  $\mu\text{m}$  de alto para prevenir que las células crezcan fuera. Los canales en este ejemplo están separados aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ .

20 La FIG. 7A ilustra una entrada fluídica de células/salida de medio de un área de cultivo celular modificada con una gran entrada de células rectangular para proporcionar carga de células más fácil y con un área de perfusión de la carga de células y un área de cultivo celular de pared sólida.

25 La FIG. 7B ilustra la entrada de medio/área de cultivo celular de un dispositivo de cultivo celular microfluídico modificado según realizaciones específicas de la invención. En este ejemplo, la carga de células es desde la derecha y el flujo de medio, como se indica por las flechas, es desde la izquierda. Otra diferencia en el diseño modificado es que los pasajes de perfusión están ausentes en una porción del canal de cultivo celular microfluídico (o senoide artificial). Esto se ha encontrado para localizar más fácilmente células en el extremo del canal de cultivo celular microfluídico en el área de cultivo celular. Opcionalmente, una porción del canal de cultivo celular microfluídico cerca de la salida de fluido tiene pasajes de perfusión para garantizar el flujo de fluidos después de que las células se hayan agregado en el extremo del cultivo. El diseño mejorado proporciona carga de células más fácil y un área de cultivo celular más larga y canales de cultivo celular para cultivar más células y flujo más uniforme de nutrientes. Se ha descubierto que durante el funcionamiento, las células están situadas/se pegan a las áreas del canal de cultivo que están inmediatamente a continuación de los pasajes de perfusión. El segmento del canal de cultivo celular microfluídico entre la principal región del área de cultivo y el otro conjunto de pasajes de perfusión 35 cerca de la entrada de células carece de células, debido a que el perfil de flujo las saca, particularmente durante la carga de células. Así, este diseño modificado previene que las células se extiendan en los canales de "flujo" después de algunos días y detengan el flujo. En el diseño modificado, el flujo sigue sin obstáculos ya que las células no pueden extenderse pasado el segmento de canal de cultivo celular largo (donde no hay pasajes de perfusión). En un sistema de ejemplo, hasta aproximadamente 2.500 células de hígado pueden cultivarse en cada área como se muestra en la FIG. 7 y la FIG. 8.

40 La FIG. 8 es un esquema que muestra tres bloques de cuatro sinusoides de cultivo celular largos, donde los sinusoides celulares largos se extienden a través de dos pocillos, y además muestra una región de entrada de células / región de salida de flujo rectangular, y cuatro orificios de aire que conectan con cuatro canales de aire.

45 Las FIG. 9A-B son diagramas esquemáticos simplificados que ilustran en tres dimensiones los componentes de un dispositivo microfluídico multicélula (por ejemplo, 3) que incluye una representación del marco de pocillos según realizaciones específicas de la divulgación.

50 La FIG. 10 es una vista lateral simplificada que muestra una estructura según realizaciones específicas de la invención que ilustra dos pocillos que se usan en flujo de células y flujo de fluidos.

55 La FIG. 11 es una micrografía en primer plano que muestra células cargadas en cinco regiones sinusoides de cultivo celular con cuatro canales sinusoides intermedias según realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 12 muestra cuatro micrografías en primer plano que muestran células cargadas en cuatro regiones de cultivo celular sinusoides diferentes dimensionadas según realizaciones específicas de la invención.

60 Así, la presente invención según realizaciones específicas de la invención proporciona varias configuraciones microfluídicas mejoradas novedosas. En un primer aspecto, se usan tres pocillos para cada sistema de cultivo celular por lo demás independiente. En un segundo aspecto, se proporcionan sinusoides artificiales con barreras epiteliales artificiales con solo una entrada fluídica (opcionalmente compartida o multiplexada) y una salida fluídica (opcionalmente compartida o multiplexada), donde la salida de medio también funciona como entrada celular. En un tercer aspecto, sinusoides artificiales con barreras epiteliales artificiales con solo una entrada fluídica y una salida fluídica se dividen en bloques con canales de aire proporcionados entre los bloques. En un cuarto aspecto, se proporcionan orificios de aire en la cámara de pocillos encima del área de cultivo celular de una matriz de cultivo 65

- celular microfluídico, donde la salida de medio también funciona de entrada celular. En un quinto aspecto, se proporcionan una estructura de entrada de medio multiplexada y estructura de entrada celular multiplexada para conectar entradas y salidas con bloques de sinusoides artificiales. En un sexto aspecto, se proporcionan una estructura de entrada de medio multiplexada y estructura de entrada celular compartida más grande para conectar
- 5 entradas y salidas con bloques de sinusoides artificiales. En un séptimo aspecto, se configuran sinusoides artificiales con porciones no abiertas de una barrera epitelial para localizar mejor células, y con entradas de perfusión que rodean un área de cultivo celular y opcionalmente también presentes cerca de un área de entrada de células del senoide. En un octavo aspecto, se proporcionan cámaras de sinusoides artificiales más largas.
- 10 Como se trata en cualquier parte, pueden hacerse diversas modificaciones al área de cultivo de células como se ha descrito anteriormente. Son posibles diversas configuraciones para la barrera epitelial, tales como una estructura de pasaje tipo rejilla. Otras variaciones serán sugeridas para aquellos expertos en la materia que tienen las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.
- 15 Las estructuras desveladas anteriormente también pueden adaptarse a sistemas usando más o menos pocillos sobre una placa de pocillos de microtítulo estándar, tales como aquellas descritas en documentos citados y en otros ejemplos en el presente documento.

### 20 **3. Funcionamiento de dispositivo de ejemplo**

La FIG. 13 es un diagrama esquemático que muestra etapas de una región de cultivo vacía para realizar un ensayo celular según realizaciones específicas de la divulgación. Diversos aspectos novedosos según realizaciones específicas de la invención simplifican estas etapas y les permiten ser automatizados.

25

#### **Carga de células**

La carga de células en realizaciones específicas de la divulgación puede utilizar el flujo de tensión superficial rápido entre la entrada de células y la salida de flujo. En este método, el reservorio de entrada de células (superior e inferior) es aspirado de su solución de imprimación. Entonces, se aspira el reservorio superior de entrada de flujo. Se dispensa una cantidad (por ejemplo, cinco microlitros) de suspensión de células (por ejemplo, línea de células cancerosas humanas HeLa tripsinada,  $5 \times 10^5$  células/ml) en el reservorio inferior de entrada de células. Se aspira el reservorio inferior de entrada de flujo, haciendo que el líquido circule desde la entrada de células hasta la entrada de flujo mediante la tensión superficial/fuerza capilar. La carga de células en diversas configuraciones puede completarse en aproximadamente 2-5 minutos. El reservorio de carga de células se lava entonces con medio (por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco, DMEM) y se llena con, por ejemplo, 50-100 microlitros de medio limpio. En este estado, la placa se coloca en un entorno de cultivo controlado durante un periodo (por ejemplo, estufa de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 2-4 horas) para permitir la unión de células.

40 Mientras que tal carga es eficaz para algunos dispositivos de cultivo celular microfluídico, en una realización actualmente preferida, un colector neumático patentado, como se describe en cualquier parte en el presente documento, se encaja a la placa y se aplica presión neumática al área de entrada de células para carga de células más eficaz. Para sistemas de células particulares, se ha encontrado que el diseño del área de cultivo celular global puede hacerse más eficaz cuando no es necesario permitir la carga de células pasiva.

45

Las FIG. 14A-C muestran una vista desde arriba, vista lateral y vista en planta de un esquema de un colector de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación. En este ejemplo, las ocho líneas de tubos a la derecha son para aire comprimido, y cada una está configurada para proporcionar presión a una columna de entrada de pocillos de células en una matriz microfluídica. La línea más a la izquierda en la figura es para vacío y conecta con un anillo de vacío externo alrededor del colector. Cada columna de pocillos está generalmente conectada a una única línea de presión con pocillos encima de las regiones de obtención de imágenes omitidos. El colector está dispuesto encima de una placa de pocillos estándar. Una junta de goma se encuentra entre la placa y el colector, con orificios que coinciden con el colector (no mostrados). La línea de vacío crea un vacío en las cavidades entre los pocillos, manteniendo juntos la placa y el colector. Se aplica presión a los pocillos para conducir el líquido dentro de los canales microfluídicos (no mostrados). Se usa una presión típica de 1 psi, por tanto, a la intensidad del vacío es suficiente para mantener una junta estanca al aire. En un ejemplo hay 9 líneas de tubos al controlador de presión: 8 líneas son para aire comprimido y 1 línea es para vacío (más a la izquierda). En realizaciones específicas de ejemplo, cada columna está conectada a una única línea de presión. Se omiten las columnas encima de las regiones de obtención de imágenes de células.

50

Se ha encontrado que la carga de células presurizada en un sistema según realizaciones específicas de la invención es particularmente eficaz en la preparación de cultivos de células de agregación (por ejemplo, tumor sólido, hígado, músculo, etc.). La carga de células presurizada también permite que estructuras con regiones de cultivo alargadas, por ejemplo, como se muestra en las FIG. 7 y FIG. 8, sean eficazmente cargadas. Durante el uso de un colector presurizado para la carga de células y el flujo pasivo para las funciones de perfusión se permite la utilización de un diseño de dos entradas bastante simple, sin la necesidad de pocillos de entrada y/o válvulas adicionales como se

65

usa en otros diseños.

### **Flujo de fluidos y funcionamiento: Gravedad y flujo de tensión superficial**

5 El formato del diseño de la placa microfluídica permite dos modalidades de flujo fáciles para la automatización, que dependen del grado de dispensación/aspiración. El primero es el flujo mediado por tensión superficial. En este caso, cuando el reservorio inferior se aspira en uno cualquiera de los pocillos, la fuerza capilar de la interfase fluido/aire junto con las superficies humedecidas (vidrio, silicona, acrílico) extraerá rápidamente líquido del pocillo opuesto hasta que se llene el reservorio inferior (o en equilibrio con el reservorio inferior opuesto). Este efecto es útil para flujos microfluídicos ya que solo es evidente cuando el diámetro del reservorio es pequeño y los volúmenes de flujo son pequeños. En un diseño de matriz de ejemplo, los pocillos del reservorio inferior tienen 1-2 mm de diámetro, y con un volumen de flujo total de aproximadamente 3-5 microlitros. Como el volumen del canal microfluídico es solo 0,2 microlitros, este mecanismo es muy apto para la carga de células y exposiciones de célula.

15 El segundo mecanismo es la perfusión accionada por gravedad, que es muy apta para flujos a plazo más largo, ya que esto depende de la diferencia de nivel de líquido y no de las dimensiones del reservorio. Según realizaciones específicas de la divulgación, esto puede llevarse a cabo añadiendo más líquido a un reservorio (normalmente llenando cerca de la parte superior del reservorio superior). La resistencia fluidica a través de los canales microfluídicos determinará cuánto tiempo (por ejemplo, 24 horas) para alcanzar el equilibrio entre los pocillos y así determinar cómo de frecuentemente deben rellenarse los pocillos.

La FIG. 15 muestra la diferencia de caudal entre el mecanismo de tensión superficial y el mecanismo accionado por gravedad. Para el flujo de tensión superficial, en un ejemplo, se dispensaron 5 microlitros en el reservorio inferior, seguido de aspiración del reservorio inferior opuesto. Para el flujo de gravedad, se usó una diferencia de nivel de líquido de 2,5 mm, con ambos pocillos llenados en la porción de depósito superior.

### ***Cambio del caudal por gravedad mediante el nivel de líquido***

La velocidad de perfusión por gravedad también es sensible a la diferencia de nivel de líquido entre los dos pocillos del reservorio superior como se ilustra en la FIG. 16. Este hecho permite que un dispensador / aspirador automatizado controle y mantenga un caudal de perfusión dado durante un intervalo de 10 veces durante el cultivo. Aquí, se produjeron diferentes diferencias de nivel de líquido dispensando volúmenes y se midieron para caudal volumétrico.

### ***Control de la velocidad de perfusión por gravedad mediante el ángulo de inclinación de la placa***

Según realizaciones específicas de la divulgación, la diferencia de altura de líquido entre los pocillos de entrada/salida a través de la placa también puede controlarse con precisión usando una plataforma de inclinación mecánica. En esta implementación, es posible mantener un caudal constante con el tiempo, además de flujo hacia adelante y hacia atrás con diferentes tiempos directos e inversos (es decir, circulación sanguínea). En el ejemplo ilustrado en la FIG. 17, tanto los reservorios de entrada como de salida se llenaron con 50 microlitros de solución. Sobre una superficie plana, no hay flujo a través de los canales, y a medida que aumenta el ángulo, así lo hace el caudal. La foto muestra una plataforma de inclinación controlada prototipo, que consiste en una plataforma mecánica y un interruptor electrónico.

En un sistema de ejemplo, el cultivo celular de perfusión puede iniciarse llenando el reservorio de entrada de flujo con 200-300 microlitros de medio fresco (por ejemplo, DMEM complementado con 10 % de suero bovino fetal) y aspirando el reservorio superior de entrada de células. La diferencia de nivel de líquido entre los pocillos de entrada de flujo y de entrada de células producirá entonces un flujo accionado por gravedad continuo a través de las células unidas. Para el cultivo sostenido, el pocillo de entrada de flujo se rellena y el pocillo de entrada de células se aspira durante un periodo dependiendo de la resistencia fluidica y los volúmenes de reservorio (por ejemplo, cada 24 horas).

### **Ensayo celular y/u observación**

55 Puede realizarse un ensayo celular directamente sobre el cultivo celular microfluídico usando kits de reactivos ópticamente basados estándar (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, luminiscencia, etc.). Por ejemplo, se ha mostrado un ensayo de viabilidad celular que utiliza la conversión de un sustrato a una molécula fluorescente por células vivas (reactivo Cell Titer Blue por Promega Corporation). El reactivo se dispensa en el reservorio de entrada de flujo y se expone a las células mediante perfusión por gravedad durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 21 horas). Para introducción más rápida de un reactivo u otro fluido, el nuevo fluido puede añadirse al reservorio de entrada de flujo, seguido de aspiración del reservorio de entrada de células.

65 Pueden recogerse datos directamente sobre las células/líquido en la placa microfluídica, tal como poniendo la placa en un lector de placas de fluorescencia estándar (por ejemplo, modelo Synergy 2 de Biotek Instruments). En algunas reacciones, el sustrato puede difundir en el medio de salida y, por tanto, ser fácilmente detectado en el reservorio de

entrada de células. Para los ensayos de obtención de imágenes de células, la placa puede ponerse sobre un microscopio de barrido o sistema de alto contenido. Por ejemplo, puede usarse una estación de microscopio invertido Olympus IX71 automatizado para capturar la viabilidad de células de hígado cultivadas con una lente de objetivo 20X.

5 Llenando/aspirando repetidamente los pocillos, las células pueden mantenerse durante largos periodos de tiempo con esfuerzo mínimo (por ejemplo, en comparación con "biorreactores" estándar que requieren una amplia preparación estéril de grandes reservorios de fluido que no pueden ser fácilmente intercambiados durante el funcionamiento).

10 **4. Sistemas automatizados**

La FIG. 18 ilustra una vista desde arriba esquemática de un sistema de automatización de cultivo celular de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación. Debido a que las placas se diseñan para ser manipuladas usando instrumentos conformes a SBS, pueden usarse diversas máquinas "disponibles para venta" para crear un sistema automatizado. Este esquema muestra un ejemplo de cómo esto se lleva a cabo. Un brazo robótico (manipulador de placas) mueve las placas microfluídicas de estación a estación. Una estufa de incubación automatizada guarda las placas a la temperatura y entorno de gas apropiados durante la perfusión a largo plazo mediante flujo de gravedad. El pipeteador dispensa los líquidos (medios, fármacos, reactivos de ensayo, etc.) a los pocillos de entrada y saca líquido de los pocillos de salida. Se usa un lector de placas para el ensayo. El cargador de células se usa opcionalmente para introducir las células a las matrices microfluídicas al principio del experimento. El cargador de células en particular no está generalmente "disponible para venta" y funciona aplicando presión neumática a pocillos especificados de la placa de matriz para inducir el flujo. Está disponible software informático estándar o a medida para integrar funciones.

25 La FIG. 19 es una fotografía de un sistema de matriz de perfusión microfluídico automatizado de ejemplo según realizaciones específicas de la divulgación. El proceso básico incluye: 1) retirar la placa de la estufa de incubación, 2) retirar líquido de los pocillos de salida mediante el pipeteador, 3) mover una placa de almacenamiento de medios/fármaco de las "pilas de placas", 4) transferir líquido de la placa de medio/fármaco a la placa microfluídica mediante el pipeteador, 5) poner la placa microfluídica en la estufa de incubación, 6) repetir para cada placa, 7) repetir después del intervalo de tiempo especificado (por ejemplo, 24 horas).

30 La FIG. 20 es un diagrama de flujo que ilustra el flujo de proceso de etapas de funcionamiento típicas. Esta figura ilustra, como un ejemplo, etapas de proceso automatizadas e indica un dispositivo automatizado que se usa para realizar una etapa tal. Se usa un pipeteador automatizado estándar para un recubrimiento superficial opcional, para añadir células en suspensión, para añadir medios o fármacos o reactivos, y para cambiar medios. Los pipeteadores automatizados conocidos pueden administrar o extraer individualmente fluidos de pocillos especificados. En una realización específica, se usa un cargador de células patentado para presurizar los pocillos de entrada de células para la carga de células. Después de un periodo en una estufa de incubación diseñado para la unión de células óptima, el cargador de células puede usarse otra vez para lavar fluido y células no unidas de las áreas de cultivo microfluídico. Se usan uno o más dispositivos de lectura o de análisis para ensayar las células.

45 La FIG. 21 ilustra cuatro áreas de cultivo microfluídico de una placa de matriz de ejemplo preparada en el sistema de ejemplo descrito anteriormente usando hepatocitos primarios de rata. Las células se cultivaron durante 1 semana con medio cambiado a una tasa de 150 ul por unidad, dos veces al día. Las células se ensayaron al final de 7 días para viabilidad usando CellTiter Blue Kit de Promega, y se leyeron en un lector de placas de fluorescencia automatizado (Biotek Synergy). En esta figura, un área de cultivo microfluídico de ejemplo usa paredes epiteliales de flujo a través de la rejilla.

50 La FIG. 22 ilustra una porción de un área de cultivo microfluídico de una placa de matriz de ejemplo preparada en el sistema de ejemplo descrito anteriormente usando hepatocitos primarios humanos. Las células se cultivaron en la matriz microfluídica según realizaciones específicas de la divulgación, que muestran (a) contraste de fases de hepatocitos humanos recién preparados cultivados en el dispositivo microfluídico durante 13 días. (b) Viabilidad de hepatocitos humanos cultivados en el dispositivo microfluídico y en una placa de 96 pocillos medida por el ensayo CellTiter Blue (Promega, Inc.). (c) Actividad de P450 CYP3A4 de hepatocitos cultivados en el dispositivo microfluídico y placa de 96 pocillos medida mediante el ensayo P450-Glow (Promega, Inc.).

60 La FIG. 23 ilustra una disposición de otro tipo de matriz de cultivo celular diseñada para la automatización general del cultivo celular según realizaciones específicas de la invención. En este diseño, cada unidad de cultivo consiste en 4 posiciones de pocillos. El primer pocillo es para el medio de perfusión, el segundo pocillo es para la entrada de células, el tercer pocillo es para la obtención de imágenes de la cámara microfluídica, y el cuarto pocillo es la salida. Una barrera de célula / barrera de perfusión localiza células en el área de células y mejora el transporte de nutrientes durante el cultivo de perfusión continuo. La baja resistencia fluidica de la trayectoria de entrada de células a la salida permite que las células sean rápidamente cargadas mediante métodos de gravedad o tensión superficial sin un mecanismo de carga de células externo. La alta resistencia fluidica de los canales de entrada de perfusión permite la perfusión continua a largo plazo de medio mediante flujo de gravedad sin ningún mecanismo de bomba

externo.

La FIG. 24 ilustra un esquema de funcionamiento para realizar cultivo celular automatizado e inmunotinción sobre una matriz microfluídica con carga de células por gravedad como se ha descrito anteriormente. Aplicaciones de ejemplo incluyen cultivo de células madre y cultivo de células primarias con tinción por inmunofluorescencia y microscopía.

