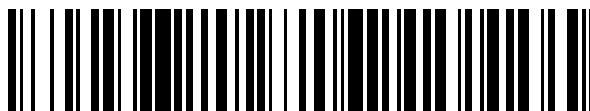


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 183**

51 Int. Cl.:

B81C 1/00	(2006.01)
B81C 99/00	(2010.01)
B01L 3/00	(2006.01)
B29C 33/38	(2006.01)
B29L 31/00	(2006.01)
B29C 59/02	(2006.01)
B29K 25/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2008 PCT/US2008/077026**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2009 WO09039378**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08832581 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2200931**

54 Título: **Estructuras microfluídicas con sección transversal circular**

30 Prioridad:

19.09.2007 US 973529 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

73 Titular/es:

**THE CHARLES STARK DRAPER LABORATORY,
INC. (50.0%)
555 TECHNOLOGY SQUARE
CAMBRIDGE, MA 02139-3563, US y
BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BORENSTEIN, JEFFREY, T.;
WEINBERG, ELI, J.;
HSIAO, JAMES, CHING-MING;
KHALIL, AHMAD, S.;
TUPPER, MALINDA, M.;
GARCIA-CARDENA, GUILLERMO;
MACK, PETER y
TAO, SARAH**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 639 183 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

Estructuras microfluídicas con sección transversal circular

REFERENCIA CRUZADA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica prioridad y las ventajas de, e incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/973,529, que se presentó el 19 de septiembre de 2007.

CAMPO TÉCNICO

10 **[0002]** En varios modos de realización, la invención se refiere a estructuras microfluídicas para aplicaciones biomédicas y, más en concreto, a constructos microfluídicos con geometría parecida a la vascular para aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en la investigación y terapia biomédica y clínica.

ANTECEDENTES

15 **[0003]** Las estructuras existentes para el flujo sanguíneo, tales como fibras huecas, tubos y estructuras mecanizadas se producen normalmente utilizando técnicas de procesamiento químicas y mecánicas convencionales a macroescala. Los dispositivos microfluídicos se fabrican normalmente utilizando técnicas litográficas o de grabado convencionales combinadas con moldeado de réplicas. Los métodos para generar estas estructuras que intentan imitar las redes vasculares normalmente experimentan dificultades en la reproducción, a microescala, de las características específicas y de vital importancia de los vasos sanguíneos. Los métodos que utilizan fibras huecas u otras estructuras tubulares y elementos mecanizados o formados de forma estereolitográfica para dispositivos terapéuticos, tales como cartuchos de diálisis renal, dispositivos de asistencia hepática y dispositivos de soporte pulmonar, están normalmente limitados en cuanto al diámetro mínimo alcanzable. Además, las bifurcaciones vasculares en tubos y constructos a base de fibras normalmente contienen ángulos agudos debido a limitaciones en los procesos de ensamblaje. Estas limitaciones introducen también cambios repentinos de diámetro en las expansiones y contracciones de diámetro de los vasos. Las características agudas y no fisiológicas repentinas provocan un flujo alterado y un control escaso en los parámetros clave, tal como la tensión de cizallamiento de la pared, provocando niveles aumentados de inflamación y coagulación y dificultades en la siembra de las células a lo largo de las paredes de los canales.

20 **[0004]** Los dispositivos microfluídicos han solucionado algunas de las deficiencias asociadas a las técnicas de formación libre sólida o de mecanización y de fibras y tubos. Principalmente, la microfluídica ha permitido una reducción drástica en el tamaño del detalle mínimo y la simplificación de los procesos de ensamblaje. Sin embargo, las técnicas de fabricación microfluídica existentes normalmente no permiten transiciones regulares en las bifurcaciones o cambios de diámetro de vasos, puesto que los procesos utilizados para construir los moldes tipo microfluídicos a menudo dan lugar a geometrías rectangulares y no permiten regiones de transición estrechadas.

25 **[0005]** Las técnicas convencionales para la microfluídica incluyen el uso de moldes tipo formados litográficamente (material fotosensible positivo o negativo convencional o resina epoxi SU-8) que producen paredes laterales rectangulares o casi rectangulares. Se han dado a conocer técnicas que producen curvatura en las paredes laterales utilizando resinas fotosensibles JSR u otras resinas fotosensibles combinadas con procesos de cocción para hundir las paredes laterales. Estos procesos no se controlan bien y no producen una geometría inversa circular necesaria para el moldeado de réplicas. Además, estos procesos no permiten transiciones regulares en las bifurcaciones o cambios suaves en el diámetro de los vasos porque son esencialmente técnicas de deposición capa por capa y exposición y, por tanto, por naturaleza dan lugar a variaciones bruscas en la geometría.

30 **[0006]** Los procesos de grabado tales como el grabado por plasma o grabado húmedo normalmente presentan las mismas limitaciones que las técnicas litográficas. Las técnicas de grabado iónico reactivo profundo (DRIE, por sus siglas en inglés) son muy anisotrópicas y, cuando se modifican para producir paredes laterales graduadas, todavía producen paredes rectas y esquinas estrechadas. Las técnicas de grabado iónico reactivo (RIE, por sus siglas en inglés) isotrópicas y las técnicas de grabado húmedo isotrópicas normalmente presentan índices de grabado muy bajos y no se controlan bien para tiempos de grabado más largos y geometrías arbitrarias. Además, el grabado isotrópico no mantiene una relación de aspecto circular para procesos de grabado más profundos.

35 **[0007]** Yi *et al.* en "Moldless electroplating for cylindrical microchannel fabrication" [Electrochemistry Communication, Elsevier, Amsterdam, NL, vol.7, n.º 9, 1 septiembre 2005] da a conocer una estructura microfluídica y un método para fabricar la estructura que comprende proporcionar una oblea impresa que comprende al menos una región eléctricamente conductora expuesta y al menos una región eléctricamente aislante expuesta. Una parte de canal inverso con sección transversal sustancialmente semicircular se electrodeposita sobre la oblea, formando de esta manera un primer molde tipo. El primer molde tipo se utiliza para estampar una parte canal en una primera lámina de polímero. La primera lámina de polímero se alinea y se une con una segunda lámina de polímero que presenta una parte de canal correspondiente para definir un primer canal con sección transversal sustancialmente circular entre las láminas de polímero, por la cual, la circularidad del canal, según se

define por la relación del diámetro más pequeño de la sección transversal sustancialmente circular con respecto al diámetro más grande de la sección transversal sustancialmente circular, es inferior a 1:1,3.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 **[0008]** Según la presente invención, se proporciona un método para fabricar una estructura microfluídica como se establece en la reivindicación 1 y una estructura microfluídica como se establece en la reivindicación 13.

10 **[0009]** En varios modos de realización, la presente invención utiliza una secuencia de proceso microfluídico en la que se forman moldes tipo y después se moldean láminas de polímero para obtener réplicas a partir de los moldes tipo y se unen para formar las redes vasculares. Pueden producirse estructuras tridimensionales a gran escala poniendo en capas las láminas de red microfluídica junto con conexiones de colector fluídico entre las capas. Una diferencia entre los métodos de ejemplo descritos en la presente memoria y los métodos anteriores es la capacidad de, utilizando los métodos descritos en el presente documento, formar geometrías regulares similares a las vasculares de redes de microcanales en tres dimensiones. En algunos modos de realización, esto es posible por la naturaleza del proceso de formación del molde tipo, así como los métodos de ensamblaje relacionados para unir las capas de colector fluídico. En algunos modos de realización de la presente invención, las técnicas de fabricación tipo dan lugar a geometrías perfectamente semicirculares, así como a transiciones regulares en los cambios de diámetro vascular y en las bifurcaciones vasculares. Se utilizan técnicas de ensamblaje y estructuración de colector capaces de proporcionar transiciones de flujo regular similares para completar la red fluídica tridimensional.

20 **[0010]** Algunas aplicaciones comerciales de ejemplo para modos de realización de la presente invención incluyen el uso de las estructuras de red microvascular como herramientas para la investigación básica sobre biología de enfermedades de órganos específicos, cardiovasculares y cancerígenas, descubrimiento de fármacos y realización de pruebas de seguridad de fármacos. Además, los modos de realización de la presente invención encuentran aplicación comercial en dispositivos de asistencia a órganos para el hígado, el riñón, el pulmón y otros órganos y tejidos vascularizados, así como en estructuras de reemplazo de órganos.

