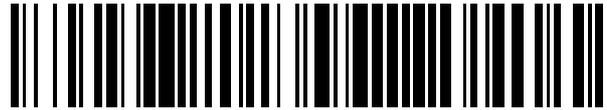


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 847**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2010 E 10763958 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2486121**

54 Título: **Biorreactor de múltiples corrientes de fluido a microescala para el cultivo de células**

30 Prioridad:

05.10.2009 US 573561

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

01.03.2016

73 Titular/es:

**THE CHARLES STARK DRAPER LABORATORY,
INC. (100.0%)
555 Technology Square
Cambridge, MA 02139-3563, US**

72 Inventor/es:

**CHAREST, JOSEPH L. y
BORENSTEIN, JEFFREY T.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 847 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

Biorreactor de múltiples corrientes de fluido a microescala para el cultivo de células

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de, e incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad, la Solicitud de Patente estadounidense pendiente con la actual No. 12/573,561 depositada el 5 de octubre de 2009.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a sistemas y procedimientos para el cultivo de células. Más concretamente, diversas formas de realización se refieren a dispositivos microfluídicos de múltiples capas para el cultivo de células, que presentan múltiples canales de intercomunicación, y a procedimientos de utilización de dichos dispositivos para el cultivo controlado de células del riñón y otras células.

Antecedentes

15 La enfermedad del riñón representa un serio riesgo para la salud en los Estados Unidos. Aproximadamente, uno de cada nueve estadounidenses adultos están aquejados de enfermedad crónica del riñón (CKD) y aproximadamente 450,000 pacientes presentan enfermedad renal en fase terminal (ESRD). Los actuales tratamiento de curación estándar, como por ejemplo hemodiálisis y hemofiltración proporcionan ayuda a los órganos dañados, pero típicamente no facilitan directamente la sustitución o regeneración de tejidos enfermos. La moderna genotecnología del tejido renal y las estrategias regenerativas, por otro lado, persiguen sustituir o reparar tejidos renales utilizando células viables específicas del riñón y construcciones de células biomateriales. El cultivo de las células específicas del riñón, de células progenitoras o células madre requieren en general un estricto control de las marcas químicas, biológicas y biofísicas para asegurar el apropiado crecimiento celular y la función fenotípica.

20 Tradicionalmente, las células relacionadas con el riñón han sido cultivadas en placas, platos y matraces, y medios de cultivo de células y otros fluidos son suministrados a las células manualmente y mantenidos en estado estático. Procedimientos de cultivo de células más recientes utilizan biorreactores con múltiples cámaras, estructuras tubulares o fibras huecas para establecer un flujo de fluido que facilite la exposición de las células a niveles controlados de esfuerzo cortante o a diversos entornos químicos. Sin embargo estos procedimientos en general no permiten, o solo hasta un punto limitado, la exposición de las células simultáneamente a múltiples estímulos químicos, biológicos y biofísicos específicos de las células. Así mismo, estos procedimientos no remedan típicamente las condiciones y la estructura fluidica que las células del riñón experimentan *in vivo*, como la proximidad íntima de diversos fenotipos celulares y una estructura a microescala de tipo vascular. Dado que las condiciones que las células experimentan influyen en la manera en que funcionan, estos procedimientos pueden, por tanto, no conseguir inducir las funciones deseadas de los tipos de células, o inducir funciones indeseadas. Así mismo, estos procedimientos típicamente no permiten el cultivo de múltiples tipos de células en distintos emplazamientos dentro de la estructura de los biorreactores. Para mejorar el cultivo de células relacionadas con el riñón en aplicaciones médicas, es por tanto deseable disponer de sistemas y procedimientos para el crecimiento de múltiples tipos de células bajo condiciones de cultivo controladas. La Solicitud internacional WO 2005/034624 describe un sistema tridimensional para tejidos de genotecnología que contienen diversos tipos de células, en el que las capas individuales del sistema comprenden unos canales divididos longitudinalmente en dos compartimentos por una membrana situada en posición central y en el que cada compartimento puede comprender un tipo de célula diferente.

Sumario

45 La presente invención proporciona, en diversas formas de realización, unos dispositivos microfluídicos de múltiples canales para el cultivo de células en un entorno que controle múltiples parámetros, químicos, biológicos y biofísicos, facilitando de esta manera, por ejemplo, una mejor simulación de las condiciones *in vivo*. Dichos sistemas biorreactores pueden, por ejemplo, incluir dos capas poliméricas separadas por una membrana permeable o semipermeable. Cada capa define uno o más microcanales los cuales son, en operación, llenados con dicho fluido, como por ejemplo una solución tampón, un medio de cultivo celular, sangre u orina. El flujo de fluido puede ser inducido en un canal, por ejemplo, aplicando una diferencia de presión entre la entrada y la salida de los canales.

50 Los canales de una capa pueden "comunicar" con uno o más canales de la otra capa a través de la membrana. La comunicación, tal y como se utiliza el término en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de interacción entre los canales, ya sean de naturaleza química, física (por ejemplo térmica, mecánica o fluidomecánica) o biológica. Por ejemplo, la comunicación puede implicar la comunicación de fluido, esto es, el transporte de fluido o de sus componentes entre los canales, o una interacción mecánica, como por ejemplo la transferencia de presión de un canal sobre el otro canal. Los canales dentro de la misma capa pueden también comunicar entre sí por medio de la membrana y un canal de la otra capa que se superpone geoméricamente con ambos. La superposición geométrica de los canales en la presente memoria se refiere a que las proyecciones de los canales dentro de un plano paralelo

con la membrana (o localmente paralelo con la membrana en casos en los que las capas y la membrana no son planos aun cuando los canales no ocupen el mismo espacio físico.

El grado de comunicación entre canales de una capa depende, entre otros factores, de la distancia entre los canales y de la altura y anchura de sus secciones transversales. Así, variando un subconjunto o todos estos parámetros a lo largo de la extensión (esto es, a lo largo de la dimensión o eje más largo) de los canales, el nivel de comunicación puede ser controlado en función de la posición a lo largo de los canales. Dicho control sobre la comunicación entre los canales, en suma, facilita el control sobre los parámetros mecánicos y químicos del fluido a lo largo de los canales por medio de la inyección de fluidos y el control de caudales y presiones en los puertos de entrada y salida. Por ejemplo, si dos fluidos de diferente composición son inyectados en canales vecinos en la entrada, los dos fluidos pueden mezclarse debido a la comunicación química, esto es, la transferencia de masa, entre los canales y producir una tercera composición mixta en las salidas. De modo similar, pueden aplicarse presiones diferentes en los puertos (entradas y / o salidas) de dos canales, y producir unos perfiles de los parámetros del fluido - mecánicos a lo largo de la longitud del canal que estén determinados (al menos en parte) por las geometrías de los canales individuales y por el nivel de comunicación mecánica entre ellos.