La FIG. 25 ilustra un esquema de matriz de biorreactor microfluídico estándar SBS (Society for Biomolecular Screening) de ejemplo alternativo. Se llenó una matriz de cultivo celular microfluídico de 16 unidades con colorantes coloreados de manera que los canales microfluídicos fueran visibles. En este ejemplo, cada unidad ocupa cinco pocillos, que de izquierda a derecha son entrada de medio, entrada de células, salida de células, obtención de imágenes de células y salida de medio.

Las FIG. 26A-B ilustran un ensamblaje de sistema de cultivo celular alternativo según realizaciones específicas de la presente divulgación que muestran (A) un diseño microfluídico esquemático de ejemplo para tres unidades de célula; (B) una fabricación de litografía suave de este diseño con mecanizado láser de cuatro aberturas por unidad de cultivo. Este diseño está unido a una microplaca con pocillos para recibir medio y células como se describe en el presente documento.

La FIG. 27 ilustra etapas de funcionamiento de un sistema menos automatizado o prototipo según realizaciones específicas de la divulgación. La placa de 96 pocillos estándar permite que el sistema microfluídico funcione usando técnicas y equipo convencionales. Por ejemplo, la dispensación de líquido se logra con mecánica de pipeta estándar, y el cultivo celular y análisis es compatible con estufas de incubación y lectores de placas existentes. Puede usarse un sistema de carga de células construido a medida para cargar las células usando presión del aire como se ha descrito anteriormente. La configuración de cultivo de flujo accionado por gravedad utiliza la diferencia de nivel de medio entre el pocillo de entrada y salida, además de manipular las resistencias fluidicas para lograr el caudal deseable en el régimen de nl/min. Esto proporciona la ventaja significativa de ser capaz de hacer circular "pasivamente" el medio de cultivo durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, hasta 4 días) sin el uso de bombas externas voluminosas.

## TÉCNICAS DE FABRICACIÓN

### 5. Ejemplo 1

La FIG. 30 es un diagrama de bloques que ilustra dos componentes de un proceso de moldeo suave directo de acuerdo con realizaciones específicas de la divulgación. Los dos componentes ilustrados son: (1) Una pieza superior moldeada por inyección hecha de acrílico que contiene al menos marcas de alineamiento (para ensamblarse con el molde microfluídico) y estructuras de pocillo que cumplen generalmente con los formatos de placa de microtitulación estándar (alternativamente, puede usarse una placa de pocillos estándar). (2) Un molde microfluídico fabricado usando tecnologías de semiconductor sobre una oblea de silicio de 6" (15,2 cm) que contiene las matrices de cultivo celular microfluídico hechas de epoxi o metales electrochapados, además de marcas de alineamiento de manera que las estructuras de pocillo se alineen con las estructuras microfluídicas durante el proceso de moldeo. Una pieza superior moldeada por inyección se hace de acrílico o cualquier material adecuado similar y contiene estructuras de pocillo que cumplen preferentemente con los formatos de placas de microtitulación estándar como se tratará más en el presente documento. A la derecha se muestra un molde microfluídico fabricado usando cualquier tecnología de semiconductores y/o microfabricación conocida sobre, por ejemplo, una oblea de 6" (15,2 cm) de silicio. El molde contiene una impresión de las matrices de cultivo celular microfluídico y puede incluir componentes hechos de epoxi o metales electrochapados, además de marcas de alineamiento de manera que las estructuras de pocillo se alineen con las estructuras microfluídicas durante el proceso de moldeo. Generalmente, antes del procesamiento adicional, el molde se recubre con fluoropolímero para reducir la fricción estática del polímero blando al molde.

Debido a que la parte superior que contiene las estructuras de pocillo se moldea por inyección, el fondo de los pocillos puede ser plano, redondo o cónico. Una característica deseada particular es que el fondo de la parte superior, que cubre las estructuras microfluídicas, es tan plano como para ayudar prácticamente al moldeo uniforme a través de la matriz. Según realizaciones específicas de la divulgación, el fondo de la parte superior puede modificarse química o mecánicamente o de otro modo o imprimirse por un reactivo (tal como Silgard Primecoat) o una superficie abrasiva (arenado) o láser de manera que los polímeros blandos se adhieran al fondo de la parte superior después del proceso de moldeo. Este tratamiento de la superficie se indica por la línea gruesa.

La FIG. 31B ilustra un ejemplo en el que una cantidad apropiada de polímero blando se vierte sobre el centro del molde (normalmente algunos mililitros, dependiendo del área que vaya a cubrirse, además del espesor del polímero blando después del moldeo). La parte superior y el molde se intercalan entre dos piezas de superficies planas (normalmente placas de vidrio) con mecanismos de sujeción (en este caso, imanes).

La FIG. 31C ilustra un ejemplo en el que el mecanismo de sujeción mantiene la pieza superior y el molde juntos con marcas de alineamiento ajustadas entre sí. El polímero blando se cura entonces, por ejemplo, por temperatura o luz

UV o de otro modo de manera que la matriz de cultivo celular microfluídico se moldee fielmente sobre el polímero blando. Como un ejemplo, una temperatura elevada (normalmente 60 °C) durante al menos 2 horas.

5 La FIG. 31D ilustra un ejemplo en el que después de desprender la matriz de cultivo celular microfluídico moldeada con la pieza superior, se usa un cortador láser para crear conexiones fluídicas entre las estructuras microfluídicas y los pocillos en localizaciones específicas (entradas/salidas de células/reactivos). La pieza superior circular se recorta a la forma rectangular en esta etapa (obsérvese que en esta imagen la estructura está invertida). Antes de encerrar el fondo de la matriz de cultivo celular microfluídico, la pieza moldeada se limpia ultrasónicamente para sacudir cualquier polvo creado por la etapa de corte láser. Puede recortarse una pieza superior a una forma rectangular en esta etapa. La sección transversal mostrada es a través de cada una de las conexiones fluídicas para fines de ilustración, aunque el láser solo hace orificios en el material y no corta los pocillos. En este estado, antes de encerrar el fondo de la matriz de cultivo celular microfluídico, la pieza moldeada se limpia preferentemente ultrasónicamente o de otro modo para soplar cualquier polvo creado por la etapa de corte láser.

15 La FIG. 31E ilustra un ejemplo en el que la matriz de cultivo celular microfluídico se somete a tratamiento por plasma de oxígeno y está unida a una pieza de vidrio rectangular.

20 La FIG. 31F ilustra un ejemplo en el que usando un dispensador de líquido, la matriz de cultivo celular microfluídico se llena con soluciones de imprimación para mantener su química superficial modificada. Si parece que burbujas están atrapadas dentro de la matriz, puede usarse colocación en una cámara de vacío para eliminar las burbujas.

25 La FIG. 31G ilustra un ejemplo en el que para prevenir la evaporación de líquido, la matriz se sella con una cinta. La FIG. 31H ilustra un ejemplo en el que la matriz se ajusta en un marco de manera que la matriz acabada pueda tratarse como una placa de microtitulación estándar con las dimensiones externas correctas.

## 6. Ejemplo 2

30 Las FIG. 32A-C ilustran tres componentes de un proceso de moldeo suave directo de acuerdo con realizaciones específicas de la divulgación. En la figura, (A) muestra una pieza superior moldeada por inyección que incluye estructuras de pocillo que cumplen con formatos de placa de microtitulación estándar. Como se trata anteriormente, en vez de la pieza superior moldeada por inyección mostrada, puede usarse una placa de microtitulación estándar como parte superior que incluye estructuras de pocillo que cumplen con los formatos de placa de microtitulación estándar, (B) ilustra una hoja circular acrílica de 1,5 mm de espesor (6" (15,2 cm) de diámetro), y (C) ilustra un molde microfluídico fabricado sobre una oblea de silicio de 6" (15,2 cm) que contiene unidades de cultivo celular microfluídico (en este ejemplo 8 x 4 unidades) en una matriz hecha de epoxi, silicio grabado o metales electrochapados, además de un espaciador para controlar el espesor mínimo del polímero blando después del moldeo. El molde está recubierto con fluoropolímero para reducir la fricción estática del polímero blando al molde. Como se muestra en la figura, el molde microfluídico está pegado a un vidrio de sosa-cal de 1 mm de espesor (7" x 7" (17,8 x 17,8 cm)) con cuatro imanes (por ejemplo, 15 mm de diámetro y 1,5 mm de espesor) pegados a las cuatro esquinas del vidrio. La otra pieza del vidrio de sosa-cal de 1 mm de espesor (7" x 7" (17,8 x 17,8 cm)) con imanes complementarios se prepara de modo similar (FIG. 32D) con los imanes de polaridad opuestos pegados sobre las cuatro esquinas de manera que los imanes se auto-alineen sobre los imanes en la FIG. 32C. Una cara de la hoja acrílica se modifica químicamente por un reactivo (por ejemplo, Silgard Primecoat) para inducir la fuerte adhesión entre el acrílico y el polímero blando (por ejemplo, Silgard 184) que van a usarse durante el proceso de moldeo.

45 La FIG. 33A ilustra una etapa en la que una cantidad apropiada de polímero blando se vierte sobre el centro del molde (normalmente algunos mililitros, dependiendo del área que va a cubrirse, además del espesor del espaciador) Por ejemplo, para un molde de 6" (15,2 cm) de diámetro y un espaciador de 150 micrómetros, la cantidad mínima requerida es  $\pi \times 7,62 \text{ cm} \times 7,62 \text{ cm} \times 0,015 \text{ cm} \sim 2,75 \text{ ml}$ .

50 La FIG. 33B ilustra una etapa en la que la hoja acrílica se intercala entre dos piezas de las placas de vidrio de manera que los imanes presionen la hoja acrílica (con la superficie modificada por la imprimación orientada hacia el molde) contra el molde hasta que la hoja acrílica choque con el espaciador. El polímero blando llenará entonces el espacio entre la hoja acrílica y el molde para repetir las estructuras microfluídicas. En realizaciones particulares, el mecanismo de sujeción asistido por imán mantiene las piezas juntas mientras que el polímero blando se cura a temperatura elevada (60 °C) durante al menos 2 horas.

60 Después de enfriarse los compartimentos hasta aproximadamente temperatura ambiente, la hoja acrílica con el polímero blando se desprende del molde y una matriz de cultivo celular microfluídico como se describe en el presente documento se moldea fielmente sobre el polímero blando.

65 Para proteger la superficie del polímero blando de contaminaciones de los siguientes procesos, una cinta de protección de la superficie (por ejemplo, Ultron Blue Adhesive Plastic Film 80 micrómetros) se aplica opcionalmente a la parte superior de la superficie del elastómero por un rodillo.

La FIG. 33D ilustra una etapa en la que se usa un cortador láser de CO2 (modelo VersaLaser, 25W) para crear

conexiones fluidicas entre las estructuras microfluidicas y los pocillos moldeados por inyección (entrada de células y entrada de medio). Como el polímero blando usado en el proceso es permeable al gas, se cortan "orificios de aire" cerca de las áreas de cultivo celular para promover la difusión de aire para el mejor cultivo celular. La pieza superior circular puede cortarse a la forma rectangular en esta etapa. Se quita la cinta de protección de la superficie y la matriz se limpia ultrasónicamente (o se limpia con chorro de agua) para sacudir cualquier polvo creado por la etapa de corte láser y opcionalmente se aplica una nueva cinta de protección de la superficie. En la FIG. 33E, la matriz de cultivo celular microfluidico se pega a la placa moldeada por inyección o una placa de pocillos estándar con un pegamento curable por ultravioleta (UV) que también es bio-compatibile (Loctite 3301). La placa con la matriz de cultivo celular microfluidico se cura en una cámara de UV durante 30 minutos. Después de quitar la cinta de protección superficial, tanto un sustrato de vidrio (por ejemplo, White Float Glass) como la matriz de cultivo celular microfluidico se someten a tratamiento por plasma de oxígeno para activar la superficie. El sustrato de vidrio encierra la matriz de cultivo celular microfluidico mediante enlace covalente, como se muestra en la FIG. 33F. Usando un dispensador de líquido, la matriz de cultivo celular microfluidico se llena con soluciones de imprimación como se muestra en la FIG. 33G. Debido a que pueden estar presentes burbujas dentro de la matriz; la matriz generalmente se pone dentro de una cámara de vacío para la eliminación de burbujas. La placa también puede colocarse dentro de una cámara de UV/ozono (Novascan) para la esterilización. Para prevenir la evaporación de líquido, la matriz se sella con una cinta (por ejemplo, Excel Scientific, AlumaSeal) como se muestra en la FIG. 33H.

## SISTEMAS INTEGRADOS

Sistemas integrados para la recogida y análisis de datos celulares y otros datos, además de para la compilación, almacenamiento y acceso a las bases de datos de la divulgación, normalmente incluyen un ordenador digital con software que incluye un conjunto de instrucciones para la búsqueda de secuencias y/o análisis, y, opcionalmente, uno o más de software de control de muestras de alto rendimiento, software de análisis de imágenes, software de interpretación de datos recogidos, un armazón de control robótico para transferir soluciones de una fuente a un destino (tal como un dispositivo de detección) unido funcionalmente al ordenador digital, un dispositivo de entrada (por ejemplo, un teclado de ordenador) para entrar los datos del sujeto al ordenador digital, o para controlar las funciones de análisis o transferencia de muestras de alta resolución por el armazón de control robótico. Opcionalmente, el sistema integrado comprende además válvulas, gradientes de concentración, multiplexores fluidicos y/u otras estructuras microfluidicas para conectarse con una microcámara, como se describe.

Pueden emplearse recursos de hardware computacional fácilmente disponibles que usan sistemas funcionales estándar y modificarse según las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, un PC (Intel x86 o Pentium chip-compatible DOS,™ OS2,™ WINDOWS,™ WINDOWS NT,™ WINDOWS95,™ WINDOWS98,™ LINUX, o incluso Macintosh, Sun o PCs serán suficientes) para su uso en los sistemas integrados de la divulgación. La técnica actual en la tecnología de software es adecuada para permitir la implementación de los métodos enseñados en el presente documento en un sistema de ordenador. Así, en realizaciones específicas, la divulgación comprende un conjunto de instrucciones lógicas (instrucciones codificadas tanto por software como por hardware) para realizar uno o más de los métodos que se enseñan en el presente documento. Por ejemplo, un experto puede construir el software para proporcionar los datos y/o el análisis estadístico, usando un lenguaje de programación estándar tal como Visual Basic, Fortran, Basic, Java, o similares. Tal software también puede construirse utilizando varios lenguajes de programación estadística, kit de herramientas, o bibliotecas.

La FIG. 34 muestra un aparato de información (o dispositivo digital) 700 que puede entenderse como un aparato lógico que puede leer instrucciones de medios 717 y/o puerto de red 719, que puede opcionalmente conectarse a servidor 720 que tiene medios fijos 722. El aparato 700 puede usar a partir de aquí aquellas instrucciones para el servidor directo o lógica de cliente, como se entiende en la materia, para incorporar aspectos de la divulgación. Un tipo de aparato lógico que puede incorporar la divulgación es un sistema de ordenador como se ilustra en 700, que contiene CPU 707, dispositivos de entrada opcionales 709 y 711, unidades de disco 715 y monitor opcional 705. Los medios fijos 717, o medios fijos 722 mediante puerto 719, pueden usarse para programar un sistema tal y pueden representar un medio óptico o magnético tipo disco, cinta magnética, memoria dinámica o estática en estado sólido, etc. En realizaciones específicas, la divulgación puede incorporarse en todo o en parte como software grabado en estos medios fijos. El puerto de comunicación 719 también puede usarse para recibir inicialmente instrucciones que se usan para programar un sistema tal y puede representar cualquier tipo de conexión de comunicación.

Pueden usarse diversos métodos y algoritmos de programación, que incluyen algoritmos genéticos y redes neurales, para realizar aspectos de la recogida de datos, correlación y funciones de almacenamiento, además de otras funciones deseables, como se describen en el presente documento. Además, los sistemas digitales o analógicos, tales como los sistemas de ordenador, digitales o analógicos, pueden controlar diversas otras funciones tales como la presentación y/o control de archivos de entrada y salida. El software para realizar los métodos de análisis eléctrico de la divulgación también está incluido en los sistemas de ordenador de la divulgación.

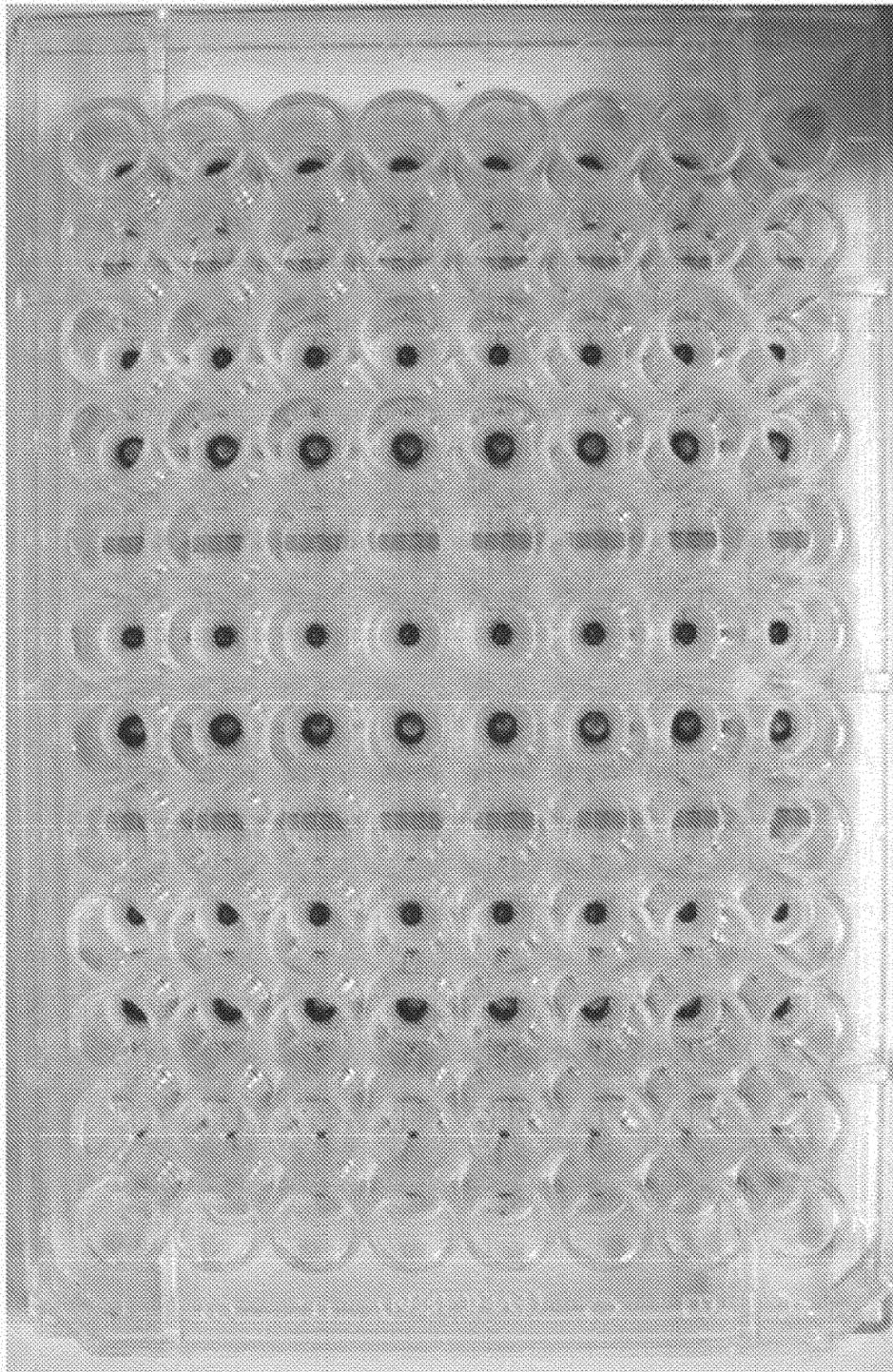
## Otras realizaciones

Aunque la presente invención se ha descrito en términos de diversas realizaciones específicas, no se pretende que la invención se limite a estas realizaciones.