25 **[0011]** Algunas ventajas de ejemplo de los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria incluyen la capacidad de construir transiciones regulares en las bifurcaciones vasculares y en los cambios de diámetro vascular de forma similar a las estructuras fisiológicas sanas, que son expansibles a estructuras tridimensionales grandes, así como la capacidad para producir geometrías de microcanal sustancialmente cilíndricas. Otras ventajas son que los modos de realización de la presente invención son mucho más realísticos fisiológicamente en cuanto a estructura. Los métodos anteriores requieren elegir entre el empleo de tubos cilíndricos de gran diámetro o estructuras microfluídicas de diámetro menor con geometrías aproximadamente rectangulares, mientras que los modos de realización de la presente invención permiten geometrías sustancialmente cilíndricas a cualquier escala. Además, las estructuras anteriores incluyen ángulos agudos, espacios muertos y expansiones/contracciones repentinas entre vasos en las bifurcaciones y en los cambios dimensionales encontrados en las redes microvasculares. Los modos de realización de la presente invención permiten transiciones regulares en las bifurcaciones y en los cambios de diámetro, volumen muerto mínimo y flujo regular. Por tanto, se minimizan o se evitan las condiciones de flujo alterado asociadas a la formación de trombos, se minimiza o se evita la formación de placa y la respuesta inflamatoria y se logra una tensión de cizallamiento de la pared sustancialmente uniforme en cada punto a lo largo de la circunferencia interior del lumen.

40 **[0012]** En un aspecto, los modos de realización de la invención presentan un método para fabricar una estructura microfluídica que presenta un canal con sección transversal sustancialmente circular. En la presente memoria, se entiende que una sección transversal es perpendicular a un eje longitudinal del canal, y el punto en el que el eje longitudinal se interseca con la sección transversal se considera el punto central de la sección transversal. No es necesario que el canal sea recto y, por consiguiente, partes diferentes del canal pueden tener ejes longitudinales diferentes. Además, en varios modos de realización, se entiende que las secciones transversales "sustancialmente circulares" denominan secciones transversales cuya desviación de la circularidad perfecta se caracteriza por una relación del diámetro más grande con respecto al diámetro más pequeño inferior a 1,3, preferiblemente inferior a 1,1, incluso más preferiblemente inferior a 1,03. Los diámetros se definen con respecto al punto central de la sección transversal.

50 **[0013]** En un modo de realización, el método incluye proporcionar una oblea impresa que incluye al menos una región eléctricamente conductora expuesta y al menos una región eléctricamente aislante expuesta; y electrodepositar una parte de canal inverso con sección transversal sustancialmente semicircular sobre la oblea, formando de esta manera un primer molde tipo. El primer molde tipo puede emplearse entonces para estampar, ya sea directamente o mediante dos moldes de transferencia, una parte de canal en una lámina de polímero. Posteriormente, la lámina de polímero puede alinearse y unirse con una segunda lámina de polímero estampada que contiene una parte de canal correspondiente, es decir, una parte de canal que presenta sustancialmente una simetría especular con respecto a la parte de canal en la primera lámina, de manera que entre las dos láminas se define un canal con sección transversal sustancialmente circular. En algunos modos de realización, puede utilizarse el mismo molde tipo para estampar ambas láminas y, en otros modos de realización, puede utilizarse un segundo molde tipo, fabricado de una forma similar a la del primer molde tipo. En un modo de realización, los canales se

siembran con células. En determinados modos de realización, el canal se caracteriza por un diámetro gradualmente cambiante, y/o por una bifurcación regular y gradual en dos canales.

5 **[0014]** La región eléctricamente conductora puede contener oro, cromo, titanio, tungsteno, platino, cobre, plata, aluminio o una combinación de los mismos. La región eléctricamente aislante puede contener dióxido de silicio y/o nitrato de silicio. La oblea impresa puede incluir además un sustrato, por ejemplo, que contenga silicio o que conste esencialmente de silicio. En algunos modos de realización, la región eléctricamente conductora, que puede ser continua o discontinua, se deposita sobre el sustrato, y la región o las regiones eléctricamente aislante(s) se deposita(n), al menos en parte, sobre la región eléctricamente conductora. En modos de realización alternativos, la región eléctricamente aislante se deposita sobre el sustrato y la región o las regiones eléctricamente conductora(s) se deposita(n), al menos parcialmente, sobre la misma. La parte de canal inverso electrodepositada puede comprender un metal seleccionado de entre el grupo que consiste en cobre, oro, níquel y/o plata.

15 **[0015]** En determinados modos de realización, puede repetirse el método de producción de la estructura microfluídica para formar estructuras microfluídicas adicionales, y la pluralidad de estructuras microfluídicas resultante puede apilarse de forma que defina una superficie frontal que contenga las salidas de los canales. El método puede repetirse adicionalmente para formar un cabezal microfluídico, que puede acoplarse a la superficie frontal y alinearse con las salidas de los canales para acoplar fluidicamente las estructuras microfluídicas.

20 **[0016]** En otro aspecto, los modos de realización de la invención presentan una estructura microfluídica, que incluye un soporte polimérico que define un primer canal en el mismo. Al menos una parte del canal se caracteriza por una sección transversal sustancialmente circular y un diámetro inferior a 300 µm. En algunos modos de realización, la relación del cualquier primer diámetro del canal con cualquier segundo diámetro que se interseque con el primero (es decir, que se encuentre en la misma sección transversal) es inferior a 1,3, preferiblemente inferior a 1,1. En un modo de realización, el canal se caracteriza además por un diámetro gradualmente cambiante. En algunos modos de realización, el primer canal se bifurca en un segundo y un tercer canal, y los pasajes entre el primer y el segundo canal, así como entre el primer y el tercer canal, son regulares y graduales. En determinados modos de realización, se siembran células dentro del canal o de los canales.

30 **[0017]** En otro aspecto adicional, los modos de realización de la invención presentan un dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye una pluralidad de estructuras microfluídicas y un cabezal microfluídico que acopla las estructuras. Cada estructura microfluídica incluye un soporte polimérico que define al menos un canal. Las estructuras se apilan para formar una estructura apilada que define una superficie frontal que contiene salidas de los canales. El cabezal microfluídico se acopla a la superficie frontal y se alinea con las salidas para acoplar fluidicamente las estructuras. En algunos modos de realización, el cabezal microfluídico incluye una pluralidad de soportes poliméricos, definiendo cada uno una red de canales. En determinados modos de realización, se siembran células dentro de los canales. Al menos una parte de un canal puede caracterizarse por una sección transversal sustancialmente circular y un diámetro inferior a 300 µm.

35 **[0018]** En otro aspecto adicional, los modos de realización de la invención proporcionan un método para fabricar una estructura microfluídica que incluye: proporcionar una oblea impresa; grabar isotrópicamente la oblea con difluoruro de xenón para formar un molde tipo con una parte de canal inverso que presenta una sección transversal sustancialmente semicircular; estampar el molde tipo en un molde de transferencia; estampar el molde de transferencia en una lámina de polímero; y alinear y unir la lámina de polímero con una segunda lámina de polímero con sustancialmente simetría especular para definir un canal con sección transversal sustancialmente semicircular entre las láminas. En determinados modos de realización, el diámetro del canal inverso cambia gradualmente de un primer a un segundo diámetro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 **[0019]** Los anteriores y otros objetos, aspectos, características y ventajas de la invención resultarán más evidentes y podrán entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra métodos de fabricación de dispositivos microfluídicos según varios modos de realización de la invención;

50 La figura 2A es un dibujo lineal trazado a partir de una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de un modo de realización de un molde electrodepositado de cobre sobre una oblea de silicio que muestra cuatro niveles de bifurcaciones vasculares regulares;

La figura 2B es un dibujo lineal trazado a partir de una imagen SEM más ampliada del molde electrodepositado de cobre sobre la oblea de silicio de la figura 2A que muestra una geometría semicilíndrica inversa del molde electrodepositado que puede utilizarse para estampar canales semicilíndricos en una lámina de polímero;

La figura 3A es un dibujo lineal trazado a partir de una imagen SEM que ilustra una vista superior de un modo de realización de una película de poliestireno que ha sufrido un proceso de estampado duro utilizando un molde electrodepositado de cobre;

5 La figura 3B es un dibujo lineal trazado a partir de una imagen SEM que ilustra una vista lateral de la película de poliestireno representada en la figura 3A;

La figura 4A ilustra una herramienta de silicio grabada con XeF₂ para la fabricación de un dispositivo microfluídico de poliestireno según un modo de realización de la invención;

La figura 4B ilustra un molde de transferencia de PDMS para la fabricación de un dispositivo microfluídico de poliestireno según un modo de realización de la invención;

10 La figura 4C ilustra una parte de poliestireno estampada para la fabricación de un dispositivo microfluídico de poliestireno según un modo de realización de la invención;

La figura 5A es un dibujo lineal trazado a partir de una foto de un dispositivo microfluídico de poliestireno sellado con tubo integrado según un modo de realización de la invención;

15 La figura 5B es un dibujo lineal trazado a partir de una foto SEM de una sección transversal de canal del dispositivo de la figura 5A;

