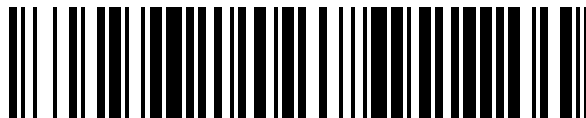


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 245 110**

21 Número de solicitud: 201932084

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

16.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)

Pedro Cerbuna, 12

50009 Zaragoza ES

72 Inventor/es:

GARCÍA AZNAR, José Manuel;

DEL AMO MATEOS, Cristina;

SANTOLARIA MAZO, Jorge y

BLANCO MONEO, Alejandro

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **DISPOSITIVO DE ENCAPSULADO APTO PARA APLICACIONES MICROFLUÍDICAS**

ES 1 245 110 U

DESCRIPCIÓN**DISPOSITIVO DE ENCAPSULADO APTO PARA APLICACIONES MICROFLUÍDICAS****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se enmarca en el ámbito de la microfluídica, es decir, de las aplicaciones científico-tecnológicas que utilizan sistemas para procesar o manipular cantidades pequeñas de fluidos, entre 10^{-18} y 10^{-9} litros, mediante canales cuyo tamaño
10 está comprendido entre decenas y cientos de micras. Más concretamente, la invención se refiere a un dispositivo encapsulado apto para diversas aplicaciones microfluídicas de tipo “laboratorio en chip”, cuyo objetivo principal es servir como plataforma compacta y aislada para realizar experimentación con cultivos celulares, permitiendo la aplicación de un amplio rango de flujos de fluido.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En los últimos años se ha comenzado a estudiar el comportamiento celular en tres dimensiones (3D) en sistemas microfluídicos, con el propósito de recrear mejor el
20 microambiente que las células soportan *in vivo* en los tejidos humanos. Para ello, y teniendo en cuenta que un gran porcentaje del cuerpo humano es líquido, resulta de gran interés investigar cómo responden las células sometidas a un flujo intersticial durante un tiempo determinado. En este sentido, es conocido el desarrollo de diversas tecnologías de chips microfluídicos y dispositivos destinados a este fin, fabricados habitualmente a
25 base de materiales poliméricos.

El campo de la microfluídica es un área en auge, puesto que con ella se ha introducido el ahorro de reactivos junto con el menor tamaño necesario para desarrollar a cabo los ensayos, lo que está permitiendo una reducción de los costes asociados, además de
30 recrear mejor el ambiente existente en los organismos vivos. Gracias a los sistemas microfluídicos, se pueden realizar gran cantidad de operaciones biológicas y/o químicas a una escala manejable, utilizando volúmenes de líquido relativamente pequeños. Estas operaciones son más eficaces, puesto que generalmente reducen los tiempos de respuesta de los citados organismos.

35

Para aplicar diferentes rangos de flujo en los dispositivos microfluídicos, se han utilizado tradicionalmente mecanismos tales como la diferencia de presión entre cada una de las

partes que componen el dispositivo en cuestión, aunque se ha demostrado que esta técnica condiciona en gran medida el desarrollo de los experimentos. En otros casos, la inyección del flujo se ha hecho directamente sobre los chips de microfluídica. Ello conlleva, en ocasiones, el desprendimiento de los hidrogeles que embeben las células a estudiar, debido a la presión ejercida sobre el interior del dispositivo. Las anteriores limitaciones técnicas han generado una necesidad creciente de desarrollar alternativas técnicas que consigan evitar daños a los geles insertados en los chips de microfluídica.

Asimismo, en el mercado existen sistemas encapsulados de mayor complejidad, tales como los distribuidos comercialmente por las empresas MYPA, Ikerlan, Micrux, Ebers Med Tech S.L., Mimetas, μ Fluidix, AIM Biotech, etc. No obstante, dichos sistemas no permiten su autoclavado y poseen un único alojamiento para su chip específico, lo cual dificulta replicar los ensayos. Adicionalmente, en la mayoría de estos sistemas las conexiones fluídicas se realizan de forma directa entre el conector (o aguja/tubo) y el polímero del chip, propiciando así la pérdida de adhesión del gel en el interior de éste. Los citados sistemas son, además, limitados en cuanto a su escalabilidad y producción a gran escala.