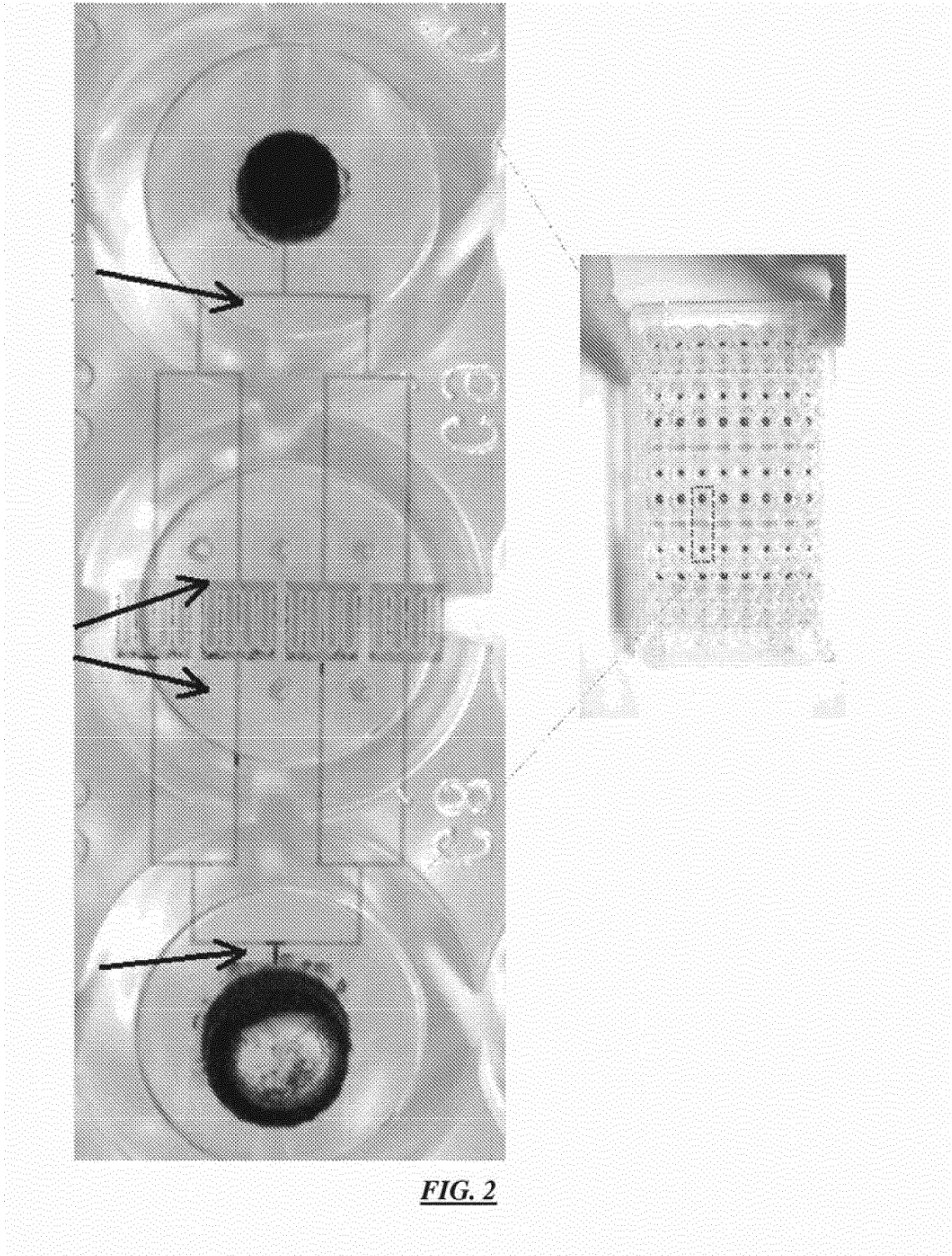
**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de cultivo celular microfluídico que comprende:
  - 5 una estructura de entrada de medio que comprende una entrada fluídica de medio y una pluralidad de canales de medio fluídico conectados fluídicamente; y
  - una estructura de entrada de cultivo celular que comprende una salida de medio fluídico y una pluralidad de canales de cultivo celular microfluídico conectados fluídicamente;
  - 10 en donde se ha formado una pared de canal sinusoide artificial que separa los canales de medio microfluídico de los canales de cultivo celular microfluídico, teniendo la pared del canal una pluralidad de pasos fluídicos estrechos que permiten el flujo fluídico entre los canales de medio microfluídico y los canales de cultivo celular microfluídico;
  - en donde la salida del medio fluídico también sirve como entrada celular fluídica.
- 15 2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además los canales de cultivo celular y los canales de medio tienen cada uno, una longitud sustancialmente mayor que su anchura.
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: la estructura de cultivo celular está fluídicamente conectada a un pocillo de reservorio de entrada de células en una placa de micropocillos para introducir células a los canales de cultivo celular.
- 20 4. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: la estructura de entrada de medio está fluídicamente conectada a un pocillo de reservorio de entrada de medio en una placa de micropocillos para introducir medio a los canales de cultivo celular.
- 25 5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde además, el dispositivo está situado en una superficie de una placa de micropocillos y en donde una pluralidad de dispositivos de cultivo independientes están configurados para usar un primer pocillo como una entrada de medio, un segundo pocillo como una salida de medio/entrada de células, y un tercer pocillo como una zona de visionado/cultivo celular.
- 30 6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además dicha placa de micropocillos convencional está configurada para acoplarse neumáticamente a un colector neumático y está configurada para recibir la presión neumática de dicho colector para dirigir las células en dichas áreas de cultivo celular.
- 35 7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: la estructura de cultivo celular está separada en al menos dos bloques, conteniendo cada bloque un sinusoide artificial que tiene una pared de canal, un canal de medio y un canal de cultivo celular; en donde cada bloque tiene un canal de aire adyacente al mismo.
- 40 8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, que además comprende un orificio de aire en comunicación con el canal de aire.
9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: el dispositivo está configurado para que las células sean introducidas en dichas áreas de cultivo celular usando presión neumática, y, después de lo cual, las células se mantienen por perfusión del medio usando un flujo fluido accionado por gravedad pasiva.
- 45 10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: una pluralidad de los pasos fluídicos estrechos son sustancialmente más estrechos que un diámetro de células que se van a cultivar.
11. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: una pluralidad de los pasos fluídicos estrechos son sustancialmente más estrechos de aproximadamente 6 micrómetros.
- 50 12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: la pared del canal del sinusoide artificial comprende 4 sinusoides.
- 55 13. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde además: la pared del canal del sinusoide artificial comprende 8 sinusoides.





**FIG. 1**



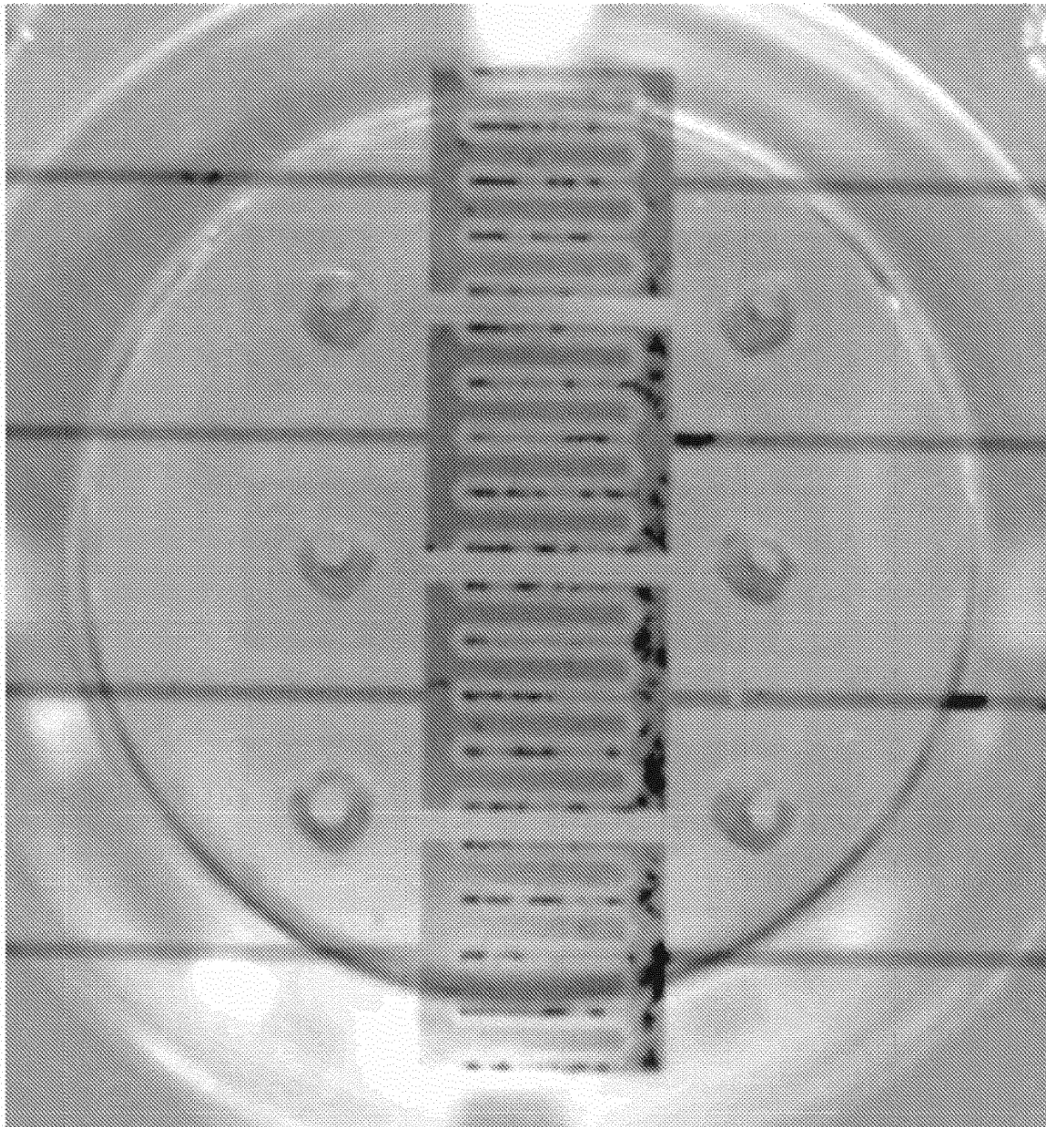
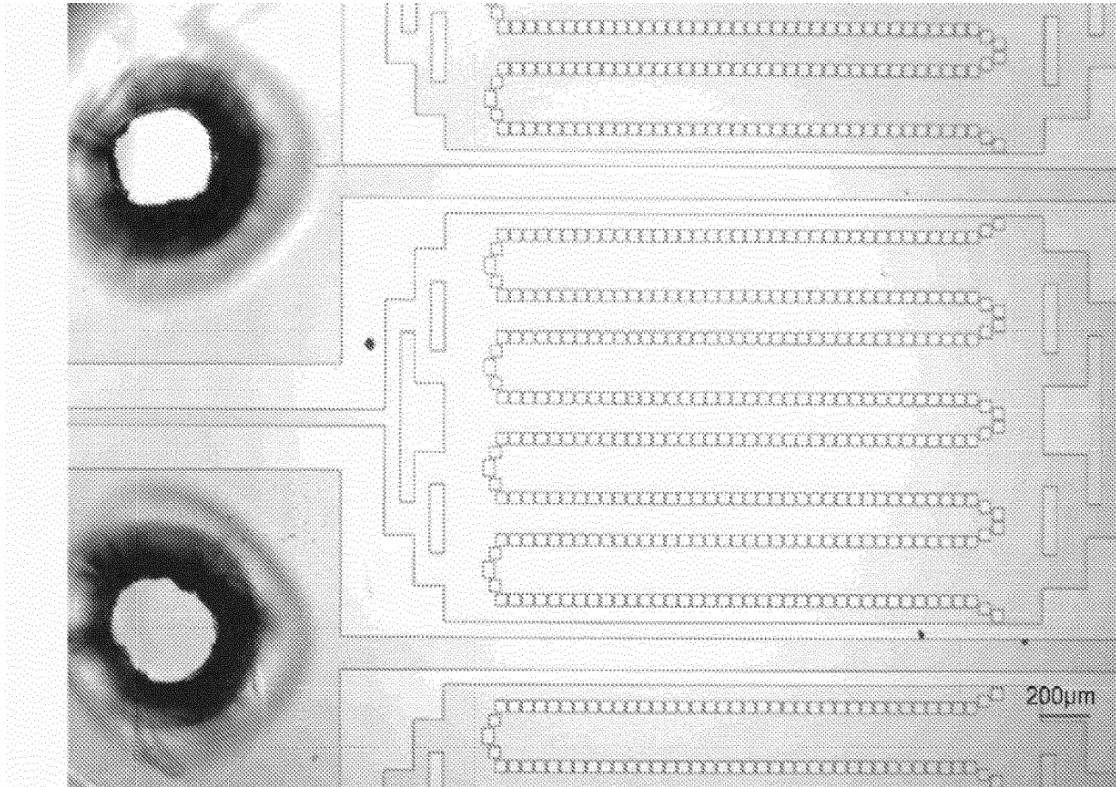
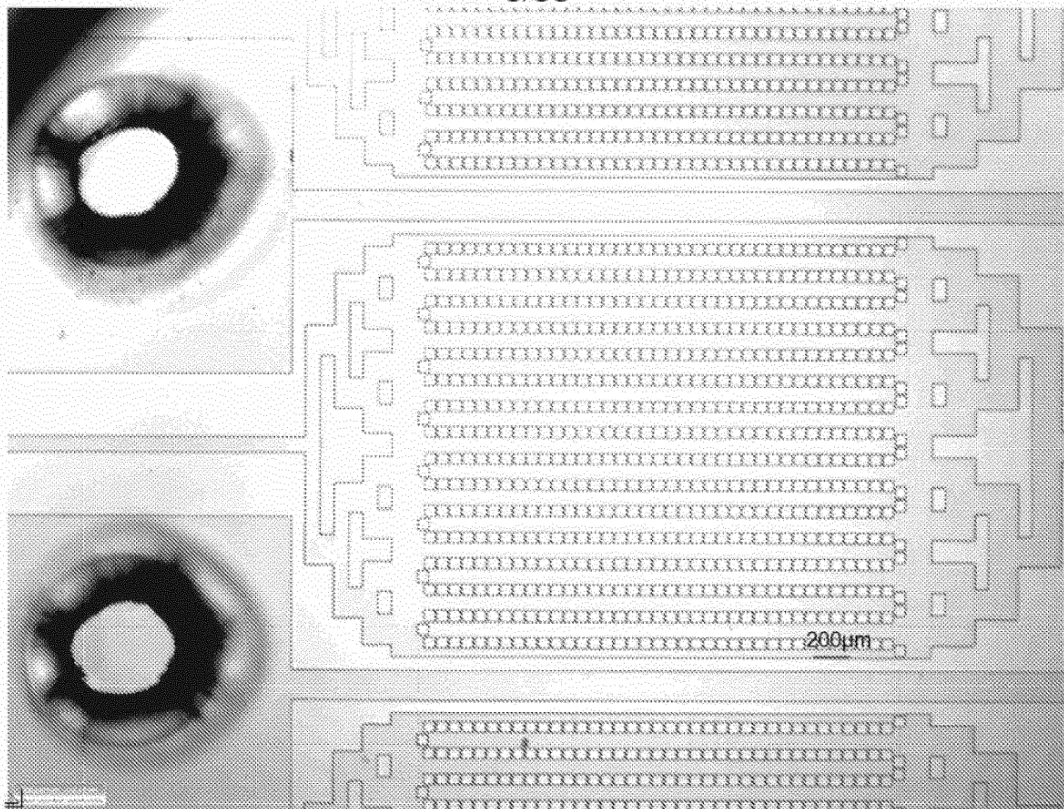