La figura 6A es un diagrama de flujo para fabricar un molde tipo según un proceso de electrodeposición de huecos impresos según un modo de realización de la invención;

20 La figura La figura 6B es una ilustración esquemática de un proceso de electrodeposición de cobre de ejemplo según el método de la figura 6A para redes de microcanales con diámetros variables, en el que el metal de siembra se imprime de manera que los contactos de electrodeposición posteriores abren nuevas áreas de metal de siembra después de un retraso, controlando de esta manera la altura y la anchura del detalle;

La figura 6C es una vista en perspectiva de una estructura de ejemplo fabricada según el método de la figura 6A;

25 La figura 7A es un diagrama de flujo de un método para fabricar un molde tipo según un proceso de electrodeposición de electrodos enterrados según un modo de realización de la invención;

La figura 7B es una ilustración esquemática de un proceso de electrodeposición de cobre de ejemplo según el método de la figura 7A, comenzando con deposición de metal de siembra de cubierta, impresión de un óxido a baja temperatura, electrodeposición de cobre sobre áreas abiertas del metal de siembra y expansión de forma isotrópica a medida que aumenta el tiempo de recubrimiento;

30 La figura 7C es una vista en perspectiva de una estructura de ejemplo fabricada según el método de la figura 7A;

La figura 8A es un diagrama de flujo de un método para fabricar un molde tipo según un proceso de electrodeposición que combina características de un proceso de hueco impreso y un proceso de electrodo enterrado según un modo de realización de la invención;

35 La figura 8B es una vista en perspectiva de una estructura de ejemplo fabricada según el método de la figura 8A;

La figura 8C es una vista en perspectiva de un canal electrodepositado de ejemplo fabricado a partir de la estructura mostrada en la figura 8B;

40 La figura 9A es una vista en despiece de un (cabezal de) colector de distribución de flujo listo para ensamblarse con una pila vertical de redes de flujo según un modo de realización de la invención;

La figura 9B ilustra el colector de distribución de flujo de la figura 9A después del ensamblaje;

La figura 9C ilustra un ensamblaje de dispositivos microfluídicos, que incorpora siete capas de flujo laterales con cabezales de entrada y de salida, para formar un dispositivo integrado tridimensional según un modo de realización dispositivo;

45 DESCRIPCIÓN

[0020] En la presente memoria se describen diversos modos de realización de estructuras microfluídicas y dispositivos microfluídicos tridimensionales para aplicaciones biomédicas. Pueden integrarse modelos computacionales para redes microvasculares, tecnologías de fabricación microfluídica precisas y un sistema de modelo de células endoteliales para establecer claramente un fenotipo celular funcional en un constructo

tridimensional real. Esta tecnología puede utilizarse para fabricar dispositivos para aplicaciones *in vitro*, incluyendo: investigación en biología vascular fundamental; investigaciones de coagulación, inflamación, formación de placa y otros estados patológicos de la vasculatura; y descubrimiento de fármacos y pruebas de seguridad de fármacos. Además, la tecnología puede traducirse en soportes biodegradables tridimensionales de precisión integrados con modelos de cocultivos y materiales de matriz adecuados para aplicaciones de ingeniería tisular, tales como el desarrollo de dispositivos portátiles o implantables que incorporan acceso vascular y una microcirculación.

[0021] Según varios modos de realización de la invención, pueden fabricarse estructuras microfluídicas que contienen microcanales sustancialmente cilíndricos de geometría similar a la vascular, con diámetros que van de aproximadamente 5 micras a más de 10 mm y con longitudes que van de aproximadamente 100 micras a varios centímetros. Los aspectos de la geometría similar a la vascular pueden incluir paredes de microcanales regulares, secciones transversales de canales sustancialmente circulares, cambios continuos en los diámetros de canal y transiciones graduales entre los canales en las bifurcaciones. Estas características permiten trayectorias de flujo regulares a través de toda la red de canales.

[0022] Pueden construirse estructuras microfluídicas utilizando materiales de soporte compatibles con la siembra, la expansión y el sostenimiento de las células vasculares funcionales, incluyendo células endoteliales y células musculares regulares. En varios modos de realización de la invención, los métodos para fabricar tales soportes microfluídicos implican la fabricación de moldes tipo que imitan la geometría de las redes microvasculares y el estampado de estos moldes tipo en un sustrato bien establecido para el cultivo de tejidos. Determinados métodos pueden producir geometrías cilíndricas adecuadas para microvasos en diámetros tan pequeños como decenas de micras, distinguiéndolos de otras técnicas de fabricación microfluídica comunes tales como fotolitografía SU-8 o grabado iónico reactivo profundo.

[0023] El diagrama de flujo representado en la figura 1 proporciona una perspectiva general de métodos para la fabricación de estructuras microfluídicas según varios modos de realización. Estos métodos comienzan con el diseño y la fabricación de una o más fotomáscaras que definen estructuras correspondientes a la red de canales deseada (etapa 100). La disposición de la máscara puede crearse en un dibujo por ordenador y, entonces, puede convertirse en una disposición de diseño asistido por ordenador (CAD, por sus siglas en inglés), p. ej., utilizando un paquete de *software* tal como Tanner L-Edit. Las disposiciones de CAD proporcionan un formato adecuado para la conversión en una fotomáscara generada por litografía por haz de electrones o una técnica similar.

[0024] En la etapa 102, la fotomáscara se utiliza para imprimir un sustrato, normalmente una oblea de silicio. El estampado puede implicar generalmente varias etapas de litografía, desarrollo químico, grabado, cocción y despegado. La secuencia de proceso particular implicada depende de las subsiguientes etapas de fabricación del molde tipo y se explica con detalle a continuación en el contexto de los métodos específicos.

[0025] En algunos modos de realización, ilustrado mediante la rama de la izquierda del diagrama de flujo representado en la figura 1, la oblea impresa contiene regiones eléctricamente conductoras y regiones eléctricamente aislantes, y sirve como la estructura de siembra para la electrodeposición. Durante la etapa de electrodeposición 104, la oblea impresa se acopla al cátodo de un circuito eléctrico y se sumerge en un baño electrolítico que también contiene un ánodo metálico. El material del ánodo, que puede ser, por ejemplo, cobre, níquel, oro o plata, se disuelve y se deposita sobre las regiones metálicas eléctricamente cargadas expuestas de la oblea impresa. De esta manera, se forma un semirrelieve para un posterior estampado duro. En las imágenes SEM de las figuras 2A y 2B se muestra una parte de un molde tipo electrodepositado de ejemplo con ocho generaciones de microcanales bifurcados que presentan secciones transversales semicirculares. En particular, la figura 2A muestra cinco generaciones de canales y la figura 2B muestra un primer plano de los puntos de bifurcación entre los canales. Los puntos de bifurcación muestran transiciones regulares que permiten un flujo no alterado a través de esas regiones.

[0026] El molde tipo electrodepositado puede utilizarse directamente para el estampado duro de características sustancialmente semicilíndricas en una lámina de polímero, tal como una lámina de policarbonato o poliestireno (etapa 106). Para cultivos celulares de numerosos tipos celulares, el poliestireno de grado de cultivo tisular proporciona una plataforma bien establecida. En una técnica de estampado duro de ejemplo que es robusta, reproducible y de alta precisión, se realiza un estampado duro de láminas de poliestireno de Plaskolite, Inc. (estireno con filtrado ultravioleta [FUV] transparente de 0,040" [0,10 cm]), cortadas con el tamaño adecuado, utilizando un molde de silicio revestido de metal como se describe anteriormente. Más específicamente, el molde de silicio y la lámina de poliestireno se intercalan entre dos piezas de película de Kaptón (Fralock Inc.) en un aparato de estampado, que permite un control preciso de la temperatura y la presión. La temperatura del aparato puede aumentarse a 130 °C, y evacuarse la cámara, haciendo que el pistón del estampador ejerza una presión de 25 pulgadas de Hg sobre el molde y el sustrato de poliestireno. La temperatura puede mantenerse a 130 °C durante 15 minutos y después enfriar el aparato a aproximadamente 40 °C. El molde y el sustrato pueden retirarse entonces del estampador y separarse para formar un dispositivo de poliestireno independiente con microcanales redondeados. Pueden crearse canales más profundos que permitan la incorporación de tubos flexibles adhiriendo tubos de metal en los extremos de los microcanales. En las figuras 3A y 3B se muestra un ejemplo de una parte de poliestireno estampada.

