

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 615**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11741408 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2542663**

54 Título: **Sistema de circulación**

30 Prioridad:

06.08.2010 EP 10008244

06.08.2010 US 371368 P

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

16.10.2014

73 Titular/es:

TISSUSE GMBH (100.0%)

**Markgrafenstrasse 18
15528 Spreenhagen, DE**

72 Inventor/es:

**MARX, UWE;
LINDNER, GERD;
HORLAND, REYK;
HOFFMANN, SILKE y
LAUSTER, ROLAND**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 508 615 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de circulación.

Introducción

5 Esta invención se refiere a un sistema de circulación autónomo que facilita la formación de capilares en secciones de crecimiento de capilares y permite la formación de microorganoides y/o secciones de microtejido para monitorizar el efecto de uno o más compuestos de ensayo y determinar la eficacia, los efectos secundarios, la bioseguridad, los metabolitos, el modo de acción o la regeneración de órganos, así como métodos para establecer tales microorganoides y/o microtejido en tal sistema de circulación autónomo.

Antecedentes de la invención

10 Se han realizado enormes esfuerzos para desarrollar sistemas de circulación para el suministro de nutrientes fisiológicos y la eliminación de desechos de tejidos cultivados in vitro. Estos desarrollos tienen como objetivo la generación in vitro de equivalentes de órganos, tales como el hígado, los nodos linfáticos (Giese et al., 2010, Journal of Biotechnology 148, 38-45) y el pulmón (Huh et al., 2010, Science, (328) 5986, págs. 1662 - 1668) o incluso de sistemas multiorgánicos (Sonntag et al., 2010, Journal of Biotechnology 148, 70-75) para ensayos de sustancias, la
15 investigación sobre la regeneración de órganos o para la fabricación de trasplantes. Inicialmente los sistemas técnicos de perfusión basados en membranas, fibras huecas (Catapano y Gerlach, Bioreactors for Liver Tissue Engineering. 2. Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007, 1-42 Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini) o redes de microcanales (Du et al., Capítulo 7: Microfluidic Systems for Engineering Vascularized Tissue Constructs” 2008 (Capítulo de libro)) fueron utilizados para estos propósitos.

20 En un sistema de soporte hepático desarrollado por Gerlach y colaboradores tres haces de fibras huecas son entretelados entre sí, formando múltiples microespacios de cultivo idénticos para la perfusión de plasma y el suministro de oxígeno. La perfusión de plasma humano está asegurada por dos haces de membrana de fibra hueca de microfiltración, mientras que la oxigenación tiene lugar a través de una membrana de transporte de oxígeno impermeable al líquido. Sistemas de soporte hepáticos basados en este principio han funcionado bien durante varias
25 semanas, estando incluidos en un circuito de flujo de plasma de los pacientes.

Du et al. reunieron plataformas fluidicas para la generación de construcciones de tejido microvascularizado basadas en hidrogeles y técnicas de microfabricación. La visión general destaca la capacidad técnica para formar una red de capilares sanguíneos como estructuras de canales dentro de materiales poliméricos para la perfusión eficiente de líquido a través de cultivos de tejido. La mayoría de los microsistemas resultantes fueron utilizados para la perfusión
30 técnica de alta eficacia sin incluir células endoteliales.

Tales sistemas están limitados al uso de medios de cultivo o plasma, pero no permiten la perfusión de sangre completa debido a los fenómenos de coagulación. Además no proporcionan la barrera de tejido sanguíneo natural, que in vivo está compuesta por una capa de células endoteliales cerradas. Esto permite el transporte activo a través de la capa de células, así como la señalización del tejido en la red capilar. Se han desarrollado diferentes enfoques
35 para sistemas de perfusión técnica en línea (Song et al., 2005, Anal. Chem, 2005, 77, 3993-3999) o matrices sintéticas o biológicas (Zhang et al., 2009, Biomaterials, 30 (19): 3213-3223; Walles, 2010, Journal of Biotechnology 148, 56-63) con células endoteliales.

Song y sus colaboradores desarrollaron un soporte microcirculatorio para cultivar células endoteliales sometidas a tensión de cizalladura definida. Monocapas cerradas de células endoteliales pudieron establecerse en
40 compartimentos de cultivo de células individuales situados entre los canales de transporte técnico.

Para generar injertos vasculares elaborados con ingeniería tisular (TGVG) Zhang et al. desarrollaron una construcción elaborada con ingeniería tisular que imitaba la estructura de los vasos sanguíneos utilizando soportes tubulares de fibroína de seda electrohilados con propiedades mecánicas adecuadas. Sembraron células de músculo liso de arteria coronaria humana (HCASMC) y células endoteliales de arteria aórtica humana (HAEC) sobre la
45 superficie luminal de los soportes tubulares y fueron cultivadas bajo flujo pulsátil fisiológico, que fue generado dentro del biorreactor de doble bucle usando tubos externos y bombas.

Una matriz totalmente biológica para el establecimiento de una vasculatura endotelializada in vitro fue usada por Walles et al. conectando tubos poliméricos y un sistema de bombeo controlado a un segmento de intestino animal descelularizado. En este sistema los capilares que están totalmente cubiertos por células endoteliales se limitan a
50 las áreas funcionalmente relevantes de la biomatriz.

El documento US 2004/203147 A1 se refiere a métodos y estructuras para el crecimiento de tejido orgánico vivo.

El documento US 2007/224677 A1 se refiere a métodos para la creación de sistemas de microvasos perfundibles.

El documento US 2009/191631 A1 se refiere a placas de Petri 3D para el cultivo y estudios de células.

Sin embargo, ninguno de los sistemas de circulación de la técnica anterior era adecuado para el cultivo de tejido a largo plazo basado en sangre completa como se proporciona en esta solicitud.

5 La presente invención se refiere a un sistema de circulación cerrado y autónomo que emula el entorno de perfusión de la sangre natural de los vertebrados a nivel tisular. El sistema utiliza una circulación de la sangre fisiológica en miniatura para proporcionar circulación de un volumen de microlitros para soportar miligramos de tejido. Esto imita la relación fisiológica de los seres humanos, donde litros de volumen de sangre soportan kilos de tejido a una microescala compatible con un chip. El sistema de circulación autónomo contiene al menos una sección de crecimiento de capilares situada entre las microentradas y las microsalidas del sistema.

10 Una sección de crecimiento de capilares para la formación de capilares sanguíneos que permiten el intercambio de nutrientes está integrada en la circulación, además de una bomba en miniatura y canales de transporte.

Breve resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de circulación (1) que es autónomo y comprende:

- 15 a. al menos una sección de crecimiento de capilares (2), que comprende al menos dos microentradas (3) y dos microsalidas (4),
- b. un dispositivo de bombeo direccional (5), y
- 20 c. un canal de transporte arteriolar (6) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos entradas (3) y un canal de transporte venular (7) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos salidas (4), en el que está prevista una subsección (16) dentro de la sección de crecimiento de capilares que carece de microentradas y salidas y tiene una distancia de al menos 100 μm y hasta 500 μm de las microentradas y/o salidas.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para establecer un sistema de circulación (1) de la invención, que comprende las etapas de:

- 25 a. siembra de células endoteliales en el sistema de circulación (1), e
- b. incubación al menos hasta que se hayan formado capilares (14) en la sección de crecimiento de capilares (2) y/o hasta que una capa de células endoteliales se haya formado en los canales de transporte y/o hasta que una capa de células endoteliales haya cubierto todas las superficies interiores del dispositivo de bombeo (5).

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso del sistema de circulación (1) según la presente invención, o que puede ser producido según la presente invención, para monitorizar el efecto de uno o más compuestos de ensayo y/o para la determinación de la eficacia, los efectos laterales, la bioseguridad, los metabolitos, el modo de acción o la regeneración de órganos.

Descripción detallada de la invención

35 Antes de describir en detalle la presente invención a continuación hay que entender que esta invención no está limitada a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. Hay que entender también que la terminología usada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se determine lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que son entendidos comúnmente por un experto ordinario en la técnica.

40

Preferiblemente, los términos utilizados en este documento se definen como está descrito en: "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W., Nagel, B. y KIBI, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza) y como se describen en "Pharmaceutical Substances : Syntheses, Patents, Applications" de Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 ; el " Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", editado por Susan Budavari et al., CRC Press, 1996 , y la United States Pharmacopeia-25/National Formulary-20, publicado por United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville Md., 2001.

45

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán como que implican la inclusión de una característica indicada, número entero o etapa o grupo de características, números enteros o etapas, pero sin excluir cualquier otra característica, número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. En los siguientes pasajes se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido puede ser combinado con cualquier otro aspecto o aspectos, a menos que se indique claramente lo

50

contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferente o ventajosa puede ser combinada con cualquier otra característica o características indicadas como preferentes o ventajosas.

Son citados varios documentos en el texto de esta memoria descriptiva.

5 A continuación se proporcionan algunas definiciones de términos usados con frecuencia en esta memoria descriptiva. Estos términos, en cada caso de su uso, tienen en el resto de la memoria descriptiva, el significado y significados preferidos respectivos definidos:

"Células" significa líneas celulares o células primarias de vertebrados o invertebrados.