FIG. 3



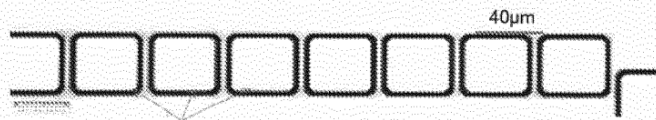
***FIG. 4***



**FIG. 5**

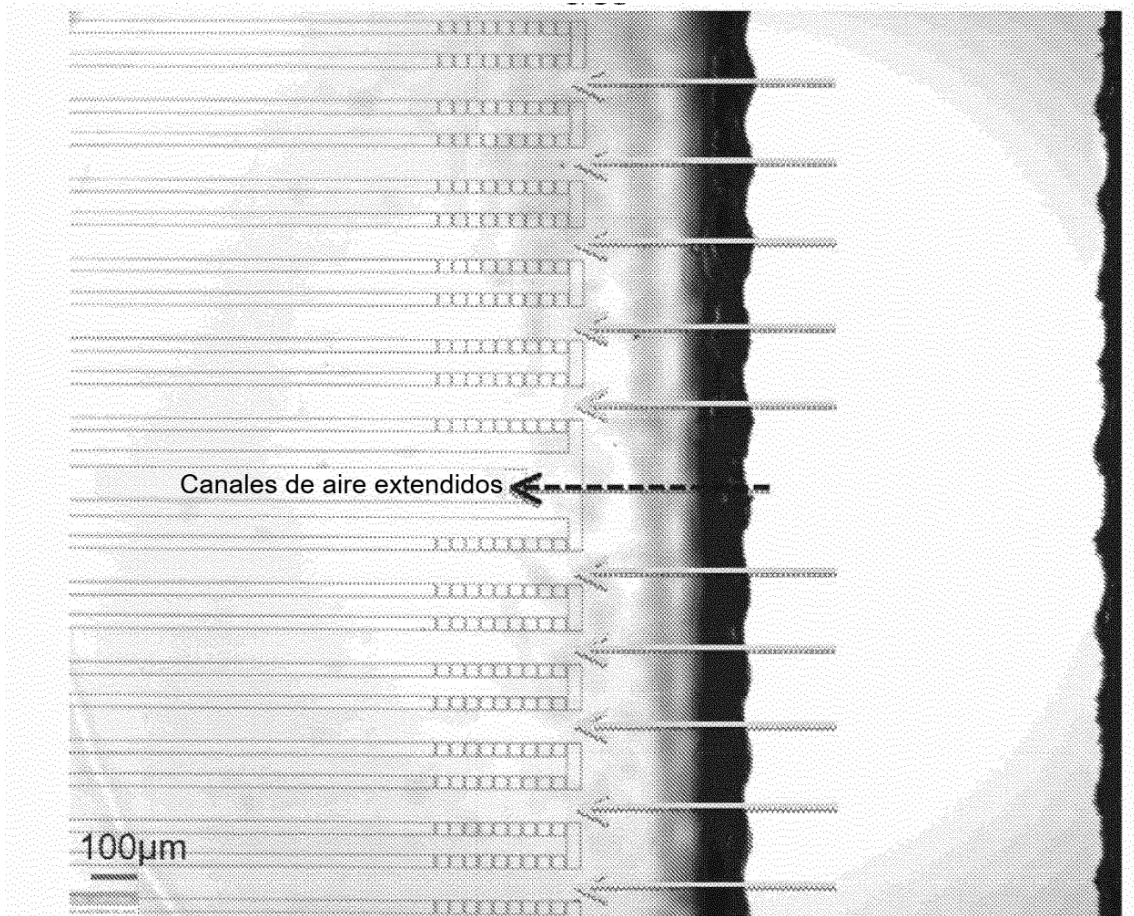


Las células se cultivan en esta área

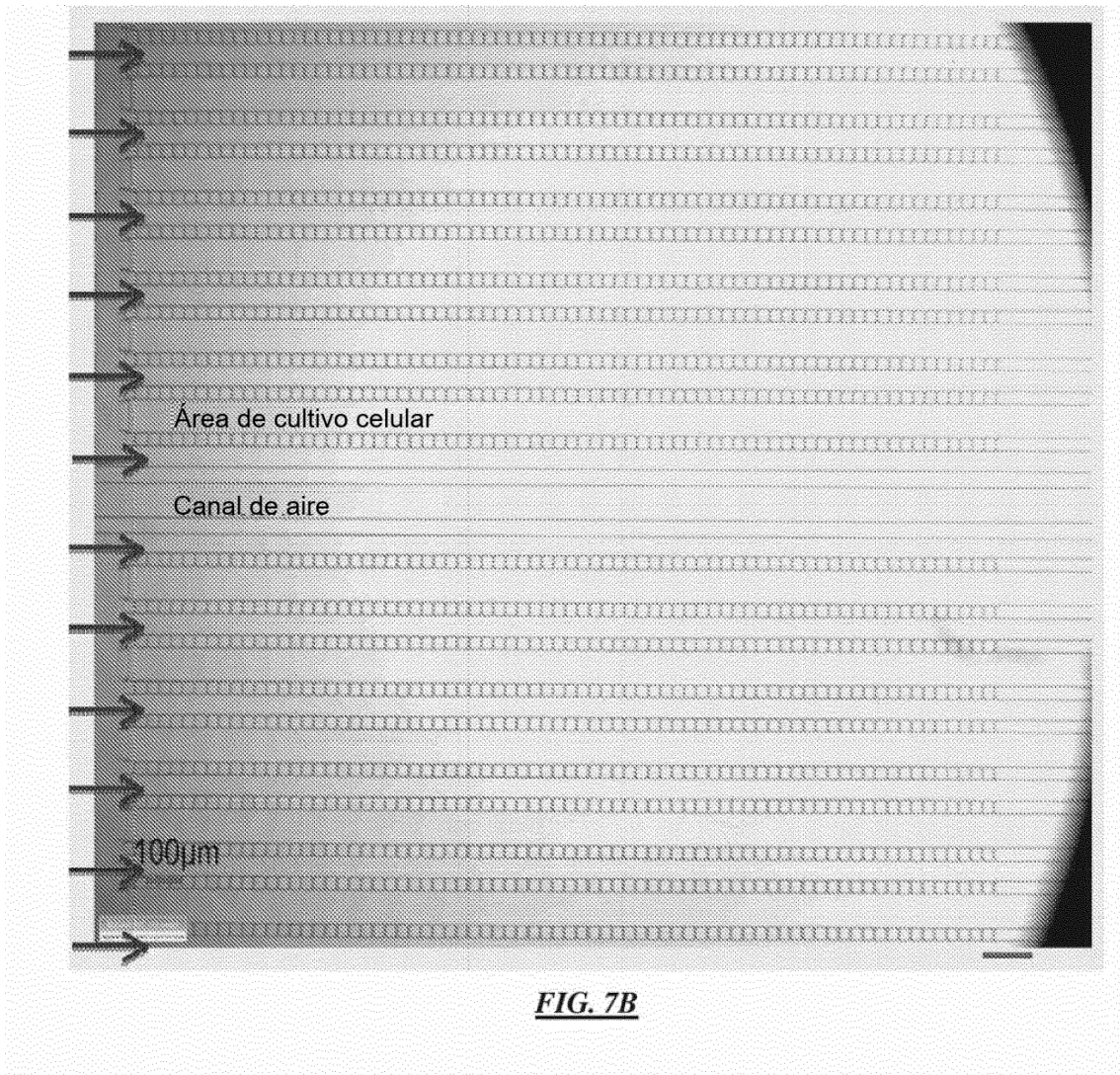


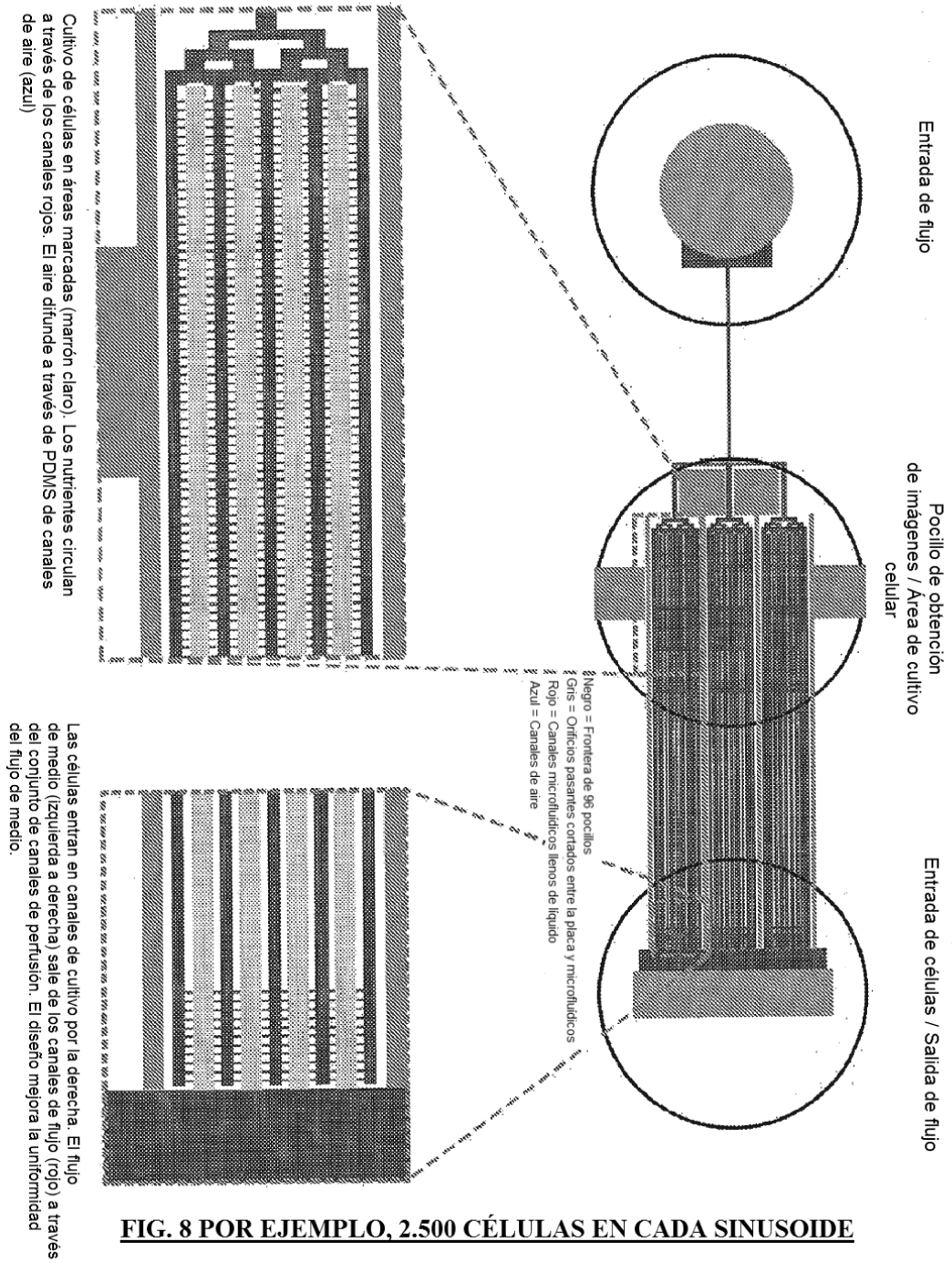
Canales de 4 µm de anchura y 40 µm de alto previenen que las células crezcan fuera