[0027] En un modo de realización alternativo, el molde tipo puede utilizarse para estampar un molde de polímero de transferencia (etapa 106'), dando lugar a un relieve reducido, y el molde de polímero de transferencia puede utilizarse para estampar un segundo molde de polímero de transferencia (etapa 106''), dando lugar a un relieve elevado. Finalmente, el segundo molde de polímero de transferencia puede utilizarse para estampar la lámina de poliestireno (etapa 106). Este método es ventajoso en el sentido en el que evita el uso repetido de los moldes tipo electrodepositados, que pueden ser frágiles y deslaminarse con el tiempo y los ciclos de temperatura. Un molde de transferencia a menudo es más robusto, puesto que es una pieza sólida, en lugar de un compuesto de un sustrato con una impresión de metal electrodepositada en la parte superior. Los materiales adecuados tanto para el primer como para el segundo molde de transferencia son polímeros duros que soportarán la temperatura y mantendrán características precisas a lo largo del tiempo y el ciclo de temperatura, tales como, p. ej., poliuretano, poliestireno o polipropileno.

[0028] De forma alternativa, y con referencia a la rama de la derecha del diagrama de flujo representado en la figura 1, la oblea impresa puede contener regiones de superficie en las que se expone el silicio y regiones protegidas por el óxido de silicio. Normalmente, se reviste una oblea de silicio con una capa de óxido de silicio, que se imprime posteriormente de forma litográfica. Esta oblea puede grabarse mediante gas difluoruro de xenón (XeF_2), que es altamente selectivo para grabar el silicio, pero no el óxido de silicio, y que elimina los átomos de silicio de forma isotrópica, es decir, graba vertical y lateralmente a la misma velocidad (etapa 108). De esta manera, se producen cavidades con secciones transversales sustancialmente semicirculares en la oblea de silicio. Pueden conseguirse cavidades con diámetros cambiantes imprimiendo la capa de material fotosensible con características de anchuras gradualmente cambiantes, tales como características de estrechamiento.

[0029] La impresión grabada en la oblea de silicio puede transferirse a un molde tipo de polímero, tal como, por ejemplo, un molde de PDMS o un molde de poliuretano, produciendo de esta manera estructuras elevadas redondeadas similares a las del molde electrodepositado (etapa 110). El molde tipo de polímero puede utilizarse entonces para el estampado blando de una lámina de polímero, tal como una lámina de poliestireno, creando de esta manera partes de microcanal redondeadas (etapa 112). En este caso, la lámina de poliestireno puede calentarse a una temperatura mayor (150 °C) para permitir que se forme más fácilmente alrededor del molde de polímero blando. En varios modos de realización, se prefiere producir una copia del polímero de la oblea de silicio grabada a utilizar directamente la oblea de silicio grabada, puesto que los polímeros pueden exhibir propiedades materiales ventajosas para aplicaciones biomédicas, incluyendo transparencia, coste de material bajo, biocompatibilidad y, en algunos casos, biodegradabilidad. En las figuras 4A, 4B y 4C se muestran respectivamente una oblea de silicio de ejemplo, un molde de transferencia de polímero (p. ej., PDMS) de ejemplo y una parte de poliestireno estampada de ejemplo creada a partir de este proceso.

[0030] En una etapa opcional 114, las partes de canal en la superficie del poliestireno pueden tratarse químicamente, p. ej., con un plasma de oxígeno utilizando un microseparador (*Microstripper*) de Technics con una configuración de 100 mW y 100 mTorr de presión de O_2 durante un minuto, para que se vuelvan más hidrófilas y favorables a la adhesión celular. Entonces se pueden poner en contacto dos superficies tratadas estampadas correspondientes y se pueden alinear partes de los canales con la ayuda de un microscopio óptico para formar canales sustancialmente cilíndricos (etapa 116). Pueden cortarse tubos silásticos flexibles (Dow Corning Inc.) y colocarse en los canales más profundos diseñados para las conexiones de tubos. Las dos láminas pueden unirse térmicamente en el aparato de estampado a 90 °C durante 30 minutos. El tubo flexible también puede sellarse en su lugar durante la unión, creando una interfaz continua para la inyección de células. En la figura 5A se representa una estructura microfluídica de ejemplo, fabricada mediante el estampado duro de un molde tipo electrodepositado en dos láminas de poliestireno. El primer plano de la figura 5B muestra la sección transversal circular de una salida de canal. Puesto que la estructura representada en las figuras 5A y 5B muestra sustancial simetría especular, puede utilizarse el mismo molde tipo para estampar ambas láminas de polímero. Sin embargo, en general, la fabricación de dos láminas correspondientes cuyas partes de canal pueden alinearse requiere dos moldes tipo con relieves sustancialmente reflejados.

[0031] En la etapa 118, la estructura microfluídica puede recubrirse con células de varios tipos, p. ej., con células endoteliales. El poliestireno de grado de cultivo tisular, que sirve como el estándar industrial para matrices de células y tejidos para cribado de alto rendimiento y otras aplicaciones de laboratorio, es muy adecuado para establecer un fenotipo funcional robusto.

A. Métodos de electrodeposición para la fabricación de moldes tipo

[0032] Pueden emplearse diversos métodos de electrodeposición para fabricar moldes tipo con partes de canal inverso que presentan secciones transversales sustancialmente semicirculares, diámetros gradualmente variables y/o bifurcaciones regulares. Las figuras 6A-6C ilustran un proceso de electrodeposición de metal conocido como proceso de "huevo impreso", que es capaz de producir moldes tipo de silicio con un intervalo de diámetros de microcanal y transiciones de flujo regulares en las bifurcaciones y entre las sucesivas generaciones de canales. Como se detalla en el diagrama de flujo de la figura 6A y el esquema de la figura 6B, el proceso comienza con la deposición de una capa de cubierta de material eléctricamente aislante sobre una oblea de silicio limpia u otro

sustrato (etapa 600). Por ejemplo, puede producirse una capa de nitruro de silicio o de óxido de silicio fina mediante oxidación térmica. Esta capa puede tener entre aproximadamente 0,5 μm y 1 μm de grosor.