10 "Organoides" significa agregados de células funcionales artificiales generadas de novo de diferentes tipos de células in vitro que muestran al menos una función de órgano o tejido, preferiblemente muestran la mayoría o esencialmente todas las funciones de los órganos o tejidos.

"Tejidos" representa material de biopsia o explantes tomados de pacientes o animales o en tejidos generados in vitro.

"Diferenciación" significa el desarrollo de funciones específicas de tejido de células cultivadas.

15 "Mantenimiento" describe la capacidad de mantener todas las funciones de una constante de tejido dada dentro de un proceso de cultivo de células dado, preferiblemente sin signos significativos de muerte celular y/o apoptosis.

"Medio" (forma plural: "medios") significa el líquido de soporte de crecimiento con nutrientes y sustancias para el cultivo de células. Ejemplos de medios adecuados comprenden DMEM, F12 de Ham y RPMI.

20 "Matriz" significa sustancias o mezclas de sustancias que mantienen la viabilidad, aumentan la proliferación, diferenciación y función de las células y/o la formación de organoides u órganos. El material de matriz es proporcionado preferiblemente en una forma que pueda ser adaptada para llenar el espacio de la sección de crecimiento de capilares (2). Matrices utilizables en el contexto de la presente invención pueden adoptar una variedad de formas que comprende, por ejemplo, hidrogeles, espumas, telas tejidas o telas no tejidas. El material de matriz puede comprender sustancias de matriz de origen natural, tales como proteínas de matriz extracelular, preferentemente colágenos, lamininas, elastina, vitronectina, fibronectina, pequeñas proteínas matricelulares, pequeñas glicoproteínas de tipo integrinas, factores de crecimiento o proteoglicanos o puede incluir sustancias de matriz artificiales como polímeros no degradables, tales como fibras de poliamida, metilcelulosa, agarosa o geles de alginato o polímeros degradables, por ejemplo poliactida.

25 "Superficie interior" significa aquellas superficies del sistema de circulación (1) que están en contacto directo con los medios de circulación, el plasma y/o la sangre, por ejemplo, sangre completa.

30 Para superar los problemas asociados a los sistemas de cultivo de células de la técnica anterior, la presente invención proporciona un sistema de circulación (1) como está descrito en la reivindicación 1.

35 "Autónomo" se refiere al hecho de que el fluido del sistema circula dentro del mismo, es decir, entre el dispositivo de bombeo direccional (5), la sección o secciones de crecimiento de capilares (2), y a que preferentemente no hay conexión fluidica para proporcionar continuamente fluido, por ejemplo, medio, sangre, desde un depósito de fluido externo dentro del sistema de circulación (1). "Externo" en este contexto significa que el depósito de fluido no es una parte integral del sistema de circulación, por ejemplo, está conectado mediante un tubo al sistema de circulación.

40 Si sustancias, por ejemplo nutrientes y/o fluidos, tienen que ser repuestas durante el curso de la incubación, es preferible que tales nutrientes o fluidos sean suministrados de forma discontinua a través de un puerto de inyección (17), que preferiblemente está localizado en un canal de transporte arteriolar o venular o conectado a la sección de crecimiento de capilares. En el primer caso, las sustancias, por ejemplo nutrientes y/o fluidos, son inyectadas directamente en el interior de los capilares. Esta inyección conduce potencialmente a una lesión de las células endoteliales que revisten la abertura del puerto de inyección (17) en la superficie interior del sistema de circulación (1). En el último caso la inyección aumenta la presión del fluido en el espacio extracapilar alrededor de los capilares formados en la sección de crecimiento de capilares. Los fluidos y nutrientes se disiparán en la circulación a través de los capilares debido a la mayor presión parcial en el espacio extracapilar. Para evitar un incremento de la presión en el sistema con el tiempo y con inyecciones repetidas de sustancias a ser repuestas, es preferible que el sistema de circulación comprenda además un depósito de compensación de la presión. Si el puerto de inyección (17) está dispuesto para permitir la inyección en el interior de los capilares, es preferible que el depósito de compensación de la presión esté conectado al espacio extracapilar. Recíprocamente, si el puerto de inyección (17) está dispuesto para permitir la inyección en el espacio extracapilar, es preferible que el depósito de compensación de la presión esté conectado al interior o los capilares. En alguna realización preferida, el depósito de compensación de la presión tiene una abertura, preferiblemente un pequeño orificio o una válvula de una vía, para liberar gas del depósito de compensación de la presión. Esta abertura está configurada preferiblemente de manera que solo libere gas al entorno si se alcanza una presión umbral establecida. Los medios adecuados son, por ejemplo, válvulas de una vía cargadas por resorte o tapones de silicona con una ranura. Por este medio es posible evitar la sobrepresurización

del sistema de circulación, que puede dañar el capilar formado. Teniendo en cuenta los pequeños volúmenes de líquido total comprendidos en el sistema, es preferible que volúmenes muy pequeños, por ejemplo menores del 10 % del volumen total, sean inyectados en cualquier momento dado. El método preferible para cargar fluidos y/o células en la circulación es la introducción de un inyector, preferiblemente una aguja de inyección, en el puerto de inyección para la inyección de fluidos y/o células en la circulación por una velocidad de movimiento del inyector ajustada a la velocidad de movimiento de las células endoteliales. Esto es particularmente preferido una vez que se haya formado una monocapa de células endoteliales cerrada. Es preferible que el puerto de inyección sea de autosellado, es decir, que cierre el líquido y preferiblemente sea también estanco al aire una vez que el dispositivo de inyección, por ejemplo una jeringa, ha sido retirado. Ejemplos de tales puertos de inyección de autosellado son bien conocidos en la técnica e incluyen, válvulas de una vía y tapones de silicona.

En realizaciones preferidas, el puerto de inyección (17) y/o el depósito de compensación de la presión están separados de la circulación o del espacio extracapilar por una membrana de retención de células, es decir, una membrana que tiene un tamaño medio de poro más pequeño que el tamaño medio de las células que crecen en el sistema de circulación (1) de la invención o por canales de exclusión de células que están dimensionados para excluir que las células crezcan en el sistema de circulación (1) de la invención para prevenir la obstrucción o escape de células.

Es posible inyectar gas con junto con fluidos, ya sea durante el llenado inicial del sistema o durante las inyecciones posteriores. Para evitar la obstrucción de la circulación por las burbujas de gas atrapadas, es preferible proporcionar una o más trampas para burbujas de gas en el sistema de circulación (1). Tales trampas pueden tener la forma de cavidades o muescas en el lado orientado hacia arriba de un canal de transporte arteriolar o venular.

Adicionalmente es preferible que el medio gaseoso, por ejemplo O_2/CO_2 sea proporcionado a la sección de crecimiento de capilares (2) de una manera pasiva, por ejemplo, mediante difusión en la sección de crecimiento de capilares (2) a través de una matriz biocompatible permeable al gas (8) y/o a través de canales de transporte arteriolar (6).

Es una de las ventajas del sistema de circulación (1) que es posible mantener dos o más tejidos diferentes y/o organoides (15) dentro de un sistema autónomo, que son perfundidos por el mismo fluido circulante y, por tanto, están en conexión fluidica como en el entorno natural. El número de secciones de crecimiento de capilares (2) es determinado generalmente por el número de tejidos y/o organoides (15) separados a ser mantenido. Por tanto, en una realización preferida del sistema de circulación (1) de la presente invención, el sistema de circulación (1) comprende al menos dos secciones de crecimiento de capilares (2); preferiblemente comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 secciones de crecimiento de capilares (2).

El intercambio de gases, por ejemplo de O_2/CO_2 , se efectúa preferiblemente proporcionando canales de transporte alveolares y venulares (7) permeables al gas, es decir, los canales de transporte alveolares y venulares comprenden o consisten en un material permeable al gas. Dependiendo del volumen total de fluido en el sistema y del área superficial total del canal de transporte (5, 6), la perfusión de O_2/CO_2 a través de la superficie interior de los canales de transporte puede no ser suficiente para mantener las células y/o organoides (15) en el sistema de circulación (1). En estos casos es preferible que el material de una sección de crecimiento de capilares (2) sea al menos en parte permeable al gas y de este modo funcione como un "micropulmón" suministrando O_2 a todo el sistema de circulación (1). Por consiguiente, es preferible que una o más paredes de la sección de crecimiento de capilares comprendan o consistan en un material permeable al gas. Materiales permeables al gas adecuados son conocidos en la técnica. Preferiblemente, el material que se utiliza para formar una o más paredes de la sección de crecimiento de capilares es polidimetilsiloxano (PDMS).