**FIG. 6**

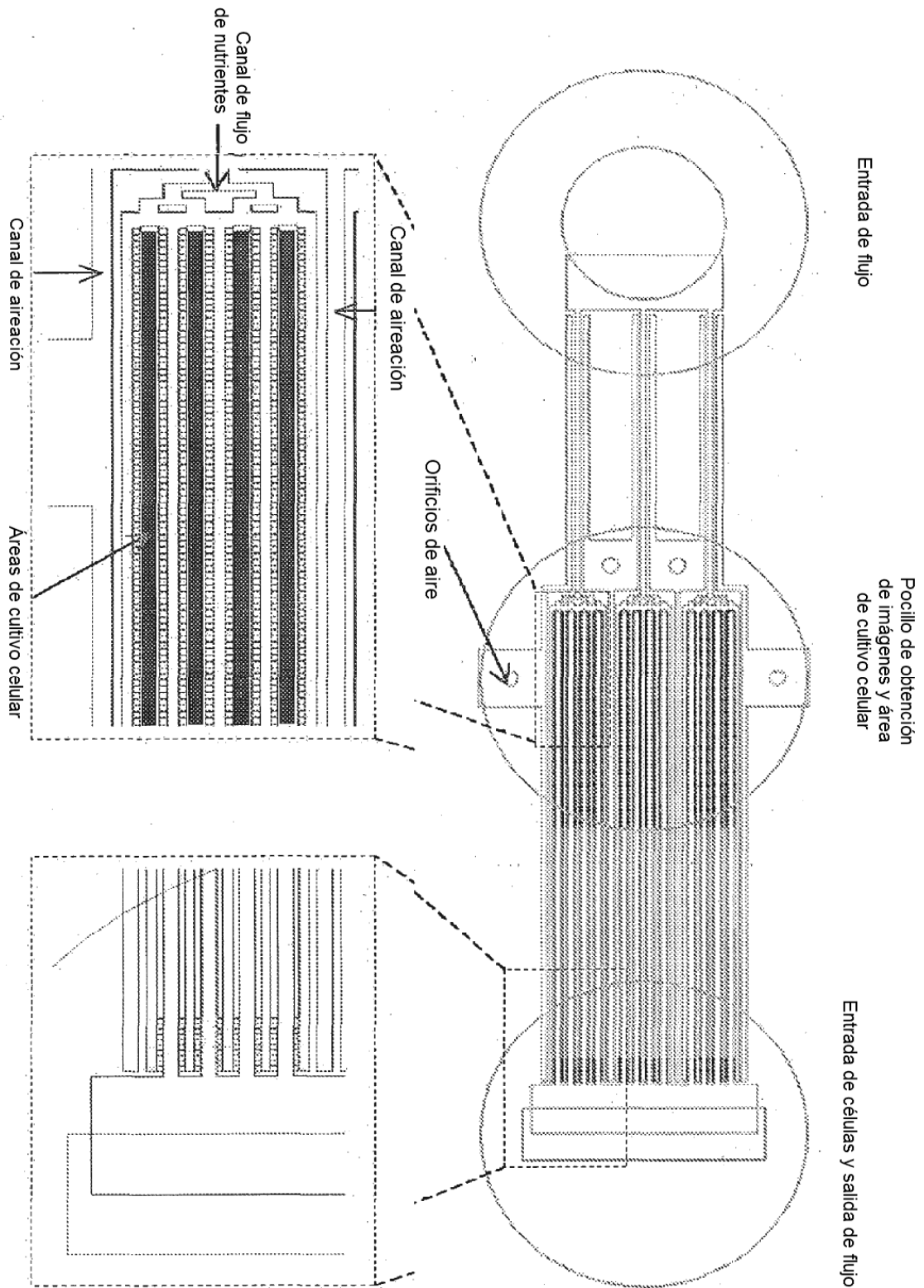


***FIG. 7A***

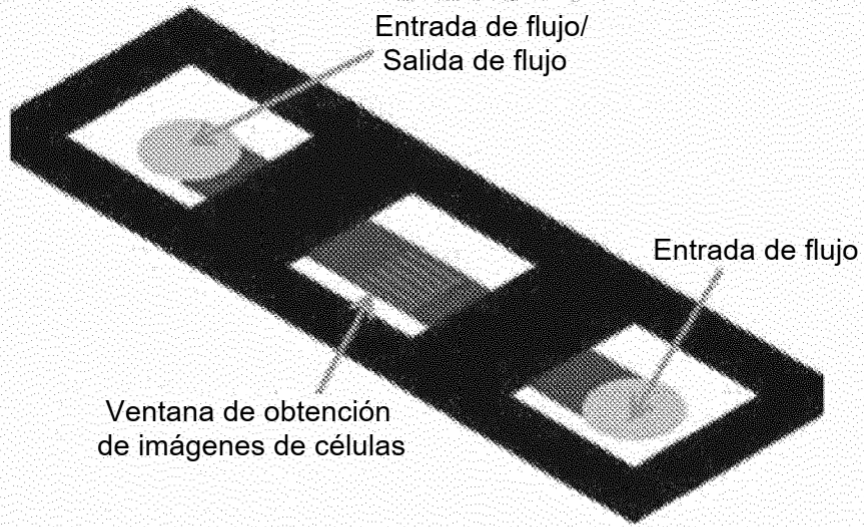




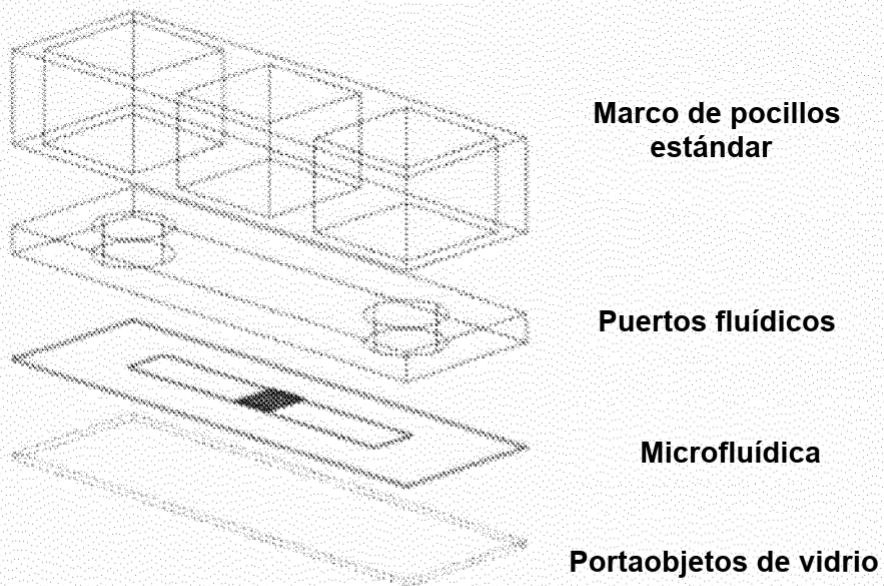




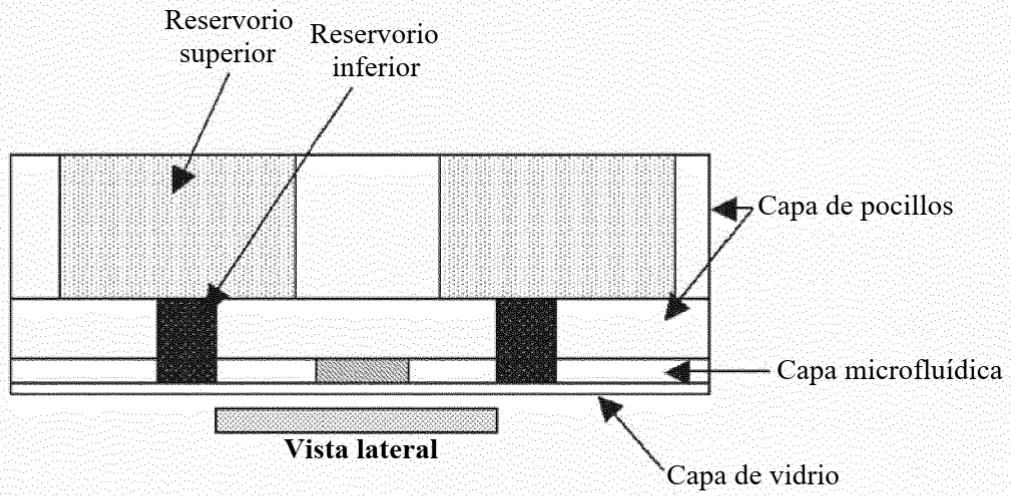
**FIG. 8**



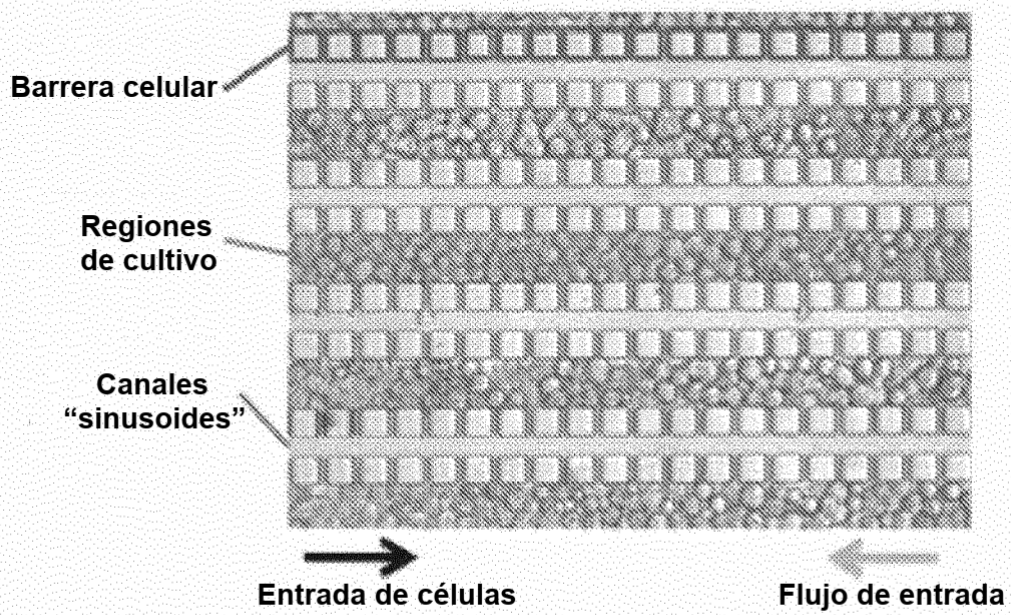
**FIG. 9A**



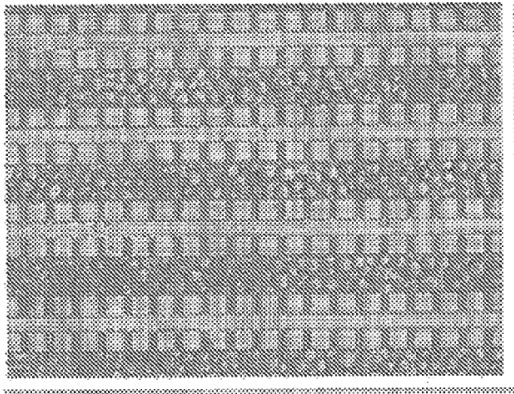
**FIG. 9B**



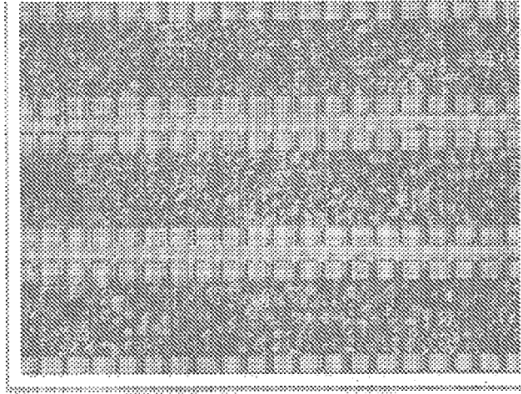
**FIG. 10**



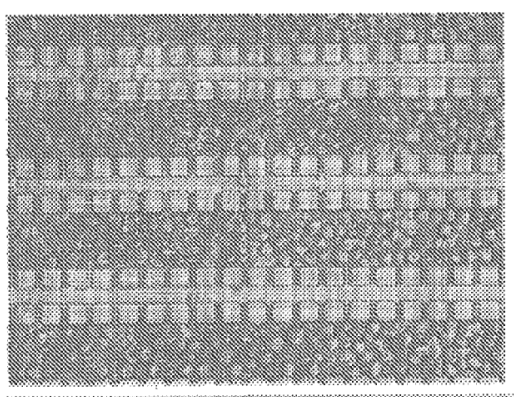
**FIG. 11**



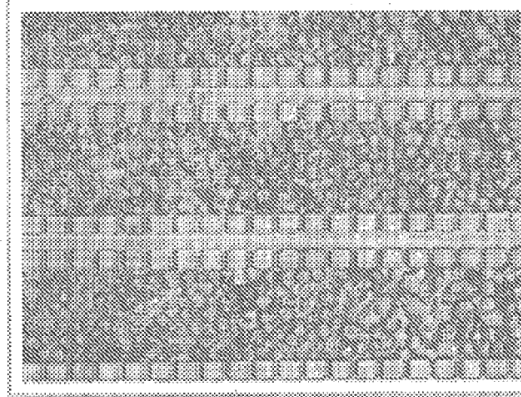
50 micrómetros de anchura



100 micrómetros de anchura

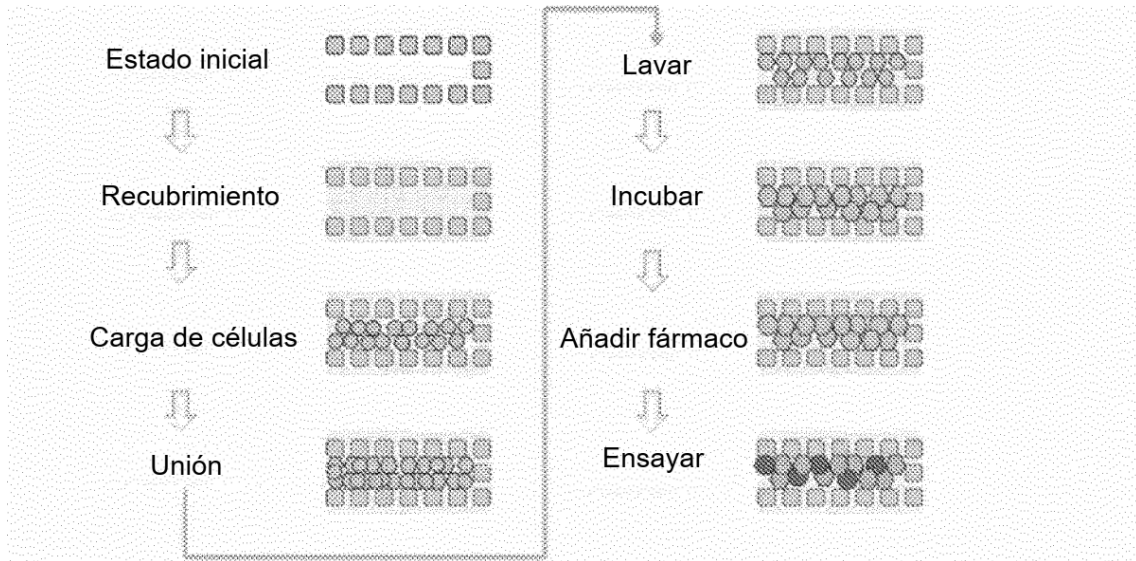


75 micrómetros de anchura

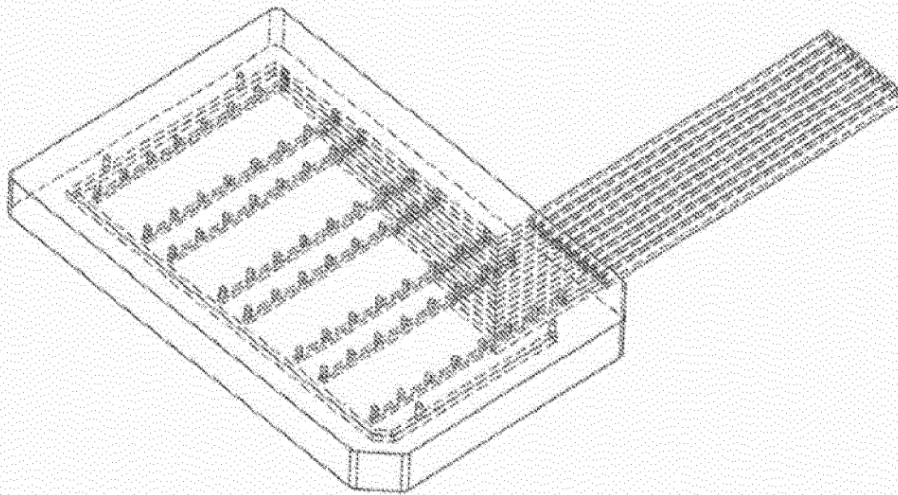


125 micrómetros de anchura

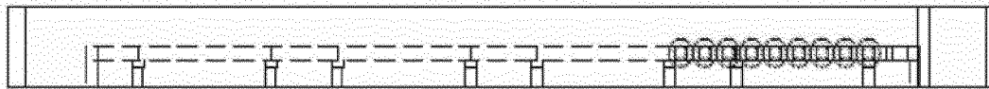
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14B**



**FIG. 14C**

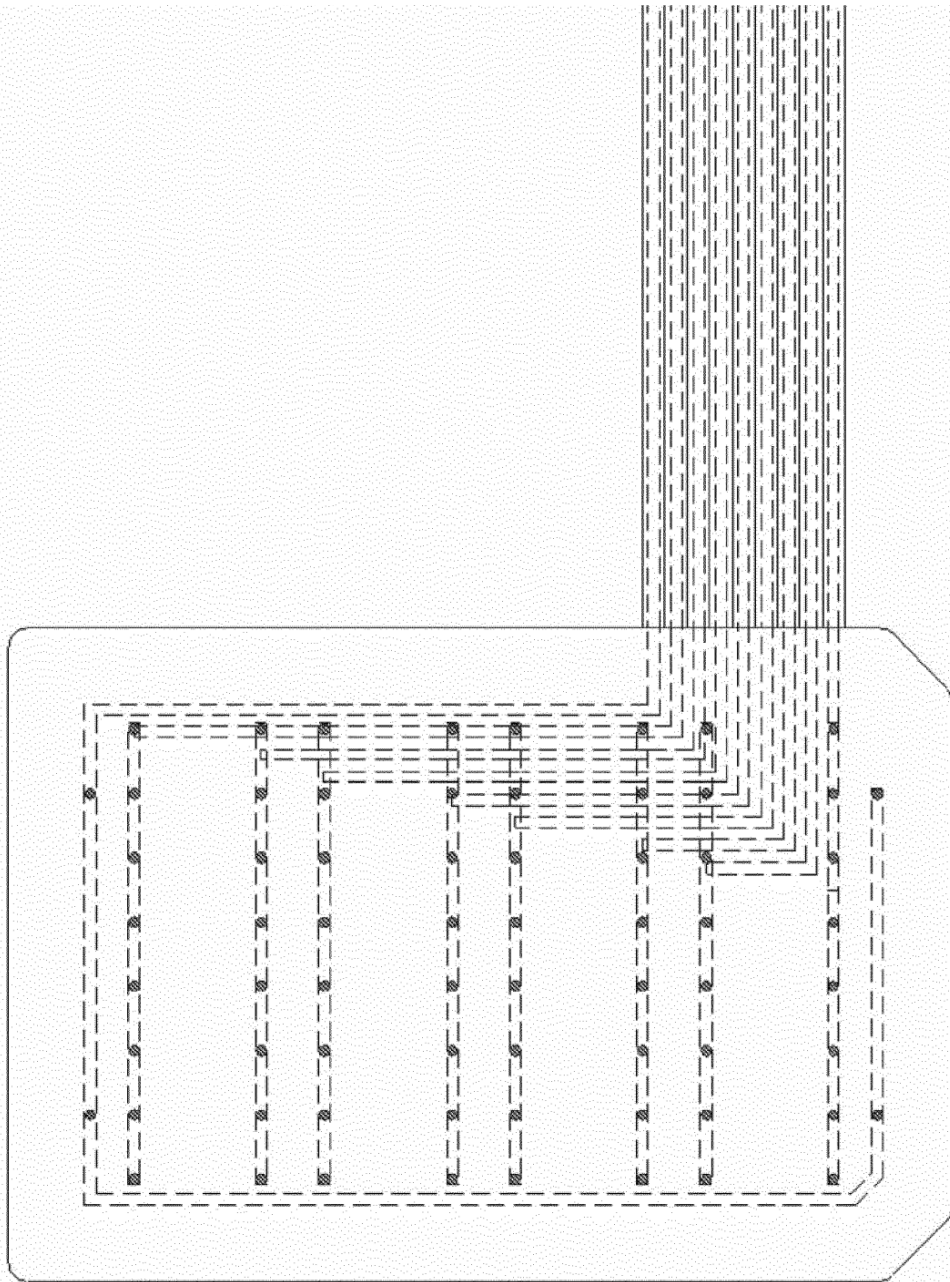
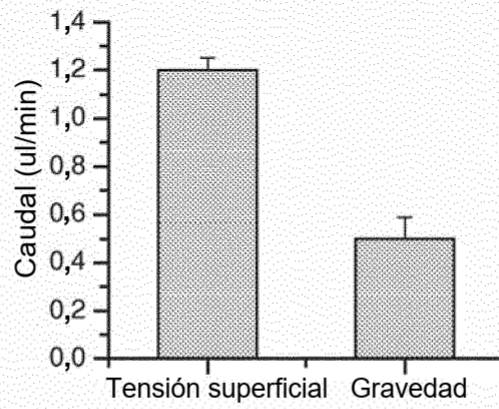
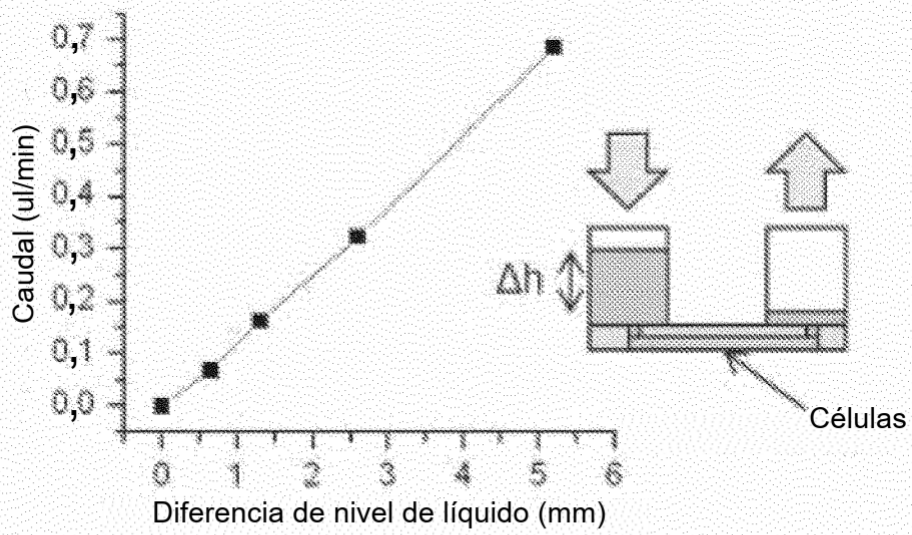


