

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 367**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2005 E 05779763 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1773978**

54 Título: **Modelos tridimensionales de enfermedades de células/tejidos perfundidos**

30 Prioridad:

**19.05.2004 US 572583 P**

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

**09.05.2014**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (50.0%)  
77 Massachusetts Avenue  
Cambridge, MA 02139, US y  
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOMANSKY, KAREL;  
GRIFFITH, LINDA G.;  
TANNENBAUM, STEVEN R.;  
WELLS, ALAN y  
INMAN, SAMUEL WALKER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 459 367 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

Modelos tridimensionales de enfermedades de células/tejidos perfundidos

## Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/572.583 presentada en la Oficina de Patentes y Marcas de EE.UU. el 19 de mayo de 2004.

## Antecedentes de la invención

10 La presente descripción está relacionada con una distribución de biorreactores perfundidos en un formato de "placa de múltiples pocillos", en donde cada biorreactor de la distribución consiste en una matriz a microescala sembrada con células que forma un microtejido, múltiples tejidos y/o un agregado de células y con métodos para utilizar la distribución en ensayos de alta producción, por ejemplo, para determinar el efecto de agentes biológicos y/o químicos en las distribuciones de tejido a microescala, estudiar las interacciones tejido-tejido, o para detectar la presencia de agentes biológicos y/o químicos. La invención proporciona un aparato según se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 La ingeniería de tejidos ha surgido como un campo científico que tiene el potencial para ayudar en la terapia humana mediante la producción de tejidos y órganos anatómicos con la finalidad de realizar trasplantes y cirugía reconstructiva. Combina los campos científicos de la ciencia de materiales, la biología celular y molecular y la medicina para crear nuevos dispositivos para la sustitución, la reparación y la reconstrucción de tejidos y estructuras dentro del cuerpo. En la última década se han propuesto muchos planteamientos. Un planteamiento es combinar células específicas de tejido con unos armazones (*scaffolds*) porosos abiertos de polímero que luego pueden implantarse. Al dispositivo de polímero puede añadirse una gran cantidad de células en un cultivo celular y puede mantenerse por difusión. Después de la implantación, se produce el crecimiento hacia el sistema vascular, las células se modelan de nuevo y a medida que el polímero se degrada por hidrólisis se crea un nuevo tejido estable.

20 Se han descrito varios planteamientos para fabricar dispositivos de regeneración de tejido para el crecimiento de células in vitro o in vivo. Se han descrito dispositivos poliméricos para sustituir la función de órganos o proporcionar un soporte estructural. Se informó de ese tipo de métodos por parte de Vacanti, et al, Arch. Surg. 123:545-49 (1988); Patente de EE.UU. nº 4.060.081 de Yannas, et al.; Patente de EE.UU. nº 4.485.097 de Bell; y Patente de EE.UU. nº 4.520.821 de Schmidt, et al. En general, los métodos utilizados por Vacanti, et al., y Schmidt, et al., pueden ponerse en práctica seleccionando y adaptando composiciones existentes de fibra de polímero para la implantación y el sembrado con células, mientras que los métodos de Yannas y Bell producen unas estructuras de colágeno modificado semejantes a esponjas.

25 Si el dispositivo tiene un grosor significativo, los dispositivos de regeneración de tejidos deben ser porosos, con los poros interconectados para permitir la penetración de las células y los tejidos. Los factores tales como el tamaño de poro, la forma y la sinuosidad pueden afectar al crecimiento hacia dentro del tejido pero son difíciles de controlar utilizando técnicas estándar de procesamiento. La patente de EE.UU. nº 5.518.680 de Cima & Cima describe el uso de técnicas de fabricación de sólidos de forma libre, especialmente impresión tridimensional de polvos de polímero, para formar matrices que pueden sembrarse con células disociadas e implantadas para formar nuevas estructuras. Son fácilmente evidentes las ventajas de los métodos de sólidos de forma libre para construir estructuras específicas de polímeros biocompatibles, sintéticos o naturales, materiales inorgánicos o compuestos de materiales inorgánicos con polímeros, en los que la estructura resultante tiene tamaños de poro, formas y orientaciones definidos, particularmente tamaño de poro y orientaciones diferentes dentro del mismo dispositivo, con más de una textura o química de superficie en sitios especificados diferentes dentro del dispositivo. Sin embargo, los dispositivos todavía tienen una limitación mayor: el crecimiento hacia dentro del tejido nuevo para formar vasos sanguíneos que sustentan a las células implantadas debe producirse en el momento correcto con respeto a la creciente densidad de células dentro de la matriz para sustentar a las células implantadas, y otros tejidos no deben encapsular ni infiltrarse en la matriz para retardar el crecimiento o destruir de otro modo a las células implantadas.

30 El documento PCT/US96/09344 de Massachusetts Institute of Technology y Childrens' Medical Center Corporation describe el uso de métodos de fabricación de forma libre sólida (SFF, *solid free-form fabrication*) para fabricar dispositivos que permitan la regeneración de tejidos y para sembrar e implantar células para formar componentes estructurales y órganos, que además que puedan proporcionar una liberación controlada de agentes bioactivos, en donde la matriz se caracteriza por una red de pasos internos funcionalmente equivalentes a los que se producen naturalmente en el sistema vascular del tejido formado por las células implantadas, y que pueda forrarse con células endoteliales y acoplarse a vasos sanguíneos u otros conductos en el momento de implantación para formar una red dúctil o vascular a través de la matriz.

35 Nada de esta tecnología proporciona sin embargo unos medios para mantener el tejido in vitro, ni utiliza el tejido como una herramienta de diagnóstico o cribado. Las células colocadas en un cultivo típico in vitro generalmente pierden por lo menos alguna función fisiológica diferenciada clave que normalmente exhiben como parte de tejidos organizados en el cuerpo. De este modo, si bien las células cultivadas pueden ser adecuadas para ciertas aplicaciones, por ejemplo, en la detección de toxinas y patógenos, ciertamente fallan en otras aplicaciones, por

ejemplo, cribado de fármacos que son metabolizados por los tejidos, o fármacos que se eliminan por la interacción con un órgano complejo, no simplemente un solo tipo de célula aislada. Por ejemplo, existen modelos de infección que no son in vitro para el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus de la hepatitis C (HCV), presumiblemente porque los hepatocitos primarios en situaciones típicas de cultivo detienen rápidamente la expresión de los receptores, de las superficie celular, que utilizan los virus para entrar en la célula. A partir de este ejemplo de un patógeno conocido, que actualmente no se puede examinar utilizando células cultivadas, se puede inferir que los patógenos (o las toxinas) desconocidos, que a menudo utilizan la captación mediada por receptor, podrían eludir similarmente la detección en células cultivadas. Similarmente, en tales sistemas tampoco pueden probarse los fármacos que deben ser unidos por receptores específicos de células que serán captados por las células para ser activas. El metabolismo xenobiótico, que principalmente es llevado a cabo por un conjunto de enzimas en el hígado, es otra función que pierden rápidamente los hepatocitos cultivados. Aunque las enzimas hepáticas producen la mayoría de los compuestos exógenos menos tóxicos, otras moléculas (como un ejemplo común, el paracetamol, fármaco para alivio del dolor) puede llegar a ser realmente más tóxico cuando es metabolizado por el hígado. Por lo tanto es crítico tener un sistema para el cribado de fármacos que pueda imitar las condiciones in vivo.

Actualmente, los modelos que no son in vitro o los modelos de animales captan adecuadamente las respuestas complejas de los tejidos humanos a los fármacos y agentes ambientales. Por otra parte un modelo que no es in vitro capta la biología compleja de las interacciones de células tumorosas con los tejidos normales adyacentes. Cada año, muchos nuevos fármacos fallan en los ensayos clínicos iniciales debido a una toxicidad imprevista, especialmente toxicidad de hígado, o debido a no tener en cuenta como metaboliza el hígado los agentes contra los tumores. Las células hepáticas pierden rápidamente las funciones específicas del hígado cuando se colocan en un cultivo. De este modo, en el tejido hepático humano in vitro no es posible evaluar la toxicidad a largo plazo de los fármacos. Además, las fuentes de células hepáticas humanas son escasas, y no pueden satisfacer la demanda para los ensayos basados en células y tejidos en la industria farmacéutica. Además la capacidad de cultivar tejido humano proporciona la oportunidad de crear modelos de metástasis de una única célula y las primeras fases del crecimiento tumoral, proporcionando un medios para cultivar el cáncer que es difícil de cultivar, para predecir la propensión de un tumor dado a metastatizar y crecer para estudiar la biología del tumor, y para probar la eficacia de los compuestos contra el cáncer.

Los actuales métodos del estado de la técnica para cultivo 2D y 3D no permiten la perfusión a través de la masa tisular de una manera que reproduzcan el flujo fisiológico.

La patente de EE.UU. nº 6.197.575 de Griffith, et al., describe una micromatriz y un conjunto de perfusión adecuado para la siembra, conexión y cultivo de tejido jerárquico complejo o estructuras de órganos.

Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un aparato para los análisis in vitro que modele eficazmente enfermedades en el tejido y/o en órganos pero que no necesite tejido ni órganos.