La sección de crecimiento de capilares (2) es un espacio que está previsto para la formación de capilares (14) mediante células endoteliales y opcionalmente células de músculo liso que son sembradas en el sistema. La sección de crecimiento de capilares es llenada preferiblemente con una matriz (8) que sirve para el propósito de proporcionar un soporte de crecimiento para los capilares (14) que se forman naturalmente una vez que las células endoteliales son sembradas en el sistema y el fluido circula a través de la sección de crecimiento de capilares (2). Es preferible, por tanto, que la matriz biocompatible (8) comprenda microcanales, estructuras y/o redes que permitan y faciliten la formación de capilares (14) por las células endoteliales. Preferiblemente, estas estructuras por sí mismas no tienen la forma de los capilares posteriores, sino que simplemente proporcionan puntos de fijación y/o guía para los capilares formados. Es preferible que la sección de crecimiento de capilares (2) comprenda o consista en una matriz biocompatible semisólida (8). Una vez que las células endoteliales son sembradas en el sistema, los capilares (14) comenzarán a formarse típicamente empezando por las microentradas (3) y crecerán dirigidos por el flujo de fluido para conectar eventualmente con una de las microsaldas (4). Alternativamente, son proporcionadas fibras huecas biocompatibles (9), ya sea solas o incrustadas en una matriz biocompatible (8) como se indicó antes. Estas están conectadas preferiblemente por un lado a la microentrada y por el otro lado a la microsaldad (4), guiando así el crecimiento de las células endoteliales. Para mantener la elasticidad de los capilares resultantes (14) es preferible que el material de la fibra hueca biocompatible (9) sea biodegradable; ya que esto permite su eliminación con el tiempo una vez que el capilar ha sido formado.

Preferiblemente la matriz biocompatible (8) comprende o consiste en matrigel, gel de fibrina, gel de agarosa, gel de alginato, gel sintético, polímeros reticulables y la fibra hueca biocompatible (9) consiste preferiblemente en un material seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), poli(láctido-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL) y poli(anhídrido fumárico-co-sebácico), alcohol de polivinilo, copolímero de etileno y ácido acrílico, ácido poliacrílico, ácido poliglicólico, polilactida, derivados de celulosa, carbometoxi/etil/ hidroxipropil, ácido hialurónico, ciclodextrina/dextrano ligado por ácido fólico, polímero espaciado por sarcosina/aminoácido, carragenina, pectina/quitosano, quitosano, dextrano, colágeno o sus mezclas. Polímeros reticulables preferibles son los derivados de PEG de la fórmula PEG-(DCR- CG)_n, donde PEG es poli(etilenglicol), DCR es una región de control de degradación, CG es un grupo de reticulación, y n es mayor o igual que 3. Materiales particularmente preferidos para la fibra hueca biocompatible (9) son PLA y PLGA.

La elección de los materiales de la matriz y/o de la fibra hueca, así como de los canales de transporte arteriolares o venulares determina que la superficie interior del sistema de circulación de la invención se cubre rápida y completamente con células endoteliales.

El análisis del transporte de oxígeno ha llevado al concepto de que el sitio del tejido más distante del extremo de entrada del capilar forma una esquina letal (Intaglietta et al., 1996, Cardiovascular Research 32, 632-643). Puesto que áreas de baja presión parcial de O₂ están también presentes en el cuerpo, por ejemplo en el tejido tumoral, es un objetivo de la presente invención establecer una llamada región de "neovascularización" (16) dentro de la sección de crecimiento de capilares (2), es decir, una sección en la que no se formen capilares (14) durante el establecimiento inicial de los capilares (14) en el sistema de circulación (1) de la presente invención. Esto se consigue previendo una subsección (16) dentro de la sección de crecimiento de capilares (2) que carece de microentradas (3) y salidas (4). Si esta subsección (16) está lo suficientemente alejada de las correspondientes microentradas (3) y microsaldas (4), la formación de capilares (14) se ve disminuida en esta subsección. La subsección está suficientemente distante si no se forman capilares en su interior. La subsección está alejada al menos 100 µm y hasta 500 µm, preferiblemente la subsección tiene una distancia de las microentradas (3) y/o microsaldas en el intervalo de 100 µm a 300 µm. Es entonces posible poner cualquier tejido u organoide de elección en esta zona, por ejemplo tejido tumoral, para investigar las indicaciones para la formación de los capilares (14) o los procesos de regeneración. Como se describe con más detalle después, es preferible que una parte del material que delimita la sección de crecimiento de capilares (2) pueda ser retirado para permitir el acceso a la sección de crecimiento de capilares (2). Se prevé que las células y/o organoides sean introducidos a través de esta abertura en la sección de crecimiento de capilares (2). Después la abertura es cubierta para ser estanca al fluido. El material de la cubierta es seleccionado preferiblemente de materiales translúcidos, por ejemplo vidrio o plástico, que permiten la inspección microscópica de la sección de crecimiento de capilares (2) por microscopía. Preferiblemente, el material es no permeable al gas. Sin embargo, en la realización en la que una o más secciones de crecimiento de capilares tienen la función de un "micropulmón", tales secciones de crecimiento de capilares están tapadas con una cubierta permeable al gas. Preferiblemente, la sección de crecimiento de capilares (2) es moldeada o aplastada para formar un bloque sólido de un material dado, preferiblemente en forma de paralelepípedo. En estas realizaciones es preferible que la abertura esté en el lado superior del bloque y se extienda por toda la zona superficial de la sección de crecimiento de capilares (2).

La formación de capilares (14) por las células endoteliales es favorecida si a la zona a ser vascularizada no se le suministra oxígeno. Además, la longitud máxima de los capilares (14) no debería exceder de 4 mm, porque los tejidos circundantes a densidades naturales consumen totalmente los nutrientes, especialmente el oxígeno, proporcionados a través de dichos capilares (14) dentro de esa distancia.

Por consiguiente, en una realización preferida la distancia entre las microentradas (3) y las microsaldas (4) que van a ser conectadas por los capilares recién formados (14) no debería exceder esta distancia máxima para fomentar el crecimiento de los capilares (14). Por consiguiente, es preferible que la distancia entre una microentrada (3) y la microsaldas (4) más cercana esté en el intervalo de 0,2 mm a 4 mm, más preferiblemente de 0,3 a 2 mm, incluso más preferiblemente de 0,4 mm a 1 mm, preferiblemente sea de aproximadamente 0,5 mm. La anchura de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,5 mm y 1,5 mm, preferiblemente es de 1,0 mm y/o la altura de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,3 y 0,7 mm, preferiblemente es de 0,5 mm. El volumen de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,03 µl y 4,2 µl, preferiblemente entre 0,5 µl y 1,0 µl. El volumen total de la sección de crecimiento de capilares (2), los canales de transporte arteriolares (6), el canal de transporte venular (7) y el dispositivo de bombeo direccional (5) está entre 1,0 µl y 100 µl, preferiblemente entre 5,0 µl y 15 µl.

Para promover el crecimiento de conexiones lineales de capilares es preferible que cada una de las microentradas (3) y las microsaldas (4) estén dispuestas en extremos opuestos de la sección de crecimiento de capilares (2). Es preferible que la sección de crecimiento de capilares tenga una forma esencialmente de paralelepípedo, preferiblemente cúbica. Preferentemente, la microentrada y la microsaldas están dispuestas en caras opuestas del paralelepípedo. La longitud del paralelepípedo es determinada entonces por la distancia entre las microentradas y las microsaldas. Es particularmente preferible que cada microentrada (3) esté directamente alineada con una microsaldas (4) correspondiente.

Se desea que el oxígeno sea suministrado a las secciones de crecimiento de capilares a través de los capilares, entonces es preferible que el material que forma las paredes de la sección de crecimiento de capilares tenga una

baja o ninguna permeabilidad al gas. Si, sin embargo, una o más secciones de crecimiento de capilares tienen la función de un micropulmón, estas secciones de crecimiento están diseñadas como se describió antes. Preferiblemente, el material de la pared es seleccionado del grupo que consiste en vidrio o plástico.

5 Como se indicó antes, los capilares (14) se forman autónomamente dentro de la sección de crecimiento de capilares (2) una vez que es sembrada con células endoteliales. Una señal direccional importante para las células endoteliales es el flujo de fluido a través del sistema. Para promover el crecimiento de capilares (14) del tamaño correcto, es preferible que el diámetro de las microentradas (3) y/o microsaldas (4) esté entre 5 μm y 50 μm , más preferiblemente, sea de 15 μm a 30 μm . Los capilares (14) formados tienen un diámetro en el intervalo de 1 a 10 μm , preferiblemente de 5 a 6 μm . Como se establece en más detalle a continuación el número de microentradas y microsaldas de la sección de crecimiento de capilares se corresponde con la zona superficial de los canales de transporte arteriales y venulares. Para proporcionar suficiente oxígeno a los tejidos el número respectivo de microentradas y microsaldas están distribuidos preferiblemente sobre la superficie del lado respectivo de la cámara de crecimiento de capilares. Por la misma razón, la distancia entre dos capilares formados no debería ser inferior a 30 μm . Por consiguiente, es preferible que la distancia entre las microentradas (3) esté en el intervalo de 30 μm a 500 μm , preferiblemente en el intervalo de 80 μm a 200 μm y/o que la distancia entre las microsaldas (4) esté en el intervalo de 30 μm a 500 μm , preferiblemente en el intervalo de 80 μm a 200 μm . En una realización preferida, las microentradas (3) y/o microsaldas (4) están dispuestas en una, dos, tres o cuatro filas.