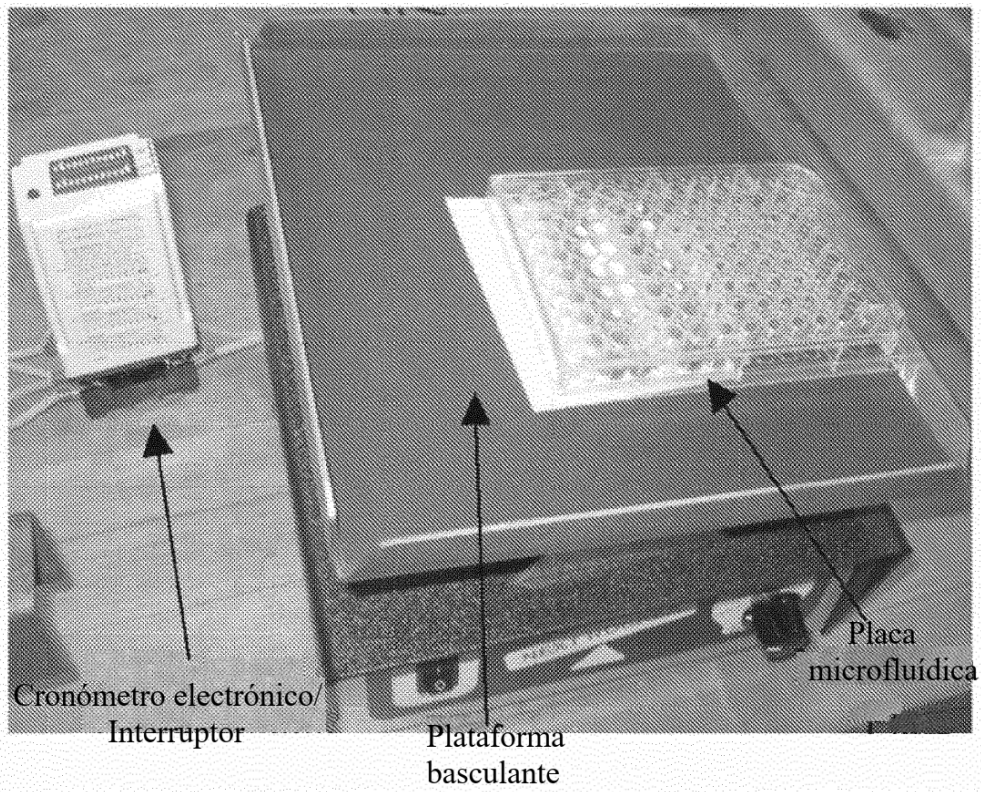
FIG. 14A



***FIG. 15***

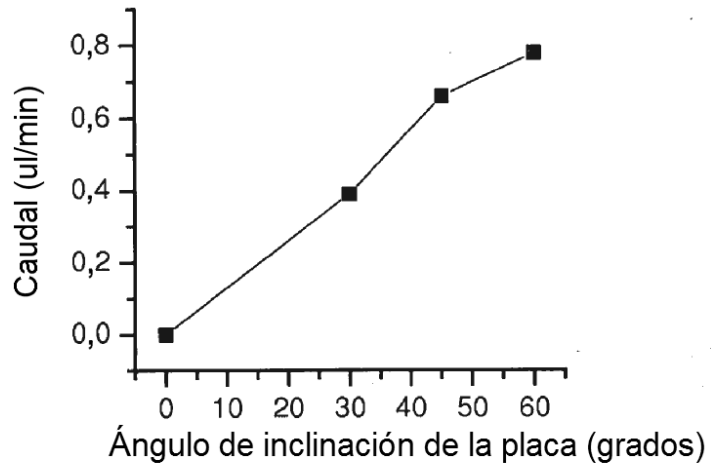


***FIG. 16***

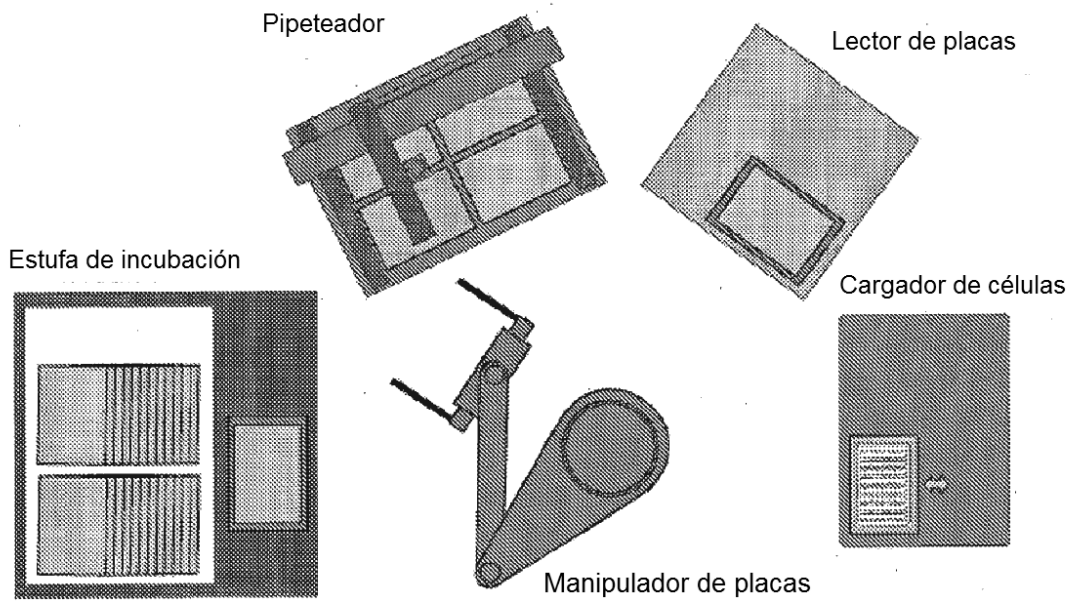


**FIG. 17A**

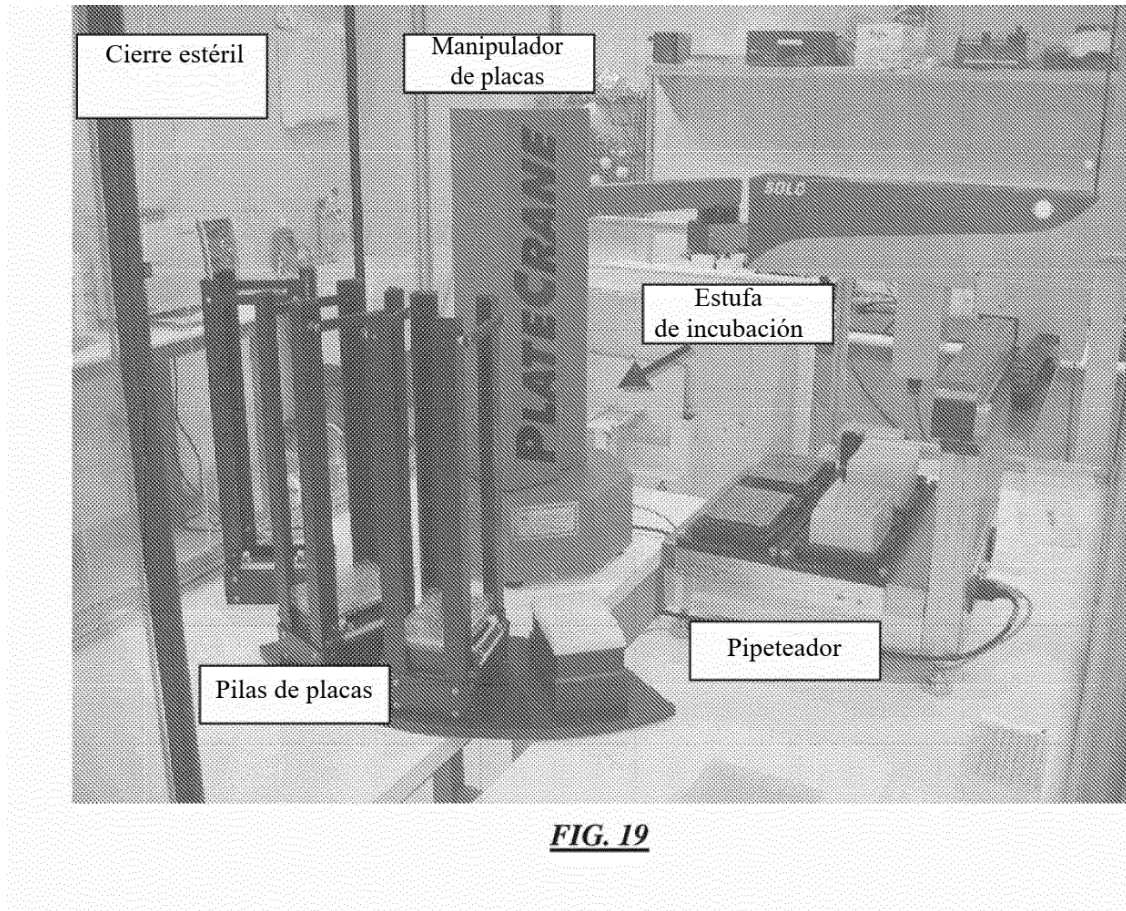


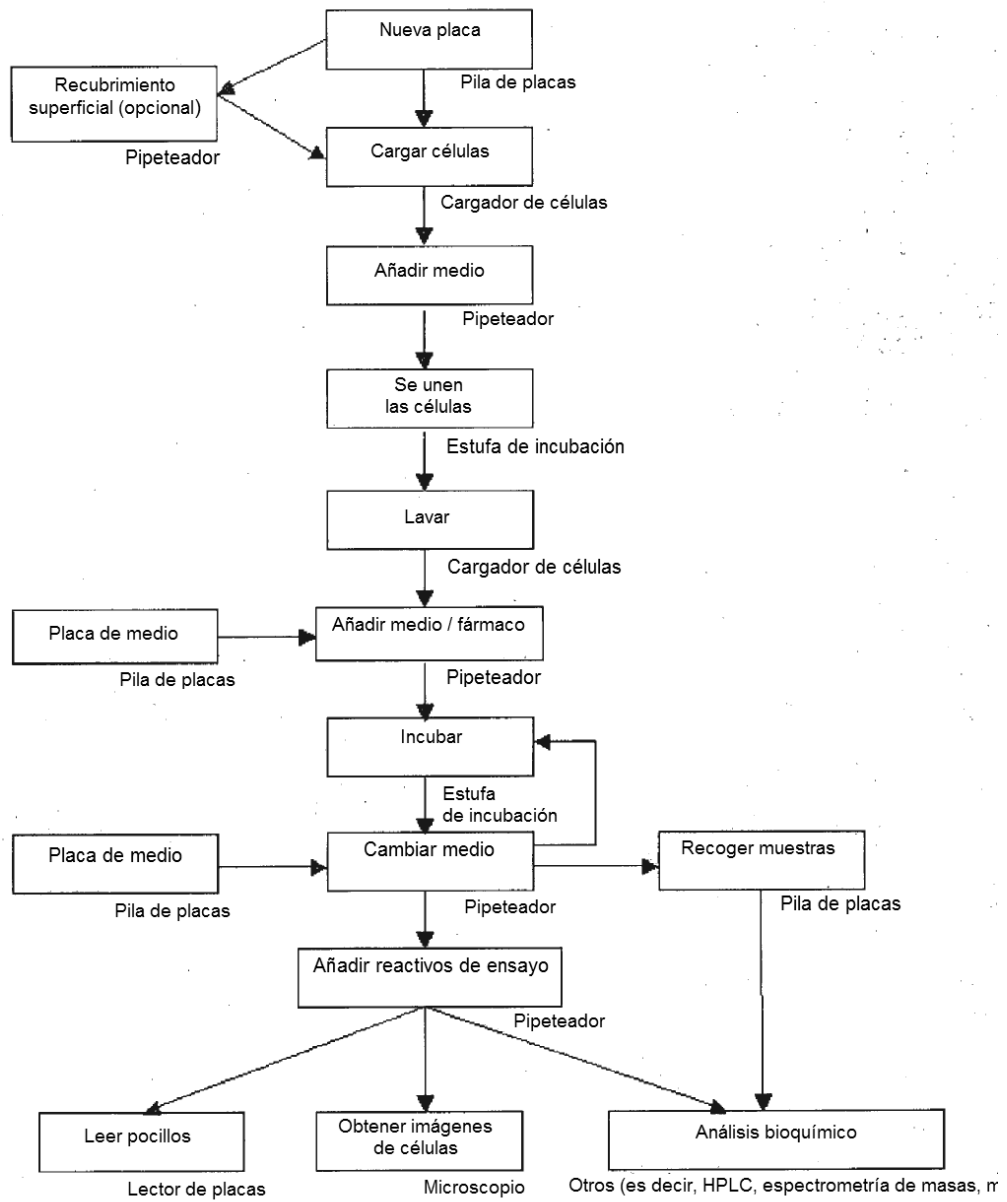


**FIG. 17B**

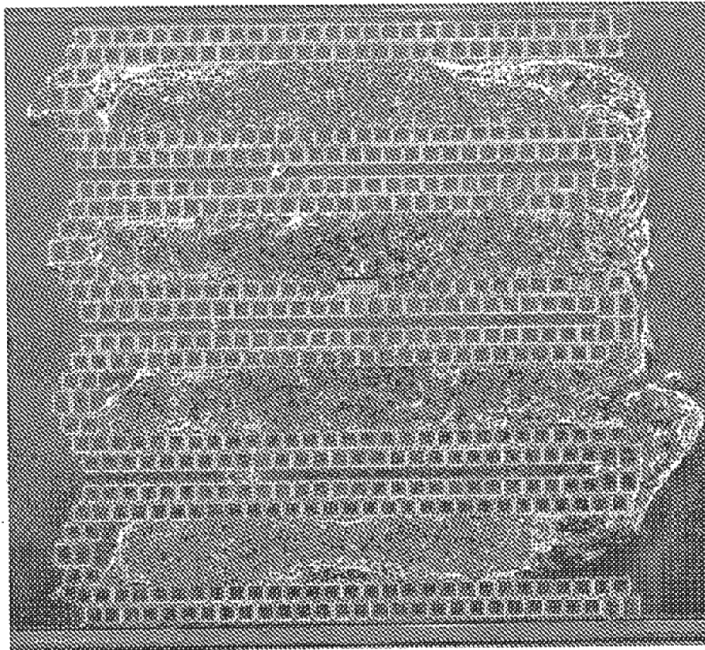


**FIG. 18**

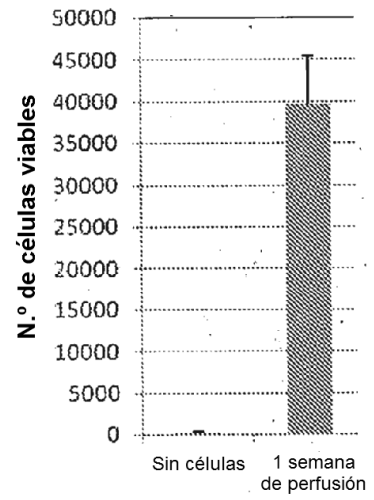


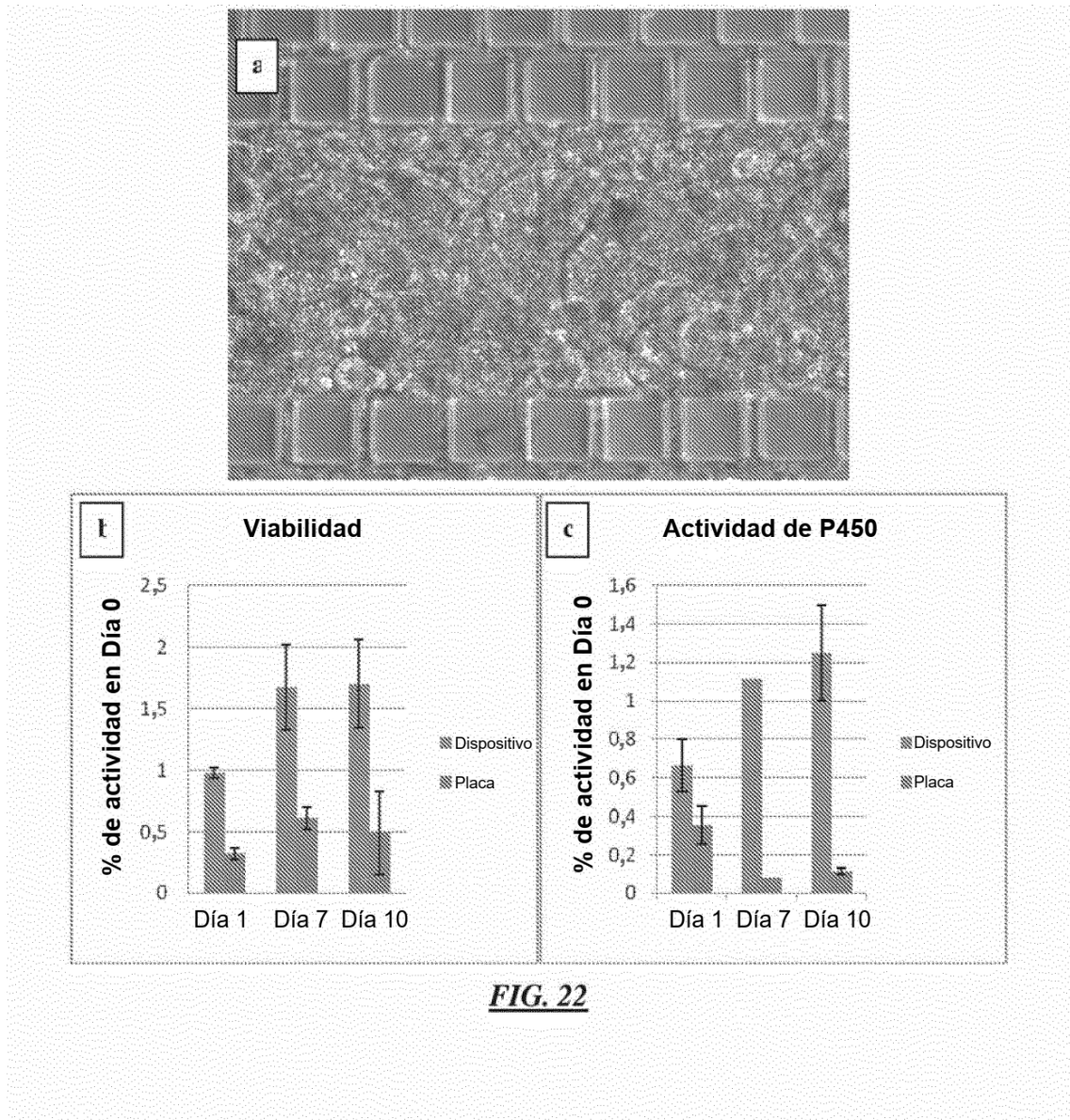


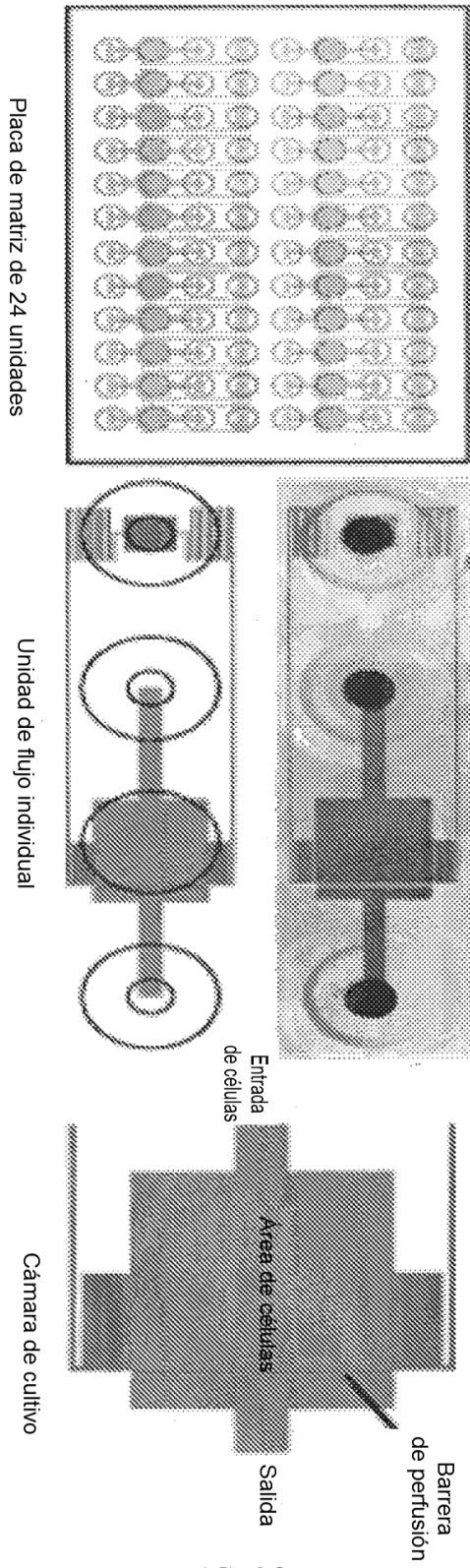
**FIG. 20**



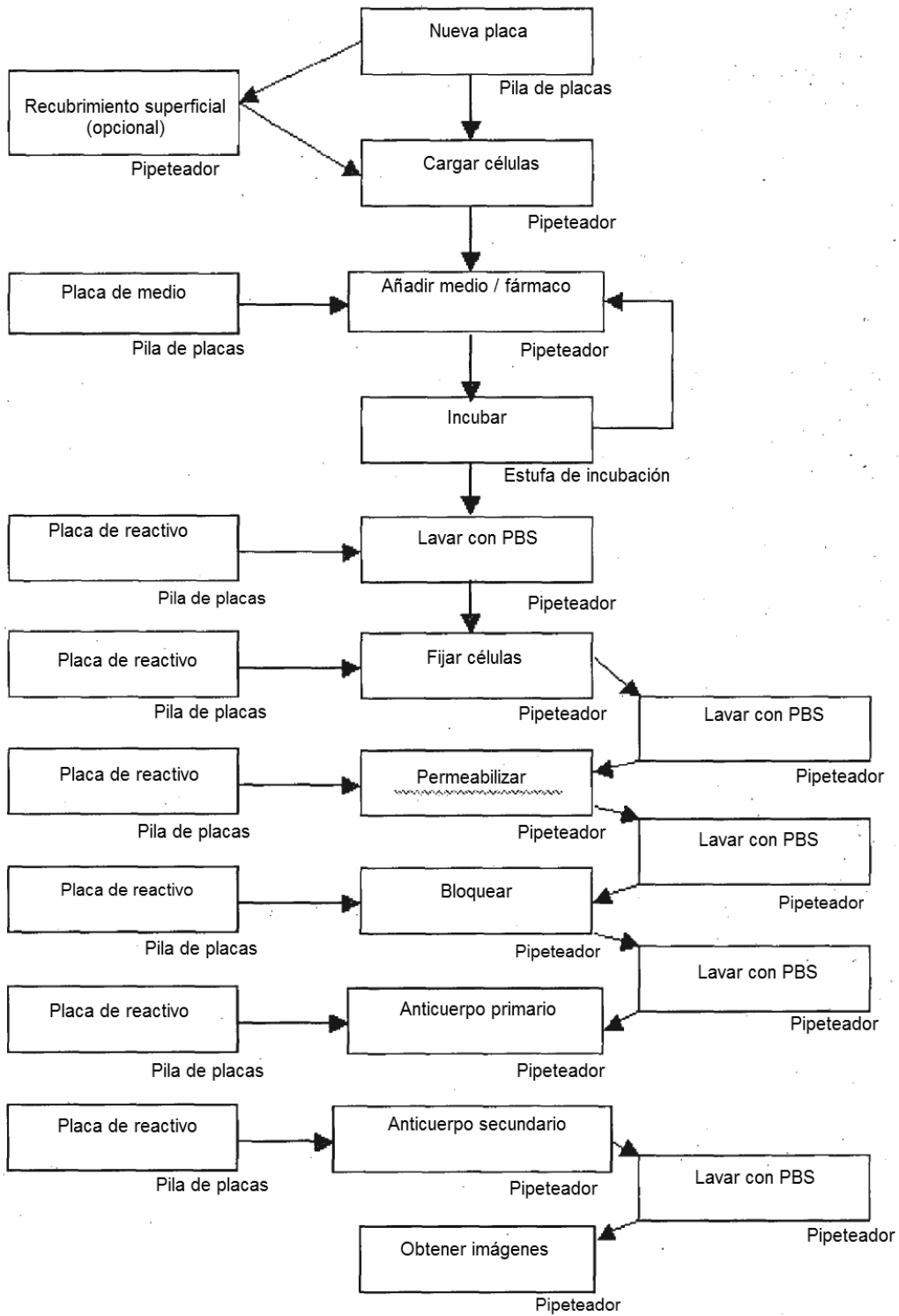
**FIG. 21**



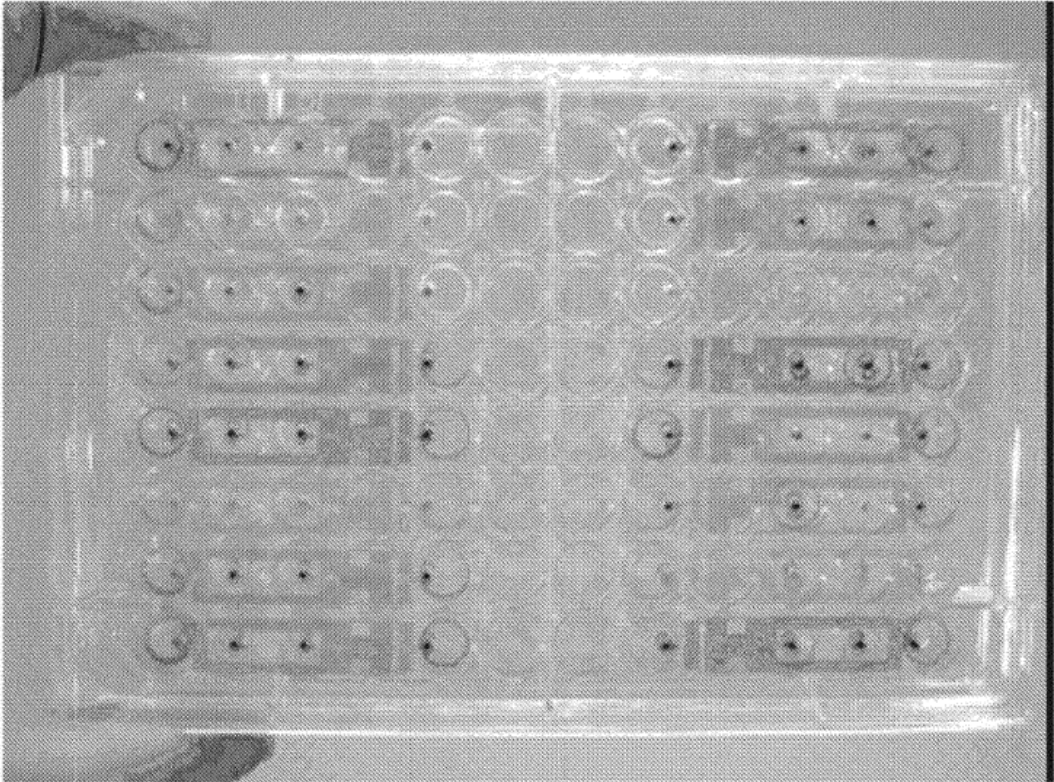




**FIG. 23**

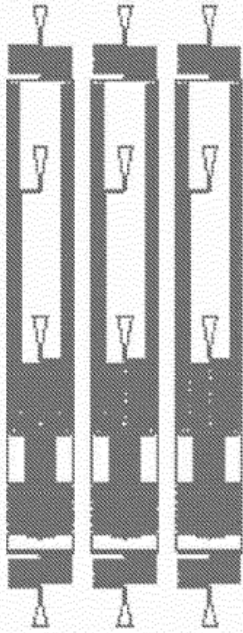


**FIG. 24**

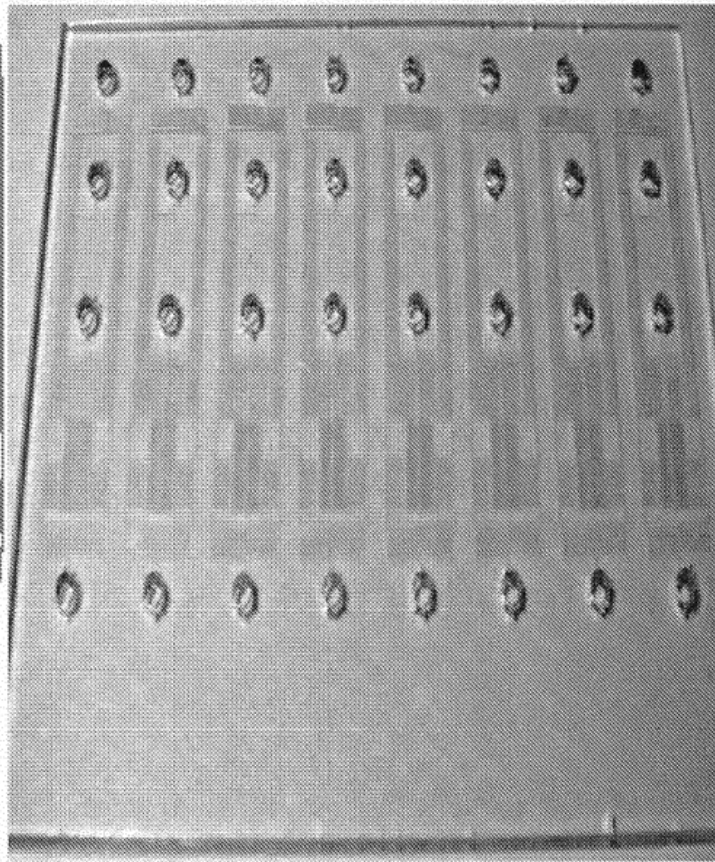


**FIG. 25**

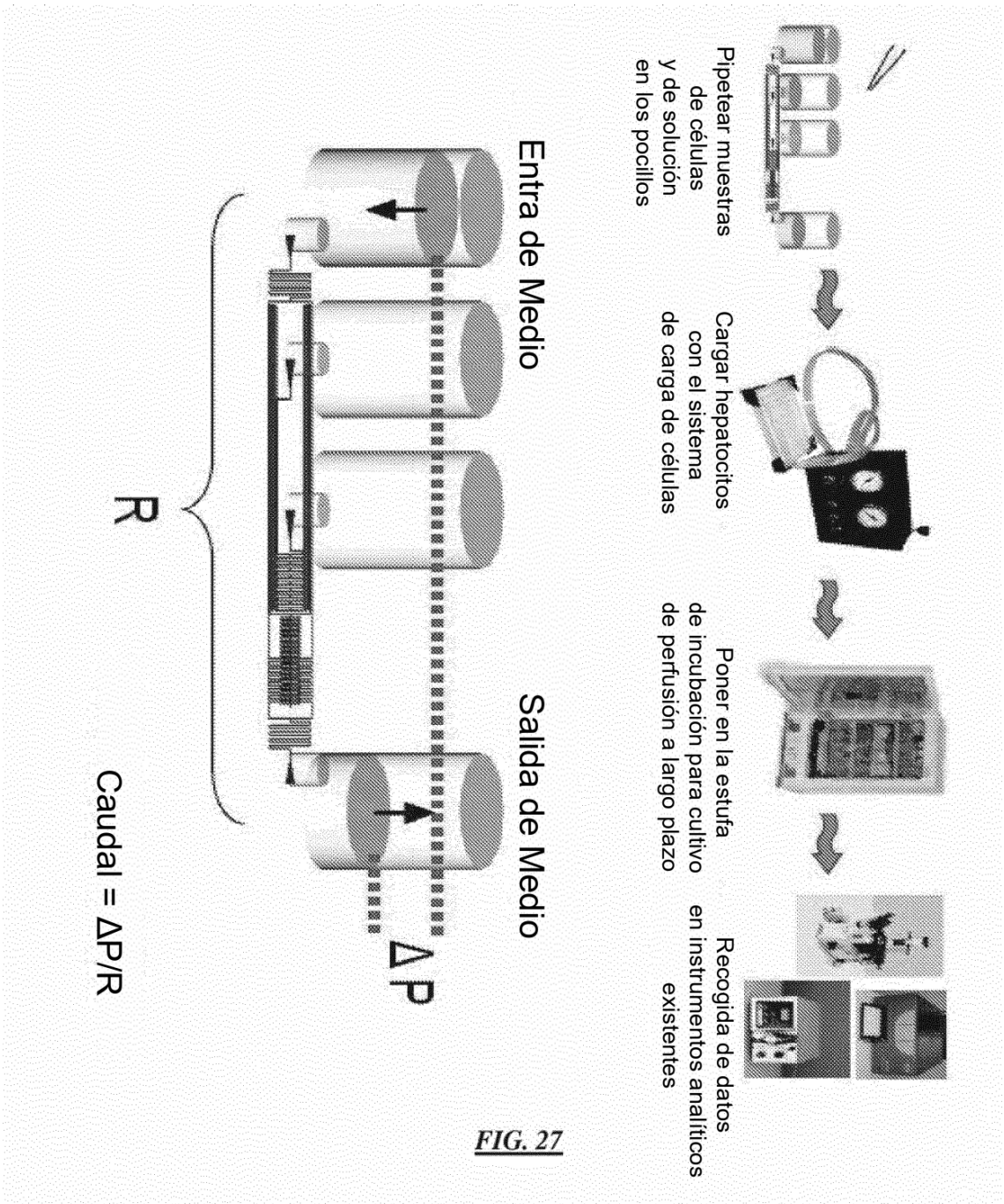




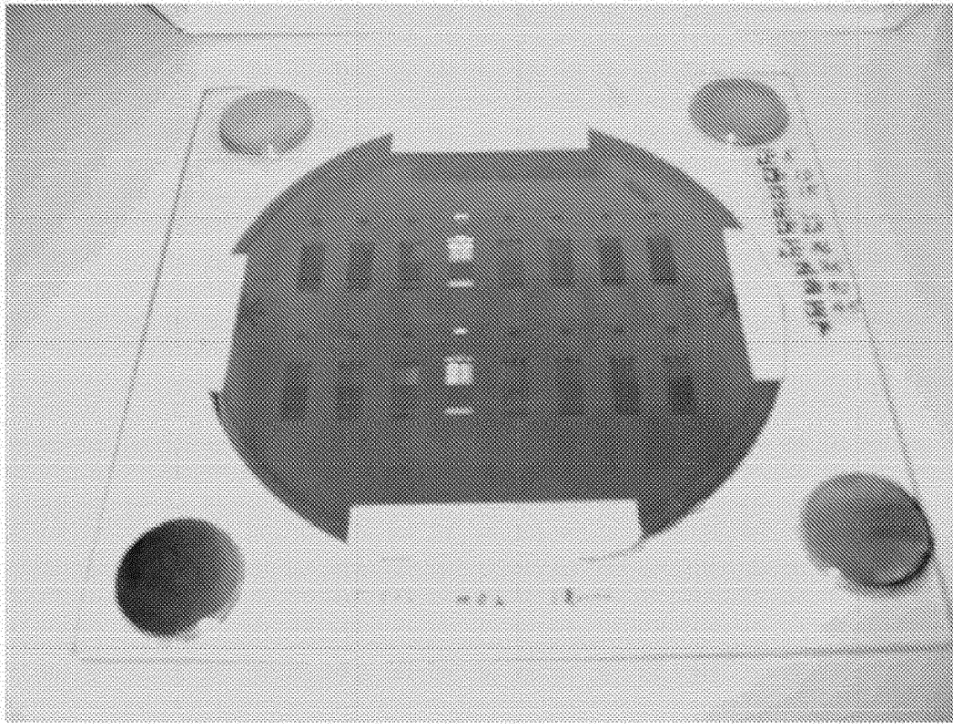
***FIG. 26A***



***FIG. 26B***



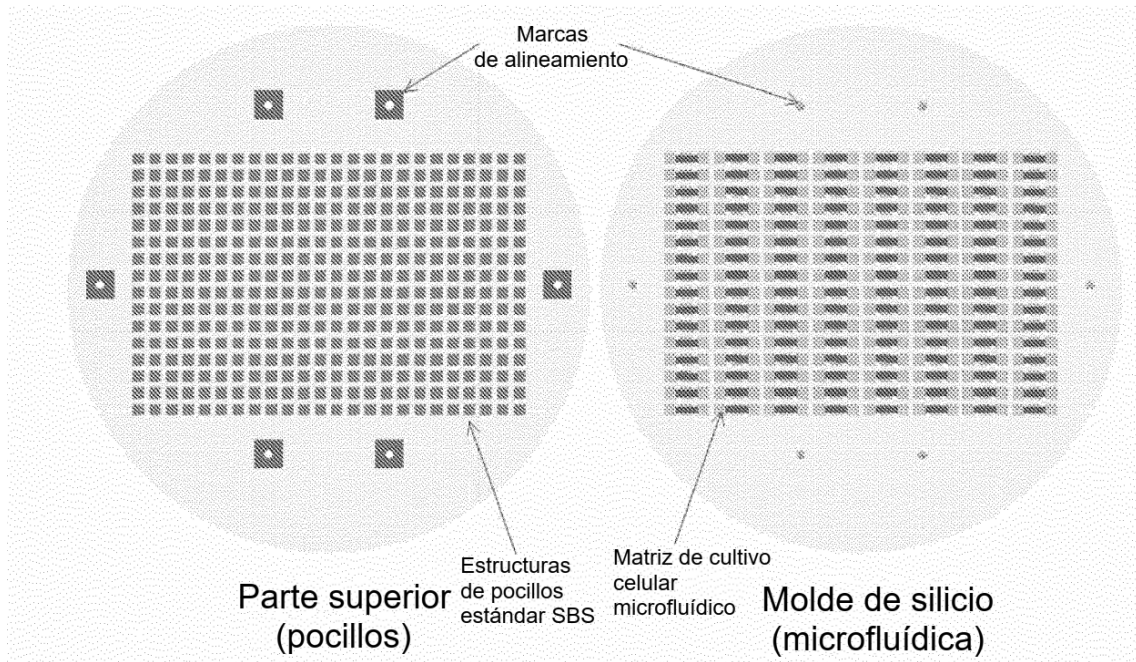
**FIG. 27**



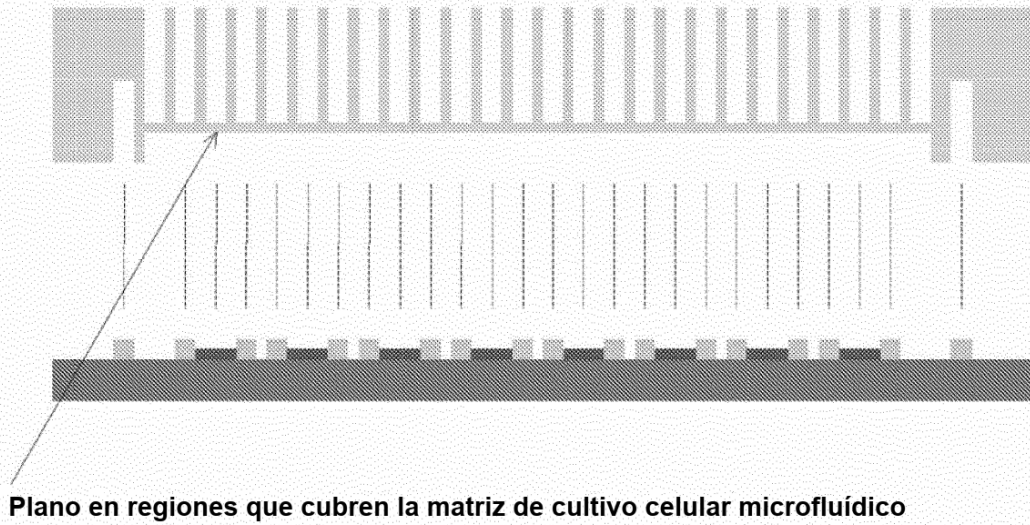
**FIG. 28**



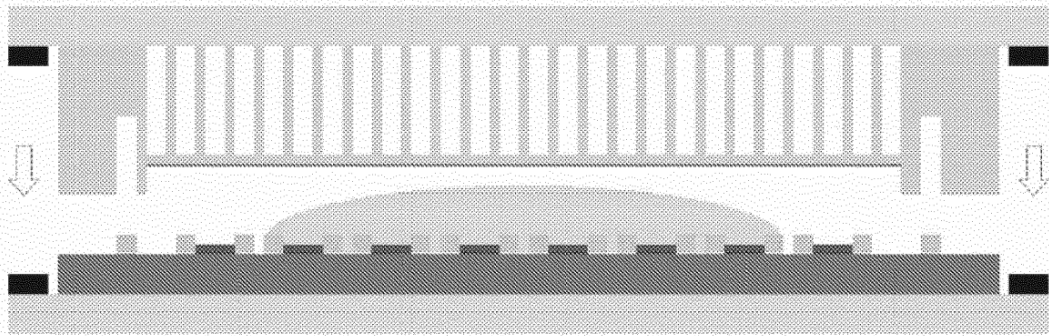
FIG. 29



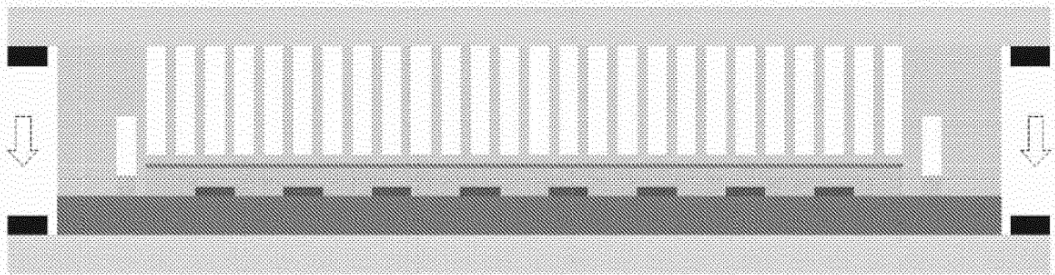
**FIG. 30**



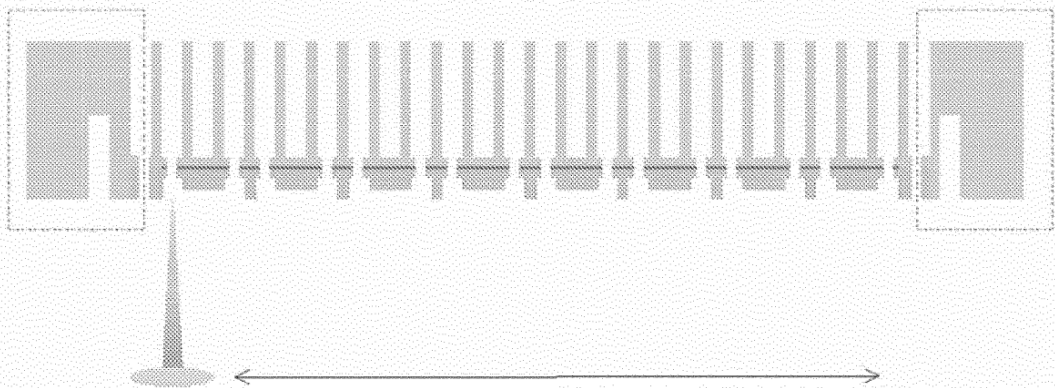
**FIG. 31A**



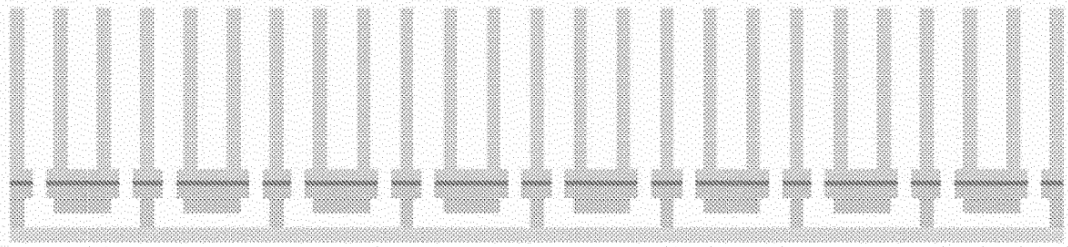
**FIG. 31B**



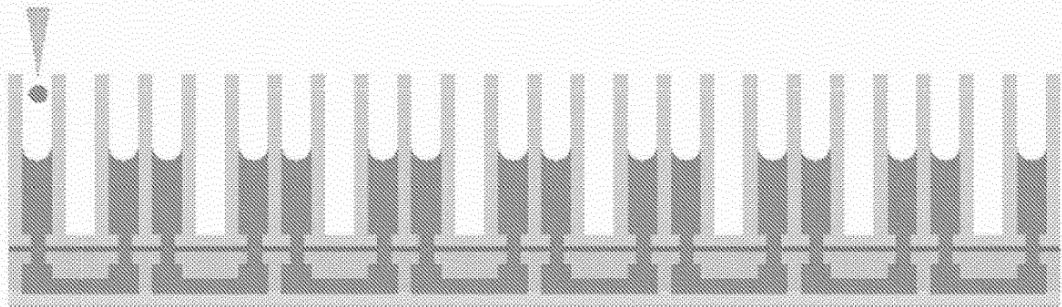
**FIG. 31C**



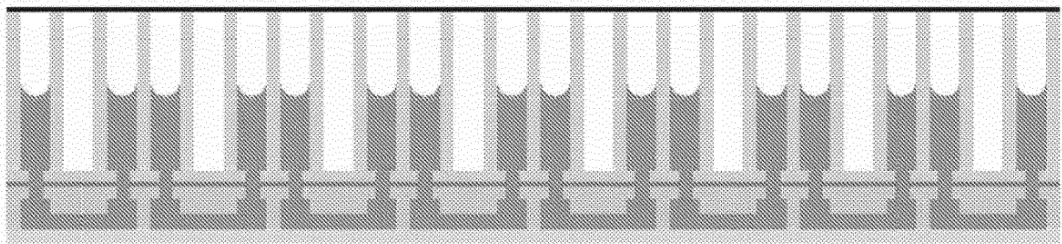
**FIG. 31D**



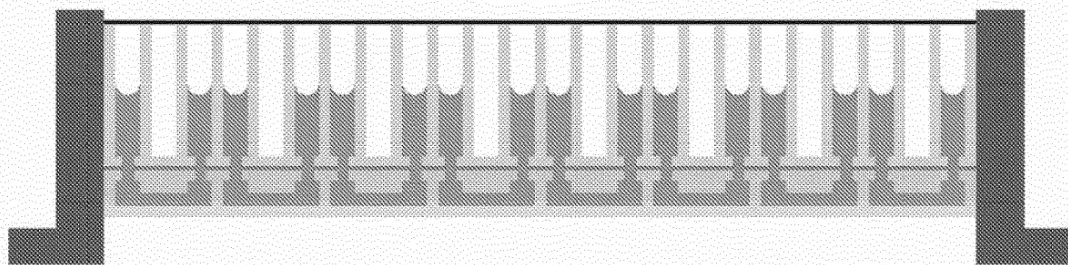
**FIG. 31E**



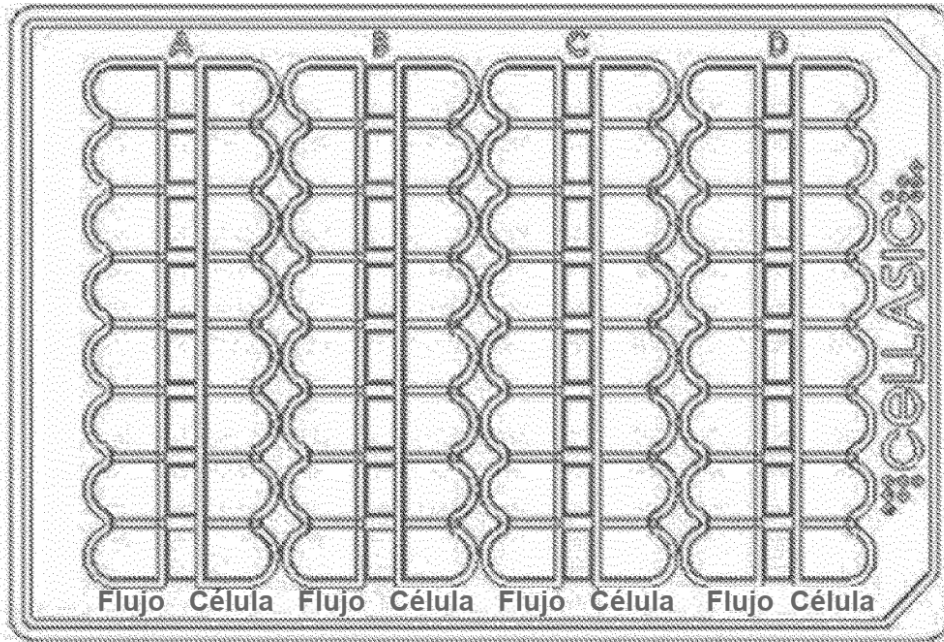