#### **Compendio de la invención**

La invención proporciona un aparato que comprende una distribución de pares aislados de biorreactor de perfusión y depósito, para cultivar células o tejido, el aparato comprende

un colector de fluidos que comprende una distribución de pares aislados de biorreactor de perfusión y depósito para el cultivo celular o tisular, y

un colector de control que comprende canales de control común accionados en paralelo para actuar simultáneamente sobre cada par de biorreactores y depósitos,

en donde cada par fluidamente aislado, de biorreactor de perfusión y depósito, se conecta por un canal de fluido que permite la recirculación de un medio de cultivo celular,

en donde cada par, de biorreactor de perfusión y depósito, se aísla fluidamente de todos los otros pares, de biorreactores de perfusión y depósitos,

en donde cada canal de control se separa de la válvula de fluido por un diafragma de canal de fluido, definida por una membrana monolítica elastomérica emparedada que puede ser desviada a una cámara de desplazamiento de válvula por un accionamiento hidráulico o neumático que utiliza los canales de control común para hacer circular el medio a través de la distribución de pares de biorreactor y depósito por lo que las válvulas definen unas bombas para el medio de cultivo,

en donde las válvulas de cada par de biorreactor y depósito se conectan en serie y en donde las válvulas de todos los biorreactores en la distribución son accionadas en paralelo a través de los canales de control común,

en donde el volumen del medio de cultivo celular bombeado a través del canal de fluido al biorreactor o al depósito se determina por el volumen de la cámara de desplazamiento de válvula, y

en donde cada biorreactor de perfusión comprende una estructura tridimensional desmontable de soporte de células o tejidos a través de la que se perfunde el medio de cultivo celular.

En las reivindicaciones dependientes adjuntas se establecen características opcionales.

- 5 Se ha construido un sistema que recapitula las características de un lecho capilar a través de tejido humano normal. El sistema facilita la perfusión de monocultivos celulares tridimensionales (3D) y co-cultivos de células heterotípicas a escala de la longitud del lecho capilar. El sistema también permite la adición de un segundo tipo de célula tal como una célula tumoral después de que se ha formado el tejido. Una característica mayor es que el sistema puede utilizarse dentro de un formato de "placa de múltiples pocillos" susceptible de ensayos de alto rendimiento compatibles con el tipo de robótica utilizada comúnmente en el desarrollo farmacéutico. El sistema proporciona unos medios para realizar ensayos de toxicología y metabolismo y como modelo para enfermedades humanas, tales como enfermedades hepáticas, inclusive la hepatitis, patologías relacionadas con la exposición y el cáncer. Las aplicaciones relacionadas con el cáncer incluyen el cáncer primario de hígado así como la metástasis a partir de otros cánceres, y para ligar el metabolismo de los fármacos con la actividad anti-tumoral. El sistema es particularmente útil para las enfermedades complejas y crónicas, tales como el cáncer, la infección vírica y la fibrosis crónica de hígado. El sistema también puede utilizarse como unos medios para probar planteamientos de terapia génica para tratar enfermedades y defectos genéticos innatos.

### Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 es una vista (superior) isométrica de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- 20 La Figura 2 es una vista (inferior) isométrica de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- La Figura 3 es una vista (superior) en despiece ordenado de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos. Por simplicidad, sólo se muestra una distribución de 5 biorreactores.
- 25 La Figura 4 es una vista (inferior) en despiece ordenado de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- La Figura 5 es una vista isométrica detallada del armazón de una distribución de biorreactores perfundidos con formato de placa de múltiples pocillos.
- La Figura 6 es una vista isométrica con la tapa retirada de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- 30 La Figura 7 es una vista superior con la tapa retirada de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- La Figura 8 es una sección transversal A-A de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- 35 La Figura 9 es una sección transversal B-B de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.
- La Figura 10 es una vista de detalle C de la sección transversal A-A de un ensayo de biorreactores perfundidos en formato de placa de múltiples pocillos.

### Descripción detallada de la invención

#### I. Sistema

- 40 Se ha desarrollado un sistema, y los métodos de fabricación y utilización del mismo, sobre la base de un planteamiento de micromatriz perfundida modificada para utilizar medios sumamente paralelos para hacer circular un medio de cultivo celular a través de las micromatrices de tejido u estructuras de órganos, haciendo que la tecnología sea extremadamente apropiada para ensayos de altos rendimiento. Este sistema tiene aplicación para probar la toxicidad de fármacos, modelos de metástasis de cáncer, cultivo de células madre y de otros modelos de enfermedades humanas. El sistema tiene como componentes básicos una distribución densa de pares, de biorreactor de perfusión y depósito, para el cultivo de células o tejidos, y unas válvulas y bombas accionadas en paralelo a través de canales de control común y recirculación de un medio a través de la distribución de pares de biorreactor y depósito. Cada biorreactor de la distribución incluye un pocillo de biorreactor y su propio pocillo de depósito. Los pocillos de biorreactor y los pocillos de depósito se conectan por canales de fluido que permiten la recirculación del medio de cultivo celular. Cada par de biorreactor/depósito se aísla para fluidos de todos los otros pares de biorreactor/depósito en la distribución. Las válvulas y las bombas de todos los biorreactores en la distribución son accionadas en paralelo a través de unos canales comunes, hidráulicos o neumáticos, de control.

Los pares de biorreactor/depósito se fabrican o microfabrican en el colector de fluido. Los canales de control se fabrican o microfabrican en el colector de control. Las válvulas de diafragma se crean al emparedar una membrana monolítica elastomérica entre colectores de fluido y de control. La membrana entre los canales de control y de fluido puede desviarse por el accionamiento hidráulico o neumático aplicado mediante los canales de control. El medio de cultivo celular en múltiples biorreactores se bombea por el accionamiento secuencial de las válvulas conectadas en serie.

Cada biorreactor incluye un pocillo que incluye una estructura tridimensional de soporte de células/tejidos. En una realización preferida, el portador o armazón de células se hace de un material poroso natural o sintético. En la realización más preferida, el armazón de células se forma por una distribución de microcanales en una película u hoja sólidas soportadas por una membrana o filtro microporosos. En una realización particularmente preferida, los armazones pueden eyectarse manual o robóticamente de los pocillos de biorreactor. En una realización preferida, todos los pares de biorreactores/depósito en la distribución son cubiertos por una tapa desmontable, y mediante pipeteo o robótica se puede añadir siembra de células/tejido, adición de agente o recogida de muestras.

En una realización, representativa de sistemas para el uso en esta memoria, la distribución por simplicidad sólo incluye cinco pares de biorreactor/depósitos en el formato de placa de múltiples pocillos como se muestra en las Figuras 1-10. Sin embargo, el tamaño de los componentes puede reducir a escala fácilmente y en una sola placa puede colocarse un número considerablemente mayor de pares de biorreactor/depósito. En la realización actual, el diseño de la distribución de biorreactores perfundidos en el formato de placa de múltiples pocillos se ha mejorado al aumentar el número de reactores por placa desde el prototipo original de cinco reactores a un prototipo de doce reactores, así como al aumentar la capacidad de células de cada reactor. Los armazones son ahora accesibles desde la parte superior y los orificios de ventilación se han eliminado de la placa. El principal componente funcional de cada biorreactor es un pocillo 4 con un armazón o portador 8 que contiene células/tejido 3D. El diseño también se ha mejorado al incluir unos bordes en los pocillos para reducir el menisco de la superficie de fluido y minimizar de ese modo la distorsión óptica durante la observación de células/tejidos en un microscopio; y hacer los pares de reactor/depósito en una disposición de chimenea para minimizar la contaminación cruzada entre los reactores adyacentes. Las chimeneas pueden emparejarse con unos anillos de la correspondiente forma en la tapa para minimizar la evaporación del fluido desde los pocillos de reactor, los pocillos de depósito y los canales superficiales de conexión. Hacer las válvulas con forma de concha (normalmente abierta) compensa una membrana estirada o arrugada y mejora las prestaciones de la válvula. Hacer las válvulas y las bombas con una forma oblonga en lugar de circular reduce las zonas en las que pueden quedar atrapadas burbujas.

El armazón o soporte pueden hacerse utilizando la tecnología convencional de procesamiento de silicio, tal como la fotolitografía, grabado por ataque químico húmedo, o grabado por ataque químico profundo iónico reactivo; micromecanizado; mecanizado por electro-descarga; moldeo por inyección con reacción; moldeo de inyección de termoplástico; micromoldeo; punzonado; cualquiera de las tecnologías de sólidos de forma libre, tal como la impresión tridimensional; u otros tipos de fabricación que puedan crear micro-agujeros pasantes en hojas de material, especialmente las tecnologías de fabricación para plásticos, tal como micromoldeo, repujado, taladrado con láser o mecanizado con haz de electrones. Los moldes para algunos de estos procesos pueden hacerse utilizando métodos tales como litografía y micromecanizado, mecanizado por electro-descarga y galvanizado.

Para formar una matriz comúnmente se utilizan varios materiales. A menos que se especifique de otro modo, el término "polímero" se utilizará para incluir cualquiera de los materiales que se utilizan para formar la matriz, incluidos los polímeros y monómeros que pueden ser polimerizados o pueden adherirse para formar una unidad integral, así como los materiales inorgánicos y orgánicos, como se menciona más adelante. En una realización las partículas se forman de un polímero que puede disolverse en un disolvente orgánico y solidificarse por retirada del disolvente, tal como un polímero termoplástico sintético, ya sea biodegradable o no biodegradable, tales como los poliésteres, poliuretanos, poliestireno, policarbonatos, etilenvinilacetato, poli(anhidridos), poliortoésteres, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico y otros hidroxácidos y polifosfacenos, polímeros de proteínas, por ejemplo, la albúmina o el colágeno, o los polisacáridos. Unos ejemplos de materiales no poliméricos que pueden utilizarse para formar la matriz incluyen los materiales orgánicos e inorgánicos como la hidroxiapatita, el carbonato de calcio, agentes amortiguadores y la lactosa, así como otros excipientes comunes utilizados en los fármacos, que se solidifican por aplicación de adhesivo o aglutinante en lugar de disolvente. En el caso de polímeros para el uso en la elaboración de dispositivos para la conexión y crecimiento de células, los polímeros se seleccionan sobre la base de la capacidad del polímero para suscitar la respuesta biológica apropiada de las células, por ejemplo, conexión, migración, proliferación y expresión genética.