20 Se prevé que los tejidos y/o organoides (15) estén colocados en la(s) sección(es) de crecimiento de capilares (2) que realizarán su función natural. Por consiguiente, en una realización preferida la sección de crecimiento de capilares (2) comprende además un colector de fluido y/o residuos extracapilares (10). El drenaje del fluido extracapilar es impulsado por las diferencias de presión intracapilares. Esto sirve para el propósito de drenar los líquidos de los tejidos y/u organoides (15), por ejemplo, el páncreas, el riñón y el intestino que secretan fluidos extracapilares. Preferiblemente, el colector de residuos (10) está separado de la matriz biocompatible (8) y/o de la fibra hueca biocompatible (9), de tal manera que evita el flujo de células sanguíneas y/o células de tejido o de organoides de la sección de crecimiento de capilares (2). Preferiblemente, el colector de fluido y/o residuos extracapilares (10) está separado de la sección de crecimiento de capilares (2) restante por una membrana de retención de células (11), es decir, una membrana que tiene un tamaño medio de poro más pequeño que el tamaño medio de las células que crecen en el sistema de circulación (1) de la invención o por canales de exclusión de células que están dimensionados para excluir que las células crezcan en el sistema de circulación (1) de la invención.

35 Para monitorizar el estado del sistema es preferible que uno o más sensores (12) estén dispuestos en el sistema de circulación (1) de la invención, preferiblemente en un canal de transporte alveolar y/o venular (7), en el colector de fluido y/o residuos extracapilares (10), y/o el dispositivo de bombeo direccional. Los sensores (11) que pueden ser usados incluyen, pero no se limitan a sensores de pH, sensores de pO_2 ; sensores de captura de analitos, sensores de conductividad, sensores de resonancia de plasmones, sensores de temperatura, sensores de CO_2 ; sensores de NO, sensores de quimiotaxis, sensores de citoquinas, sensores de iones, sensores de presión, sensores potenciométricos, sensores amperométricos, sensores de flujo continuo, sensores de llenado, sensores de impedancia, sensores de conductividad, sensores de campo electromagnético, sensores de ondas acústicas superficiales y sensores metabólicos. Los sensores (12) usados en este sistema pueden ser sensores que monitoricen la sección de crecimiento de capilares (2) y/o el medio que fluye fuera de la sección de crecimiento de capilares (2) o pueden ser sensores (12) situados dentro del canal y/o depósito de residuos (10).

45 Los canales de transporte imitan las arterias y venas más pequeñas en un sistema sanguíneo y sirven como conexión entre el dispositivo de bombeo direccional (5) y la sección de crecimiento de capilares (2). Por tanto, es preferible que los canales de transporte sean adecuados para ser recubiertos con células de músculo liso y células endoteliales. Los canales de transporte del diámetro y la forma deseados pueden ser proporcionados por micromecanizado de la estructura respectiva en una matriz biocompatible (8) o pueden ser fibras huecas biocompatibles (9). Sin embargo, también es posible utilizar las arteriolas y/o vénulas biológicas descelerizadas. El área superficial de los canales de transporte (6, 7) es suficiente para proporcionar el O_2 requerido a la mayoría de los sistemas a menos que haya demasiadas secciones de crecimiento de capilares (2). Por tanto, es preferible que dicha matriz biocompatible (8) o fibra hueca biocompatible (9) sea al menos en parte permeable al gas, preferiblemente comprenda o consista en PDMS. PDMS es un polímero orgánico a base de silicona, ópticamente claro, viscoelástico y puede ser modelado directamente, por ejemplo, por litografía de carga superficial.

55 En una realización preferida de la invención, el diámetro del canal de transporte arteriolar (6) y/o el canal de transporte venular (7) en su conexión con el dispositivo de bombeo direccional (5) está entre 300 μm y 2,0 mm, preferiblemente es de 500 μm . Es deseable que la velocidad del flujo de fluido en los sistemas de circulación (1) no cambie significativamente en todo el sistema durante la circulación del fluido. Preferiblemente, la velocidad de flujo en el sistema está en el intervalo de 0,02 cm/s a 0,1 cm/s, más preferiblemente de 0,03 hasta 0,07 cm/s, más preferiblemente, es de aproximadamente 0,05 cm/s. Sin embargo, las microentradas (3) y las microsaldas (4) tienen generalmente un diámetro más pequeño y, por lo tanto, una área superficial más pequeña que las microentradas arteriolares (3) y las microsaldas venulares (4), respectivamente, lo que conduciría a un aumento de la tasa de flujo cuando el fluido entra en las microentradas (3). Por consiguiente, es preferible que el canal de transporte arteriolar

(6) se ramifique al menos una vez para conectar con las al menos dos entradas y el canal de transporte venular (7) se ramifique al menos una vez para conectar con las al menos dos salidas (4), respectivamente. Para evitar variaciones significativas del flujo de fluido es preferible que el área combinada de la sección transversal de los canales arteriolares después del punto de ramificación (13) sea esencialmente idéntica al área de la sección transversal del canal arteriolar delante del punto de ramificación (13) y/o el área de la sección transversal combinada de los canales de transporte venulares (7) después del punto de ramificación (13) sea esencialmente idéntica al área combinada de la sección transversal del canal venular delante del punto de ramificación (13). Usualmente, el canal arteriolar (6) o venular (7) conectado al dispositivo de bombeo direccional (5) se ramifica en dos o tres canales arteriolares o venulares (6, 7) de diámetro menor. El número de puntos de ramificación (13) y/o el número de ramas requerido para reducir el diámetro del canal arteriolar y venular al diámetro de la microentrada (3) y microsalida (4) respectivas es determinado por el área de la sección transversal relativa del canal arteriolar (6) y el canal venular (7) y el diámetro y el área de la sección transversal, respectivamente, de las microentradas (3) y micro salidas (4) a la que se conectan. Si, por ejemplo, el canal arteriolar (6) tiene un diámetro de 1 mm y el diámetro de la microentrada (3) es de 50 μm , entonces 400 microentradas (3) tienen la misma área superficial que el canal arteriolar (6) en el dispositivo de bombeo direccional (5). En consecuencia, se requiere proporcionar tantos puntos de ramificación (13) de dos vías, tres vías, cuatro vías o más como sea necesario para conectar cada microentrada individual con una rama de canal arteriolar (6). En una realización preferida, el punto de ramificación (13) son puntos de ramificación (13) de dos vías y por tanto, el número de microentradas (3) está determinado por la fórmula 2^n , donde n es el número de puntos de ramificación (13) en cada trayectoria de flujo. En los casos en que en el sistema de circulación (1) comprende dos o más secciones de crecimiento de capilares (2), la trayectoria de flujo está ramificada para conectar ambas secciones de crecimiento de capilares (2) por separado. No se requiere que las dos ramas tengan la misma superficie en sección transversal, siempre que el área combinada de la sección transversal después del punto de ramificación (13) sea idéntica o esencialmente idéntica al área de la sección transversal delante del punto de ramificación (13). Por ejemplo, en los casos en que se ha formado un "micropulmón" en una sección de crecimiento de capilares (2) puede no ser necesario que sea dirigida a este organoide (15) una cantidad de fluido similar a la de la sección de crecimiento de capilares (2) de otro organoide (15). Por lo tanto, en el punto de ramificación (13) la rama arteriolar que conecta el organoide de pulmón tendrá un área superficial más pequeña que la rama arteriolar que conecta la otra sección de crecimiento de capilares (2). El área combinada de la sección transversal de todas las entradas (3) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal de dicho canal arteriolar y/o canales arteriolares y el área combinada de la sección transversal de todas las salidas (4) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal de dicho canal venular y/o canales venulares, preferiblemente las áreas en sección transversal de los canales arteriolares (6) y venulares (7) son idénticas.

Preferiblemente, el dispositivo de bombeo direccional (5) es una bomba biológica, una bomba hidráulica, una bomba piezoeléctrica, una bomba peristáltica, una bomba neumática, una bomba electromagnética o una bomba magnética. Una bomba biológica está formada, por ejemplo, por cardiomiocitos, que son sembrados preferiblemente sobre polímeros elásticos de una forma que soporta flujo pulsátil en la contracción de los cardiomiocitos (Tanaka et al., 2006, Lab Chip, 6, 362-386). El espasmo de los cardiomiocitos proporciona la contracción necesaria para la acción de bombeo. La direccionalidad del flujo, es decir, desde los canales venulares dentro de los canales arteriolares del dispositivo de bombeo (5), puede ser establecida por el modo de accionamiento de la bomba (5) que conduce a la expulsión de fluido solo en un lado de la dispositivo de bombeo (5) o en casos, en los que el dispositivo de bombeo (5) simplemente pulsa por otros elementos que fomentan un flujo direccional en los canales arteriolares. Por consiguiente, en una realización preferida el dispositivo de bombeo direccional (5) comprende uno o más elementos de flujo direccionales, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en un elemento de tipo chorro y un elemento de válvula unidireccional. Los elementos de flujo pueden estar dispuestos en la trayectoria de flujo del canal de transporte venular (7) delante del dispositivo de bombeo direccional (5) y/o en la trayectoria de flujo en el canal arteriolar después del dispositivo de bombeo direccional (5). En el caso de elementos de tipo chorro es preferible que estén dispuestos en ambos extremos del dispositivo de bombeo direccional (5). Preferiblemente, el mecanismo de bombeo está basado en las pulsaciones de la matriz/membrana de PDMS elástica preferida accionada por la cámara de bombeo para generar un flujo peristáltico continuo del medio.