- [0033]** En las etapas posteriores, la capa aislante puede imprimirse según la estructura microfluídica deseada, utilizando la fotomáscara fabricada en la etapa 100. En un modo de realización, la oblea revestida con aislante se cubre con una capa protectora de 'despegado' especializada (p. ej., Microchem, Corp. serie LOR) y el material fotosensible AZ1518 (etapa 602). A continuación, se coloca la fotomáscara sobre la oblea, p. ej., utilizando un alineador de contacto (p. ej., Karl Suss MA-6), para la posterior etapa 604 de litografía. Después de la iluminación, el material fotosensible y la capa protectora de despegado pueden desarrollarse utilizando AZ400K y MF319 diluido, respectivamente (etapa 606). En la etapa 608, se deposita el metal de siembra para la electrodeposición.
- 5 Algunos metales de siembra adecuados incluyen cromo, oro, titanio, tungsteno y platino, así como combinaciones de los mismos, tales como cromo-oro (p. ej., 1000A Cr/ 3000A Au) o titanio- tungsteno. En algunos modos de realización, la capa de metal de siembra incluye una capa de adhesión de cromo, titanio o tungsteno-titanio y una capa de metal superior de oro, platino o cobre. El metal de siembra puede depositarse en un pulverizador catódico (p. ej., pulverizador catódico con magnetron de CC de Mill Lane) o en un evaporador (p. ej., evaporador de haz de electrones de Denton). El despegado (etapa 610) puede lograrse agitando ultrasónicamente la oblea en un disolvente. La estructura resultante 640, representada en las figuras 6B y 6C, incluye un sustrato 650, una capa aislante continua 652 y regiones metálicas 654 encima de la capa aislante 652. En las regiones 656 en las que el metal se ha despegado, la capa aislante 652 queda expuesta. La oblea impresa 640 está lista para la electrodeposición de metal.
- 10 **[0034]** Con referencia a las figuras 1 y 6A, puede conseguirse entonces la electrodeposición de cobre, en la etapa 104, sumergiendo la oblea en una solución de baño comercialmente disponible (Technic, Inc. Copper Bath RTU) y aplicando corriente eléctrica adecuada en el baño. Optimizando la aplicación de la corriente (p. ej., 70 mA medidos con un voltímetro de Fluke), puede conseguirse un índice de crecimiento de cobre fiable de 15 $\mu\text{m}/\text{h}$. De forma alternativa, pueden electrodeponerse otros metales tales como, por ejemplo, níquel, oro y plata.
- 20 **[0035]** En un modo de realización, la electrodeposición de metal comienza inmediatamente en regiones para las que la impresión de metal está directamente conectada al ánodo, pero se retrasa en otras regiones por la presencia de los huecos que rompen la conexión entre el ánodo y el metal de siembra expuesto. La longitud de estos huecos rige el tiempo de retraso antes del comienzo de la electrodeposición del metal sobre el siguiente nivel de microcanales con el diseño de red. Por ejemplo, un hueco de 100 micras introduce un retraso de tiempo de manera que las crestas más grandes son 100 micras más altas que las estructuras del siguiente nivel. Variando los huecos de forma sistemática, puede conseguirse un intervalo completo de diámetros de microvasos sobre las capas estampadas. Por ejemplo, la figura 6C ilustra tres impresiones de metal de ejemplo 670, 672 y 674. Las impresiones 670 y 674 comprenden cada una tres partes de metal rectas, mientras que la impresión 672 comprende una parte de metal recta y dos partes de metal ramificadas. Si las partes de metal más a la izquierda se conectan al ánodo, el metal se deposita sobre estas partes primero. Una vez que se ha alcanzado un determinado grosor de la capa depositada, el metal depositado forma una conexión eléctrica con las siguientes partes a la derecha y el metal se deposita después en ambas regiones. Como resultado, el diámetro de la estructura depositada cambia en la ubicación del hueco. Las impresiones 670 y 674 dan lugar ambas a un canal inverso cuyo diámetro cambia dos veces; la impresión 672 da lugar a un canal inverso que se ramifica en dos canales de diámetro más pequeño. La electrodeposición de hueco impreso produce estructuras redondeadas, que, cuando se estampan en una lámina de polímero, logra partes de canal redondeadas. La forma exacta de la sección transversal del canal depende del material recubierto, de las dimensiones de las estructuras de metal de siembra y de los parámetros de electrodeposición. En algunos modos de realización, las secciones transversales se parecen a trapecios, es decir, son similares a semicírculos.
- 30 **[0036]** Un método alternativo, que puede conseguir de forma reproducible geometrías casi circulares, es un proceso de electrodeposición conocido como proceso de "electrodo enterrado", representado en las figuras 7A-7C. En un modo de realización, este proceso implica, en la etapa 700, la deposición de una capa de metal de cubierta, tal como una capa de cromo-oro (p. ej., 500A Cr/ 1000A Au), sobre una oblea de silicio mediante evaporación o pulverización catódica. En la etapa 702, puede depositarse una capa aislante (p. ej., una capa de óxido) sobre la parte superior del metal de siembra, utilizando, por ejemplo, deposición química de vapor mejorada con plasma (PECVD, por sus siglas en inglés; Oxford System 100 PECVD Reactor). El grosor de la capa de óxido puede encontrarse en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm a 1 μm . En un modo de realización, el óxido se imprime, en las etapas 704 y 706, utilizando un sistema de litografía de contacto (Karl Suss MA-6) y material fotosensible Shipley 1822 (desarrollador MF319). Esta etapa puede ir seguida, en la etapa 708, por grabado húmedo del óxido en ácido fluorhídrico (ataque químico de óxido tamponado [BOE, por sus siglas en inglés] DI 1:7 HF) o por grabado iónico reactivo. Después de grabar el óxido, el material fotosensible puede eliminarse con un disolvente (SVC-14) (etapa 710), dejando la oblea lista para la electrodeposición de metal (etapa 104).
- 35 **[0037]** Una estructura impresa de ejemplo 740, representada en las figuras 7B y 7C, incluye, por este orden, un sustrato 750, una capa eléctricamente conductora continua 752 y regiones eléctricamente aislantes 754. En las regiones 756 donde se ha grabado la capa aislante, se expone la capa conductora 752. Sin embargo, a diferencia de la estructura de hueco impreso 640 representada en la figura 6C, las regiones metálicas 752 en la estructura
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

740 se encuentran por debajo de las regiones aislantes 754. Esta característica elimina los problemas de deslaminación que pueden producirse en el proceso de hueco impreso y, por consiguiente, reduce la optimización de los parámetros del proceso para las geometrías de canal deseadas.

5 **[0038]** En general, la forma y la regularidad de las estructuras de relieve electrodepositadas depende de las dimensiones de la impresión de la oblea, así como de diversos parámetros del proceso de electrodeposición, incluyendo el material electrodepositado, la densidad de la corriente, la configuración del ánodo y la concentración del baño y la agitación. Pueden lograrse geometrías inversas casi perfectamente circulares en moldes tipo en una solución de baño de cobre comercial (p. ej., Technic, Inc. Copper Bath RTU) sin agitación a una densidad de corriente en el intervalo de 5,5 mA/cm² a 7,75 mA/cm². Para obtener densidades de corriente uniformes, puede emplearse un ánodo en configuración de alambre en espiral. La velocidad de recubrimiento resultante es de aproximadamente 14 µm/hora. Comenzando con anchuras de detalle de 50 µm en la oblea impresa, la altura de las partes de canal inverso se aproxima a la anchura en un diámetro de la parte de canal inverso de aproximadamente 200 µm. Utilizando la relación del diámetro más grande con respecto al diámetro más pequeño de canales realistas como una medida del grado de circularidad, puede conseguirse relaciones inferiores a 1,3. La figura 3B, por ejemplo, muestra una canal semicircular con un diámetro mayor de 199,1 µm y un diámetro menor de 176,8 µm, correspondiente a una relación de 1,12. Algunos modos de realización pueden dar lugar a relaciones inferiores a 1,1, o incluso inferiores a 1,03.

20 **[0039]** La oblea de electrodo enterrado representada en la figura 7C, aunque permite partes de canal inverso sustancialmente semicirculares, no contempla simultáneamente cambios en el diámetro. Puesto que la capa de metal de siembra 752 es continua, el material electrodepositado se deposita en todas las regiones expuestas a aproximadamente la misma velocidad. Por lo tanto, si las impresiones grabadas incluyeran características de estrechamiento para variar la anchura de las partes de canal inverso, la altura de las partes de canal inverso no variaría. Por consiguiente, las secciones transversales de las partes de canal inverso no serían semicirculares en todo su conjunto.

25 **[0040]** Con el fin de emplear el proceso de electrodo enterrado y conseguir partes de canal inverso con diámetros variables, pueden combinarse las propiedades ventajosas del proceso de electrodo enterrado y del proceso de hueco impreso en un método híbrido ilustrado en las figuras 8A-8B. Este método emplea la impresión tanto del metal de siembra como de las capas aislantes. En detalle, como se muestra en la figura 8A, el método implica, en una primera etapa 800, revestir un sustrato (p. ej., silicio) con una capa protectora de despegado y un material fotosensible e imprimirlo litográficamente (de forma similar a las etapas 602 y 604 en la figura 6A). Después, en la etapa 802, la capa de metal de siembra se deposita sobre la oblea mediante evaporación o pulverización catódica (de forma similar a la etapa 700 en la figura 7A). En la posterior etapa de despegado 804 (parecida a la etapa 610 de la figura 6A), se elimina el metal en un baño de disolvente agitado en determinadas zonas en las que se desea cambiar el diámetro del canal. La oblea impresa se reviste posteriormente con una capa aislante (etapa 702), tal como óxido de silicio, y con una capa de material fotosensible (etapa 704), y se imprime mediante litografía (etapa 706) y grabado (etapa 708). Después de la eliminación de la capa protectora y de la limpieza de la oblea (etapa 710), la oblea está lista para la electrodeposición (etapa 104).

40 **[0041]** En la figura 8B se representa una oblea 840 de ejemplo, impresa según el método mostrado en la figura 8A. Contiene, por este orden, un sustrato 850, una capa de metal de siembra 852 y una capa aislante 854. A lo largo del eje de las estructuras de canal (dirección x), la capa de metal se imprime de manera similar a la estructura 640; a lo largo del eje y perpendicular, la capa de metal es continua. Los huecos 856 en la capa de metal pueden rellenarse con material aislante. La discontinuidad de la capa de metal de siembra provoca cambios de diámetro de las estructuras elevadas producidas por electrodeposición. La capa aislante 854 se imprime, en la dirección y, al igual que la de la oblea de electrodo enterrado 740, y permite la fabricación de partes de canal sustancialmente semicirculares. La figura 8C ilustra la forma de una estructura electrodepositada que resulta de la parte 870 de la oblea impresa 840.

B. Redes microfluídicas tridimensionales integradas

50 **[0042]** Los soportes microfluídicos que presentan dos capas de láminas de polímero unidas normalmente forman una red de flujo bidimensional. Con el fin de construir una red de flujo tridimensional, pueden combinarse varias de estas estructuras bidimensionales. Por ejemplo, como se ilustra en las figuras 9A-9C, pueden apilarse varias estructuras microfluídicas individuales 900 para formar una estructura apilada 902. Las capas individuales 900 de la estructura apilada 902 pueden entonces conectarse fluidicamente, p. ej., con tubos encajados dentro de las salidas del canal 904. De forma alternativa, las estructuras 900 pueden integrarse en una red de flujo tridimensional utilizando un cabezal microfluídico 906 con trayectorias de flujo curvadas regulares que distribuye el fluido uniformemente a través de la estructura apilada 902.