Por referencia a The Polymer Handbook, edición tercera (Wiley, N. Y., 1989) pueden obtenerse otros adecuados.

Para microestructuras hechas a la medida de un hueso, unos polvos inorgánicos en el dispositivo final aumentan la fortaleza del dispositivo y proporcionan una fuente de minerales para el tejido regenerado. Los requisitos de fortaleza de los tejidos blandos, tales como el hígado, son substancialmente menos que para el hueso, así que en los dispositivos finales se pueden tolerar mayores fracciones de oquedades.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 1-10, las estructuras 8 de soporte de células/tejidos pueden formarse, por ejemplo, mediante una membrana porosa o mediante una distribución de microcanales en una película u hoja

sólidas soportadas por un filtro microporoso 9. Los armazones porosos pueden fabricarse, por ejemplo, mediante adhesión de fibras (Vacanti, et al. MRS Proceedings, vol. 252 (1992); Mikos, et al., J. Biomed. Mater. Res. 27:183-189 (1993)), moldeo de disolventes y lixiviación de partículas (*solvent casting/particulate leaching*), (Mikos, et al., Biomaterials 14:323-330 (1993)), espumar por gas (*gas foaming*) (Mooney, et al., Biomaterials 17:1417-1422 (1996)), y separación de gases (Lo, et al., Tissue Engineering 1:15-28 (1995)). Los armazones de silicio, con una distribución de microcanales, pueden microfabricarse utilizando las tecnologías apropiadas, tales como mediante la técnica de ataque químico profundo iónico reactivo (Powers, et al., Biotechnology and Bioengineering, 78:257 (2002)). Los armazones de polímero con microcanales pueden producirse por micromecanizado por láser (Brenan, et al., Proc. SPIE, 3912, 76-87, Prog. Biomed. Optics, Micro- and Nanotechnology for Biomedical and Environmental Applications, San Jose, 26-27 de enero de 2000), moldeo por inyección (Weibezahn, et al., Micro System Technologies '94, H. Reichl y A. Heuberger, eds., vde-verlag gmbh, Berlín, págs. 873-878) o fotopolimerización.

El armazón sólido 8 con microcanales puede tener una capa superior que contiene una distribución de microcanales que contiene las células. Cada microcanal en la distribución es la unidad funcional del biorreactor. Bajo esta capa, hay una membrana microporosa o un filtro 9. La membrana puede ser una pieza monolítica del armazón que contiene células o puede adherirse a ella p. ej. térmica o ultrasónicamente. El armazón que contiene células y/o tejidos puede estar provisto de unas juntas de sellado 7, 11, un armazón de soporte 10 y una pieza de inserción 12. Los microcanales 34 pueden tener una sección transversal cuadrada o rajada. El tamaño típico de los canales cuadrados es de cientos de micrómetros. Las rajadas pueden ser de cientos de micrómetros a varios milímetros de largo. El grosor del armazón es típicamente de cientos de micrómetros.

Ambos colectores de fluido 24 y de control 22 pueden fabricarse p. ej. por fresado micromecánico de polímeros tales como el policarbonato. Esto puede ser rentable para la fabricación de pequeños lotes. En la fabricación de grandes volúmenes, pueden utilizarse técnicas de réplicas masivas, tales como el moldeo por inyección y materiales p. ej. poliestireno o policarbonato. El material de la membrana puede ser p. ej. polidimetilsiloxano (PDMS). La membrana 23 puede, p. ej. adherirse al colector de fluido y al de control por oxidación con plasma de las superficies de emparejamiento y apretando inmediatamente las piezas entre sí (Duffy et al, Anal. Chem., 70, 4973- 4984 (1998)). Como alternativa, como se muestra en las Figuras 3 y 4, la membrana 23 puede emparejarse entre los colectores de fluido 24 y de control 22 p. ej. por medio de un mecanismo de sujeción 21 de enganche que proporciona una fuerza constante en la membrana y que mantiene juntos los colectores.

El armazón 8 puede ser p. ej. encajado a presión en la sección estrechada inferior del pocillo 4 de biorreactor en el colector 24 de fluido. El pocillo 4 de biorreactor se conecta con el pocillo 6 de depósito mediante dos canales de fluido. El canal superior 5 p. ej. con forma de U se utiliza para retornar el medio de cultivo celular desde el pocillo 4 de biorreactor al pocillo 6 de depósito. La parte inferior del depósito puede contener un enfrentamiento para insertar un filtro microporoso 26 con un soporte 25 de filtro asegurado en el pocillo de depósito mediante una pieza de inserción 27 encajada a presión (Nota: Por claridad del dibujo, los componentes 25, 26, y 27 se han etiquetado en el par de biorreactor/depósito e y no a. Los pares de biorreactor/depósito a, b, c, d y e en la distribución en el placa son idénticos. Véase en la Figura 6 las etiquetas de pares de biorreactor/depósito y las líneas neumáticas o hidráulicas). El filtro 26 puede utilizarse para retirar los restos de células del medio de cultivo celular. Utilizar el filtro en el pocillo de depósito puede mejorar la fiabilidad de las válvulas y bombas. Además, puede eliminar los atascos de la membrana o del filtro microporoso 9 en el lado posterior del armazón 8 que contiene células/tejidos. El medio de cultivo filtrado es aspirado a través el orificio 29 hacia los canales inferiores de fluido 30, 31, y 32 que conectan los pocillos de depósito 6 y de biorreactor 4. El canal está provisto de tres válvulas de diafragma que forman una bomba. Las válvulas se crean al emparejar una membrana monolítica elastomérica 23 entre los colectores de fluido 24 y de control 22. Se crea una válvula en la que un canal de control atraviesa un canal de fluido. Las válvulas p. ej. pueden estar normalmente cerradas. En ese caso, al aplicar vacío a los canales 20, 35 y 36 (véase la Figura 9) en el colector de control a través de los adaptadores 16, 15 y 14 sellados con los anillos tóricos 17, la membrana elastomérica 23 se desvía hacia abajo, las válvulas se abren, y el medio de cultivo celular llena las cámaras 19, 18, 13 de desplazamiento de válvula y todas las otras cámaras de desplazamiento conectadas encima de la membrana 23. Aplicar la presión positiva fuerza a la membrana contra los asientos de válvula y el medio de cultivo celular fuera de las cámaras de desplazamiento de las válvulas. Las válvulas de cada bomba se abren en un ciclo de seis etapas. Inicialmente, todas las válvulas están cerradas. En la primera etapa, la válvula de entrada 19 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 20 están abiertas. En la segunda etapa, la válvula principal de diafragma 18 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 20 están abiertas. En la tercera etapa, la válvula de entrada 19 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 20 están cerradas. En la cuarta etapa, la válvula de salida 13 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 36 están abiertas. En la quinta etapa, la válvula principal de diafragma 18 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 35 están cerradas. En la sexta etapa, la válvula de salida 13 y todas las otras válvulas en los pares de biorreactor/depósito b, c, d y e conectadas en serie por el canal de control 36 están cerradas. Las válvulas que bombean el medio de cultivo celular pueden controlarse p. ej. mediante electroválvulas conectas a fuentes de vacío y aire presurizado.

Las válvulas monolíticas de membrana normalmente cerradas son de auto-cebado y bombean el medio de cultivo celular hacia delante o hacia atrás simplemente invirtiendo el ciclo de accionamiento. Al ajustar el volumen de la

cámara de desplazamiento de válvula de diafragma, el volumen bombeado por accionamiento puede determinarse en la fase de diseño. Por lo tanto, pueden utilizarse bombas de diafragma para medir con precisión los volúmenes del medio de cultivo celular. Si las cámaras de desplazamiento de las bombas son idénticas, las células/tejidos en todos los biorreactores se perfundirán con el mismo caudal. Por contra, si las bombas tienen volúmenes diferentes de cámaras de desplazamiento, las células/tejidos en cada biorreactor se pueden perfundir con diferentes caudales.

Los pares de biorreactor y depósito se ceban p. ej. mediante pipeteo manual o robótico del medio de cultivo celular en el pocillo de biorreactor o de depósito y activando el ciclo de bombeo en el sentido de avance o de retroceso. Si es necesario retirar las burbujas de aire de los canales de fluido, se pueden utilizar unos orificios 3 de sangrado de aire que tienen instalado un tornillo 1 y un anillo tórico obturador 2. Los orificios de sangrado de aire se conectan con el pocillo 5 de biorreactor a través del canal 33.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 1-10, las células se siembran en los armazones 8 mediante la dispensación (p. ej. por pipeteo manual o robótico) de una suspensión de células en los pocillos 4 de biorreactor. El medio de cultivo celular circula desde el pocillo 6 de depósito al pocillo 4 de biorreactor. Después de perfundir el cultivo celular 3D en el armazón 8 en el pocillo 4 de biorreactor, el medio de cultivo celular se retorna al pocillo 6 de depósito. Cada biorreactor a, b, c, d y e (véase la Figura 6) de la distribución tiene su propio depósito 6 y sus microcanales de fluido 5, 30, 31 y 32 están aislados completamente de todos los demás biorreactores en la distribución. El medio de cultivo celular circula utilizando bombas de diafragma. Tres válvulas de diafragma conectadas en serie forman una bomba de diafragma. Las válvulas 19, 18 y 13 y por lo tanto las bombas se crean al emparedar una membrana elastomérica monolítica 23 entre los colectores de fluido 24 y de control 22. Se crea una válvula en la que un canal de control atraviesa un canal de fluido. La membrana delgada 23 entre los canales de control y de fluido puede desviarse por el accionamiento hidráulico o neumático aplicado mediante los canales de control. El medio de cultivo celular se bombea por el accionamiento secuencial de las válvulas conectadas en serie. Haciendo referencia a la Figura 6, las válvulas de todos los pares de biorreactor/depósito a, b, c, d, e en la distribución son accionadas en paralelo a través de unas líneas de control común, hidráulicas o neumáticas, x, y, z. Como resultado, en este caso, mediante tres líneas comunes, neumáticas o hidráulicas, se pueden abordar cinco biorreactores de perfusión completamente aislados. Sin embargo, el número de pares de biorreactor/depósito en la distribución manejados por tres líneas neumáticas o hidráulicas puede aumentarse a escala considerablemente.