Los dispositivos microfluídicos según se han descrito anteriormente, pueden ser ventajosamente empleados para el cultivo de células. Los canales pueden ser poblados con células de uno solo o de múltiples tipos, las cuales pueden ser situadas en emplazamientos diferentes dentro de los canales. El emplazamiento y la configuración relativos de los canales, la colocación de las células dentro de los canales, y los parámetros operativos tales como las composiciones y las presiones del fluido aplicadas en los orificios de forma colectiva permiten un nivel de control sin precedentes sobre el microambiente de las células cultivadas y la administración de señales físicas, químicas, mecánicas y biofísicas a las células. Sobre el control de estos parámetros, el biorreactor puede ser utilizado para influir en la función de las células y para facilitar el cultivo de múltiples tipos de células en distintos emplazamientos dentro de la estructura del biorreactor. Un usuario puede administrar cualquier combinación de parámetros, simultáneamente o por separado de acuerdo con un esquema específico, con el fin de alterar la función de las células en la forma deseada y / o con un propósito determinado. Las funciones de las células que pueden así ser adaptadas a esas funciones incluyen, pero no se limitan a, la potenciación o la limitación de la proliferación, el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre, o la diferenciación de células hacia un fenotipo específico. Las células pueden también ser directamente genomanipladas.

Formas de realización de la invención proporcionan una plataforma para cultivar y desarrollar poblaciones de células para una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, los cultivos de células pueden ser adaptadas para una aplicación terapéutica específica, por ejemplo, una nueva terapia regenerativa o la potenciación de una terapia a base de células anterior. En algunas formas de realización, el biorreactor está diseñado para remedar un órgano natural, y ser utilizado para el desarrollo de células y funciones orgánicas. El dispositivo biorreactor puede también ser un precursor, o parte de, un órgano artificial genomaniplado por procesos bioquímicos. Diferentes aplicaciones pueden, en términos generales, utilizar diferentes aspectos y características de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un dispositivo biorreactor microfluídico que incluye una primera capa polimérica que define en su interior unos primero y segundo microcanales y una segunda capa polimérica que define en su interior un tercer microcanal. Una membrana separa los primero y segundo canales del tercer canal (y, de manera opcional, un cuarto canal) en porciones geoméricamente superpuestas permitiendo al tiempo la comunicación (por ejemplo, la comunicación de fluido o la comunicación mecánica) entre las porciones superpuestas de los microcanales. Los primero y segundo canales pueden comunicar entre sí a través del tercer canal. Al menos un parámetro geométrico de al menos una de los microcanales varía a lo largo de una extensión del canal dentro de la(s) porción(es) superpuesta(s). Los parámetros geoméricos que pueden variar a lo largo de la longitud de los microcanales incluyen la distancia entre los primero y segundo canales, y / o la anchura y / o la profundidad de cualquiera de los canales.

En algunas formas de realización, las capas poliméricas incluyen, o esencialmente están compuestas por un biopolímero. La membrana o una porción de la misma, puede ser semipermeable, y puede estar formada por un material poroso o semisólido. En determinadas formas de realización, la membrana incluye o está compuesta esencialmente por una napa, polidimetilsiloxano (PDMS) u otro polímero de silicona, poliétersulfona, un material electrohilado, o una membrana de trazas atacadas.

El término "dispositivo biorreactor", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la estructura microfluídica descrita anteriormente, ya se emplee o no. En formas de realización configuradas para el cultivo de células el dispositivo biorreactor incluye además unas células en al menos algunos de los microcanales. Por ejemplo, las células pueden ser células renales, y los microcanales pueden también ser configurados para remedar colectivamente el tejido renal. Las células pueden adherirse a la membrana o a las paredes de los canales, y / o quedar suspendidas en el fluido contenido dentro de los canales. Las células pueden comprender múltiples tipos, los cuales, en algunas formas de realización, varían a lo largo de la extensión del canal.

El dispositivo puede incluir además un fluido, por ejemplo, un medio de cultivo de células, una solución tampón, componentes sanguíneos, sangre, orina, dializado, agua, o un filtrado en los microcanales. En determinadas formas de realización, el fluido es o incluye una solución que remeda un fluido corporal. Los fluidos de los canales pueden

5 presentar unos parámetros mecánicos (por ejemplo, presión, caudal, coeficiente corriente, viscosidad, etc.) asociados con ellos. Los valores de un parámetro de fluido mecánico pueden diferir sustancialmente (por ejemplo por un factor superior a 1,1, superior a 1,5, superior a 2, o superior a 10) entre cualesquiera dos microcanales. Por ejemplo, pueden diferir entre el primero y el segundo canal (los cuales pueden estar formados en una primera capa) y el tercer canal (el cual puede estar formado en una segunda capa) y / o entre los primero y segundo canales y / o los tercero y cuarto canales. Así mismo, las concentraciones o los gradientes de concentración de un elemento constitutivo de los fluidos pueden variar entre cualesquiera dos canales o sobre el mismo o sobre diferentes lados de la membrana. El (los) parámetro(s) geométrico(s) de los canales puede(n) variar gradualmente a lo largo de la extensión del canal. En algunas formas de realización uno o más parámetros pueden basarse en un perfil mecánico del fluido predeterminado en al menos uno de los microcanales de la primera capa polimérica. El perfil del fluido mecánico puede, por ejemplo, ser un perfil conectivo o de transporte difusivo, o un perfil de esfuerzo cortante. En algunas formas de realización, la variación del (de los) parámetro(s) geométrico(s) facilita la variación de al menos un estímulo entre un estímulo químico o un estímulo mecánico a lo largo de la extensión del microcanal.

10 En otro aspecto, diversas formas de realización de la invención se refieren a un procedimiento de cultivo de células mediante la provisión de un biorreactor según lo descrito anteriormente. La introducción de células dentro de al menos uno de los microcanales y el cultivo de las células. El procedimiento puede también incluir la introducción de un fluido dentro de al menos uno de los microcanales. En algunas formas de realización, el procedimiento conlleva además la exposición de las células a un estímulo mecánico, químico y / o biológico, y de manera opcional, la medición de una respuesta de las células (por ejemplo un cambio en la función celular) al estímulo. Las células pueden ser sembradas en el (los) microcanal(es) en emplazamientos seleccionados, y los diferentes emplazamientos de las células pueden ser expuestos a diferentes estímulos. Así mismo, diferentes tipos de células pueden ser introducidos en el (los) microcanal(es). En algunas formas de realización, diferentes tipos de células son introducidos en diferentes microcanales y, en algunas formas de realización, diferentes tipos de células son sembradas en diferentes emplazamientos dentro del mismo microcanal.