**FIG. 31F**



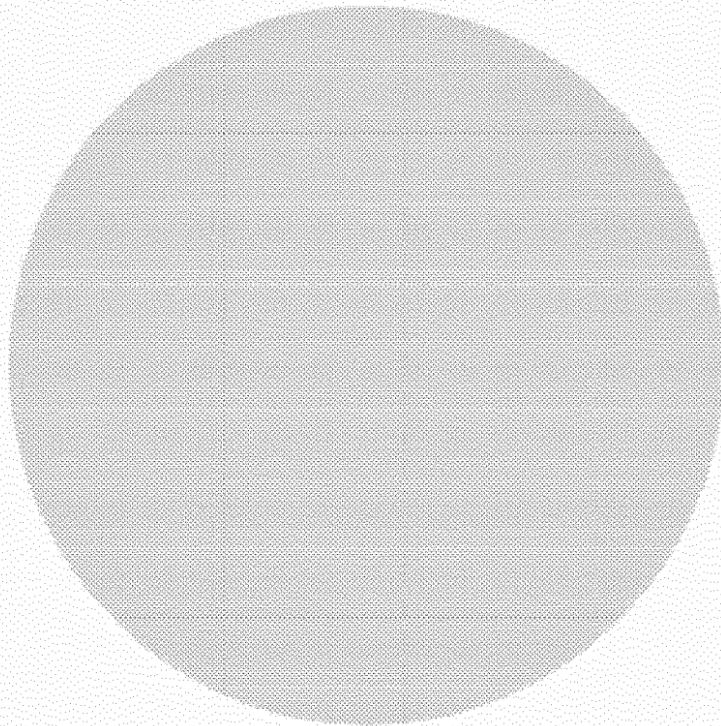
**FIG. 31G**



**FIG. 31H**



**FIG. 32A**



**FIG. 32B**



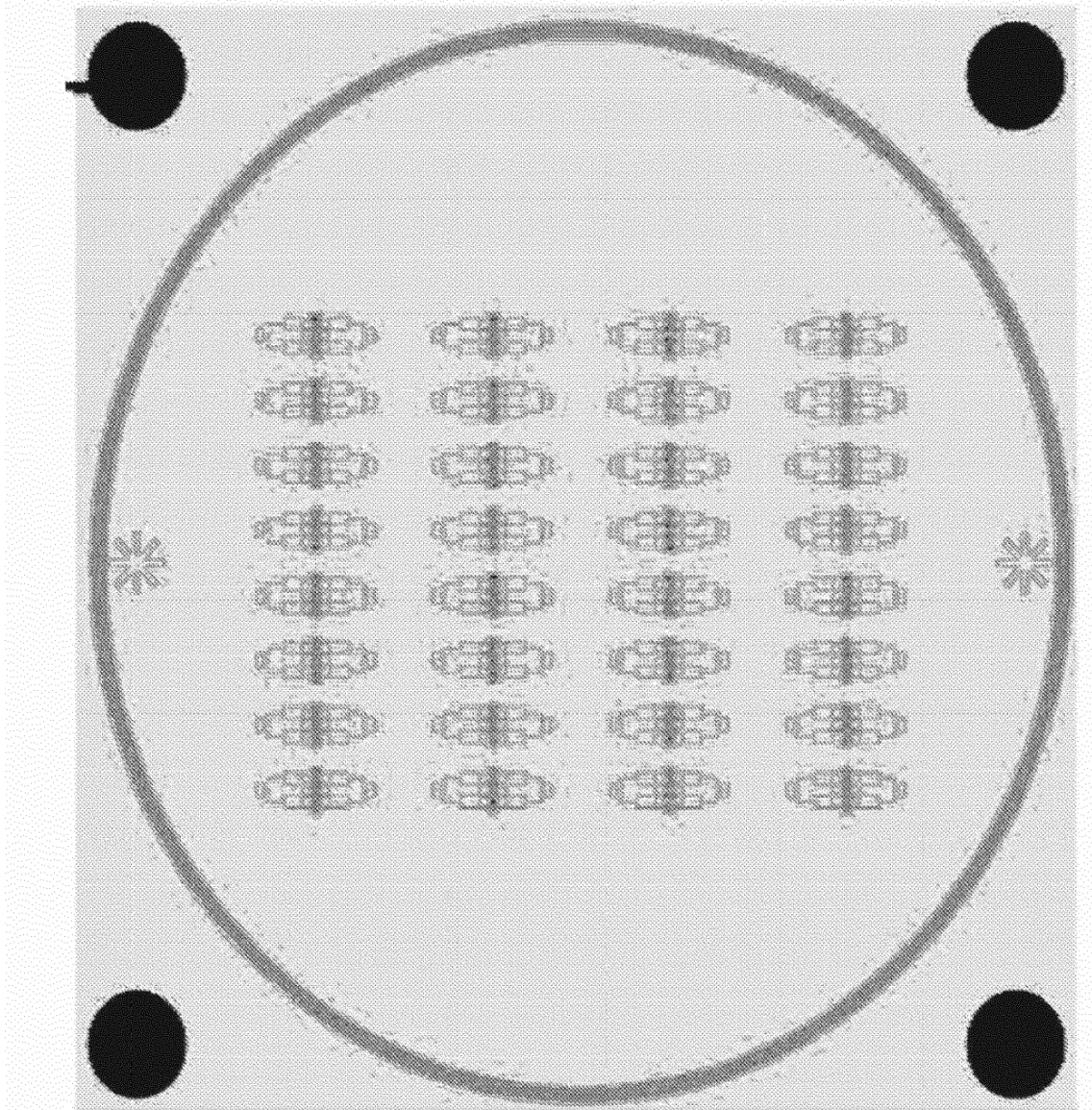
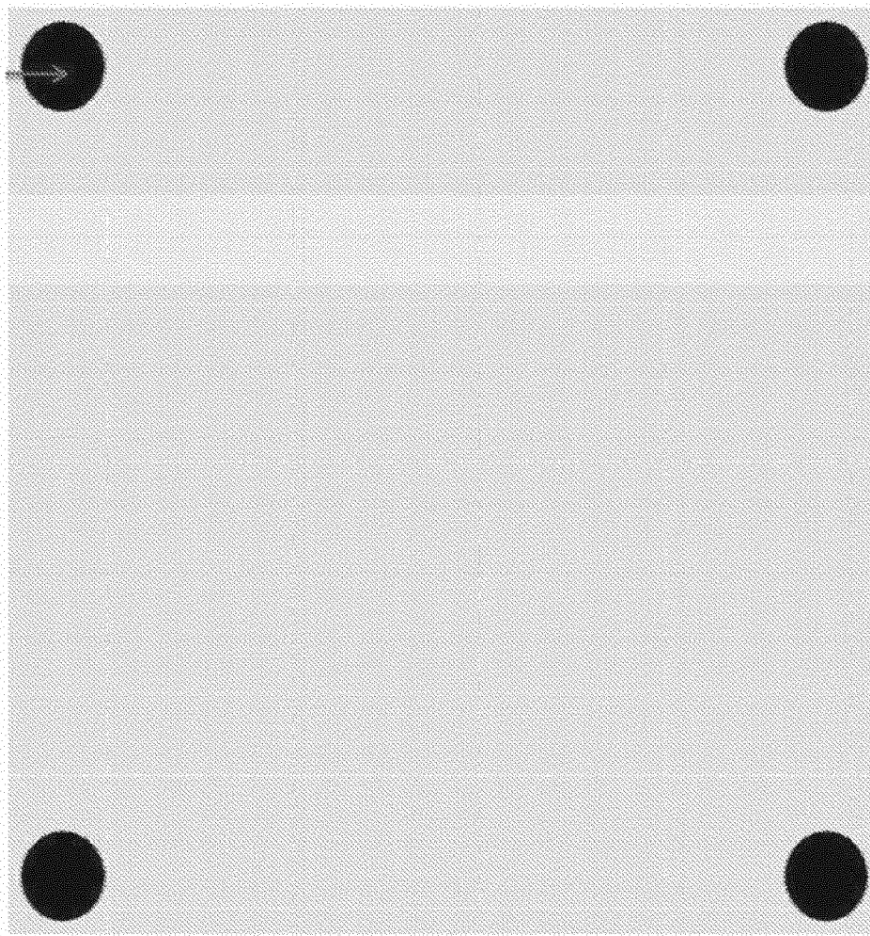
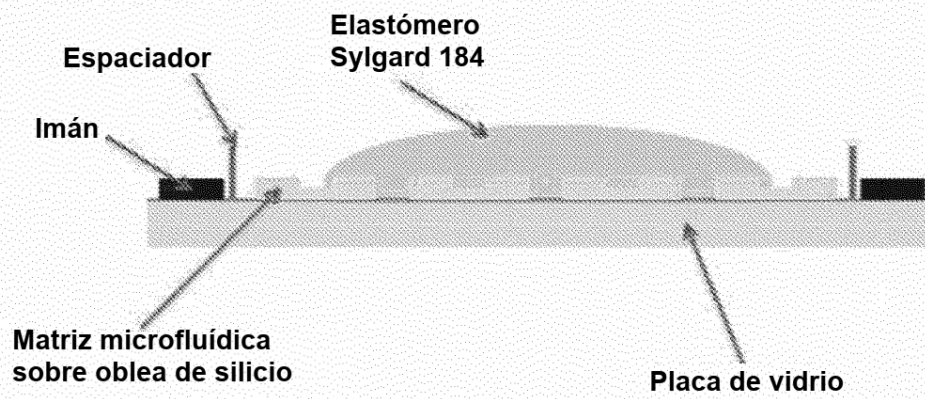


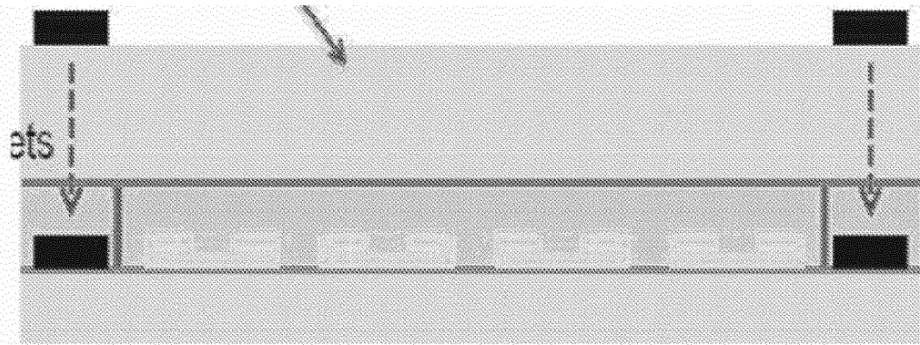
FIG. 32C



***FIG. 32D***



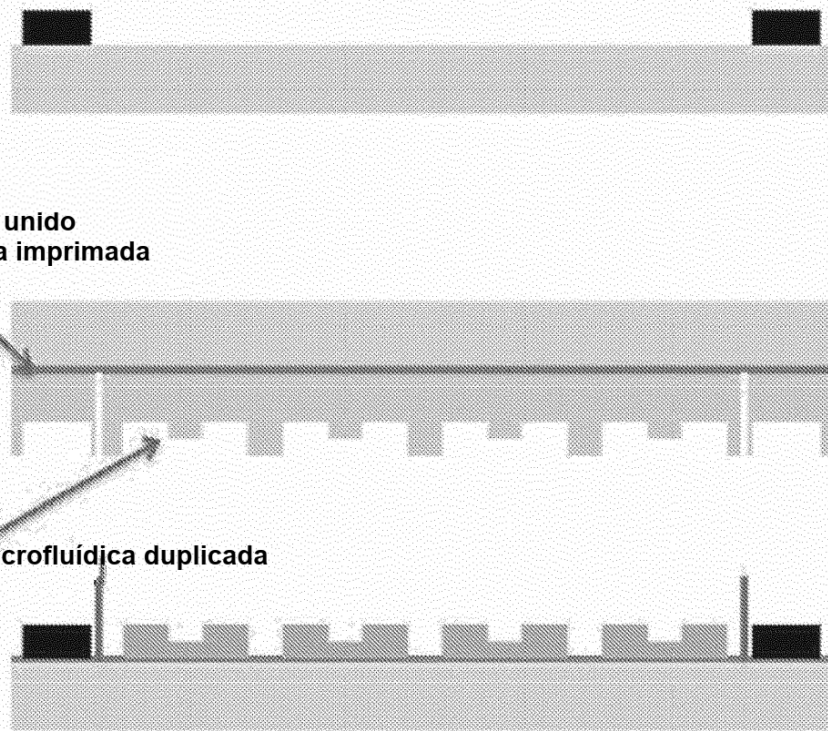
***FIG. 33A***



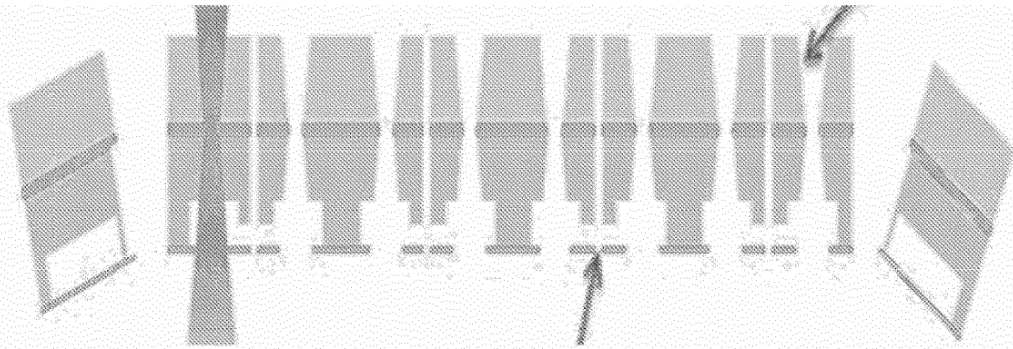
**FIG. 33B**

**Polímero blando unido  
a la oblea acrílica imprimada**

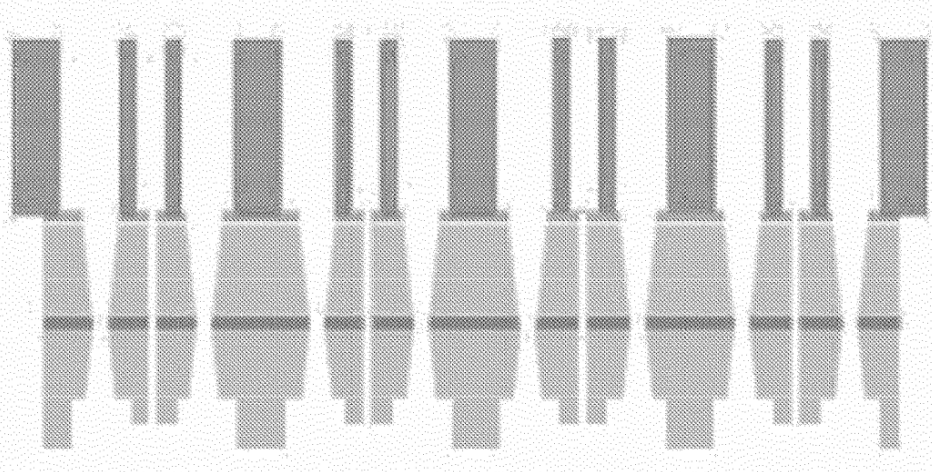
**Matriz microfluídica duplicada**



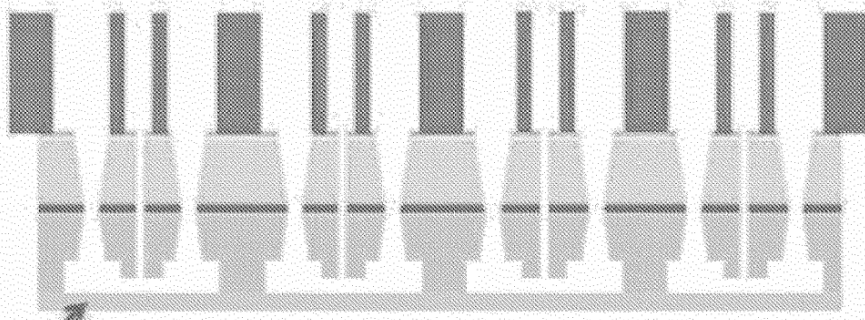
**FIG. 33C**



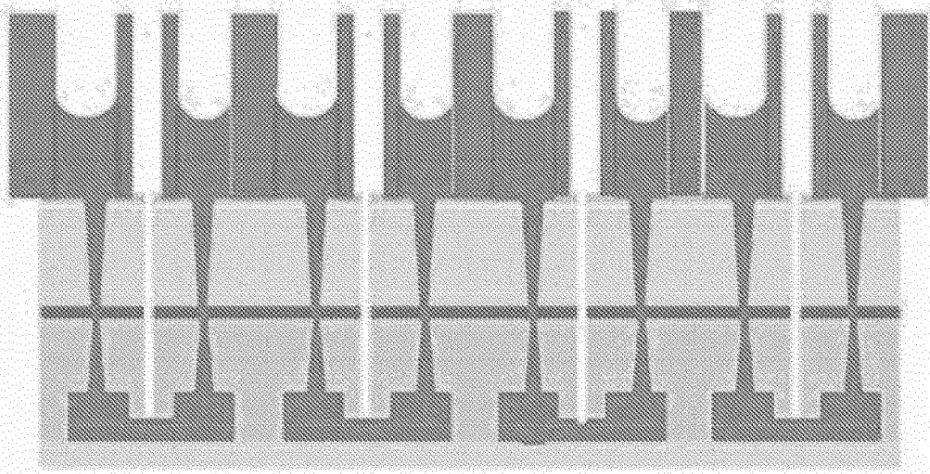
**FIG. 33D**



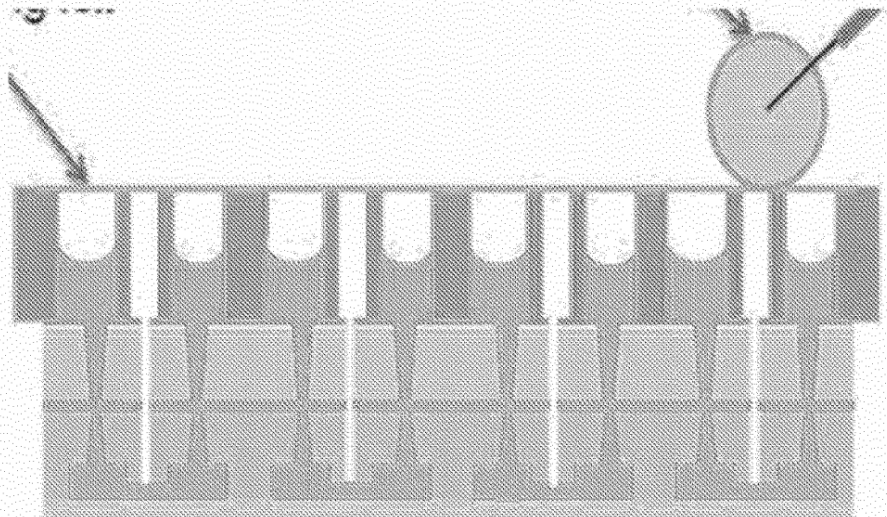
**FIG. 33E**



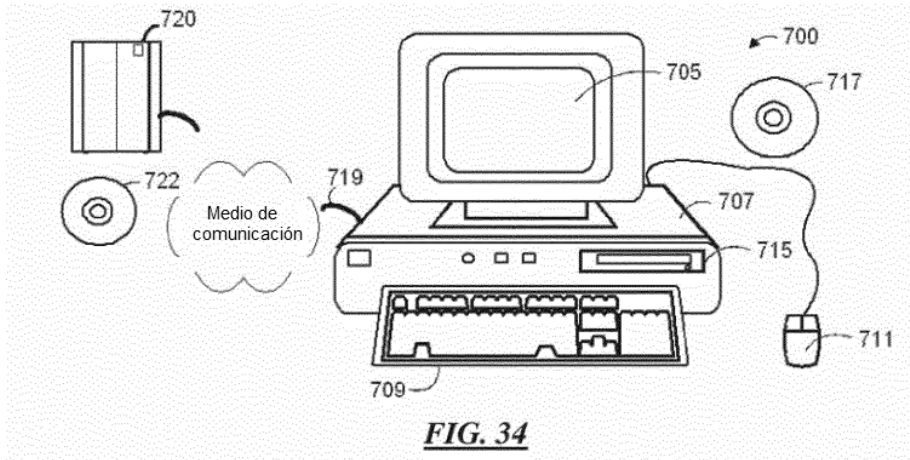
**FIG. 33F**



**FIG. 33G**



**FIG. 33H**



<i>Clasificación de enfermedad</i>	<i>Enfermedad</i>
<b><u>Enfermedad cardiovascular</u></b>	Aterosclerosis; Angina inestable; Infarto de miocardio; Reestenosis después de angioplastia u otra intervención percutánea; Insuficiencia cardíaca congestiva; Miocarditis; Endocarditis; Disfunción endotelial; Cardiomiopatía
<b><u>Enfermedad endocrina</u></b>	Diabetes mellitus I y II; Tiroiditis; Enfermedad de Addison