Otros dispositivos de encapsulado de chips se han propuesto, dentro del ámbito experimental, como soporte a ensayos de monitorización de chips microfluídicos, donde dichos chips se alojan en una base y se cierran con una cubierta. Ejemplos de dichos dispositivos se describen en las publicaciones: “Flow reversal at low voltage and low frequency in a microfabricated ac electrokinetic pump” (M. M. Gregersen et al.), *Physical Review E* 76, 056305 (2007); “A simple pneumatic setup for driving microfluidics” (T. Braschler et al.), *Lab on Chip*, 7, 420–422 (2007), y “Single-cell attachment and culture method using a photochemical reaction in a closed microfluidic system” (K. Jang et al.), *Biomicrofluidics* 4, 032208 (2010).

Si bien las anteriores referencias divulgan encapsulados que permiten realizar determinados ensayos puntuales sobre los chips, carecen de capacidad para su esterilización por autoclavado, ya que se basan en materiales que presentan altas deformaciones ante aumentos de temperatura, tales como las alcanzadas durante las esterilizaciones sucesivas realizadas para la repetición o realización de nuevos experimentos. En este contexto, los citados dispositivos del estado de la técnica no son, por tanto, reutilizables. Asimismo, muchos de los dispositivos citados no proporcionan flexibilidad para adaptarse a diferentes técnicas de monitorización del chip microfluídico, por ejemplo por medio de técnicas de microscopía 2D, 3D o 4D.

Según lo descrito, se hace necesario, en el presente campo técnico, desarrollar tecnologías de encapsulado que permitan reducir el daño sobre los geles alojados en los chips microfluídicos, que sean además aptos para su producción a escalas industriales y para su reutilización (incluso siendo sometidos a procesos intermedios de esterilización), y que permitan la monitorización microscópica óptica o confocal de las muestras alojadas mediante una gran variedad de técnicas. La presente invención está orientada a resolver dicha necesidad, por medio de un novedoso dispositivo de encapsulado basado en materiales metálicos y plásticos cuya combinación permite obtener las propiedades ventajosas descritas.

10

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN

El objeto de la invención se refiere pues a un dispositivo que, según se ha descrito en la sección anterior, permite la aplicación de diferentes condiciones de flujo en múltiples configuraciones de chips de microfluídica en un entorno celular específico. La invención permite, asimismo, la visualización en tiempo real del comportamiento celular mediante técnicas de microscopía 2D, 3D y 4D, lo que permite cuantificar el comportamiento celular en el espacio y en tiempo real ante diferentes condiciones de flujo. Adicionalmente, el dispositivo de la invención permite su autoclavado para la realización de ensayos sucesivos, y puede fabricarse a gran escala con gran facilidad, mejorando las alternativas conocidas del estado de la técnica.

15

20

Dicho objeto de la invención se realiza, preferentemente, mediante un dispositivo de encapsulado apto para aplicaciones microfluídicas, que comprende al menos un elemento base y al menos un elemento tapa, entre los cuales se define un espacio principal de alojamiento de un chip microfluídico, donde:

25

- el elemento tapa comprende uno o más orificios de conexión de un canal de entrada o salida de fluido al chip microfluídico, a través de dicho elemento tapa; y

- el elemento base y el elemento tapa comprenden medios de unión mecánica correspondientes, adaptados para cerrar el espacio principal de alojamiento del chip microfluídico.

30

Además, en dicho dispositivo, ventajosamente:

- el elemento base comprende una superficie principal metálica, adaptada para soportar el elemento tapa;

35

- el elemento tapa comprende una superficie principal plástica formada a base de una o más resinas fotopolimerizables, directamente obtenibles por técnicas de impresión

por prototipado en 3D, y donde dicha tapa está adaptada para disponerse sobre la superficie principal metálica del elemento base y cerrarse sobre la misma mediante el ajuste de los medios de unión mecánica.

- 5 En una realización preferente de la invención, el elemento base comprende aluminio o aluminio anodizado.

En otra realización preferente de la invención, el dispositivo comprende dos o más elementos base y dos o más elementos tapa correspondientes, definiendo una pluralidad de espacios principales de alojamiento de chips microfluídicos aptos para el alojamiento simultáneo de una pluralidad de chips microfluídicos.

En otra realización preferente de la invención, el elemento base y el elemento tapa son reutilizables y esterilizables.