Las válvulas y las bombas se pueden producir a escala y pueden microfabricarse en distribuciones densas. Los documentos, Science 286, 113 (2000) de Unger, et al, Science 298, 580 (2002) de T. Thorsen, et al., y Sensors and Actuators B 89, 314 (2003) de W. H. Grover, describen unos procesos para producir válvulas y bombas monolíticas.

Debido al hecho de que la distribución de pares de biorreactor/depósito tiene un diseño abierto y está cubierto por una tapa común desmontable (28), la siembra de células así como la adición de agente y recogida de muestras pueden realizarse utilizando estaciones de trabajo robóticas automatizadas.

Los caudales a través del sistema se determinan según las necesidades metabólicas celulares y por asuntos de tensión mecánica. Se necesitan unos caudales en el intervalo de 0,1 - 1 microlitro/min. de medio para 1000 células de manera casi continua (son factibles períodos cortos de hasta 15 min. si flujo). Cada biorreactor contiene típicamente 500-50.000 células dependiendo del tipo de ensayo que se realiza. El diseño del armazón permite que el sistema se pueda realizar a escala muy fácilmente en unidades de ~500 células (es decir, un canal). Los caudales a través del sistema podrían variarse durante el tiempo de cultivo o de ensayo con el fin de realizar el ensayo (p. ej., los caudales podrían ralentizarse para permitir la conversión completa de un compuesto, o aumentarse para mantener una concentración constante del compuesto).

#### Sensores

Pueden utilizarse sensores para detectar los cambios en el pH, niveles de oxígeno, metabolitos específicos tales como la glucosa, la presencia o ausencia de una molécula indicadora tal como una proteína vírica, o cualquier otro indicio de un efecto en los tejidos o un material expuesto a los tejidos dentro del biorreactor.

En una realización, las lecturas de salida de lesiones o infección se basan en cambios en la fluorescencia del tejido tal como detecta una distribución de fibra óptica miniaturizada que excita la fluorescencia a través de unos medios de uno o múltiples fotones. La naturaleza de la excitación es un parámetro crítico que se aborda en el desarrollo de la tecnología. La excitación de múltiples fotones ofrece varias ventajas sobre la de un solo fotón, en términos de resolución y de prevención de daños en el tejido.

Son posibles muchos tipos de lecturas de salida fluorescentes. Los cambios en los parámetros metabólicos básicos del tejido pueden abordarse mediante la medición del cambio en los niveles NAD(P)H mediante la fluorescencia intrínseca de estas moléculas. Las células también pueden precargarse con un tinte que fuga en el caso de daño de la membrana, que tiene como resultado una disminución de la intensidad fluorescente. Como alternativa o adicionalmente, los genes informadores pueden someterse a transfección en las células bajo el control de un promotor relacionado con la tensión que se activa durante las lesiones de tejido para producir un producto fluorescente. Este último planteamiento tiene un interés particular para detectar la infección vírica en una rápida secuencia temporal.

El objetivo en el esquema de detección es proporcionar una lectura de salida de lesiones de tejido por espectroscópica de fluorescencia sensible, rápida, adaptable al campo y mínimamente invasiva. Se ha identificado un panel de indicadores potenciales que variarán en el espectro y/o la intensidad de la fluorescencia. Dado que las respuestas pueden requerir la monitorización del estado bioquímico celular dentro de una estructura de tejido normal, puede no ser suficiente analizar sólo la capa superficial de las células en el tejido, sino monitorizar selectivamente los estratos celulares de varias células de profundidad en el interior del canal. Estos requisitos pueden resumirse en cuatro criterios de diseño para el sistema óptico de detección: (1) detección por selección de profundidad en tejido grueso (300  $\mu\text{m}$ ), (2) esquema flexible de excitación y detección para obtención de imágenes de una variedad de indicadores, (3) mínimamente invasivo para el cultivo de tejido vivo en el dispositivo, (4) rápida detección de señal con la alta sensibilidad, (5) robustez y adaptable al campo.

Si se utiliza excitación con un solo fotón, se necesita detección confocal para separar la fluorescencia que se origina en el interior del canal de su superficie. Un microscopio confocal es un instrumento bien desarrollado diseñado para seccionar ópticamente los especímenes gruesos. En planos conjugados se disponen dos aberturas o agujeritos; uno delante de la fuente de luz y uno delante del detector. Este diseño puede simplificarse y hacerse más robusto para la detección en línea mediante el uso de la fibra óptica de modo único. Mediante un divisor dicróico de haces, la luz de excitación se introduce en una fibra de modo único (Figura 1; el divisor de haces no está representado). La luz emitida desde la fibra puede colimarse mediante una lente. Una segunda lente puede enfocar la luz de colimada hacia el canal del trozo de tejido. La resolución alta no es crítica en esta aplicación -- no se necesita obtención de imágenes -- y de este modo poca óptica y el trozo para proporcionar espacios para el diseño hidráulico en la cámara de flujo. La fluorescencia a partir de la muestra es recogida por dos lentes de relevo (*relay lenses*) y se refleja de vuelta a la fibra de modo único. La fibra de diámetro pequeño funciona simultáneamente como la abertura de agujerito de excitación y de emisión en este sistema. La fluorescencia originada fuera de la región focal no puede volverse a enfocar por las lentes de relevo sobre la fibra óptica y se rechaza. Este proceso proporciona discriminación de profundidad. Durante este proyecto pueden considerarse varios cromóforos con longitudes de ondas de excitación que abarcan desde el UV cercano a la región verdiazul de los espectros. Los indicadores de fluorescencia que tiene particular interés son los cromóforos endógenos, nucleótidos de piridina. Los nucleótidos de piridina, NAD(P)H se excitan en la zona de 365 nm y son fluorescentes en la región de 400-500 nm. Otro indicador de interés es la proteína de fluorescencia verde (GFP, *green fluorescence protein*) que puede excitarse en o cerca de la zona de UV o de verdiazul del espectro y típicamente emite a aproximadamente 510 nm. Con el fin de excitar este amplio intervalo de cromóforos, para este estudio puede adquirirse un láser regulable de argón-ion de UV. Aunque este láser no sea lo suficientemente robusto para la aplicación en campo, proporciona la flexibilidad para probar un conjunto grande de fluoróforos. Después de que se identifica el conjunto apropiado de cromóforos, se puede incorporar fácilmente un sistema láser menos flexible pero más robusto y compacto. Este diseño confocal de fibra óptica es una tecnología madura y puede incorporarse rápidamente en el sensor de tejido para evaluar los cambios de la bioquímica celular bajo tensión de toxina dentro del trozo de tejido.

Aunque se puede construir un trozo de tejido sensible a toxinas sobre la base del planteamiento confocal de un solo fotón, el uso del planteamiento de dos fotones puede mejorar el sistema al aumentar la proporción de señal de fluorescencia a ruido y disminuir el daño al tejido. Este nuevo planteamiento para estudiar se basa en la microscopia de dos fotones desarrollada por Denk et al. (Denk, et al., Science 248:73-77 (1990)). Los cromóforos puede excitarse por la absorción simultánea de dos fotones, cada uno tiene la mitad de la energía necesaria para la transición de excitación. Dado que la excitación de dos fotones sólo se produce en el punto focal de un objetivo de alta apertura numérica, una región de alta concentración temporal y espacial de fotones. Al utilizar la excitación de dos fotones, más del 80% de la intensidad total de la fluorescencia procede de una región de 1  $\mu\text{m}$  de grosor cerca del punto focal para un objetivo con apertura numérica 1,25. Este efecto de discriminación en profundidad de la excitación de dos fotones surge de la dependencia cuadrática de la intensidad de fluorescencia de dos fotones respecto al flujo de fotones de excitación que disminuye rápidamente al alejarse del plano focal. La discriminación en profundidad es un resultado de la física del método de excitación y no se necesita abertura de agujerito de detección confocal. Esta localización de la excitación de dos fotones puede visualizarse mejor en un simple experimento de decoloración.

Para demostrar el efecto de la excitación de dos fotones, se enfocó un volumen de excitación de dos fotones en el centro de una esfera fluorescente de látex de 15  $\mu\text{m}$ . El volumen de excitación se escaneó repetidas veces a lo largo del eje x hasta que se produjo fotodecoloración. Se obtuvo una pila de imágenes 3D de la esfera de látex, en la que una serie de imágenes son planos x-y de la esfera a una distancia creciente del centro. No se observó fotodecoloración más allá de 1  $\mu\text{m}$ .