15 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para remedar un riñón. El procedimiento conlleva la provisión de un biorreactor que presenta las características descritas anteriormente, en el que el parámetro varía de una forma que remeda una estructura renal. El procedimiento conlleva además la introducción de células renales dentro de al menos uno de los microcanales y el cultivo de las células. El biorreactor puede ser utilizado, por ejemplo, de forma extracorpórea en terapia renal. En algunas formas de realización, el biorreactor puede ser implantado en un paciente.

20 Estos y otros objetos, junto con las ventajas y características de las formas de realización de la presente invención divulgadas en la presente memoria, se pondrán de manifiesto mediante referencia a la descripción subsecuente, a los dibujos que se acompañan y a las reivindicaciones. Así mismo, se debe entender que las características de las diversas formas de realización descritas en la presente memoria no se excluyen entre sí y pueden existir en diversas combinaciones y permutaciones.

Breve descripción de los dibujos

25 En los dibujos, los mismos caracteres de referencia indican genéricamente las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Así mismo, los dibujos no están necesariamente a escala, poniéndose por el contrario énfasis, en términos generales en la ilustración de los principios de la invención. En la descripción subsecuente se describen diversas formas de realización de la presente invención con referencia a los dibujos siguientes, en los cuales:

Las FIGS. 1A - 1C son vistas en perspectiva esquemáticas de un dispositivo microfluídico de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la FIG. 2 es una imagen de un microscopio electrónico de escaneo (SEM) de una sección transversal del dispositivo mostrado en las FIGS. 1A - 1C;

30 las FIGS. 3A - 3C son vistas desde arriba esquemáticas de canales cuya separación, anchura y profundidad, respectivamente, varía a lo largo de la extensión de los canales de acuerdo con diversas formas de realización de la presente invención; y

las FIGS. 4A - 4D son vistas laterales esquemáticas de un dispositivo que presenta un canal en una capa que comunica con tres canales de otra capa de acuerdo con una forma de realización de la invención, que ilustran el efecto de una variación en la distancia del canal, la anchura y la profundidad, respectivamente, sobre el nivel de comunicación.

Descripción

La invención se refiere, en diversas formas de realización, a dispositivos microfluídicos que presentan dos capas que contienen unos canales separados por una membrana a través de la cual los microcanales de una capa pueden comunicar con los microcanales de la otra capa. Las capas que obtienen canales están constituidas por un polímero, pero la invención no está limitada en este sentido. En algunas formas de realización, las capas pueden consistir en o incluir materiales cerámicos, metal, vidrio u otros materiales no poliméricos. Materiales poliméricos no degradables

incluyen poliestireno, PDMUS, policarbonato, y poliuretano. Para ciertas aplicaciones, puede ser ventajoso el uso de materiales biodegradables o biocompatibles, como por ejemplo sebacato de poliglicerol, citrato de polioctanediol, citrato de polidíol, fibroína de la seda o policaprolactona. Así mismo, en determinadas aplicaciones, pueden ser utilizados biopolímeros, como por ejemplo proteínas o geles.

5 Las capas que contienen canales pueden presentar unos grosores que oscilen entre menos de 100 micrómetros hasta varios milímetros. La membrana, por otro lado, es solo de aproximadamente de 1 micrómetro a aproximadamente 100 micrómetros de grosor. Para hacer posible la transferencia de un lado a otro de la membrana, la membrana, o al menos una porción de la misma, es permeable o semipermeable (esto es, selectivamente permeable a algunas, pero no a otros iones y moléculas, dependiendo de las propiedades físicas o químicas de la molécula y de la membrana. Puede conseguirse la permeabilidad utilizando un material semiporoso o poroso (por ejemplo poliétersulfona) en el que la transferencia de masa tiene lugar a través de los poros, o un material permeable sólido (por ejemplo PDMS o un material a modo de napa). En determinadas formas de realización, la membrana se crea mediante electrohilitura de un polímero sobre una de las capas que contienen canales - un proceso que produce una malla polimérica flexible, porosa.

15 Un dispositivo microfluídico ejemplar simple se ilustra esquemáticamente en las FIGS. 1A - 1C. Mientras la FIG. 1A es una vista ensamblada del dispositivo 100, la FIG 1B es una vista en despiece ordenado del dispositivo 100 que ilustra las dos capas 102, 104 poliméricas y la membrana 106, por separado. En este ejemplo, la capa 104 de fondo define un único canal 108 que se extiende a lo largo de la capa 104 y al que se puede acceder a través de los orificios 110 situados en ambos extremos. La capa 102 superior incluye cinco canales 112, cada uno de los cuales tiene diámetros más pequeños que el canal 108 de la capa 104 de fondo. Estos canales 112 están separados estrechamente y se superponen lateralmente con el canal 108 más ancho a lo largo de la porción de mayor tamaño de la longitud del canal, pero divergen en los extremos de los canales 112 para incrementar la comodidad de acceso a ellos a través de sus respectivos orificios 114.

20 La FIG. 1C proporciona una vista translúcida del dispositivo 100 ensamblado, junto con una vista de tamaño aumentado, en la imagen de detalle de una sección transversal que muestra la membrana 106 y las capas 102, 104 poliméricas ligeramente separadas. Como puede apreciarse en la imagen de detalle, los canales 108, 112 definidos en cada una de la capas 102, 104 poliméricas presentan un lado abierto encarado hacia la membrana 106. Como resultado de ello, los canales 112 de la capa 102 superior y el canal 108 ancho de la capa 104 de fondo pueden interactuar a través de la membrana 106. En muchas formas de realización, los canales 108, 112 presentan secciones transversales rectangulares, como se muestra en la FIG. 1C. En general, sin embargo, las secciones transversales de los canales pueden adoptar cualquier forma poligonal o redondeada. Por ejemplo, las secciones transversales de los canales pueden ser semicirculares, o presentar sus límites rectos formados por la membrana 106.

25 Una imagen del SEM de una sección transversal de un dispositivo 100 que presenta la estructura básica ilustrada en las FIGS. 1A - 1C se muestra en la FIG. 2. La capa 106 porosa presenta un grosor de aproximadamente 6 μm . Los cinco microcanales 112 de la capa 102 superior tienen cada uno aproximadamente 50 μm de ancho y aproximadamente 50 μm de profundidad. En general, formas de realización típicas presentan unas profundidades de canal que oscilan entre unos pocos micrómetros y cientos de micrómetros y las anchuras oscilan entre unos pocos micrómetros y unos pocos milímetros.