55 **[0043]** El cabezal 906 puede fabricarse utilizando tecnología de estereolitografía (SLA, por sus siglas en inglés), o empleando las técnicas anteriormente descritas. Por ejemplo, la figura 9A ilustra un cabezal 906 que contiene dos partes con redes de flujo de medio canal correspondientes, que puede producirse estampando relieves electrodepositados en bloques de poliestireno como se ha descrito anteriormente. Para integrar las capas

individuales 900, estas pueden acoplarse (p. ej., ajustarse) y colocarse en contacto directo con los cabezales de entrada y salida 906, como se representa en la figura 9B. Las placas 908 superior e inferior pueden utilizarse para retener las posiciones relativas de los cabezales 906 y la estructura apilada 902.

5 **[0044]** En un modo de realización, la red de flujo de microcanal de los cabezales 906 se rota con respecto a las redes de flujo en la estructura apilada 902, y se alinea con las salidas 904 en una superficie frontal 910 de la estructura apilada 902 que resulta de una disposición alineada de las capas 900. Si las salidas 904 se colocan a lo largo de una línea recta, como se representa, el cabezal 906 solo tiene que contener una única red de flujo de canal. Generalmente, las estructuras 902 pueden contener diferentes redes de flujo de canal, cuyas salidas forman una impresión bidimensional en la superficie frontal 908. Las conexiones fluidicas entre las capas 900 pueden
10 conseguirse entonces con un cabezal 906 que comprende por sí mismo varias capas con redes de microcanales.

[0045] En la figura 9C se muestra una fotografía de un ensamblaje de ejemplo de una red de flujo tridimensional, con una única red de flujo bidimensional cerrada (es decir, dos capas de medio canal encajadas) colocada a la derecha a título de ejemplo. En este ensamblaje, los canales del cabezal se bifurcan con trayectorias de flujo regulares de una forma vertical para conectarse a cada una de las siete capas de flujo bidimensionales.

15 C. Aplicaciones biomédicas

[0046] La creación de un fenotipo funcional robusto para células endoteliales en constructos microfluídicos tridimensionales requiere normalmente un control excelente sobre numerosos parámetros asociados al microentorno celular. Entre estos se encuentran las interacciones químicas superficiales entre la capa endotelial cultivada y las paredes del soporte, y la estabilidad de la superficie con el paso del tiempo. Además, las fuerzas mecánicas presentes deben controlarse adecuadamente y ser estables con el paso del tiempo y como una función de la siembra de células y las condiciones de flujo locales.
20

[0047] Como se describe en la presente memoria, los dispositivos microfluídicos según diversos modos de realización proporcionan microcanales con paredes regulares, secciones transversales sustancialmente circulares y diámetros gradualmente variables. La combinación de estas características da como resultado transiciones regulares en las bifurcaciones. En cambio, las bifurcaciones de los canales con secciones transversales rectangulares normalmente provoca o un cambio de la relación del aspecto del canal, es decir, la relación de la anchura del canal con respecto a la altura del canal, o, si cambia la zona de la de la sección transversal del canal en la bifurcación mientras que la relación de aspecto permanece constante, cambios bruscos en la altura del canal. Ambos cambios en la relación de aspecto y las esquinas estrechadas asociadas a cambios bruscos en la dimensión del canal provocan normalmente perturbaciones en el flujo. Por otro lado, los dispositivos fabricados según determinados modos de realización de la presente invención, presentan trayectorias de flujo regulares y, como resultado, fuerzas controladas adecuadamente, a lo largo de toda la red de canales.
25
30

[0048] Las interacciones químicas entre las células endoteliales y los canales influyen en la capacidad de las células para adherirse como una monocapa confluyente a las paredes del canal de la red y mantienen la viabilidad en condiciones de cultivo normales. Se ha conseguido la adhesión celular y la formación de monocapas dentro de las redes de poliestireno micromoldeadas a partir de moldes tipo estereolitográficos y se visualiza mejor utilizando diagnóstico por secuencia de contraste de fase. Se ha confirmado la viabilidad celular utilizando una tinción de células vivas con calceína AM en la que solo dan respuesta fluorescente las células viables. En algunos modos de realización, tanto la adhesión celular/formación de monocapas como la viabilidad son constantes entre los canales e independientes del diámetro del canal. En general, estos resultados muestran que las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) primarias se adhieren y forman una monocapa confluyente dentro de las redes tridimensionales y siguen siendo viables después de 24 horas del cultivo, validando el enfoque de fabricación descrito anteriormente para generar dispositivos microfluídicos tridimensionales para aplicaciones de redes microvasculares.
35
40

[0049] Los medios canales de poliestireno abiertos que presentan diámetros de aproximadamente 200 μm , generados con el enfoque de fabricación de electrodeposición descrito anteriormente, pueden recubrirse durante 18 horas con HUVEC y evaluar la formación de monocapas y la viabilidad celular. Las HUVEC primarias formaron una monocapa intacta y se tiñeron con calceína AM (un marcador de viabilidad celular), validando de esta manera la compatibilidad del proceso de fabricación de electrodeposición propuesto anteriormente con cultivo de células endoteliales.
45
50

[0050] Varias ventajas de los enfoques descritos en la presente memoria incluyen la capacidad para producir redes vasculares que presentan vasos con geometrías sustancialmente cilíndricas, y para construir transiciones regulares en las bifurcaciones vasculares y cambios de diámetro de los vasos de forma similar a las estructuras fisiológicas sanas. Una vez se ha fabricado dicha estructura fisiológica sana como se describe en la presente memoria, puede introducirse una geometría específica asociada a una enfermedad o patología en un único vaso y estudiarse de manera aislada. Por ejemplo, puede introducirse en el mismo una geometría rectangular, un ángulo agudo o recodo, un espacio muerto y/o una expansión o contracción repentina en una bifurcación vascular o en un cambio dimensional en el vaso para asemejarse a una condición ateroesclerótica u otra condición cardiovascular. De esta forma, una condición de flujo alterada asociada, por ejemplo, a la formación de trombos, a la formación de
55

placa o a una respuesta inflamatoria puede estudiarse de manera aislada y de forma controlada en esa única estructura enferma o patológica.

REIVINDICACIONES

1. Método para fabricar una estructura microfluídica, que comprende:
- (a) proporcionar una oblea impresa (640, 740, 840) que comprende al menos una región eléctricamente conductora expuesta (654, 752, 852) y al menos una región eléctricamente aislante expuesta (652, 754, 854);
 - 5 (b) electrodepositar una parte de canal inverso con sección transversal sustancialmente semicircular y un diámetro gradualmente variable a lo largo de al menos una parte de la parte de canal inverso sobre la oblea (640, 740, 840), formando de esta manera un primer molde tipo;
 - (c) emplear el primer molde tipo para estampar una parte de canal en una primera lámina de polímero; y
 - 10 (d) alinear y unir la primera lámina de polímero con una segunda lámina de polímero que presenta una parte de canal correspondiente para definir un primer canal con sección transversal sustancialmente circular entre las láminas de polímero, por la cual, la circularidad del canal, según se define por la relación del diámetro más pequeño de la sección transversal sustancialmente circular con respecto al diámetro más grande de la sección transversal sustancialmente circular, es inferior a 1:1,3.
2. Método de la reivindicación 1, que comprende además emplear el primer molde tipo para estampar una parte de canal en la segunda lámina de polímero.
3. Método de la reivindicación 1, que comprende además repetir las etapas (a) y (b) para formar un segundo molde tipo que presenta una parte de canal inverso sustancialmente con simetría especular con respecto a la parte de canal sobre el primer molde tipo, y emplear el segundo molde tipo para estampar una parte de canal en la segunda lámina de polímero.
- 20 4. Método de la reivindicación 1, donde la etapa (c) comprende estampar directamente el molde tipo en la primera lámina de polímero.
5. Método de la reivindicación 1, donde la etapa (c) comprende estampar el molde tipo en un primer molde de transferencia, estampar el primer molde de transferencia en un segundo molde de transferencia y estampar el segundo molde de transferencia en la primera lámina de polímero.
- 25 6. Método de la reivindicación 1, donde la región eléctricamente conductora (654, 752, 852) comprende un metal seleccionado de entre el grupo consistente en cromo, oro, titanio, tungsteno, platino, plata, aluminio y cobre.
7. Método de la reivindicación 1, donde la región eléctricamente aislante (652, 754, 854) comprende un material seleccionado de entre el grupo consistente en dióxido de silicio y nitruro de silicio.
- 30 8. Método de la reivindicación 1, donde la oblea impresa (640, 740, 840) comprende además un sustrato (650, 750, 850), y donde la región eléctricamente conductora (654, 752, 852) se deposita sobre el sustrato (650, 750, 850), y la región eléctricamente aislante (652, 754, 854) se deposita sobre la región eléctricamente conductora (654, 752, 852).
9. Método de la reivindicación 8, donde la región eléctricamente conductora (654, 752, 852) es continua.
10. Método de la reivindicación 8, donde la región eléctricamente conductora (654, 752, 852) es discontinua.
- 35 11. Método de la reivindicación 1, donde la oblea impresa (640, 740, 840) comprende además un sustrato (650, 750, 850), y donde la región eléctricamente aislante (652, 754, 854) se deposita sobre el sustrato (650, 750, 850), y la región eléctricamente conductora (654, 752, 852) se deposita sobre la región eléctricamente aislante (652, 754, 854).
- 40 12. Método de la reivindicación 1, donde la parte de canal inverso electrodepositada comprende un metal seleccionado de entre el grupo consistente en cobre, níquel, plata y oro.
13. Estructura microfluídica, que comprende:
- un soporte polimérico que define un primer canal en el mismo, estando al menos una parte del primer canal **caracterizada por** una sección transversal sustancialmente circular y un diámetro gradualmente variable a lo largo de su longitud, un diámetro máximo inferior a 300 micrómetros, y una circularidad del canal, según se define por la relación del diámetro más pequeño de la sección transversal sustancialmente circular con respecto al diámetro más grande de la sección transversal sustancialmente circular, inferior a 1:1,3.
- 45
14. Estructura microfluídica de la reivindicación 13, donde la relación del primer diámetro y el segundo diámetro es inferior a 1,1.