La excitación con dos fotones permite una evaluación selectiva del estado fisiológico del tejido en cualquier punto en el interior del canal de trozo de tejido. El planteamiento de múltiples fotones tiene varias ventajas en comparación con el planteamiento confocal en el que los coeficientes de dispersión y absorción de la muestra son altos, tal como los de los tejidos: (1) La dispersión y la absorción típicas en el intervalo espectral de infrarrojos están sobre un orden de magnitud inferior al UV cercano o la región verdiazul. Al utilizar excitación con infrarrojos en el microscopio de dos fotones se minimiza la atenuación de la señal de excitación. (2) La microscopia confocal utiliza la abertura de agujerito de emisión para rechazar la luz desenfocada. En el interior del tejido profundo es inevitable la dispersión de los fotones de la señal. La consecuente desviación de la trayectoria tiene como resultado una pérdida significativa de estos fotones en el agujerito confocal. La geometría de recogida para los fotones de fluorescencia es menos crítica en

el caso de dos fotones en el que se puede utilizar un detector de área grande sin una abertura de agujerito. La mayor parte de los fotones dispersados hacia delante pueden retenerse. (3) La excitación de dos fotones minimiza el foto-daño del tejido. Las técnicas confocales convencionales obtienen una resolución 3D mediante la limitación del volumen de observación, pero se produce excitación de fluorescencia en toda la trayectoria de la luz con forma de reloj de arena. Por contra, la excitación de dos fotones limita la región de foto-interacción con un volumen inferior a un femtolitro en el punto focal. (4) Las longitudes de ondas de excitación de dos fotones típicamente están desplazadas en rojo aproximadamente dos veces las longitudes de onda de excitación de un fotón. Esta ancha separación entre el espectro de excitación y de emisión asegura que la luz de excitación y la dispersión Raman se pueden rechazar mientras se filtra el mínimo de fotones de fluorescencia. (5) Se ha encontrado que muchos fluoróforos tienen un espectro muy ancho de absorción de dos fotones. Una sola longitud de onda elegida apropiadamente puede excitar un gran intervalo de fluoróforos con bandas de emisión que van del UV cercano al infrarrojo cercano.

Estas ventajas del planteamiento de dos fotones la hace una atractiva alternativa al planteamiento de un solo fotón. Sin embargo, la miniaturización de un sistema de dos fotones todavía requiere una extensa investigación. Todavía hay que resolver los problemas tales como la dispersión de impulsos en el sistema de fibra. Por lo tanto, un segundo foco para el desarrollo del sistema óptico para el trozo de tejido es el desarrollo de la tecnología de miniaturización para la espectroscopia de excitación de dos fotones. Pueden construirse microscopios de dos fotones para evaluar la respuesta del tejido a toxinas como una función de profundidad de tejido en el canal del trozo y para optimizar la configuración de la óptica para maximizar la eficiencia de detección en la geometría única del trozo de tejido. Si se puede demostrar que el planteamiento de dos fotones es ventajoso en comparación con el método confocal de un fotón, puede construirse un sistema miniaturizado final de detección de fluorescencia basado en la excitación de dos fotones.

Hay disponibles unos espectrómetros miniaturizados de fluorescencia de fibra óptica que pueden utilizarse. Un sistema se basa en un esquema de detección confocal y excitación de un fotón. Un segundo sistema implica el uso de excitación de dos fotones. La ventaja de este sistema incluye menor daño del tejido, mayor rendimiento y mayor flexibilidad en términos de monitorización simultánea de múltiples indicadores.

También pueden utilizarse otros sensores distintos a los sensores fluorescentes. Por ejemplo, se pueden analizar muestras utilizando espectrofotómetros de infrarrojos, espectrofotómetros de ultravioleta, cromatogramas de gas, cromatogramas de líquido de altas prestaciones, espectrometría de masas y otros medios de detección conocidos por los expertos en la técnica. Estos pueden utilizarse para medir nutrientes, gases, metabolitos, pH y otros indicadores de actividad celular, infecciones y el metabolismo. Se pueden realizar mediciones en las propias células o en el medio de cultivo, o en ambos. Las mediciones pueden hacerse como un ensayo en el transcurso del tiempo o un ensayo de punto final o a la vez durante el cultivo y al final del cultivo.

## II. Aplicaciones

La tecnología es susceptible de una integración a gran escala. Esto posibilita la realización masiva de ensayos en paralelo. Por ejemplo, en cada pocillo de biorreactor se pueden sembrar diferentes células o mezclas de células. Como alternativa, un medio de cultivo celular diferente puede circular por cada par de biorreactor/depósito o las células/tejido en cada pocillo de biorreactor pueden exponerse a un agente diferente. Se pueda añadir un tipo inicial de célula (p. ej., colonias aisladas de células hepáticas humanas), estabilizada en el tejido, y luego un segundo tipo de célula (p. ej., célula cancerígena) añadida para examinar la respuesta.

Los tipos de células determinan la función del tejido. Tal como se emplea en esta memoria, el tejido se refiere a una agregado de células más o menos similares morfológica y funcionalmente. En una realización, la matriz se siembra con una mezcla de células que incluyen células endoteliales y por lo menos un tipo de células parenquimales, tales como los hepatocitos, células pancreáticas u otras células de órganos, o la matriz se siembra con células madre totipotentes/pluripotentes que pueden diferenciarse en células, que incluyen células endoteliales para formar células. Las mezclas de células de función diversa se conocen como células. Las células endoteliales (y en algunos casos otras células como los pericitos o las células estrelladas) pueden formar "vasos sanguíneos" a través del tejido. Un órgano se refiere a una estructura diferenciada de un organismo compuesto de varias células o tejidos y adaptado para una función específica (McGraw-Hill Dictionary of Bioscience).

En la realización preferida, el tejido donante se disocia en células individuales, los tipos de célula se separan y purifican, y se recombinan dentro de los canales de una manera que permite que se vuelva a formar la arquitectura histotípica de los tejidos. Para obtener y disociar células se utilizan procedimientos estándar. Por ejemplo, los hepatocitos primarios de rata y las células no parenquimales pueden aislarse utilizando perfusión estándar con colagenasa (Griffith, et al, Ann. N. Y. Acad. Sci. 831 (1997); Cima, et al, Biotech. Bioeng. 38:145-58 (1991)). Los hepatocitos humanos pueden obtenerse a partir de la perfusión de colagenasa de tejido obtenido de la resección del hígado o de biopsias de hígado a través del New England Organ Bank (Fontaine, et al., J. Ped. Surg. 30:56-60 (1995)). Las células endoteliales microvasculares de rata pueden obtenerse de la perfusión de la colagenasa de grasa. Las células endoteliales microvasculares humanas se pueden obtener de Clonetics. Es improbable que se necesite el emparejamiento de tipos de tejido para el endotelio microvascular, ya que el endotelio exhibe una gran plasticidad para adaptarse a nuevos ambientes. Las células madre embrionarias (células ES) pueden cultivarse en el

estado totipotente utilizando técnicas estándar con inducción de diferenciación, por ejemplo, sustituyendo LIF con varias citoquinas.

5 Varias células diferentes pueden aplicarse a las matrices de soporte. En las realizaciones preferidas, éstas son células humanas normales o células humanas tumorales. Las células pueden ser una suspensión homogénea o una mezcla de tipos de células. Los tipos diferentes de célula pueden sembrarse sobre y/o en las matrices de manera secuencial, junto o después de que se permita a una suspensión inicial conectarse y proliferar (por ejemplo, células endoteliales, seguido por células hepáticas). Las células se siembran en los armazones mediante la dispensación (p. ej. por pipeteo manual o robótico) de una suspensión de células en los pocillos de biorreactor. Para permitir que las células se conecten a los armazones, el flujo de perfusión puede reducirse o desactivarse durante un periodo de tiempo inmediatamente después de sembrar.

10 La composición del medio de cultivo debe considerarse desde dos perspectivas: nutrientes básicos (azúcares, aminoácidos) y factores de crecimiento/citoquinas. El co-cultivo de células a menudo permite la reducción o eliminación del suero de un medio debido a la producción de macromoléculas reguladoras por las propias células. La capacidad de suministrar tales factores reguladores macromoleculares de una manera fisiológica es una razón primaria por la que se utilizan co-cultivos 3D perfundidos. Se ha probado un medio sin suero complementado con varios factores de crecimiento adecuados para un cultivo a largo plazo de hepatocitos primarios diferenciados (Block, et al., J. Cell Biol. 132:1133-49 (1996)) y se ha encontrado que soporta un co-cultivo de hepatocitos con células endoteliales. Las células ES se mantienen rutinariamente en un estado totipotente en presencia del factor inhibitorio de leucemia (LIF, *leukemia inhibitory factor*) (William, et al., Nature 336:684-87 (1988)), que activa los caminos de señalización gp130 (Saito, et al., J. Immunol. 148:4066-71 (1992)). Varias formulaciones de medios pueden soportar la diferenciación de las células ES, diferentes mezclas de citoquinas producen distintos patrones de diferenciación (Millauer, et al, Cell 72:835-46 (1993); Gendron, et al., Dev. Biol. 177:332-46 (1996); Bain, et al., Dev. Biol. 168:342-57 (1995)). Las velocidades de sustitución de medios se determinarán midiendo las velocidades de agotamiento de los azúcares y aminoácidos clave así como los factores de crecimiento/citoquinas clave. El agotamiento del factor de crecimiento es un factor limitativo rara vez reconocido que determina las velocidades de sustitución de medios (Reddy, et al., Biotechnol. Prog. 10:377-84 (1994)). Si se utiliza medio de cultivo celular con bicarbonato de sodio, el control ambiental puede proporcionarse, p. ej., colocando el módulo con pares de biorreactor/depósito en una incubadora de CO<sub>2</sub>. La adición de reactivo o la extracción de muestras deben realizarse en ese caso en un ambiente estéril. Si se utiliza un medio de cultivo celular con una solución amortiguadora orgánica, el módulo con pares de biorreactor/depósito puede colocarse en un ambiente estéril en el que se puede realizar la adición de reactivo o extracción de muestras de manera manual o robótica.