30 En una forma de realización, durante la operación de un dispositivo 100 como el mostrado en las FIGS. 1A - 1C y 2, el fluido, que puede incluir las células, es transportado hasta los microcanales 108, 112 a través de los orificios 110, 114. Dado que cada canal presenta unos orificios de entrada y salida distintos, el tipo de fluido y las condiciones del flujo pueden ser controlados de manera independiente para cada canal. En consecuencia, los parámetros mecánicos del fluido de un canal pueden diferir de los parámetros mecánicos del fluido de otro canal, ya se sitúe otro canal en la misma u otra capa. Los parámetros mecánicos del fluido incluyen, por ejemplo, presión, caudal, esfuerzo de cizallamiento, laminaridad y viscosidad. Otros parámetros que pueden diferir entre los canales 108, 112 incluyen temperatura, conductividad térmica, conductividad eléctrica, densidad y composición química del fluido. Así mismo, puede ser empleada cualquier combinación de flujo paralelo en los múltiples canales 108, 112, el contraflujo, el flujo a ambos lados de la capa 106 porosa y las condiciones estáticas. Los parámetros pueden ser seleccionados para una aplicación específica. Por ejemplo, para remedar el Asa de Henle, una porción del riñón en la que se reclaman agua y sales procedentes de un flujo de desechos y se forma orina concentrada, puede establecerse un contraflujo entre dos canales vecinos que estén conectados por medio de un fluido en un extremo. Para remedar un glomérulo, en el que tiene lugar el filtrado de sangre, la sangre puede ser conducida a través de un canal, mientras que el dializado, puede ser conducido a través de un canal adyacente. La simulación del proceso, por ejemplo, el filtrado de sangre utilizando los dispositivos descritos en la presente memoria aprovecha la capacidad de los canales 108, 112 para comunicar entre sí mediante la transferencia de masa, el equilibrado de la presión, o de otra forma.

35 El grado de comunicación entre canales a ambos lados de la membrana 106, así como entre canales de la misma capa a través de un canal dispuesto sobre el otro lado de la membrana 106, depende de diversos parámetros geométricos, que incluyen la proximidad de los canales y las dimensiones de sus secciones transversales, así como de las propiedades (por ejemplo, material, grosor, tamaño de poro, etc.) de la membrana 106. Así mismo, la

comunicación puede ser influida por concentraciones y gradientes de concentración de diversos elementos constitutivos del fluido.

Aunque la geometría de los canales 108, 112 representada en las FIGS. 1A - 1C y 2 no se modifica a lo largo de la extensión de los canales 108, 112, no es necesario que este sea el caso. Por el contrario, diversas formas de realización de biorreactores microfluídicos pueden utilizar variantes de uno o más de estos parámetros para controlar la comunicación entre los canales y, en consecuencia, las condiciones dentro de los canales, en función de la posición a lo largo de la extensión de los canales. Las FIGS. 3A - 3C ilustran, en una vista desde arriba, una capa 300 del dispositivo que presenta cinco microcanales 301 cuyas propiedades geométricas cambian de modo paulatino en un punto 302 a lo largo del canal 301. En la FIG. 3A, la distancia de los dos canales 301 más exteriores hasta los canales 301 interiores cambia de forma abrupta. En la FIG. 3B, los canales 301 más exteriores se ensanchan y los dos canales 301 interiores vecinos se estrechan, mientras que el canal 301 central no cambia en sección transversal. Finalmente, en la FIG. 3C, la profundidad de los canales 301 cambia en el punto 302.

La geometría puede variar en más de un emplazamiento. Así mismo, puede variar gradualmente. Por ejemplo, la distancia entre dos canales rectos puede aumentar linealmente a lo largo de una extensión de los canales. Dado que en ese caso, los canales ya no son paralelos, la variación del parámetro geométrico relevante (en el ejemplo, una distancia) puede ser definida con respecto a una longitud o eje geométrico de uno u otro de los canales, un eje geométrico de simetría entre los canales o, en general, cualquier eje geométrico a lo largo del cual ambos canales presenten un componente de proyección (esto es, que es un componente no perpendicular a cualquiera de los canales). La frase "a lo largo de una extensión del canal" pretende abarcar todos estos ejes geométricos de referencia posibles. Para asegurar la comunicación entre canales divergentes a través de otro canal de la capa situada sobre el otro lado de la membrana sobre la ruta más corta posible, ese otro canal típicamente variará en consonancia con ello su anchura (por ejemplo, incorporará unas proyecciones trapezoidales en el interior de la capa si los canales de intercomunicación de la otra capa divergen linealmente). Como alternativa, el canal más ancho que proporcione el medio de comunicación presentará una anchura igual a al menos la distancia mayor entre los canales más estrechos en la porción relevante del dispositivo. (Nótese que la divergencia de los cinco microcanales 112 de las FIGS. 1A - 1C cerca de los orificios 114 se distingue del cambio del parámetro geométrico descrito anteriormente en que, más allá de la región en la que los cinco canales 112 son paralelos, no se solapan con el canal 108 más ancho dispuesto en la capa 104 de fondo).

El efecto de la geometría de los canales sobre las intersecciones sobre los canales y, en particular, sobre la interacción sobre los canales de la misma capa, de un lado a otro de la membrana, y a través de un canal lateralmente superpuesto en la otra capa, se ilustra de forma esquemática en las FIGS. 4A - 4D. La configuración 400 inicial, que comprende tres canales 402 estrechos aproximadamente equidistantes que presentan aproximadamente las mismas secciones transversales y un canal 404 más ancho en la capa superior que está al mismo nivel que las dos capas 402 exteriores de la capa inferior, se muestra en la FIG. 4A. Debido a las características de los fluidos microfluídicos, en particular el predominio del flujo laminar en los canales, la mezcla de soluciones a través de los flujos de fluidos dentro de los canales resulta ampliamente dominado por difusión. Dado que la difusión depende de la longitud de la trayectoria, la modificación de la geometría de los canales para alterar las longitudes de la trayectoria de difusión entre los canales y dentro de los canales proporciona un medio para controlar el suministro de elementos constitutivos solubles en las diversas regiones a lo largo de la extensión de los canales. Así mismo, la difusión depende del área en sección transversal, de forma que la alteración de la anchura o la profundidad de los canales puede influir en la cantidad de difusión a través de la membrana.

En las secciones transversales de las FIGS. 4A - 4D, la cantidad de difusión a través de la membrana 405 se indica mediante la anchura de las flechas verticales, y las longitudes de la trayectoria de difusión a través de la anchura 404 de la capa superior se indica por las flechas horizontales. La reducción de la distancia entre los canales de la capa de fondo reduce la longitud de la trayectoria de difusión a través del canal superior, lo que provoca el incremento de la difusión entre los dos canales de la capa de fondo. Así, en la configuración con la referencia 410 mostrada en la FIG. 4B, el transporte de difusión entre dos canales 412, 414 de estrecha separación es mayor que el transporte de difusión entre dos canales 412, 414 separados de forma distante. En la configuración 420 mostrada en la FIG. 4C, la difusión a través de la membrana 405 se incrementa respecto del canal 422 más ancho de la capa de fondo debido al área de contacto aumentada con la membrana 405. En consecuencia, la difusión entre el canal 422 más ancho y cada uno de los canales 424, 426 más estrechos también se incrementa. En la configuración 430 mostrada en la FIG. 4D, la profundidad de canal alterada del canal 432 central influye en la longitud de la trayectoria de difusión dentro del canal 422, lo que modifica la extensión de la comunicación incrementando el volumen total del canal para una cantidad determinada de difusión.