Preferiblemente, la superficie interior de dichos canales de transporte y/o el dispositivo de bombeo direccional (5) están recubiertos con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en péptidos o proteínas que favorecen la adhesión celular en polímeros biocompatibles o una mezcla de los mismos. Las moléculas de adhesión adecuadas para el mantenimiento de las células son seleccionadas del grupo que consiste en integrinas, albúminas, fibrinas, adhesinas y/o colágenos, o sus mezclas. Este recubrimiento fomenta la cobertura completa de la superficie interior del sistema de circulación (1) con células endoteliales y/o células de músculo liso.

En una realización preferida del sistema de circulación (1) de la presente invención comprende además capilares (14) y/o organoides (15) formados en la sección de crecimiento de capilares (2).

Preferiblemente, la sección de crecimiento de capilares (2), el dispositivo de bombeo direccional, el(los) canal(es) (6) de transporte arteriolar(es) y el canal de transporte venular (7) están hechos en una sola pieza. La una sola pieza puede estar compuesta de diferentes materiales que se adhieren entre sí. Por ejemplo, el dispositivo de bombeo direccional (5), el(los) canal (es) de transporte arteriolar(es) (6) y el canal de transporte venular (7) están formados, por ejemplo, por micromecanizado o moldeado en un bloque de material permeable al gas, por ejemplo PDMS. La

parte que comprende la sección de crecimiento de capilares y las microentradas y microsaldas está formada de un material no permeable al gas, que se adhiere a la otra parte de manera que cada microentrada y microsaldada está alineada, respectivamente, con un canal de transporte arteriolar (6) y el canal de transporte venular (7), respectivamente. Como también es preferible que la matriz (8) y/o las fibras huecas que está(n) dispuesta(s) en la sección de crecimiento de capilares esté(n) hechas de un material diferente al de la sección de crecimiento de capilares, es preferible que esta parte sea producida por separado y sea insertada en la sección de crecimiento de capilares. Preferiblemente, la sección de crecimiento de capilares es tapada después por una cubierta no permeable al gas a menos que sirva para la función de un micropulmón.

Preferiblemente, las dimensiones de un sistema de circulación (1) de la invención soportan la circulación continua de 4-8 μl de sangre entera a través de un sistema cuyas superficies internas están completamente cubiertas con células endoteliales, preferiblemente una monocapa de ellas. Preferiblemente, este sistema de circulación está configurado para proporcionar nutrientes para al menos dos microorganismos diferentes, cada uno de la escala del microlitro durante varios meses de cultivo. El uso de sangre, preferiblemente sangre entera, determina un sistema tampón fuerte, proporciona todas las proteínas necesarias del plasma a los tejidos, facilita el transporte de oxígeno a través de los eritrocitos y proporciona una actividad inmunológica contra los microorganismos contaminantes a través de las células sanguíneas blancas.

La presente invención proporciona un método para establecer un sistema de circulación (1) que comprende las etapas de:

- a. siembra de células endoteliales en el sistema de circulación (1), e
- b. incubación al menos hasta que se formen capilares (14) en la sección de crecimiento de capilares (2) y/o hasta que se haya formado una capa de células endoteliales en los canales de transporte y/o hasta que una capa de células endoteliales haya cubierto todas las superficies interiores del dispositivo de bombeo (5).

Las células endoteliales pueden formar capilares (14) si son colocadas en un entorno que proporcione un soporte de crecimiento, nutrientes y oxígeno y opcionalmente factores angiogénicos como FGF y/o cadherina de endotelio vascular (VEC). En consecuencia, las células endoteliales son sembradas en el sistema, preferentemente a través del puerto de acceso y son incubadas hasta que se formen los capilares (14), lo que generalmente tarda entre 2 y 10 días, preferiblemente de 2 a 6 días en función del número de células endoteliales sembradas, la distancia entre las microentradas (3) y las microsaldas (4) que van a ser conectadas y la superficie interior total del sistema de circulación (1) de la presente invención a ser cubierta con células endoteliales. Típicamente, son sembradas en el sistema células en el intervalo de 500 a 5.000 con un volumen total de fluido en el intervalo de 1 μl a 100 μl , preferentemente en el intervalo de 5 μl a 50 μl . Naturalmente las arteriolas y las vénulas se componen no solo de células endoteliales, sino que también comprenden células de músculo liso y matrices biocompatibles. Las células de músculo liso proporcionan flexibilidad a las arteriolas y a las vénulas y las hacen impermeables a los fluidos. Por consiguiente, en una realización preferida del método comprende además la siembra de células de músculo liso, ya sea antes, simultáneamente o después de las células endoteliales. Preferiblemente, la razón entre las células endoteliales y las células de músculo liso sembradas está entre 5 a 1 y 0,5 a 1, preferiblemente es de 2 a 1.

Preferiblemente, el método de la invención comprende además la etapa de inyectar sangre entera en la microcirculación una vez que una monocapa de células endoteliales ha cubierto todas las superficies. Durante el período de incubación las células endoteliales son más propensas a formar capilares intactos (14), si están expuestas constantemente a fuerzas mecánicas, por lo tanto, preferiblemente la etapa b) es realizada bajo fuerza de cizalladura. Las fuerzas de cizalladura son creadas por el medio circulante a través del sistema de circulación (1) de la presente invención. Preferiblemente, el flujo en la microentrada (3) y las microsaldas (4) está en el intervalo de 5 a 20 dyn/cm^2 . Para permitir la adherencia de las células a la superficie interior del sistema de circulación (1) y/o la migración a la cámara de crecimiento de capilares (2), el sistema de circulación (1) está lleno de fluido. Por consiguiente, en una realización preferida, las células de siembra están comprendidas en medios, plasma o sangre, preferiblemente sangre entera. Un "medio de siembra" particular preferido que es también utilizado durante la etapa de incubación que conduce a la formación de los capilares (14) contiene, por ejemplo, medio-2 basal de células endoteliales (EBM-2) suplementado con hidrocortisona, suero fetal bovino (FCS), VEGF porcino, factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (hbFGF), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF 3R), ácido ascórbico, penicilina, estreptomina; si el medio de siembra es plasma o sangre se prefiere que estos sean suplementados con una o más de las sustancias indicadas anteriormente. Para determinar si los capilares (14) se han formado en la etapa b) son usados microsensores (12) y/o la inspección visual. Microsensors (12) adecuados miden la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). Preferiblemente, uno o más tipos de células no endoteliales son sembrados en el sistema de circulación (1), preferiblemente en la sección de crecimiento de capilares (2) para establecer tejidos y/o organoides (15) en las secciones de crecimiento de capilares (2). Estas células adicionales pueden ser sembradas antes, simultáneamente con la etapa a), después de la etapa a) o después de la etapa b). Los tipos de tejido a partir de los cuales se derivan las células son seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en hígado, piel, pulmón, riñón, intestino, neuronas, músculo cardíaco y/o tumores.

La presente invención prevé el uso del sistema de circulación (1) para monitorizar el efecto de uno o más compuestos de ensayo y/o para la determinación de la eficacia, los efectos secundarios, la bioseguridad, los metabolitos, el modo de acción o la regeneración de órganos. Preferiblemente, tal ensayo se lleva a cabo mediante la inyección de uno o más compuestos de ensayo a través del puerto de inyección.

5 Los puntos siguientes se proporcionan como información general:

El punto 1 se refiere a un sistema de circulación (1) que es autónomo y comprende:

- a. al menos una sección de crecimiento de capilares (2), que comprende al menos dos microentradas (3) y dos microsaldas (4),
- b. un dispositivo de bombeo direccional (5), y
- 10 c. un canal de transporte arteriolar (6) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos entradas (3) y un canal de transporte venular (7) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos salidas (4).

El punto 2 se refiere al sistema de circulación (1) del punto 1, en el que el sistema de circulación (1) comprende al menos dos secciones de crecimiento de capilares (2).

15 El punto 3 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 ó 2, en el que una sección de crecimiento de capilares (2) es al menos en parte permeable al gas.

El punto 4 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la sección de crecimiento de capilares (2) comprende o consiste en una matriz biocompatible semisólida (8) y/o fibras huecas biocompatibles semisólidas (9).

20 El punto 5 se refiere al sistema de circulación (1) del punto 4, en el que la fibra hueca biocompatible (9) es biodegradable.

El punto 6 se refiere al sistema de circulación (1) según el punto 4 ó 5, en el que la matriz biocompatible (8) comprende o consiste en un material seleccionado del grupo que consiste en matrigel, gel de fibrina, gel de agarosa, gel de alginato, gel sintético, polímeros reticulables y la fibra hueca biocompatible (9) consiste en un material
25 seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico, polilactida-co-glicólido o sus mezclas.

El punto 7 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 4 a 6, en el que la matriz biocompatible (8) comprende microcanales, estructuras y/o redes que permiten la formación de capilares (14) mediante células endoteliales.