15

En otra realización preferente de la invención, el elemento tapa presenta un comportamiento elástico respecto al elemento base tal que permite un cierre estanco de dichos elementos mediante el ajuste de los medios de unión mecánica.

20 En otra realización preferente de la invención, el elemento tapa comprende, en una región interior contigua al espacio principal de alojamiento del chip microfluídico, uno o más rebajes equipados con juntas de conexión integradas en los orificios de conexión, y correspondientes a una o más entradas o salidas de fluido al chip microfluídico.

25 En otra realización preferente de la invención, el elemento tapa comprende una o más superficies de encaje en el interior del elemento base.

En otra realización preferente de la invención, el elemento tapa comprende una geometría en relieve correspondiente con las dimensiones del chip microfluídico a alojar.

30

Otro objeto de la invención se refiere a un sistema de monitorización microfluídica que comprende un dispositivo de encapsulado según cualquiera de las realizaciones aquí descritas, en combinación con uno o más dispositivos de microscopía dispuestos para la monitorización en 2D, 3D o 4D del chip microfluídico a alojar.

35

En una realización preferente de dicho sistema, la tapa del dispositivo de encapsulado comprende al menos una ventana de inspección óptica que comunica con el chip

microfluídico, y que está dispuesta para facilitar el acceso por parte de los dispositivos de microscopía.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

Figura 1: Vista general en perspectiva del dispositivo de encapsulado de la invención, según una realización preferente de la misma, donde se muestran sus elementos principales.

10

Figuras 2a-2d: Vistas en alzado y planta de la tapa (Figs. 2a-2b) y de la base (Figs. 2c-2d) del dispositivo de la invención, según una primera realización preferente de la misma.

Figuras 3a-3b: Vistas en alzado y planta de la base del dispositivo de la invención, según una segunda realización preferente de la misma que comprende múltiples alojamientos de chips microfluídicos.

15

Figura 4: Vista general en perspectiva del dispositivo de la invención, según la realización preferente de la misma mostrada en las Figs. 3a-3b.

20

Referencias numéricas utilizadas en los dibujos:

(1)	Elemento base
(1')	Alojamiento del chip microfluídico
(2)	Elemento tapa
(3)	Medios/Orificios de conexión microfluídica de la tapa
(3')	Juntas de conexión
(4)	Uniones mecánicas de la base y la tapa
(5)	Ventana de inspección óptica del chip microfluídico

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

Diferentes ejemplos de realizaciones preferentes del dispositivo de la invención se muestran en las Figuras 1-4 del presente documento. En dichas figuras, se aprecia cómo el citado dispositivo consta, principalmente, de dos elementos: un elemento base (1) y un elemento tapa (2), que en su conjunto sirven como herramienta para la aplicación de flujo a dispositivos microfluídicos de tipo chip, preferentemente fabricados con base polimérica (comprendiendo, típicamente, polidimetil-siloxano (PDMS)) en un entorno celular

30

concreto. No obstante, la utilización de este material no supone un uso restringido

únicamente a este tipo de dispositivos, pudiendo adaptarse sin limitación a otros chips fabricados con diferentes materiales que mantengan unas dimensiones concretas, y que sean susceptibles de monitorización mediante microscopía.

5 El elemento base (1) está fabricado preferentemente a base de un material metálico, y consta de uno o más alojamientos (1') en los que se dispone el chip microfluídico a visualizar y manipular. Ello permite obtener una plataforma sólida de soporte de dicho dispositivo, asegurando la estabilidad del mismo durante la realización de los experimentos. Asimismo, la posibilidad de incluir más de un alojamiento (1') en el
10 dispositivo permite la duplicidad simultánea de los ensayos colocados en flujo, con visualización microscópica tridimensional en tiempo real, así como una nula interferencia para su utilización en microscopía (por ejemplo, microscopía confocal). En las Figuras 3 y 4 se muestra una realización preferente de la invención donde la base (1) comprende dos alojamientos (1') de dispositivos microfluídicos.

15

El elemento base (1) es preferentemente reutilizable, y puede ser sometido a procesos de esterilización en autoclave, así como a una exposición prolongada en el tiempo a temperaturas del orden de 37 °C durante el desarrollo de los ensayos. Para ello, se seleccionará, preferentemente, el aluminio, ya que es más estable que otros metales,
20 como podría ser el acero inoxidable, cuando se somete a temperaturas de 37°C durante períodos de tiempo prolongados. Opcionalmente, el posterior anodizado del aluminio se puede utilizar para reducir o evitar el deterioro de la base (1) por factores ambientales, tales como la humedad.