15 Las células pueden obtenerse de una biopsia o un cultivo celulares. Las células pueden ser de uno o más tipos, ya sean células diferenciadas, tales como células endoteliales o células parenquimales, incluidas las neuronas, o células indiferenciadas, tales como las células madre o las células embrionarias. En una realización, la matriz se siembra con una mezcla de células que incluyen células endoteliales o con células madre totipotentes/pluripotentes que pueden diferenciarse en células que incluyen células endoteliales, que formarán "vasos sanguíneos", y por lo menos un tipo de células parenquimales, tales como hepatocitos, células pancreáticas o células de otros órganos.

20 Las células pueden cultivarse inicialmente y luego pueden utilizarse para el cribado de componentes en cuanto a toxicidad, cuando reactores diferentes contienen diferentes tipos de célula (por ejemplo, hígado en los reactores 1-10, células pancreáticas en los reactores 11-20, células de piel en los reactores 21-30, etc.). Las células también pueden utilizarse para el cribado de compuestos que tienen un efecto deseado. Por ejemplo se pueden utilizar células endoteliales para cribar los compuestos que inhiben la angiogénesis. Pueden utilizarse células tumorales para cribar los compuestos en cuanto a la actividad contra tumores. Las células que expresan ciertos ligandos o receptores pueden utilizarse para cribar los compuestos que se unen a los ligandos o activan los receptores. Se pueden sembrar células madre, solas o con otros tipos de células. Las células pueden sembrarse inicialmente, luego se introduce un segundo conjunto de células después de que se establezca el tejido inicial de biorreactor, por ejemplo, células tumorales que crecen en el ambiente de tejido hepático. Las células tumorales pueden estudiarse en cuanto a sus conductas de célula tumoral o se pueden visualizar los sucesos moleculares durante el crecimiento de las células tumorales. Las células pueden modificarse antes o después de la introducción en el aparato. Las células pueden ser células tumorales primarias de pacientes para realizar pruebas de diagnóstico y de pronóstico. Las células tumorales pueden evaluarse en cuanto a su sensibilidad a un agente o terapia génica. La sensibilidad de la célula tumoral a un agente o a terapia génica puede vincularse al metabolismo, que hace el hígado, del agente o la terapia génica establecidos. Las células pueden ser células madre o progenitoras, y las células madre o progenitoras se inducen para diferenciarse mediante el tejido maduro. Se puede inducir a las células maduras para que se reproduzcan mediante la manipulación de los caudales o los componentes del medio en el sistema.

25 El sistema tiene muchas aplicaciones diferentes: identificación de marcadores de enfermedad; evaluación de la eficacia de terapias contra el cáncer; pruebas de vectores de terapia génica; desarrollo de fármacos; cribado; estudios de células, especialmente células madre; estudios en biotransformación, depuración, metabolismo y activación de los xenobióticos; estudios de biodisponibilidad y transporte de agentes químicos a través de capas epiteliales; estudios de biodisponibilidad y transporte de agentes biológicos a través de capas epiteliales; estudios del transporte de agentes biológicos o químicos a través de la barrera sangre-cerebro; estudios de la toxicidad de agentes químicos basal aguda; estudios de la toxicidad, de agentes químicos, aguda específica de órganos y aguda

5 local; estudios de la toxicidad, de agentes químicos, basal crónica; estudios de la toxicidad, de agentes químicos, crónica específica de órganos o crónica local; estudios en teratinogenicidad de agentes químicos; estudios en genotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de agentes químicos; detección de agentes biológicos infecciosos y armas biológicas; detección de agentes químicos perjudiciales y armas químicas; estudios de enfermedades contagiosas; estudios de la eficacia de agentes químicos para tratar enfermedades; estudios de la eficacia de agentes biológicos para tratar enfermedades; estudios del intervalo óptimo de dosis de agentes para tratar enfermedades; predicción de la respuesta de órganos in vivo a agentes biológicos; predicción de la farmacocinética de agentes químicos o biológicos; predicción de la farmacodinámica de agentes químicos o biológicos; estudios con respecto al impacto del contenido genético en la respuesta a agentes; puede elegirse o construirse un filtro o material poroso debajo de tejido a microescala para unirse a ADN desnaturalizado monocatenario; estudios de transcripción genética en respuesta a agentes químicos o biológicos; estudios de la expresión de proteína en respuesta a agentes químicos o biológicos; estudios de cambios en el metabolismo en respuesta a agentes químicos o biológicos; predicción del impacto de agentes mediante sistemas de bases de datos y modelos asociados; predicción del impacto de agentes mediante sistemas de expertos; y predicción del impacto de agentes mediante modelos basados en estructuras.

Los biorreactores pueden modificarse por conexión de ligandos o moléculas aglutinantes receptoras específicas para modificar la conexión o la conducta de las células.

20 Se pueden añadir fármacos y pueden circular a través de la masa de tejido en cada biorreactor individual, se toman muestras en varios momentos puntuales para determinar los perfiles metabólicos de depuración; se puede determinar una respuesta a la dosis utilizando diluciones de fármaco en varios reactores individuales en una sola placa. Se pueden añadir diferentes dosis de fármacos a diferentes biorreactores dentro de la misma placa y se pueden incubar durante días o incluso semanas para determinar respuestas de toxicidad crónicas y subcrónicas.

25 La última lectura de salida es compatible con los ensayos ópticos de placa. El sistema también puede utilizarse para cribado en las células, en cuanto a un efecto de las células en los materiales (por ejemplo, de una manera equivalente al metabolismo, que hace el tejido, de un fármaco).

Si se desea investigar las muestras biológicas fuera de la distribución de biorreactores (por ejemplo después de realizar un ensayo), los armazones con células/tejido pueden eyectarse de los pocillos de biorreactor a una placa con pocillos de transferencia. Esto puede realizarse manual o robóticamente en todos o sólo en unos pocillos seleccionados de biorreactor.

30 Los resultados de estos estudios pueden introducirse en modelos matemáticos para predecir la respuesta de los órganos in vivo. Los resultados también pueden introducirse en modelos matemáticos para predecir la farmacocinética y/o la farmacodinámica de agentes químicos y biológicos. El sistema puede integrarse con otros sistemas de pruebas, tales como los que conciernen genómica, transcripción genética, expresión de proteínas y otros fenómenos biológicos de interés.

35 Los sistemas de pruebas que utilizan distribuciones de tejido a microescala tienen un amplio abanico de usos para los ensayos in vitro. Al utilizar las distribuciones, se puede estudiar la biotransformación, depuración, metabolismo y activación de los xenobióticos. Puede estudiarse la biodisponibilidad y el transporte de agentes químicos y biológicos a través de capas epiteliales y a través de la barrera sangre-cerebro. También se puede estudiar la toxicidad aguda basal, la toxicidad aguda local o la toxicidad aguda específica de órganos, teratogenicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad, de agentes químicos. Pueden detectarse agentes biológicos contagiosos, armas biológicas, agentes químicos perjudiciales y armas químicas. Pueden estudiarse enfermedades contagiosas y la eficacia de agentes químicos y biológicos para tratar estas enfermedades, así como los intervalos óptimos de dosis para estos agentes. Puede predecirse la respuesta de órganos in vivo a agentes químicos y biológicos, y a la farmacocinética y farmacodinámica de estos agentes. Puede estudiarse el impacto del contenido genético en la respuesta a los agentes.

Puede determinarse la cantidad de expresión de proteínas en respuesta a agentes químicos o biológicos. Pueden estudiarse los cambios en el metabolismo en respuesta a agentes químicos o biológicos. Puede predecirse el impacto de agentes mediante sistemas de bases de datos y modelos asociados, sistemas de expertos o modelos basados en estructuras.

50 Las sustancias tóxicas, incluidas los compuestos que son intrínsecamente tóxicos para todas las células (p. ej., el cianuro) y los que son convertidos metabólicamente en metabolitos tóxicos (generalmente electrófilos) por células parenquimales, también puede detectarse utilizando un planteamiento integral para detectar un suceso que lleve a la muerte celular. Esto puede ser general y no específico; es decir no específico para una toxina individual, pero general para la clase entera. Unos ejemplos incluyen los venenos mitocondriales, agentes dañinos para el ADN y agentes dañinos para la membrana.

La detección de metabolitos puede lograrse por monitorización de los efluentes fluidos desde las células utilizando métodos de detección en línea, tales como detectores de UV, visible o fluorescencia y/o espectrometría de masas.

Además, los efluentes de células pueden muestrearse periódicamente y pueden analizarse en busca de la presencia de metabolitos de manera fuera de línea utilizando técnicas analíticas estándar.

El filtro o material poroso debajo de las células puede diseñarse para incorporar sustratos y/o agentes de retención como un método para detectar los metabolitos. Estos agentes de retención (es decir péptidos o especies orgánicas nucleófilas) se expondrían al fluido que emana de las células y se unirían de manera covalente a los metabolitos reactivos generados por las células y liberados en el líquido perfundido. El complejo formado por enlace covalente del agente de retención y el metabolito reactivo podrían detectarse entonces in situ o podrían liberarse del filtro o material poroso por escisión de una unión lábil que conecta al agente de retención con el filtro o el material poroso. Esta unión lábil podría escindirse por medios químicos, por la actividad o por una enzima, o por la exposición de longitudes de ondas específicas de luz.