30 El punto 8 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que una sección de crecimiento de capilares (2) está desprovista de microentradas (3) y microsaldas (4).

El punto 9 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la distancia entre las microentradas (3) y las microsaldas (4) es de 0,2 mm a 4 mm, preferiblemente de 0,5 mm.

El punto 10 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que la anchura de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,5 mm y 1,5 mm, preferiblemente es de 1,0 mm y/o la altura de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,3 y 0,7 mm, preferiblemente es de 0,5 mm.
35

El punto 11 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 10, en el que el volumen de la sección de crecimiento de capilares (2) está entre 0,03 μ l y 4,2 μ l.

El punto 12 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 11, en el que las microentradas (3) y las microsaldas (4) están dispuestas en extremos opuestos de la sección de crecimiento de capilares (2).
40

El punto 13 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 12, en el que el diámetro de las microentradas (3) y/o microsaldas (4) está entre 10 y 50 μ m.

El punto 14 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 13, en el que la sección de crecimiento de capilares (2) comprende además un colector de fluido y/o residuos extracapilares (10).

45 El punto 15 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 14, en el que colector de fluido y residuos extracapilares (10) está separado de la matriz biocompatible (8) y/o de la fibra hueca biocompatible (9) por una membrana de retención de células o por canales de exclusión de células (11).

El punto 16 se refiere al sistema de circulación (1) según el punto 14 ó 15, en el que al menos un sensor (12) está dispuesto en el colector de fluido y/o residuos extracapilares (10).

- 5 El punto 17 se refiere al sistema de circulación (1) según el punto 16, en el que el al menos un sensor (12) es seleccionado del grupo que consiste en un sensor de pH, un sensor de pO₂; un sensor de captura de analitos, un sensor de conductividad, un sensor de resonancia de plasmones, un sensor de temperatura, un sensor de CO₂; un sensor de NO, un sensor de quimiotaxis, un sensor de citoquinas, un sensor de iones, sensores de presión, un sensor potenciométrico, un sensor amperométrico, un sensor de flujo, un sensor de llenado, un sensor de impedancia, un sensor de conductividad, un sensor de campo electromagnético, un sensor de onda acústica superficial y un sensor metabólico.
- 10 El punto 18 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 17, en el que el canal de transporte ha sido micromecanizado en una matriz biocompatible (8) o es una fibra hueca biocompatible (9), en el que dicha matriz biocompatible (8) o fibra hueca biocompatible (9) es al menos en parte permeable al gas, preferiblemente comprende o consiste en PDMS.
- 15 El punto 19 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 18, en el que el diámetro del canal de transporte arteriolar (6) y/o el canal de transporte venular (7) en su conexión con el dispositivo de bombeo direccional (5) es de entre 300 µm y 2,0 mm, preferiblemente de 500 µm.
- 20 El punto 20 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 19, en el canal de transporte arteriolar (6) se ramifica al menos una vez para conectar con al menos dos entradas (3) y el canal de transporte venular (7) se ramifica al menos una vez para conectar con las al menos dos salidas (4), respectivamente.
- 25 El punto 21 se refiere al sistema de circulación (1) del punto 20, en el que el área combinada de la sección transversal de los canales arteriulares después del punto de ramificación (13) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal del canal arteriolar delante del punto de ramificación (13) y/o el área combinada de la sección transversal de los canales de transporte venulares (7) después del punto de ramificación (13) es esencialmente idéntica al área en sección transversal del canal venular delante del punto de ramificación (13) .
- 30 El punto 22 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 20 y 21, en el que el área combinada de la sección transversal de todas las entradas (3) es esencialmente idéntica al área en sección transversal de dicho canal arteriolar y/o canales y arteriulares y el área combinada de la sección transversal de todas las salidas (4) es esencialmente idéntica al área en sección transversal de dicho canal venular y/o canales venulares, preferiblemente las áreas en sección transversal de los canales arteriulares y venulares son idénticas.
- 35 El punto 23 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 22, en el que el dispositivo de bombeo direccional (5) es una bomba biológica, una bomba hidráulica, una bomba piezoeléctrica, una bomba peristáltica, una bomba neumática, una bomba electromagnética o una bomba magnética.
- 40 El punto 24 se refiere al dispositivo del sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 23, en el que el dispositivo de bombeo direccional (5) comprende uno o más elementos de flujo direccional, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en un elemento de tipo chorro y un elemento de válvula unidireccional.
- 45 El punto 25 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 24, en el que al menos la superficie interior de dichos canales de transporte y/o el dispositivo de bombeo direccional (5) están recubiertos con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en péptidos o proteínas que promueven la adhesión celular en polímeros biocompatibles o sus mezclas.
- 50 El punto 26 se refiere al sistema de circulación (1) según el punto 25, en el que los péptidos o proteínas que promueven la adhesión celular son seleccionados del grupo que consiste en integrinas, albúminas, fibrinas, adhesinas y colágenos.
- El punto 27 se refiere al sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 26, que comprende además capilares (14) y/o organoides (15) formados en la sección de crecimiento de capilares (2). El punto 28 se refiere a un método para establecer un sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 1 a 27, que comprende las etapas de:
- a. siembra de células endoteliales en el sistema de circulación (1), e
 - b. incubación al menos hasta que se hayan formado capilares (14) en la sección de crecimiento de capilares (2) y/o hasta que se haya formado una capa de células endoteliales en los canales de transporte y/o hasta que una capa de células endoteliales haya cubierto todas las superficies interiores del dispositivo de bombeo (5).
- El punto 29 se refiere al método para establecer un sistema de circulación (1) según el punto 28, en el que las células de siembra están comprendidas en medios y plasma.
- El punto 30 se refiere al método para establecer un sistema de circulación (1) según el punto 28 ó 29, en el que el método comprende además la etapa de siembra de células de músculo liso, ya sea antes, simultáneamente o después de la etapa a).

El punto 31 se refiere al método para establecer un sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 28 a 30, en el que el método comprende además la etapa de inyectar sangre entera en dicho sistema de circulación.

El punto 32 se refiere al método para establecer un sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 28 a 31, en el que la etapa b) es llevada a cabo bajo fuerza de cizalladura.

- 5 El punto 33 se refiere al método de establecer un sistema de circulación (1) según cualquiera de los puntos 29 a 32, en el que células de uno o más tipos de células son sembradas en dicha sección de crecimiento de capilares (2), preferiblemente después de la etapa b).

10 El punto 34 se refiere al método de establecer un sistema de circulación (1) según el punto 33, en el que las células son seleccionadas del grupo que consiste en células del hígado, células de la piel, células pulmonares, células renales, células intestinales, células neuronales, cardiomiocitos y/o células tumorales.

El punto 35 se refiere a un sistema de circulación (1) producible por el método según cualquiera de los puntos 28 a 34.

- 15 El punto 36 se refiere al uso del sistema de circulación (1) según el punto 27 ó 35 para monitorizar el efecto de uno o más compuestos de ensayo y/o para la determinación de la eficacia, los efectos secundarios, la bioseguridad, los metabolitos, el modo de acción o la regeneración de órganos.

Lista de números de referencia

- (1) sistema de circulación autónomo
- (2) sección crecimiento de capilares
- (3) microentrada
- 20 (4) microsaldada
- (5) dispositivo de bombeo direccional
- (6) canal de transporte arteriolar
- (7) canal de transporte venular
- (8) matriz biocompatible
- 25 (9) fibra hueca biocompatible
- (10) colector de fluido y/o residuos extracapilares
- (11) membrana de retención o canal de exclusión de células
- (12) sensores
- (13) punto de ramificación
- 30 (14) capilares
- (15) tejidos y/o organoides
- (16) región de neovascularización
- (17) puerto de inyección

Breve descripción de las figuras

- 35 Fig. 1: vista desde arriba hacia abajo de una realización preferida de un sistema de circulación (1) autónomo que comprende dos secciones de crecimiento de capilares (2), el dispositivo de bombeo direccional (5) y los canales de transporte arteriolar (6) y venular (7). En una realización preferida, el dispositivo de bombeo (5) y las dos secciones de crecimiento de capilares (2) están dispuestos en paralelo. Los canales de transporte (6, 7) sirven de conexión entre el dispositivo de bombeo direccional (5) y la sección de crecimiento de capilares (2). En una
- 40 realización preferida un puerto de inyección (17) para soporte de tampón está localizado en estrecha proximidad a la microbomba. Usualmente, el canal arteriolar (6) o venular (7) conectado al dispositivo de bombeo direccional (5) se ramifica en dos o tres canales arteriolar y venular de diámetro más pequeño en los puntos de ramificación (13). Las secciones de crecimiento de capilares (2) están preferiblemente pobladas por diferentes tejidos y/o organoides (15), que son perfundidos por el mismo fluido en circulación y permite, por ejemplo, el ensayo del efecto de un
- 45 compuesto en más de un organoide simultáneamente.