25 De este modo, el material metálico empleado para la base (1) presenta un comportamiento óptimo ante variaciones de temperatura, con unas deformaciones despreciables ante estas condiciones de trabajo durante su funcionamiento y uso.

En cuanto a las dimensiones preferentes del elemento base (1), éstas siguen
30 preferentemente las especificaciones de la norma ANSI/SBS (1-4)-2004, siendo así el dispositivo de la invención compatible con todo tipo de microscopios dotados de un adaptador para microplacas.

Por su parte, el elemento tapa (2) está fabricado preferentemente con un material plástico
35 a base de resinas fotopolimerizables, aptas para su impresión mediante técnicas de fabricación aditiva (impresión 3D). La selección de estos materiales específicos consigue el doble efecto de: (i) permitir una producción a gran escala de dicha tapa (2), adaptable a

cualquier geometría de chips utilizados, y (ii) proporcionar la capacidad de de soportar altas temperaturas de esterilización (superiores a 100°C en tiempos cortos correspondientes a las operaciones de autoclavado), y ser además adaptable a las pequeñas deformaciones que pueda sufrir el material con el paso del tiempo, no afectan ni a la inyección del flujo ni a la visualización microscópica del chip. De este modo, la combinación del material metálico (y especialmente del aluminio) de la base (1) con el material plástico basado en resinas fotopolimerizables de la tapa (2) confieren, en la presente invención, la capacidad de mejorar sustancialmente las soluciones conocidas y superar las limitaciones de las mismas.

10

Así, la combinación de dos tipos distintos de materiales para la fabricación de la invención (metal para la base (1) y fotorresina plástica imprimible en 3D para la tapa (2)) aporta al dispositivo una gran estabilidad en su estado final de montaje (con deformaciones despreciables en un rango de temperaturas entre 35-39°C), y también una gran adaptabilidad al chip microfluídico, debido a la mayor capacidad de deformación del elemento tapa (2).

15

Por otra parte, y según se aprecia en las Figuras 1-4, el elemento tapa (2) presenta unos orificios (3) roscados (por ejemplo, de tipo 10-32 UNF), los cuales permiten realizar las conexiones con los tubos para la aplicación del flujo, de forma rápida y sencilla.

20

El comportamiento elástico del material plástico utilizado facilita, además, el ajuste óptimo de ambos elementos, base (1) y tapa (2). Por otro lado, para garantizar adicionalmente la estanqueidad del dispositivo en su unión con el chip, en la parte interior de la tapa (2) pueden disponerse uno o más rebajes, configurados con una o más juntas (3') tóricas u "o-rings" integrados en los orificios (3) roscados de la tapa (2), de forma correspondiente a cada uno de los orificios de entrada/salida del chip microfluídico alojado. De este modo, se asegura una correcta conexión microfluídica del dispositivo al citado chip.

25

Asimismo, exteriormente el dispositivo está conectado, preferentemente, a una pluralidad de tubos de circulación de flujo comprendidos en el circuito microfluídico del que formará parte, típicamente, la invención durante su uso. La conexión entre los tubos y el dispositivo se realiza, preferentemente, mediante un conector rápido roscado a la tapa (2) y conectado al tubo, por el que entrará o saldrá del dispositivo, por ejemplo uniéndose al final de su recorrido a una jeringa, u otros medios similares utilizados para provocar el desplazamiento de flujo en el circuito microfluídico desde o hacia el dispositivo. El diseño

30
35

propuesto resulta especialmente adecuado para garantizar su estanqueidad, y evitar la aparición de burbujas en el citado circuito.

5 Por su parte, el acoplamiento entre los dos elementos (1, 2) principales del dispositivo se realiza, preferentemente, mediante uniones mecánicas (4) roscadas tuerca-tornillo, en una pluralidad de puntos del soporte (por ejemplo, seis puntos en las realizaciones mostradas en las Figuras 1-4), garantizando una adecuada fijación y estabilidad del dispositivo. La tapa (2) puede incluir, adicionalmente, un diseño de encaje en el interior de la base (1), presentando por ejemplo una geometría en relieve correspondiente con la
10 del chip microfluídico a alojar, con el objetivo de evitar un mal montaje de éste en el encapsulado, mediante un diseño de tipo Poka-Yoke.