Tres potenciales lecturas de salida fluorescentes de infección, cada una como función de la evolución temporal, son las fugas de enzima citosólica, reducción de NAD(P)H citosólica y la expresión de GFP enlazados a promotores inducibles por esfuerzo en células endoteliales o hepatocitos.

Las toxinas biológicas actúan mediante mecanismos diferentes y pueden exhibir diferentes sensibilidades y evoluciones temporales de acciones comparadas con las toxinas químicas. Pueden evaluarse las toxinas biológicas en cuanto a sus efectos en el hígado en las células ES. Unos ejemplos representativos incluyen la toxina semejante a Shiga (SLT o verotoxina), producida por la bacteria Enterohemorgicá *Escherichia coli* (EHEC), y Vac (toxina formadora de vacuolas), producida por la bacteria *Helicobacter pylori*. La SLT detiene la síntesis de proteína de célula anfitriona mediante la desactivación de la subunidad 60S de ribosomas de células anfitrionas (Tesh, et al., *Mol. Microbiol.* 5:1817-22 (1991)). La toxina Vac se une a células mediante un receptor desconocido, e induce la formación de vacuolas, probablemente por inhibición de la actividad de la sodio-potasio ATPasa.

Los desafíos técnicos asociados con la monitorización de la citotoxicidad en tiempo real dentro del contexto de este sensor dinámico de tejido pueden cumplirse utilizando una variedad de técnicas Florescencia Inducida por Láser (LIF, *Laser Induced Fluorescence*). LIF proporciona límites de detección a pocos femtomoles ( $10^{-15}$  moles), y para analitos ideales, es posible la detección de límites de attomoles ( $10^{-18}$  moles). Se han identificado dos puntos finales primarios para monitorizar los efectos de un ataque tóxico al sensor de tejido: disminución de los niveles de NAD(P)H dentro de las células y una pérdida de la integridad celular de membrana.

En el caso de venenos mitocondriales (p. ej., menadiona o cianuro) se observa una disminución de la NAD(P)H intracelular en respuesta a la exposición a toxinas debido a interrupción de la cadena respiratoria. Los niveles intracelulares de NADH y NAD(P)H también se agotan en respuesta a las toxinas nucleares (p. ej., gas nitrógeno) a través del proceso de poli-ADP-ribosilación de proteínas asociadas con el ADN. El reservorio celular de NAD(P)H puede monitorizarse con espectroscopia de florescencia in situ como se ha descrito párrafos antes en busca de fluctuaciones en respuesta a la exposición a toxinas o protoxina.

Una pérdida de la integridad de membrana es un punto final común de todas las vías citotóxicas (es decir, necrosis o apoptosis) y puede observarse después de todas las exposiciones citoletales en el sensor basado en tejido. La pérdida de integridad de membrana está acompañada de una fuga de los constituyentes intracelulares hacia al líquido perfundido. Un planteamiento para capitalizar esta pérdida de integridad de membrana puede ser cargar las células del biosensor con derivados poli-esterificados de fluoresceína (p. ej., Calcein AM, Abs: 494 Em: 517). Estos derivados no fluorescentes entran pasivamente en las células, después de lo cual las esterases los hidrolizan para formar tintes fluorescentes poli-aniónicos que son retenidos en las células. Un aumento de la permeabilidad de la membrana celular debido a un ataque tóxico puede llevar a una pérdida del tinte hacia el líquido perfundido. De este modo, la monitorización de una disminución en la florescencia del tinte retenido por las células puede proporcionar una lectura de salida de la citotoxicidad.

Otro planteamiento para cuantificar la citotoxicidad por pérdida de integridad de membrana puede ser observar un aumento en la actividad enzimática (p. ej., fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa) liberada en el líquido perfundido. Esto puede lograrse mediante espectroscopia LIF de un detector de enzima en línea que consiste en sustratos inmovilizados de enzima pro-fluoróforo o pro-cromóforo.

Por ejemplo, este planteamiento podría utilizarse para monitorizar la actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa liberada en el líquido perfundido por una distribución celular después de un ataque tóxico. Se ha diseñado un derivado de la rodamina que no es fluorescente hasta que la acción de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa libera la amina libre. El producto resultante es sumamente fluorescente (Abs: 492 Eme: 529) y se queda unido al soporte sólido. El uso de un sustrato inmovilizado en línea permite la monitorización de una señal acumulada y mejora drásticamente la sensibilidad, en comparación con la detección de la señal de un fluoróforo soluble que circula en el líquido perfundido. Puede emplearse una estrategia similar para monitorizar la actividad de la fosfatasa alcalina utilizando un derivado inmovilizado de difosfato de fluoresceína.

Una configuración de detector en línea implica inmovilizar el sustrato(s) de enzima pro-fluoróforo y/o pro-cromóforo sobre el filtro o material poroso situado debajo de cada célula para reaccionar a las respuestas celulares específicas que proceden de cada célula. Tal distribución de filtros puede diseñarse para que incluya sustratos que responden

5 con sensibilidades variables a la misma respuesta celular y sustratos que responden a diferentes respuestas celulares. Además, la redundancia (es decir, el mismo pro-fluoróforo/cromóforo presente por debajo de más de una célula dentro de una distribución) puede distribuirse por toda la distribución de células. Los pro-fluoróforos/cromóforos se diseñan para responder a numerosas respuestas celulares incluidas pero no limitadas a la fuga de enzimas desde las células, fluctuaciones del pH efluente y la liberación de especies reactivas con oxígeno.

10 La señal de fluorescencia producida por cada filtro o material poroso es proporcional a la magnitud de la respuesta celular. La distribución de filtros o materiales porosos demostraría un patrón característico de intensidad de fluorescencia que sería indicativo del estado de la distribución de células. La señal de fluorescencia de la distribución puede recogerse de manera periódica según sea necesario utilizando la instrumentación resumida unos párrafos antes en la sección que describe sensores. Los datos obtenidos de la distribución de fluoróforos pueden interpretarse con software de reconocimiento de patrones para poner en correlación el patrón de la señal de fluorescencia con el estado de la distribución de células. Tres potenciales lecturas de salida fluorescentes de infección, cada una como función de la evolución temporal, son las fugas de enzima citosólica, reducción de NAD(P)H citosólica y la expresión de GFP enlazados a promotores inducibles por esfuerzo en células endoteliales o hepatocitos. Otras lecturas de salida fluorescentes incluyen la activación de la actividad mitocondrial y de las caspasas como informan marcadores tales como la rodamina 123.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato que comprende una distribución de pares aislados de biorreactor de perfusión y de depósito para cultivar células o tejido, el aparato comprende
  - 5 un colector de fluidos que comprende una distribución de pares aislados de biorreactor de perfusión y depósito para el cultivo celular o tisular, y
  - un colector de control que comprende canales de control común accionados en paralelo para actuar simultáneamente sobre cada par de biorreactores y depósitos,
  - en donde cada par fluidamente aislado, de biorreactor de perfusión y depósito, se conecta por un canal de fluido que permite la recirculación de un medio de cultivo celular,
  - 10 en donde cada par, de biorreactor de perfusión y depósito, se aísla fluidamente de todos los otros pares, de biorreactores de perfusión y depósitos,
  - en donde cada canal de control se separa de la válvula de fluido por un diafragma de canal de fluido, definida por una membrana monolítica elastomérica emparedada que puede ser desviada a una cámara de desplazamiento de válvula por un accionamiento hidráulico o neumático que utiliza los canales de control común para hacer circular el medio a través de la distribución de pares de biorreactor y depósito por lo que las válvulas definen unas bombas para el medio de cultivo
  - 15 en donde las válvulas de cada par de biorreactor y depósito se conectan en serie y en donde las válvulas de todos los biorreactores en la distribución son accionadas en paralelo a través de los canales de control común
  - en donde el volumen del medio de cultivo celular bombeado a través del canal de fluido al biorreactor o al depósito se determina por el volumen de la cámara de desplazamiento de válvula, y
  - 20 en donde cada biorreactor de perfusión comprende una estructura tridimensional desmontable de soporte de células o tejidos a través de la que se perfunde el medio de cultivo celular.
2. El aparato de la reivindicación 1 en donde la estructura de soporte tridimensional de células o tejidos es o incluye un armazón o portador formados por un método seleccionado del grupo que consiste en la tecnología
  - 25 convencional de procesamiento de silicio, tal como la fotolitografía, ataque químico húmedo, ataque químico profundo iónico reactivo, micromecanizado, mecanizado por descarga de electrones, moldeo por inyección con reacción, moldeo por inyección de termoplástico, micromoldeo, punzonado, tecnologías de sólidos de forma libre, micromoldeo, repujado, taladrado con láser y mecanizado con haz de electrones.
3. El aparato de la reivindicación 1 en donde la estructura tridimensional de soporte de células/tejidos se hace
  - 30 de material poroso.
4. El aparato de la reivindicación 1 en donde la estructura de soporte de células/tejidos se forma por una distribución de microcanales en una película u hoja sólidas soportadas por una membrana o filtro microporosos.
5. El aparato de la reivindicación 1 en donde todos los pares de biorreactor/depósito en la distribución se cubren con una tapa común desmontable.
- 35 6. El aparato de la reivindicación 1 que comprende un dispositivo para el pipeteo manual o robótico de siembra de células/tejidos, adición de agente o recogida de muestras.
7. El aparato de la reivindicación 1 en donde el medio de cultivo celular en múltiples biorreactores se bombea por el accionamiento secuencial de las válvulas conectadas en serie.
8. El aparato de la reivindicación 1 que comprende además un primer conjunto de células.
- 40 9. El aparato de la reivindicación 8 que comprende además un segundo conjunto de células introducido después de que se establezca el tejido inicial de biorreactor.
10. El aparato de la reivindicación 9 en donde el segundo conjunto de células son células tumorales.
11. El aparato de la reivindicación 9 en el que el segundo conjunto de células son células madre.
12. El aparato de la reivindicación 8 que comprende células tumorales que crecen en el ambiente del tejido hepático.
- 45 13. El aparato de la reivindicación 8 que comprende células tumorales que pueden estudiarse en cuanto a conductas de células tumorales.