Fig. 2: vista desde arriba hacia abajo de una realización preferida de la sección de crecimiento de capilares (2) del sistema de circulación (1) autónomo. Las secciones de crecimiento de capilares (2) son los espacios que están previstos para la formación de capilares (14) por ejemplo mediante células endoteliales entre las microentradas (3) y microsaldas (4). Para proporcionar un entorno apropiado para el crecimiento de los capilares (14) es preferible que la sección de crecimiento de capilares (2) comprenda o consista en una matriz biocompatible semisólida (8). Alternativamente, son proporcionadas fibras huecas biocompatibles (9) que están conectadas por un lado a la microentrada (3) y por otro lado a la microsaldad (4). El sitio de tejido más distante del extremo de entrada del capilar (14) forma una región de neovascularización (16) dentro de la sección de crecimiento de capilares (2), es decir, una sección en la que no se forman capilares (14) durante el establecimiento básico de los capilares (14) en la circulación. Preferiblemente, la sección de crecimiento de capilares (2) comprende además un colector de fluido y/o residuos extracapilares (10) que está separado de la sección de crecimiento de capilares (2) restante por una membrana de retención de células (11). Para monitorizar el estado del sistema están dispuestos uno o más sensores (12) en el colector de fluido y/o residuos extracapilares (10).

Fig. 3: vista desde arriba hacia abajo de una realización preferida del sistema de circulación autónomo utilizado en el experimento de ejemplo equipado con una bomba peristáltica (5), tres válvulas para el desplazamiento de líquido, un inserto (15) y dos colectores (10) que permiten el relleno y enjuague del sistema.

Fig. 4: tinción de viabilidad con CalceinAM de un segmento particular de los canales del sistema de microcirculación autónomo completamente cubierto con células endoteliales humanas después de siete días de cultivo perfundido.

Fig. 5: tinción fluorescente de membrana plasmática con CellMask[®] del chip de sistema de circulación autónomo completamente cubierto con células endoteliales humanas después de siete días de perfusión.

Ejemplo

Un sistema de circulación (1) autónomo fue establecido durante un período de 14 días, cubriendo completamente todos los canales y superficies de un chip de prototipo de biorreactor como se muestra en la figura 3 con células endoteliales humanas vivas en un medio estéril. Una microbomba peristáltica (5) fue utilizada para crear la circulación de líquido a través del espacio de cultivo de tejido (15). Fueron usados colectores de fluido y residuos extracapilares (10) en combinación con válvulas A, B y C para gestionar los niveles de líquido y de intercambio en el sistema. El chip fue moldeado usando un maestro y PDMS. La capa de PDMS fue después transferida a un portaobjetos de vidrio y fue insertada en un soporte. Insertos metálicos para inóculos de células y tejidos (15) y un colector de fluido o residuos extracapilares (10) fueron fijados al chip biorreactor a través de una placa de carbonato en la parte superior del portaobjetos de PDMS. Un chip de sistema de circulación autónomo completamente montado se muestra en la figura 4.

Células endoteliales microvasculares de dermis humana (HDMEC) obtenidas a partir de Promocell fueron usadas entre los pasajes 4-7. Antes de su uso fueron cultivadas en matraces T-75 con medio de crecimiento de células endoteliales MV-2 (Promocell, 5 % de FCS, 1 % de penicilina-estreptomicina) a 37° C y 5 % de CO₂ (incubador humidificado) y en pasajes con una confluencia del 80 %. Para el experimento se recogieron células lavándolas una vez con PBS y añadiendo 2 ml de una solución de tripsina/EDTA al 0,25 %. La separación de las células se produjo dentro de 5 minutos de incubación a 37° C. Después de la neutralización de la solución de tripsina con un 10 % de FCS en DMEM, las células fueron centrifugadas 5 min a 300 x g y contadas usando un hemocitómetro.

Un chip de sistema de circulación autónomo estéril fue lavado con etanol al 80 % durante 10 minutos. Usando una jeringa fue inyectado PBS en los canales e incubado durante otros 10 minutos. Después de la sustitución de PBS por el lavado de los canales con medio HDMEC, el chip fue incubado a 4° C durante la noche.

Para la siembra de HDMEC en los microcanales, el sedimento celular fue vuelto a suspender en medio de HDMEC hasta una concentración final de 2×10^7 células/ml. La suspensión celular fue transferida al inserto vacío (figura 3, 15). Para crear una diferencia de presión hidrostática entre el espacio del inserto y los colectores (figura 3, 10), fue retirado medio de los colectores. A continuación, la bomba peristáltica fue abierta para permitir que las células llenaran los canales. Además, la válvula A fue abierta para asegurar un llenado homogéneo de todo el chip.

Para permitir la fijación y propagación de las células endoteliales sobre las superficies de los canales, el chip del sistema de circulación autónomo fue incubado a 37° C y 5 % de CO₂ durante 2 h. Posteriormente, se añadieron 50 µl de medio de HDMEC al inserto y las células se volvieron a suspender para llenar los canales, de la misma manera que se describió anteriormente. Los colectores se rellenaron con medio, se cerraron con estanqueidad y el dispositivo fue invertido para dejar que las células se adhieran también al techo de los canales. Después de 5 h de incubación estática, el chip fue conectado al dispositivo de bombeo neumático y las válvulas B y C fueron cerradas para crear un flujo de circulación. El chip fue incubado durante 14 días a una frecuencia de bombeo de 0,16 Hz y una presión de 0,3 bar. El medio del espacio del inserto y del colector fue reemplazado cada día.

El efecto de cizalladura en la forma de las células endoteliales y la cobertura totalmente cerrada de todas las superficies de los canales por células endoteliales fue determinada por microscopía de fluorescencia (figuras 4 y 5).

REIVINDICACIONES

1. Sistema de circulación (1), que es autónomo y comprende:
 - a. al menos una sección de crecimiento de capilares (2), que comprende al menos dos microentradas (3) y dos microsaldas (4),
 - 5 b. un dispositivo de bombeo direccional (5), y
 - c. un canal de transporte arteriolar (6) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos entradas (3) y un canal de transporte venular (7) que conecta el dispositivo de bombeo direccional (5) y las al menos dos salidas (4),

en el que está prevista una subsección (16) dentro de la sección de crecimiento de capilares (2) que carece de microentradas (3) y de salidas (4) y en la que la subsección (16) está suficientemente retirada de las correspondientes microentradas (3) y microsaldas (4), de modo que la formación de capilares (14) se ve debilitada en esta subsección, en el que la subsección (16) tiene una distancia de al menos 100 µm y hasta 500 µm de las microentradas (3) y/o de las microsaldas (4).
- 10 2. Sistema de circulación (1) según la reivindicación 1, en el que el sistema de circulación (1) comprende al menos dos secciones de crecimiento de capilares (2).
- 15 3. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que una sección de crecimiento de capilares (2) es al menos en parte permeable al gas.
- 20 4. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sección de crecimiento de capilares (2) comprende o consiste en una matriz biocompatible semisólida (8) y/o fibras huecas biocompatibles semisólidas (9), en el que la matriz biocompatible (8) comprende opcionalmente microcanales, estructuras y/o redes que permiten la formación de capilares (14) por las células endoteliales.
5. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sección de crecimiento de capilares (2) comprende además un colector de fluidos y/o residuos extracapilares (10).
- 25 6. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que el colector de fluido y/o residuos extracapilares (10) está separado de la matriz biocompatible (8) y/o de la fibra hueca biocompatible (9) por una membrana de retención de células o por canales de exclusión de células (11) y en el que opcionalmente al menos un sensor (12) está dispuesto en el colector de fluidos y/o residuos extracapilares (10).
7. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además capilares (14) y/o organoides (15) formados en la sección de crecimiento de capilares (2).
- 30 8. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dos o más tejidos y/o organoides (15) diferentes son mantenidos dentro de un sistema autónomo, los cuales son perfundidos por el mismo fluido circulante.
9. Sistema de circulación (1) según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la subsección (16) tiene una distancia de 100 µm a 300 µm de las microentradas (3) y/o microsaldas (4).
- 35 10. Sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el canal de transporte arteriolar (6) se ramifica al menos una vez para conectar con las al menos dos entradas (3), y el canal de transporte venular (7) se ramifica al menos una vez para conectar con las al menos dos salidas (4), respectivamente.
11. Sistema de circulación (1) según la reivindicación 10, en el que
 - 40 a. el área combinada de la sección transversal de los canales arteriolar después del punto de ramificación (13) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal del canal arteriolar delante del punto de ramificación (13) y/o el área combinada de la sección transversal de los canales de transporte venulares (7) después del punto de ramificación (13) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal del canal venular delante del punto de ramificación (13) y/o
 - 45 b. el área combinada de la sección transversal de todas las entradas (3) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal de dicho canal arteriolar y/o canales arteriolar y el área combinada de la sección transversal de todas las salidas (4) es esencialmente idéntica al área de la sección transversal de dicho canal venular y/o canales venulares, preferiblemente las áreas de las secciones transversales de los canales arteriolar y venulares son idénticas.
- 50 12. Método para establecer un sistema de circulación (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de:
 - a. siembra de células endoteliales en el sistema de circulación (1), e

- b. incubación al menos hasta que se hayan formado los capilares (14) en la sección de crecimiento de capilares (2) y/o hasta que una capa de células endoteliales se haya formado en los canales de transporte y/o hasta que una capa de células endoteliales haya cubierto todas las superficies interiores del dispositivo de bombeo (5).
- 5 13. Método para establecer un sistema de circulación (1) según la reivindicación 12, en el que:
- (a) el método comprende además la etapa de inyectar sangre completa en dicho sistema de circulación o
 - (b) la etapa b) es realizada cabo bajo fuerza de cizalladura.
- 10 14. Uso del sistema de circulación (1) según las reivindicaciones 1 a 11 para monitorizar el efecto de uno o más compuestos de ensayo y/o para la determinación de la eficacia, los efectos secundarios, la bioseguridad, los metabolitos, el modo de acción o la regeneración de órganos.