En formas de realización en las que los parámetros geométricos varían a lo largo de la longitud del canal, el suministro basado en la difusión de elementos constitutivos del fluido (por ejemplo componentes de la sangre, nutrientes o agentes farmacéuticos) puede ser sintonizada por medio de la geometría de canal para diferentes regiones de los canales. Esto es particularmente útil para el cultivo de células renales, como las células a lo largo del túbulo renal, por ejemplo, experimentando variación en las reacciones químicas dependientes de su emplazamiento dentro de la trayectoria del túbulo. Así, las variaciones de la geometría de los canales proporcionan un modo único de cultivar células renales en un dispositivo microfluídico de forma que experimenten condiciones similares a las experimentadas *in vivo*.

Los dispositivos microfluídicos de acuerdo con formas de realización de la invención pueden ser fabricados utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo moldeo de réplica, mecanizado convencional, moldeo por inyección, o fabricación de formas libres sólidas. Para producir capas poliméricas individuales, por medio de moldeo réplica, un molde maestro que presenta un relieve en negativo de la estructura deseada es fabricado para cada capa. Procedimientos ampliamente utilizados de crear el molde maestro incluyen litografía blanda, ataque al ácido húmedo, ataque al ácido por plasma, y galvanoplastia.

La producción del molde maestro por litografía blanda, por ejemplo, conlleva la designación de una fotomáscara que tiene las aristas del molde maestro, correspondientes a las indentaciones de la primera capa, como regiones transparentes de una lámina por otro lado opaca. La configuración de la máscara puede ser definida en un dibujo informático y, a continuación, ser convertida, por ejemplo, con un paquete software como el Tanner L-Edit, en una configuración de Diseño Asistido por Ordenador (CAD), que sea apropiado para una estructura física de la máscara por litografía de haz de electrones o una técnica similar.

Como otra etapa preparatoria, una oblea de sustrato, por ejemplo, fabricada en silicio, puede ser centrifugada con una solución viscosa de un fotoresist, por ejemplo, SU-8. Típicamente, la oblea es hilada rápidamente, a de 1200 a 4800 revoluciones por minuto, durante un periodo de tiempo que oscila entre varias docenas de segundo hasta minutos, para producir una capa de grosor uniforme de fotoresist con un grosor de hasta de 10 a incluso cientos de micrómetros. A continuación, la fotomáscara puede ser colocada sobre la oblea, y el fotoresist de las regiones transparentes de la masa puede ser químicamente estabilizado mediante exposición a la luz UV. El fotoresist en las regiones no expuestas puede ser a continuación retirado por exposición a un agente de desarrollo químico, y el fotoresist restante puede ser reducido a temperaturas elevadas para formar un relieve negativo duradero. En la etapa de ataque al ácido un agente químico puede ser empleado para suprimir la capa de más arriba del sustrato en las regiones que no están protegidas por el fotoresist, generando un patrón de canal en relieve negativo en la oblea, que ahora constituye el molde maestro. El fotoresist, que ya no se necesita, puede a continuación ser retirado del sustrato. A continuación, un polímero líquido puede ser vaciado dentro del molde maestro, curado y desprendido, quedando un molde réplica de la capa del dispositivo que contiene canales (por ejemplo, capa 102 o 104).

La membrana que separa el (los) canal(es) de una capa de los de la otra capa puede ser fabricado revistiendo un material apropiado sobre una oblea, curándolo, si es aplicable, y desprendiéndolo. Otro esquema de fabricación conlleva el centrifugada de una membrana con las deseadas porosidad, grosor y otras propiedades deseadas. Como alternativa, puede ser utilizada una membrana comercialmente disponible (por ejemplo una membrana de policarbonato de trazas atacadas de Sterlitech, Kent, Washington) o una membrana fabricada *in situ*. Las capas poliméricas y la membrana pueden entonces ser ensambladas, alineadas y ligadas por plasma o de cualquier otra forma unidas entre sí de manera temporal o permanente.

Las técnicas descritas anteriormente proporcionan gran versatilidad en la producción de canales de anchura, profundidad, trayectoria de flujo y configuración deseadas. Por ejemplo, pueden ser diseñados canales que se desplacen a lo largo de trayectorias curvas, se ramifiquen en múltiples canales o formen redes complejas. Así, los dispositivos pueden ser ajustados para remedar características importantes de órganos y tejidos biológicos, como por ejemplo una microvasculatura o una porción de una nefrona. En algunas formas de realización, los canales están diseñados en base a un perfil de mecánica de los fluidos deseado, como por ejemplo un perfil definido por unas propiedades de transporte convectivas o difusivas u otros parámetros de mecánica de los fluidos en función de la posición en el (los) canal(es). Como alternativa, o adicionalmente, el diseño de canal puede basarse en un perfil de concentración deseado de determinados elementos constitutivos existentes en el fluido destinados a ser inyectados dentro del dispositivo. Unos modelos computacionales pueden ser empleados para calcular, a partir de un perfil de mecánica de los fluidos o de concentración, la geometría y configuración de los canales que producirían dicho perfil. El perfil puede escogerse para remedar un órgano biológico concreto, o para optimizar un parámetro biológicamente relevante. Por ejemplo, la eliminación de pequeñas moléculas de un canal puede ser optimizada haciendo que el canal sea adecuadamente superficial. Como alternativa, el microentorno mecánico, químico o biológico dentro de un canal o compartimento puede ser optimizado para inducir las condiciones apropiadas para incrementar la viabilidad de las células.

Diversas modificaciones y características adicionales pueden ser introducidas en los dispositivos de biorreactores microfluídicos de acuerdo con la invención. En algunas formas de realización ambas capas incluyen múltiples canales. Por ejemplo, una capa puede contener dos canales más anchos, cada uno de los cuales se solape lateralmente con y establezca comunicación entre dos de cuatro canales más estrechos de la otra capa. En otra configuración ejemplar cada capa puede contener un canal que se solape lateralmente con múltiples canales de la otra capa. En determinadas formas de realización, los canales situados en la capa comunican no solo a través de un canal sobre el otro lado de la membrana, sino también directamente a través de una pared lateral con ventana o un material permeable poroso de cualquier otra forma que separa los canales de esa capa. Así mismo, un dispositivo puede incluir más de dos capas, que pueden ser integradas por un componente cabecero que conecte de manera fluidica los orificios de las capas. Así, se puede obtener una red tridimensional. Los propios canales pueden incorporar paredes lisas, bifurcaciones lisas, paredes distensibles y / o secciones transversales circulares o semicirculares casi perfectas.