Como se ha mencionado, según la descripción proporcionada la invención está orientada para facilitar al usuario el análisis 4D de los efectos del flujo de fluido aplicado a cultivos
15 celulares en 3D, aunque también se puede utilizar sin limitación para el estudio de cultivos bidimensionales. Para facilitar la monitorización del chip a través del dispositivo, la tapa (2) comprende, preferentemente, al menos una ventana (5) de inspección óptica que comunica con el chip microfluídico, y que está dispuesta para facilitar el acceso por parte del sistema de microscopía utilizado para registrar la actividad en el chip durante los
20 ensayos.

A modo de resumen, se describen de nuevo las ventajas principales de la invención:

- Combinación de un material metálico en la base y un material plástico en
25 la tapa, para adaptarse a las pequeñas deformaciones que pudiera sufrir el material de la impresora 3D, compensándose gracias a las diferencias de coeficientes de elasticidad de ambos materiales.

- Acoplamiento sencillo basado preferentemente en uniones atornilladas,
30 que permite regular en altura y ajustar la tapa (2) a las dimensiones del chip que se aloja en su interior.

- Capacidad de realizar una multiplicidad de ensayos simultáneos,
mediante el uso de una pluralidad de alojamientos de chips en la base (1).
35

- Versatilidad para adaptar el dispositivo a todo tipo de chips, así como a diferentes tamaños de los mismos por la simplicidad del proceso de fabricación de

la invención. A su vez, las dimensiones típicas y adaptables del dispositivo lo hacen compatible con cualquier tipo o marca de microscopio.

5 El dispositivo de la invención se ha aplicado experimentalmente con éxito para la circulación de fluido a cultivos celulares. A lo largo de la exposición a flujo, no se han visto fugas en el montaje y se ha conseguido la difusión de éste a través del gel durante días, manteniéndose su integridad, sin ningún tipo de fugas. Para probar la resistencia a la temperatura de cada uno de los elementos (1, 2) que forman el dispositivo, ambos se han sometido a ciclos de autoclavado, observándose una nula o mínima deformación en
10 la tapa (2) que no afecta al comportamiento global del dispositivo, gracias a la adecuada selección de sus materiales de fabricación.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo de encapsulado apto para aplicaciones microfluídicas, que comprende al menos un elemento base (1) y al menos un elemento tapa (2), entre los
5 cuales se define un espacio principal de alojamiento (1') de un chip microfluídico, donde:

- el elemento tapa (2) comprende uno o más orificios de conexión (3) de un canal de entrada o salida de fluido al chip microfluídico, a través de dicho elemento tapa (2); y

- el elemento base (1) y el elemento tapa (2) comprenden medios de unión mecánica (4) correspondientes, adaptados para cerrar el espacio principal de alojamiento
10 (1') del chip microfluídico;

estando dicho dispositivo **caracterizado por que:**

- el elemento base (1) comprende una superficie principal metálica, adaptada para soportar el elemento tapa (2);

- el elemento tapa (2) comprende una superficie principal plástica formada a base
15 de una o más resinas fotopolimerizables, directamente obtenibles por técnicas de impresión por prototipado en 3D, y donde dicha tapa (2) está adaptada para disponerse sobre la superficie principal metálica del elemento base (1) y cerrarse sobre la misma mediante el ajuste de los medios de unión mecánica (4).

20 2.- Dispositivo según la reivindicación anterior, donde el elemento base (1) comprende aluminio o aluminio anodizado.

3.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dos o más elementos base (1) y dos o más elementos tapa (2)
25 correspondientes, definiendo una pluralidad de espacios principales de alojamiento (1') de chips microfluídicos aptos para el alojamiento simultáneo de una pluralidad de chips microfluídicos.

30 4.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento base (1) y el elemento tapa (2) son reutilizables y esterilizables.

5.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento tapa (2) presenta un comportamiento elástico respecto al elemento base (1) tal que permite un cierre estanco de dichos elementos (1, 2) mediante el ajuste de los
35 medios de unión mecánica (4).