<b><u>Enfermedad infecciosa</u></b>	Hepatitis A, B, C, D, E; Malaria; Tuberculosis; VIH; Pneumocystis carinii; Giardia; Toxoplasmosis; Enfermedad de Lyme; Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas; Citomegalovirus; Virus de Epstein-Barr; Virus del herpes simple; Colitis por Clostridium difficile; Meningitis (todos los organismos); Neumonía (todos los organismos); Infección de las vías urinarias (todos los organismos); Diarrea infecciosa (todos los organismos)
<b><u>Angiogénesis</u></b>	Angiogénesis patológica; Angiogénesis fisiológica; Angiogénesis inducida por el tratamiento
<b><u>Enfermedad inflamatoria/reumática</u></b>	Artritis reumatoide; Lupus eritematoso sistémico; Enfermedad de Sjögren; síndrome de CREST; Esclerodermia; Espondilitis anquilosante; Crohn; Colitis ulcerosa; Colangitis esclerosante primaria; Apendicitis; Diverticulitis; Esclerosis biliar primaria; Granulomatosis de Wegener; Poliarteritis nodosa; Enfermedad de Whipple; Psoriasis; Poliangeítis microscópica; Enfermedad de Takayasu; Enfermedad de Kawasaki; Hepatitis autoinmune; Asma; Enfermedad de Churg-Strauss; Enfermedad de Beurger; Enfermedad de Raynaud; Colecistitis; Sarcoidosis; Asbestosis; Neumoconiosis
<b><u>Rechazo de trasplante</u></b>	Corazón; Pulmón; Hígado; Páncreas; Intestino; Médula ósea; Célula madre; Enfermedad de injerto contra huésped; Vasculopatía del trasplante
<b><u>Leucemia y linfoma</u></b>	

**FIG. 35. (TABLA 1)**