- En determinadas formas de realización un biorreactor que puede en otro caso ser similar estructural o funcionalmente a los descritos anteriormente puede ser producido a partir de una capa o bloque polimérico simple. Los canales pueden ser taladrados dentro del bloque a diversas alturas, por ejemplo, para que los ejes geométricos centrales de dos canales se sitúen dentro de un plano, y el eje geométrico central de un canal se sitúe en otro plano paralelo. En determinadas porciones, el material entre los canales en dos planos puede ser parcialmente separado por ataque al ácido o de cualquier otra forma suprimido para que se forme una estructura tipo membrana entre los canales. Como alternativa, uno o más canales con una dimensión vertical igual a dos profundidades de canal deseadas se puede formar en el bloque, y una membrana puede ser insertada para dividir el (los) canal(es) en canales apilados verticalmente.
- 5
- 10 Para preparar el dispositivo para cultivos celulares, las características químicas de las paredes de los canales pueden, de manera opcional, ser ajustadas purgando los canales con soluciones apropiadas, por ejemplo albúmina de suero de bobino (BSA) o una solución de funcionalidad superficial. Dependiendo de la aplicación, las proteínas típicamente encontradas en una matriz extracelular (ECM), como por ejemplo colágeno, laminina, fibronectina o elastina pueden ser fijadas a las paredes por medio de metodologías de funcionalización de superficie.
- 15 El microdispositivo puede entonces ser incorporado en un montaje experimental ajustando la tubería a las entradas y salidas, inyectando fluido que puede contener células, y / o conectando el dispositivo a otros aparatos. Las células pueden flotar en el fluido que está contenido en o fluye a través de los canales. Como alternativa o adicionalmente, las células puede adherirse a las paredes y / o a la membrana. En membranas con tamaños de poro suficientes, las células pueden ocupar los propios poros, formando así una capa de cultivo de células porosas. Así, las células pueden quedar expuestas a estímulos procedentes de fluidos a ambos lados de la membrana.
- 20
- En diversas formas de realización, múltiples tipos de células son cultivadas en el biorreactor. Diferentes tipos pueden ser cocultivados en el mismo emplazamiento, inyectados en diferentes canales, o sembrados en diferentes emplazamientos dentro del mismo canal. En general, la adhesión de las células a las paredes y a la membrana depende de la química de la superficie, la cual puede ser específica para ligar los puntos encontrados sobre algunos pero no sobre otros tipos de células. Así, la elección como objetivo de emplazamientos diferentes dentro del canal con tipos de células diferentes puede llevarse a cabo modificando la química de la superficie a lo largo de la extensión del canal, por ejemplo, mediante la biopauta de moléculas de adhesión de la superficie o creando una nanotopografía sobre la pared del canal. Factores adicionales que influyen cuando se cultivan tipos de células concretos incluyen el orden en el que los tipos de células son introducidos en el canal y la orientación en el que el dispositivo es mantenido durante el sembrado de las células (lo que puede aprovechar las fuerzas gravitatorias para situar las células en emplazamientos concretos).
- 25
- 30 Los cultivos de células pueden estar expuestos a múltiples estímulos químicos, físicos, biológicos y / o biofísicos impuestos por el usuario. Por ejemplo, la configuración de los canales puede permitir estímulos biofísicos tanto de presión normal como de esfuerzo de cizallamiento. El esfuerzo de cizallamiento puede ser regulado controlando el caudal que fluye a través de los canales, mientras que la presión dentro de los canales puede fijarse mediante presión suministrada externamente. La presión puede ser controlada respecto de múltiples canales a uno u otro lado de la capa porosa. Dado que pueden ser empleados múltiples canales a cada lado de la membrana, la presión a través de la membrana (y de esta manera, en algunas formas de realización, a través de la capa de células porosas) puede ser controlada para múltiples emplazamientos de forma independiente. El control de la presión a un lado y otro de una capa de células es de particular importancia para remedar las condiciones de las células que llevan a cabo funciones de transporte *in vivo* como las diversas células que se encuentran en el riñón.
- 35
- 40 Los parámetros biológicos controlables incluyen la densidad y los tipos de células que rodean un cultivo de células concreto. Las células de la capa porosa pueden interactuar con un conjunto de especies de células sobre el otro, y otro conjunto de especies sobre el otro lado. En algunas formas de realización, la anchura a microescala de los canales limita el número de células existentes en un área, imitando de esta manera las interacciones de célula a célula. Así mismo, la profundidad a microescala de los canales puede influir en el nivel de comunicación entre células sobre la capa porosa y las células dispuestas sobre la pared del canal opuesta a esa capa. Colectivamente, esos efectos proporcionan una posibilidad para que el usuario controle las interacciones de célula a célula por medio de la geometría del canal local. Así mismo, como se mencionó con anterioridad, la variación de la proximidad, la anchura y la profundidad del canal a lo largo de la extensión del canal facilita el control sobre el entorno químico a lo largo de la extensión del canal, lo cual puede ser utilizado para aproximar los cambios del entorno químico que las células pueden experimentar *in vivo*, por ejemplo a lo largo de la extensión del túbulo renal. Dado que el tipo y función de las células cambia a lo largo de la extensión del túbulo renal, la provisión de una química variada puede soportar la función de esas células cuando sean cultivadas en el biorreactor.
- 45
- 50
- 55 Las células pueden interactuar no solo entre sí, sino también con el fluido del canal. Por ejemplo, la proliferación de células puede cambiar en respuesta a un fármaco determinado, un cambio en el contenido de los nutrientes del fluido, el Ph de una solución tampón, etc. Las células pueden también absorber o secretar determinados compuestos, modificando así la composición del fluido. En una forma de realización, la sangre puede fluir a través de un canal sobre un lado de la membrana, y un dializado puede fluir a través del canal sobre el otro lado del canal, remedando el contraflujo dentro del riñón e induciendo a que las células filtren la sangre a lo largo de su trayectoria.
- 60