6.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento tapa (2) comprende, en una región interior contigua al espacio principal de alojamiento (1') del chip microfluídico, uno o más rebajes equipados con juntas de conexión (3') integradas en los orificios (3) de conexión, y correspondientes a una o más
5 entradas o salidas de fluido al chip microfluídico.

7.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento tapa (2) comprende una o más superficies de encaje en el interior del elemento
10 base (1).

8.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento tapa (2) comprende una geometría en relieve correspondiente con las dimensiones del chip microfluídico a alojar.

9.- Sistema que comprende un dispositivo de encapsulado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en combinación con uno o más dispositivos dispuestos para la monitorización microscópica en 2D, 3D o 4D del chip microfluídico a alojar.
15

10.- Sistema según la reivindicación anterior, donde la tapa (2) del dispositivo de encapsulado comprende al menos una ventana (5) de inspección óptica que comunica con el chip microfluídico, y que está dispuesta para facilitar el acceso por parte de los dispositivos de microscopía.
20

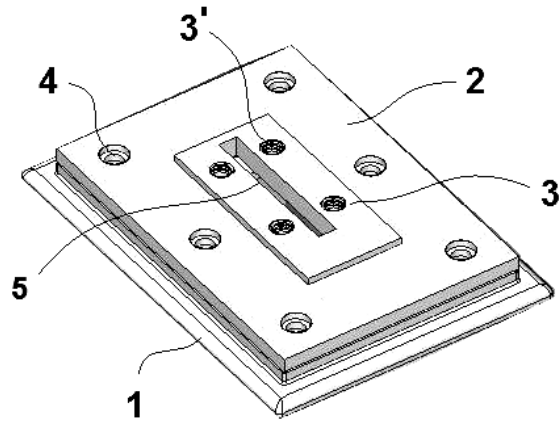


FIG. 1

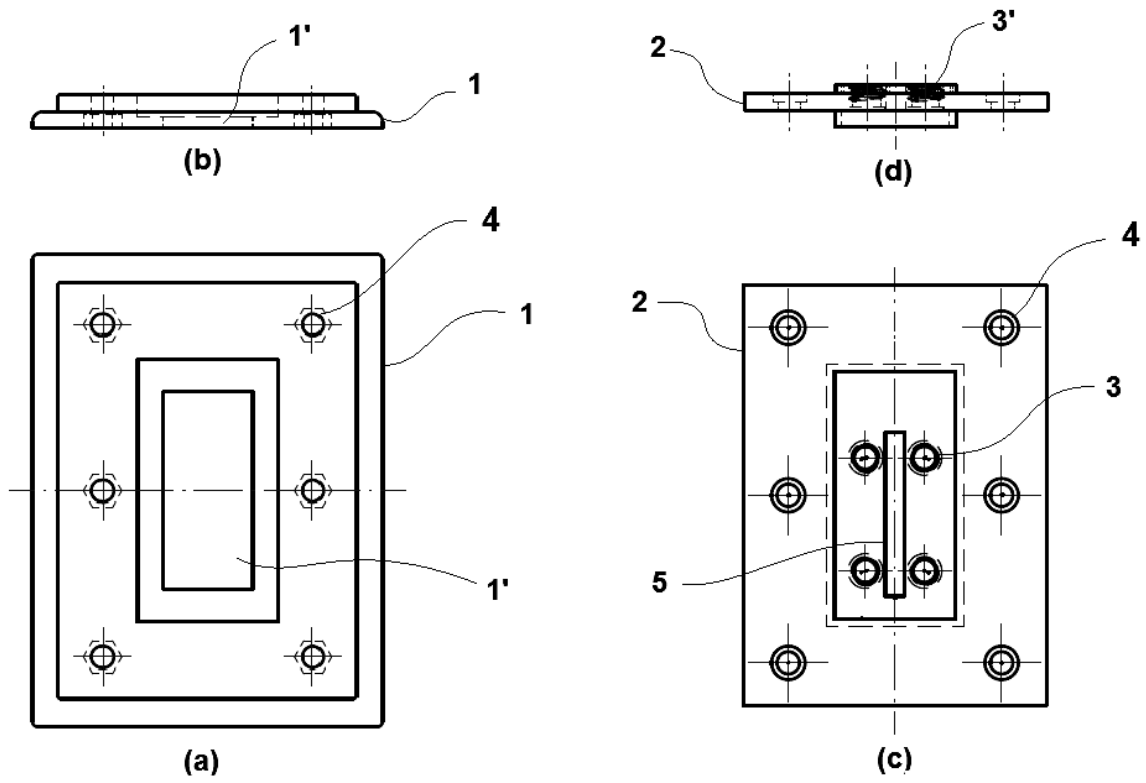


FIG. 2

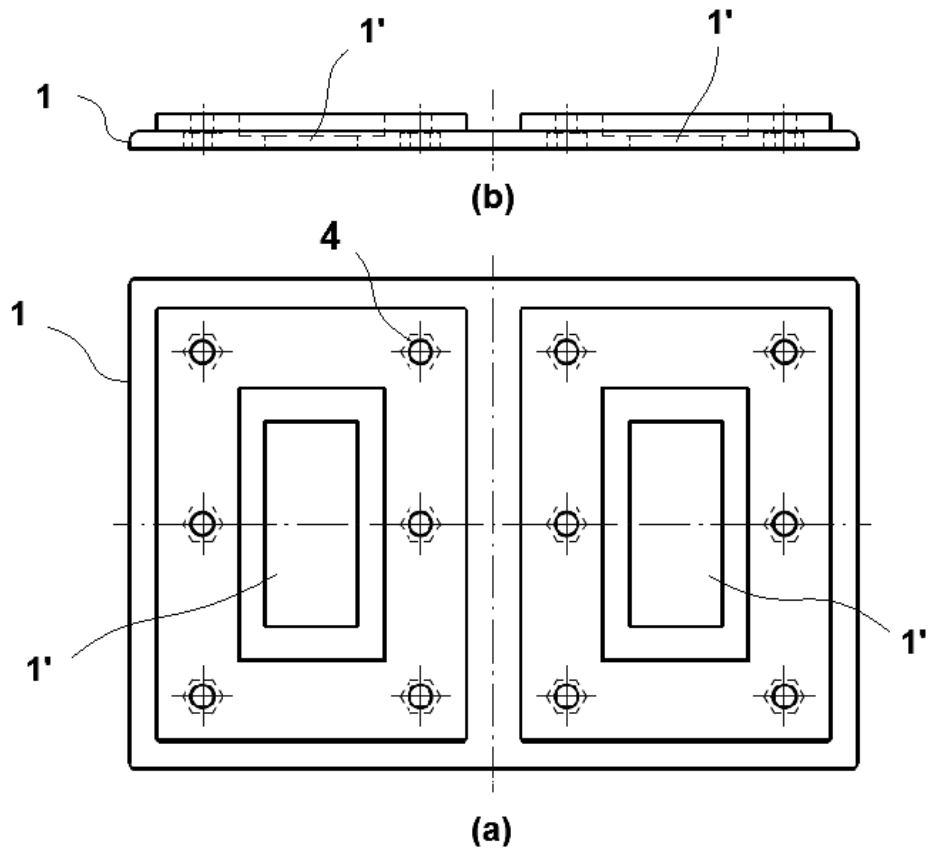


FIG. 3

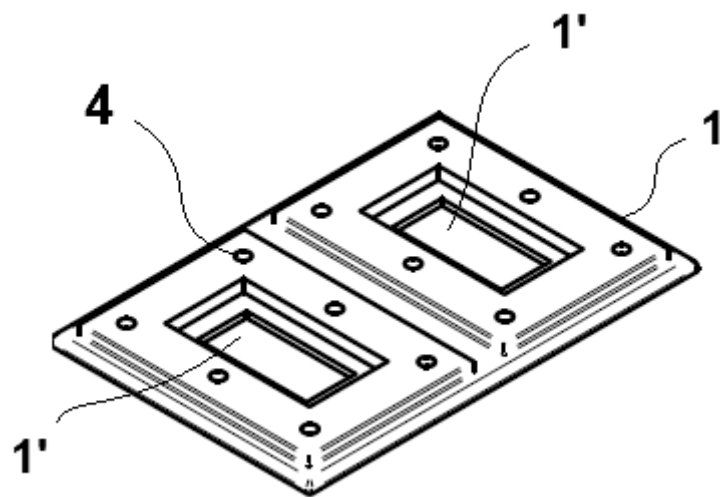


FIG. 4