14. El aparato de la reivindicación 9 en donde los sucesos moleculares pueden visualizarse durante el crecimiento de las células tumorales.
15. El aparato de la reivindicación 8 en donde el primer conjunto de células puede modificarse antes o después de la introducción en el aparato.
- 5 16. El aparato de la reivindicación 1 que comprende células tumorales primarias de pacientes para pruebas de diagnóstico y pronóstico.
17. El aparato de la reivindicación 16 en donde las células tumorales pueden evaluarse en cuanto a su sensibilidad a un agente o terapia génica.
- 10 18. El aparato de la reivindicación 12 en donde la sensibilidad de las células tumorales a un agente o a terapia génica se vinculan al metabolismo, que hace el hígado, de un agente o terapia génica.
19. El aparato de la reivindicación 11 en donde el segundo conjunto de células introducidas son células madre o progenitoras, y las células madre o progenitoras son inducidas por el tejido maduro para diferenciarse.
20. El aparato de la reivindicación 8 que comprende células maduras que se pueden inducir para reproducirse mediante la manipulación de los caudales o los componentes del medio en el sistema.

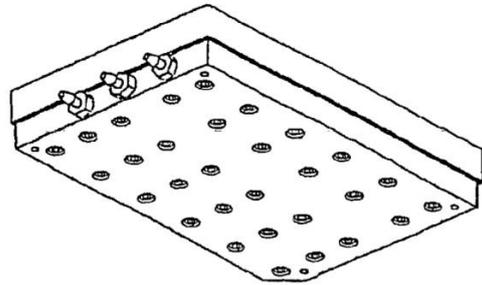
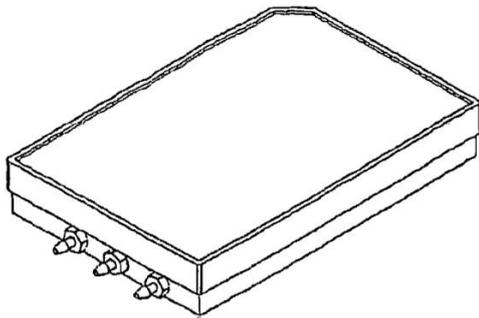


FIG. 1 VISTA ISOMÉTRICA (SUPERIOR) FIG. 2 VISTA ISOMÉTRICA (INFERIOR)

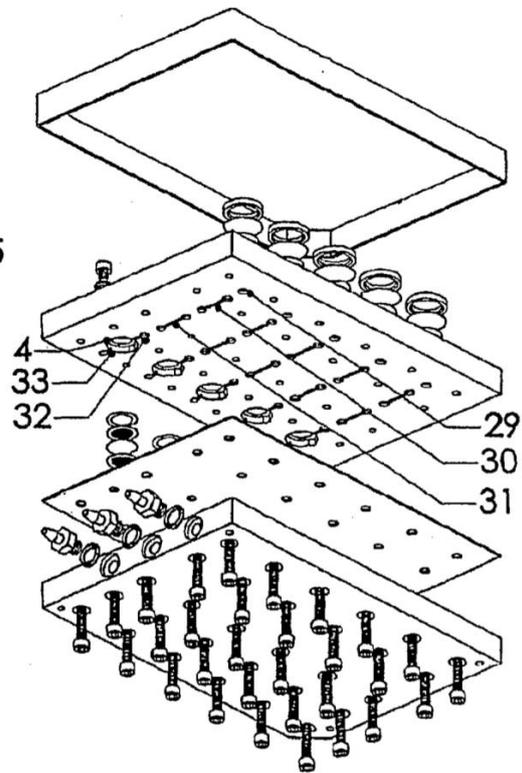
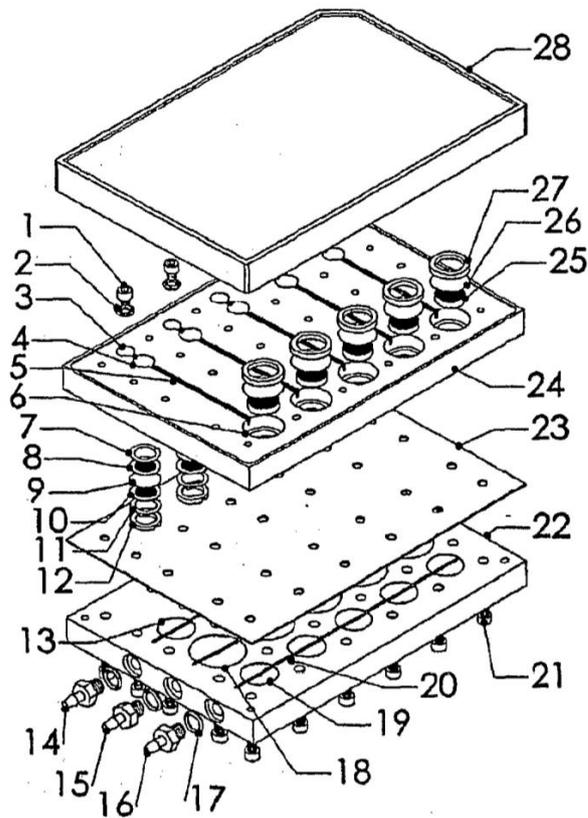


FIG. 3 VISTA EN DESPIECE ORDENADO (SUPERIOR)

FIG. 4 VISTA EN DESPIECE ORDENADO (INFERIOR)

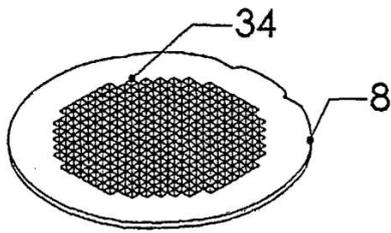


FIG. 5 VISTA ISOMÉTRICA EN DETALLA DEL ARMAZÓN

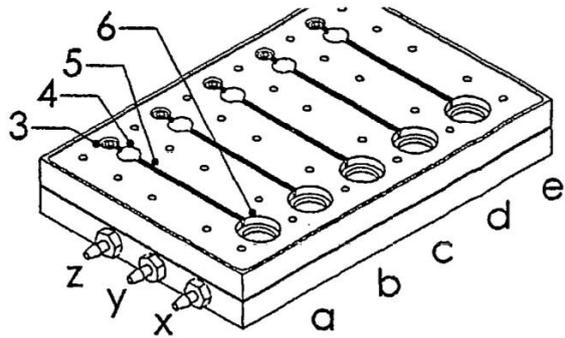


FIG. 6 VISTA ISOMÉTRICA (CON LA TAPA QUITADA)

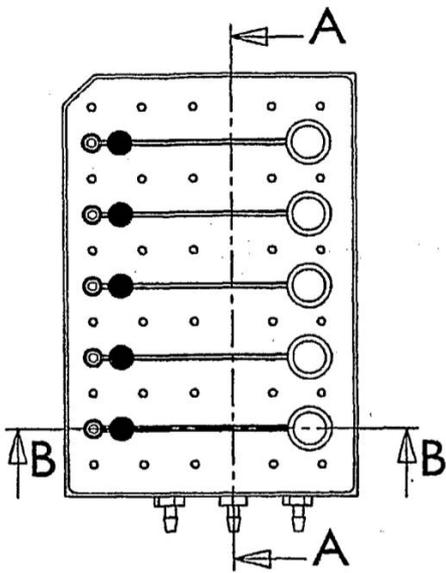


FIG. 7 VISTA SUPERIOR (CON LA TAPA QUITADA)

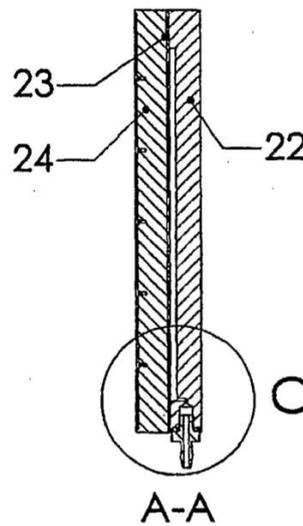


FIG. 8 SECCIÓN TRANSVERSAL A-A

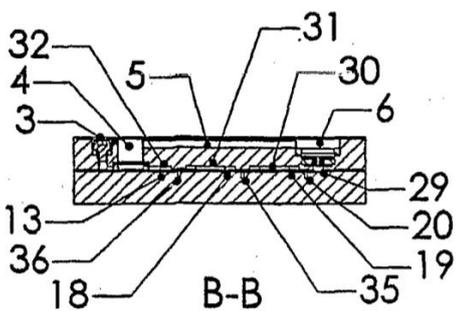


FIG. 9 SECCIÓN TRANSVERSAL B-B

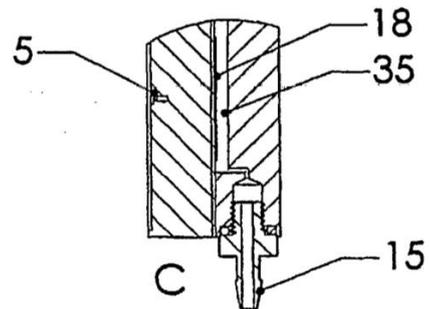


FIG. 10 VISTA EN DETALLE C DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL A-A