- 5 El efecto de los diversos estímulos sobre las células puede ser observado y / o medido de diversas maneras. El microscopio óptico puede ser utilizado para detectar cualquier cambio de los tamaños o las formas de las células. El fluido puede ser desviado en la salida y analizado respecto de ciertos elementos constitutivos para determinar la secreción o la absorción de determinados compuestos, lo que puede proporcionar información acerca del metabolismo celular y / o la expresión proteínica. Las mediciones de la tasa a la cual el fluido, las partículas y las especies moleculares pasan a través de la membrana a la presión aplicada de un lado a otro de la membrana, o de la resistencia eléctrica en toda la membrana pueden ser utilizadas para evaluar la perfección con la que las células bloquean los poros de la membrana.
- 10 Como apreciarán los expertos en la materia, los biorreactores microfluídicos, como se describen en la presente memoria, proporcionan una plataforma para múltiples aplicaciones de investigación y médicas, en particular, en cuanto se refiere a cultivos de células relativas al riñón o células madre. El control de los diversos parámetros facilita el cultivo de las células en un entorno prescrito con el fin de provocar una función deseada. Por ejemplo, las células madre pueden ser cultivadas para una aplicación terapéutica concreta manteniendo al tiempo la potencia o estimulando la diferenciación en un determinado fenotipo.
- 15 Los dispositivos biorreactores también mejoran las capacidades de estudio de la función celular *in vitro*, también bajo condiciones estrechamente similares a las condiciones *in vivo*. Debido a que los parámetros medioambientales de los biorreactores son satisfactoriamente controlados, es posible la observación de la respuesta celular a entradas conocidas para un determinado conjunto de condiciones. En determinadas formas de realización, el biorreactor, poblado con células renales, remeda importantes componentes funcionales del riñón. Así, pueden ser desarrolladas importantes sustancias farmacéuticas para una terapia renal sobre una plataforma satisfactoriamente controlada. La eficacia de los fármacos y la toxicidad pueden ser sometidas a prueba con seguridad *in vitro* evaluando las células relacionadas con el riñón en el biorreactor para su viabilidad y los marcadores de la salud celular después de que han recibido una agresión farmacéutica. El elevado nivel de control sobre múltiples parámetros puede reducir la variabilidad experimental y mejorar la precisión, en comparación con procedimientos de pruebas de fármacos.
- 20
- 25 Determinadas formas de realización de dispositivos de biorreactores pueden ser utilizadas para el tratamiento de una enfermedad renal terminal. El biorreactor y las células adherentes pueden ser configuradas de manera que el dispositivo lleve a cabo algunas funciones del riñón, sirviendo de esta manera como dispositivo de asistencia del riñón, el cual puede ser utilizado de forma extracorpórea en la terapia de sustitución renal. El dispositivo puede también ser empleado como la genotecnología de tejidos. En concreto, mediante la provisión de una arquitectura controlada que remede estructuras del riñón y haga posible la fijación de las células, el biorreactor puede servir como entramado para generar construcciones de tejido específicas del riñón. Dichas construcciones pueden ser
- 30 implantadas en el cuerpo de un paciente para sustituir el tejido renal enfermo.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un dispositivo biorreactor microfluídico, que comprende:
- 5 una primera capa polimérica que define en su interior unos primero y segundo microcanales y una segunda capa polimérica que define un tercer microcanal; y una membrana que separa del tercer canal los primero y segundo canales en unas porciones geoméricamente superpuestas entre ellos, permitiendo la membrana la comunicación entre las porciones superpuestas de los microcanales, en el que una distancia entre el primero y el segundo microcanales varía a lo largo de una extensión de estos y una profundidad y una anchura del primer microcanal y una profundidad y una anchura del segundo microcanal permanecen constantes a lo largo de su extensión dentro de las porciones superpuestas.
- 10 2.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el primer microcanal comunica con el segundo microcanal por medio del tercer microcanal.
- 3.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la membrana comprende al menos un elemento entre una napa, un material electrohilado, un polidimetilsiloxano micromoldeado, poliétersulfona, o una membrana de trazas atacadas.
- 15 4.- El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además al menos un tipo de célula que se adhiere a al menos un elemento entre: la membrana y una pared de los microcanales.
- 5.- El dispositivo de la reivindicación 4, en el que el tipo de células varía a lo largo de la extensión del microcanal.
- 20 6.- El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un fluido dentro de los microcanales, en el que el fluido consiste en al menos uno de entre un medio de cultivo celular, una solución tampón, unos componentes sanguíneos, sangre, orina, dializado, agua, filtrado, o una solución que remeda un fluido corporal.
- 7.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que un valor de una presión, un caudal, una velocidad de cizallamiento o una viscosidad en al menos uno de los primero y segundo microcanales es sustancialmente diferente de un valor de una presión, un caudal, una velocidad de cizallamiento o una viscosidad del tercer microcanal
- 25 8.- El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un cuarto microcanal sobre el mismo lado de la membrana que el tercer microcanal, siendo un valor de un parámetro de mecánica de los fluidos del cuarto microcanal sustancialmente diferente de un valor de un parámetro de mecánica de los fluidos del tercer microcanal
- 9.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que una concentración o un gradiente de concentración de un elemento constitutivo del fluido de al menos uno de los primero y segundo microcanales es sustancialmente diferente de una concentración o de un gradiente de concentración del elemento constitutivo en el fluido del tercer microcanal.
- 30 10.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la distancia entre los primero y segundo microcanales varía a lo largo de la extensión de sus longitudes.
- 11.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la variación de la distancia entre los primero y segundo microcanales a lo largo de sus extensiones facilita la variación de al menos un estímulo químico o un estímulo mecánico a lo largo de la extensión de ese microcanal.
- 35 12.- Un procedimiento de cultivo de células, comprendiendo el procedimiento:
- (a) la provisión de un biorreactor, que comprende un dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;
- 40 (b) la introducción de células en al menos uno de los microcanales; y
- (c) el cultivo de las células.
- 13.- El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además la introducción de un fluido en al menos uno de los microcanales.
- 45 14.- El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además la exposición de las células a al menos un estímulo entre un estímulo mecánico, un estímulo químico o un estímulo biológico; y la medición de un cambio en la función celular de las células con respecto al estímulo.
- 15.- El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la etapa (b) comprende:
- 50 la introducción de tipos de células diferentes en al menos un microcanal;
- la introducción de diferentes tipos de células en diferentes microcanales; y
- la siembra de diferentes tipos de células en diferentes emplazamientos seleccionados dentro del al menos un microcanal.