Figura 1

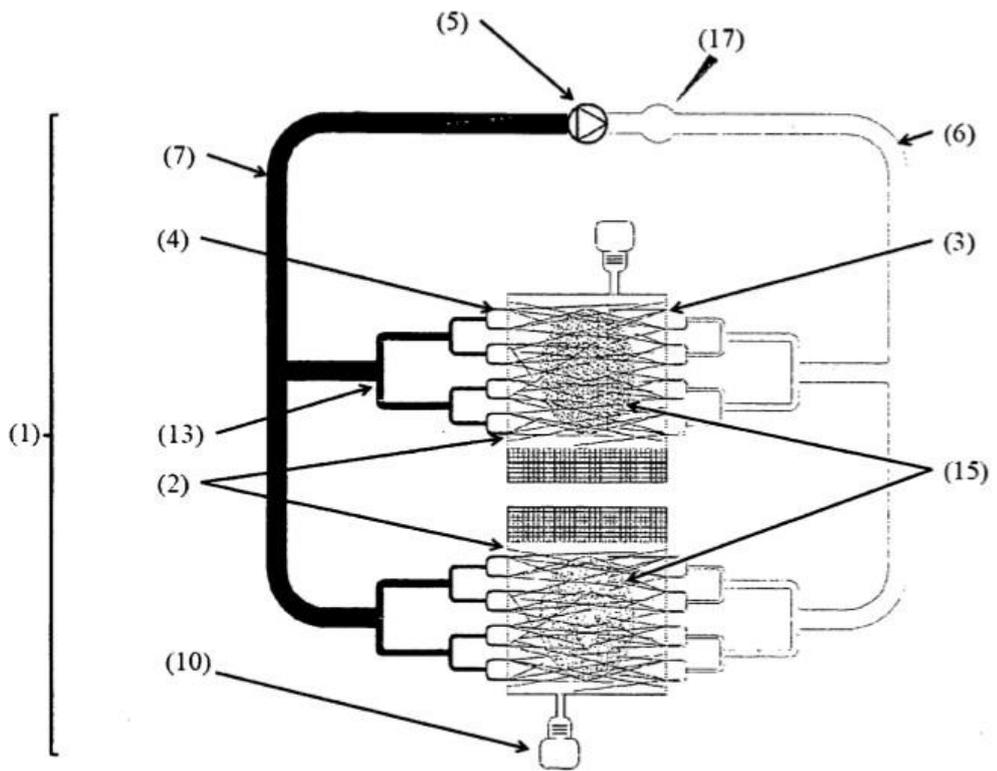


Figura 2

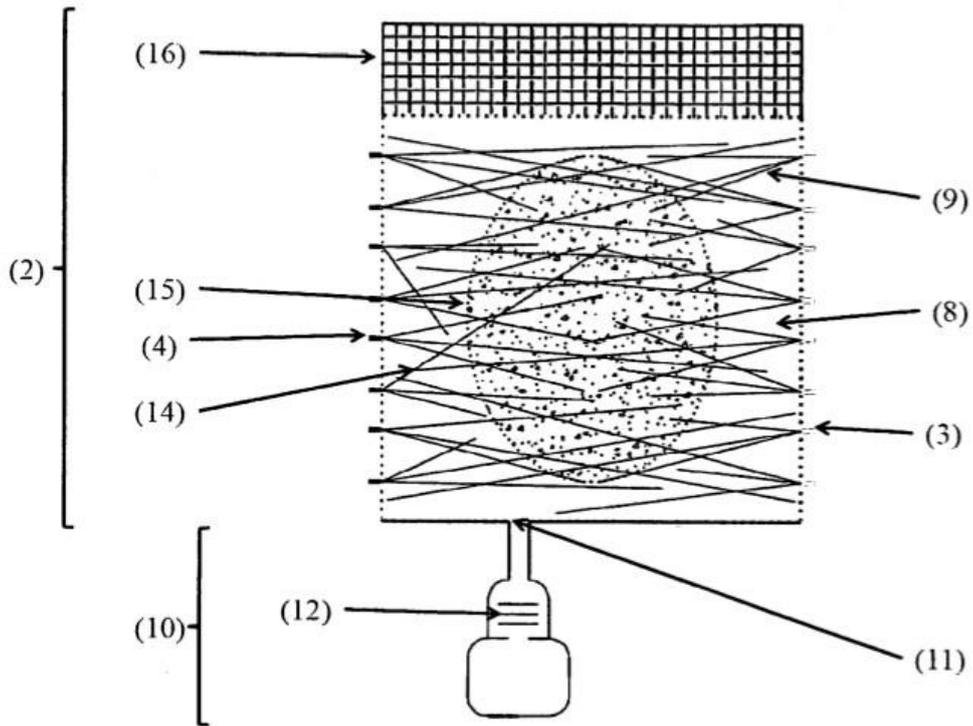


Figura 3

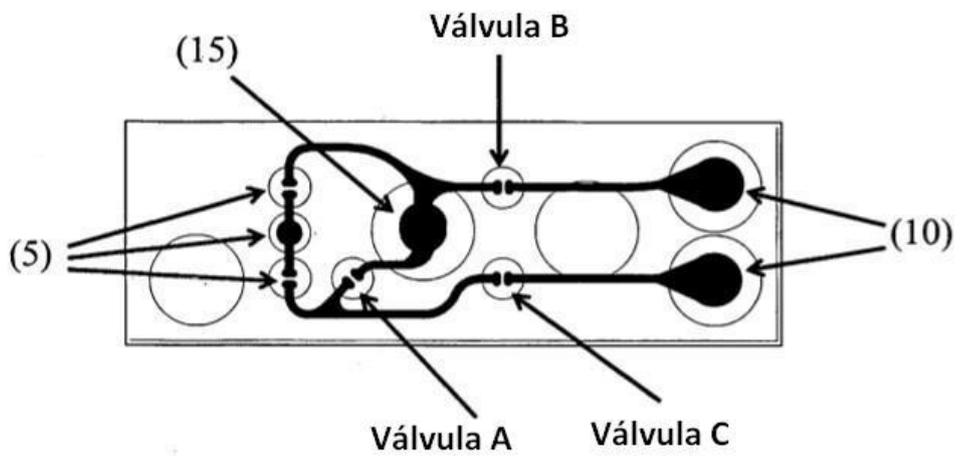


Figura 4

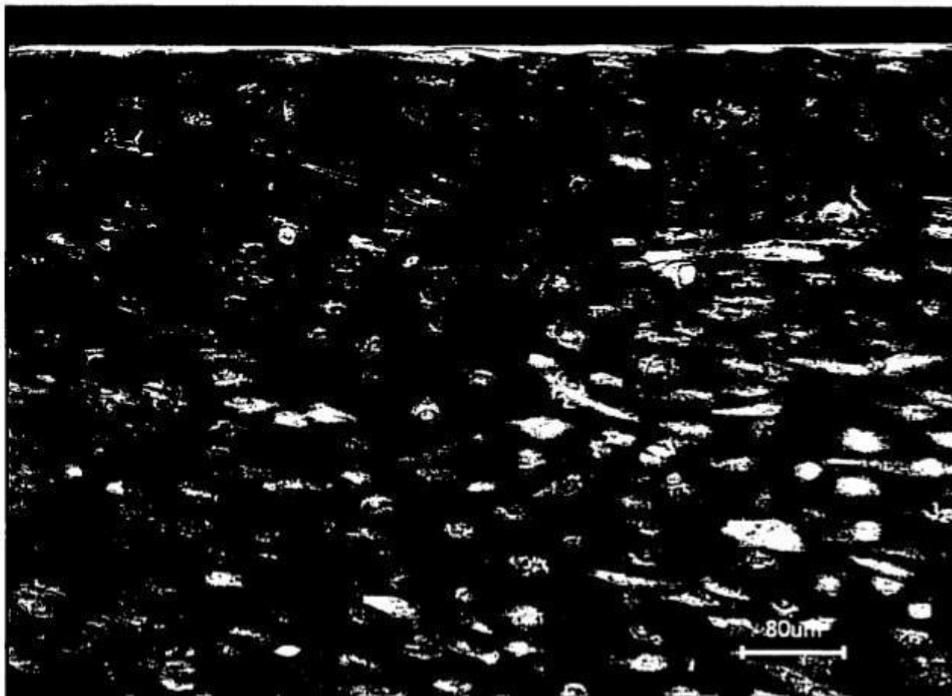


Figura 5