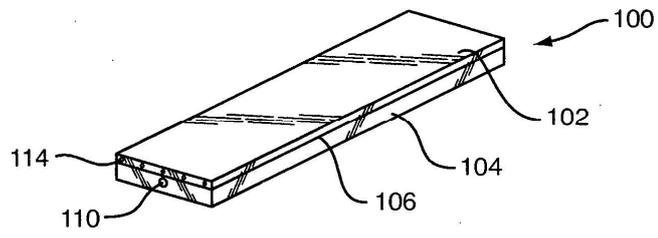


FIG. 1A

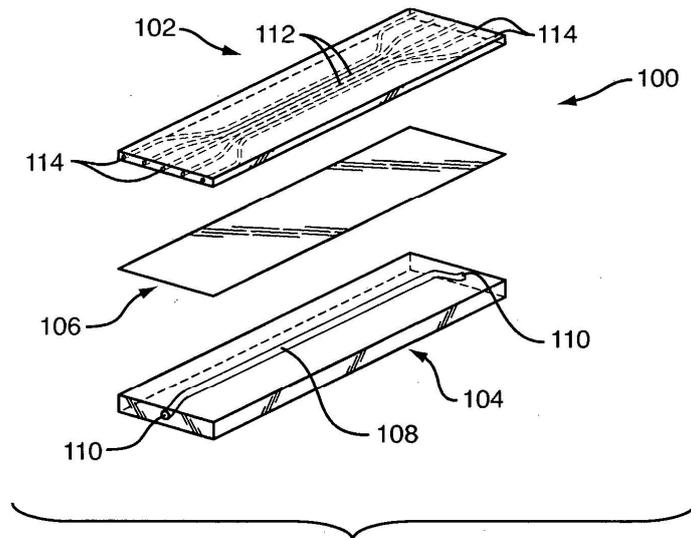


FIG. 1B

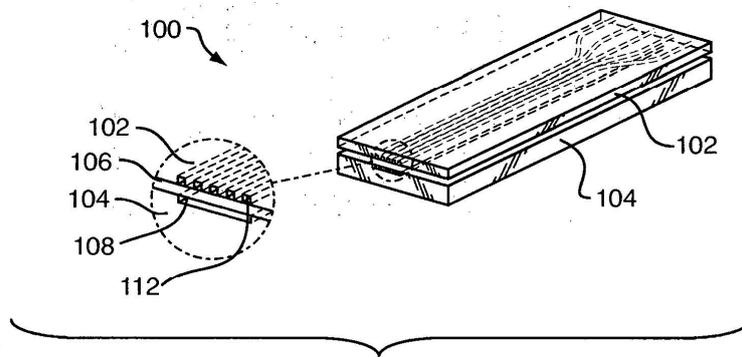


FIG. 1C

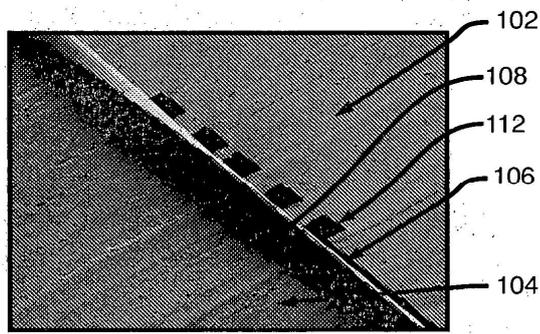


FIG. 2

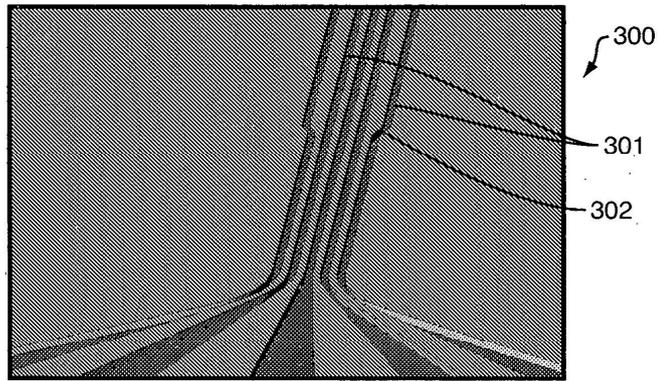


FIG. 3A

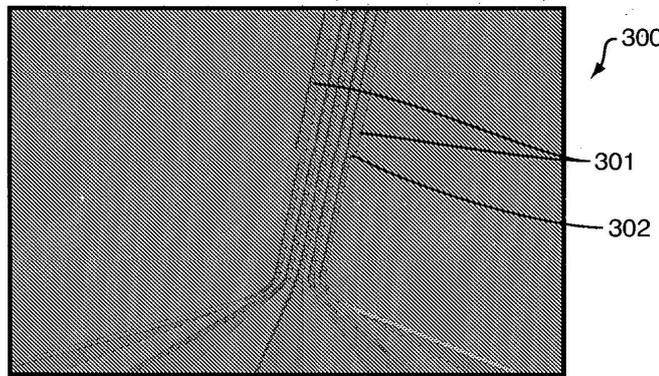


FIG. 3B

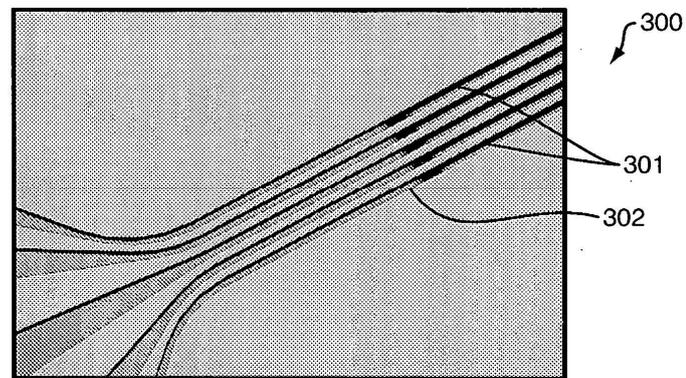


FIG. 3C

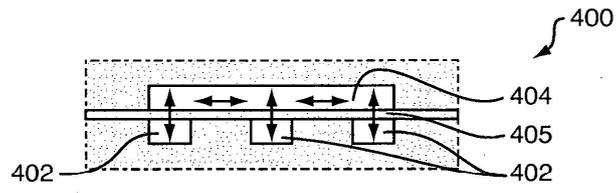


FIG. 4A

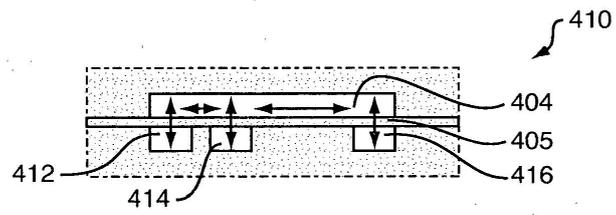


FIG. 4B

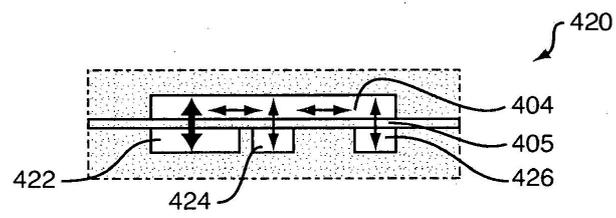


FIG. 4C

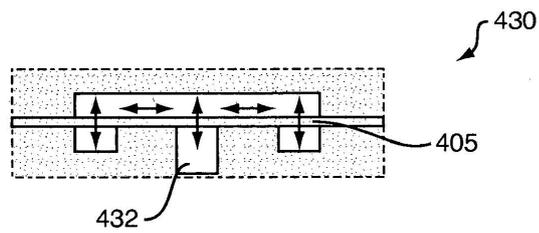


FIG. 4D