15. Método de la reivindicación 1 o la estructura microfluídica de la reivindicación 13, donde el primer canal está además **caracterizado por** un diámetro gradualmente cambiante.

16. Método de la reivindicación 1 o la estructura microfluídica de la reivindicación 13, donde el primer canal se bifurca en al menos un segundo canal y un tercer canal, siendo un primer pasaje entre el primer canal y el segundo canal y un segundo pasaje entre el primer canal y el tercer canal regulares y graduales.

5

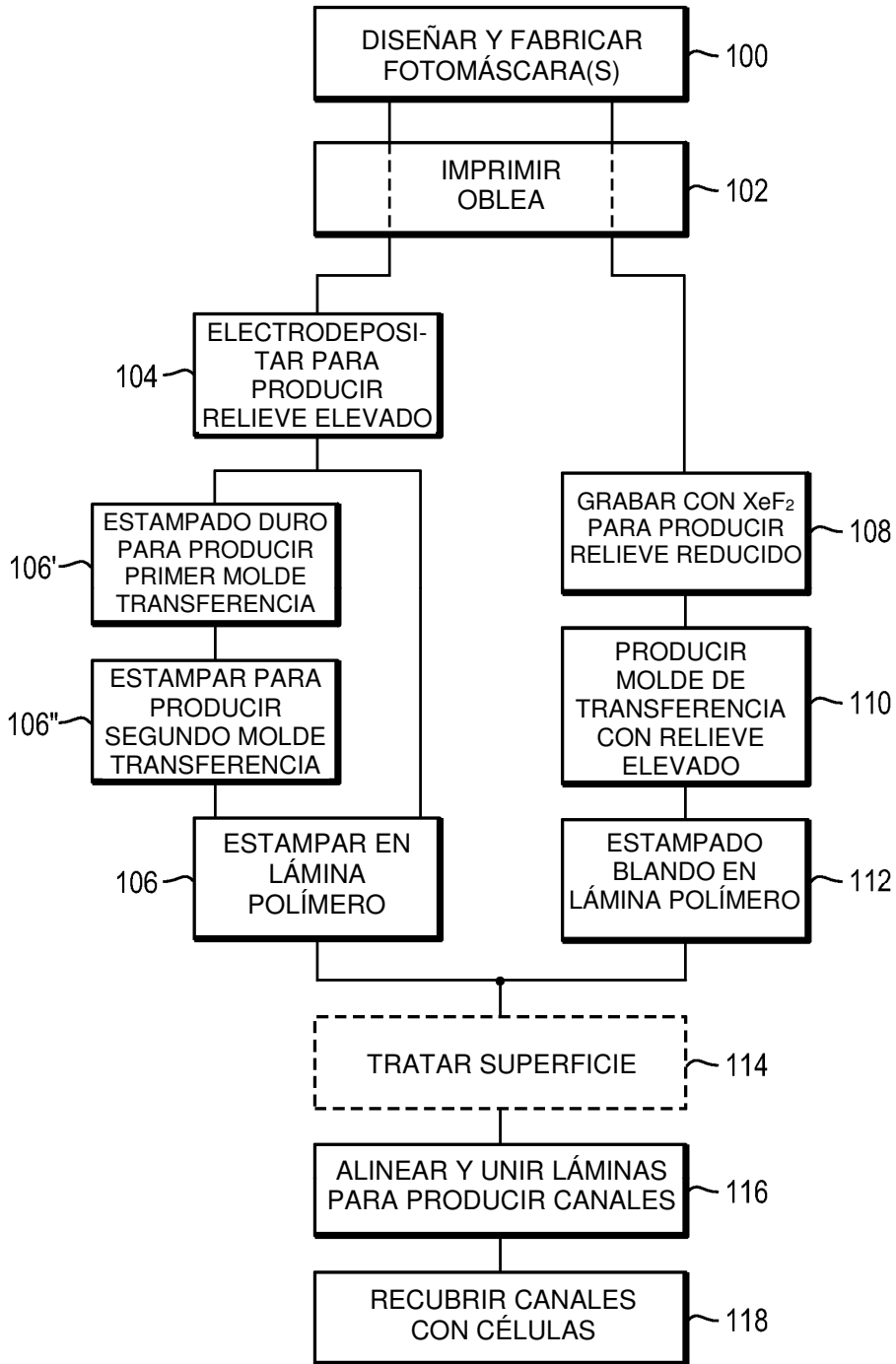


FIG. 1

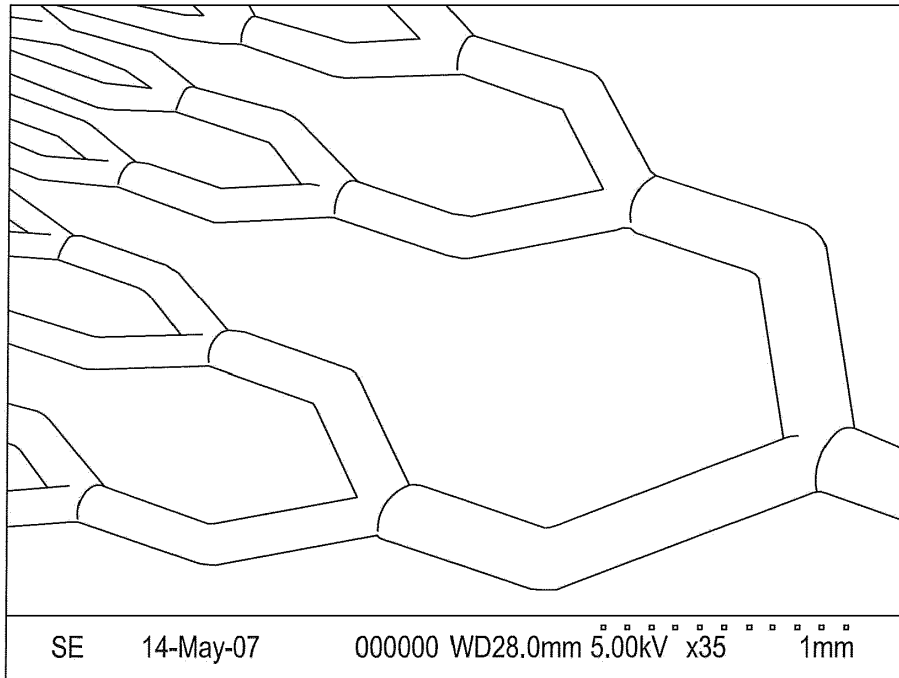


FIG. 2A

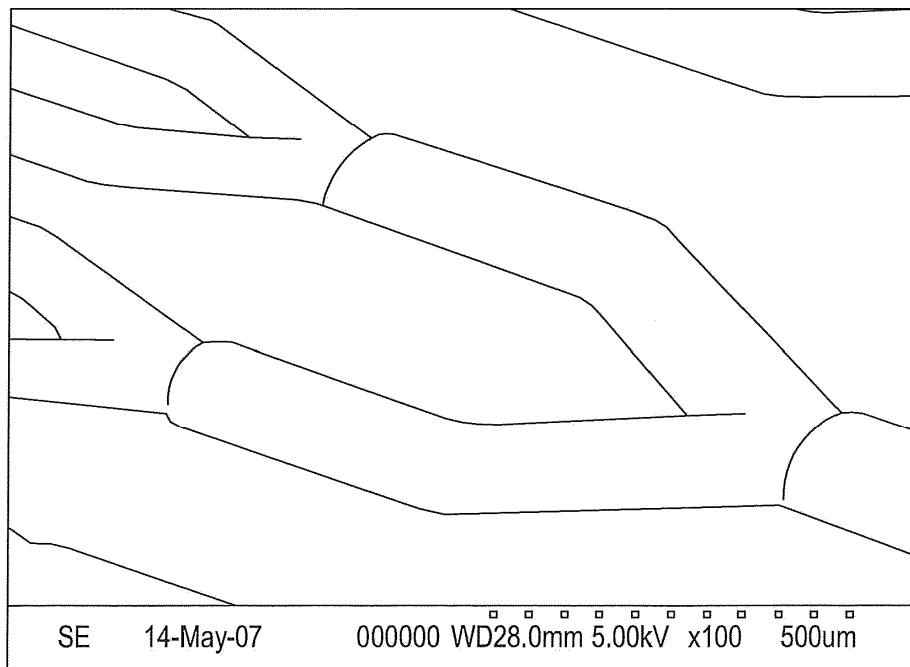


FIG. 2B

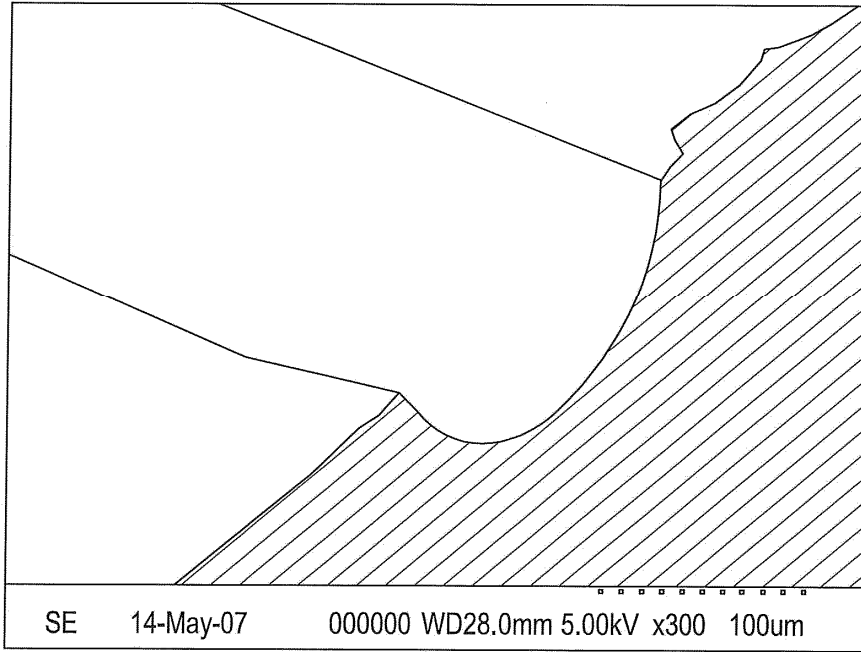


FIG. 3A

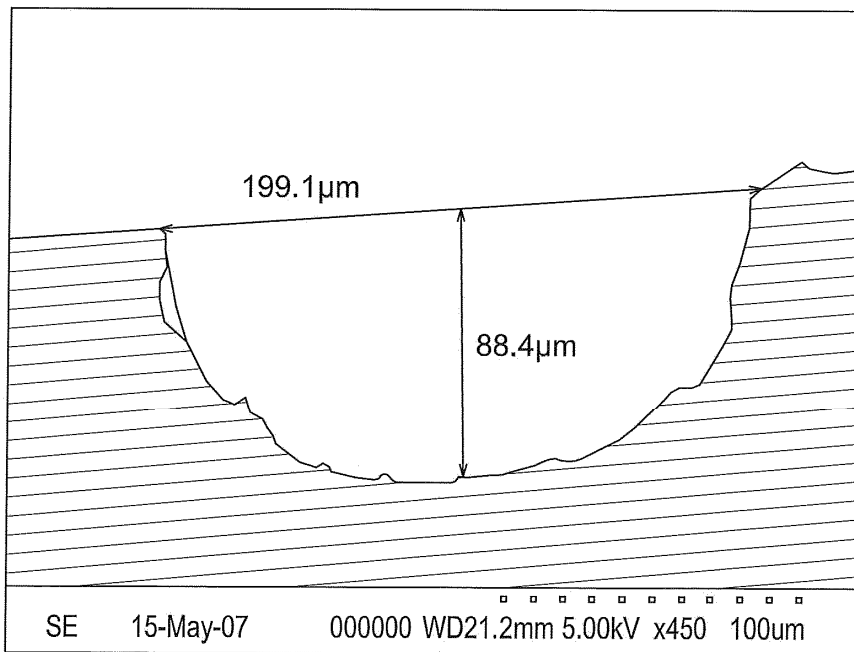


FIG. 3B

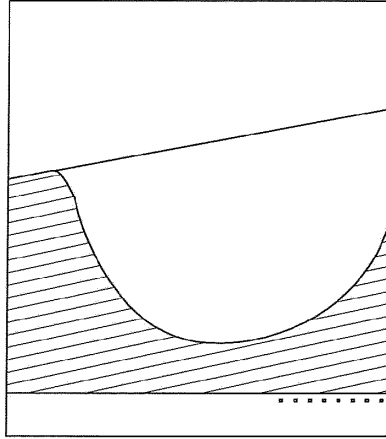


FIG. 4A

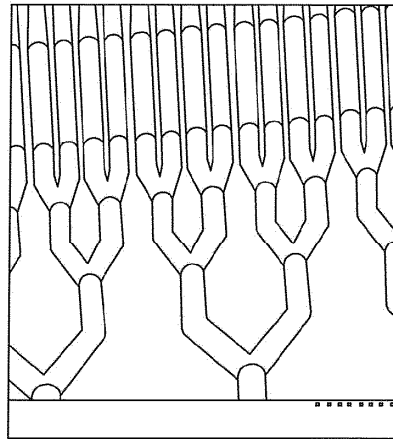


FIG. 4B

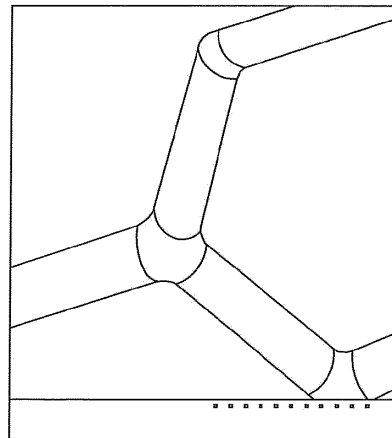


FIG. 4C

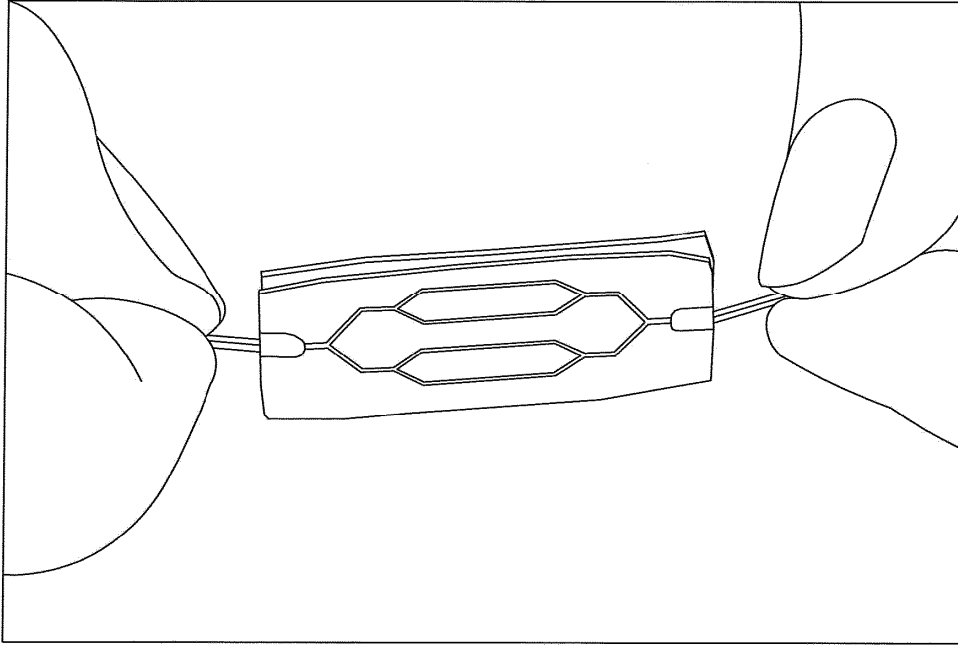


FIG. 5A

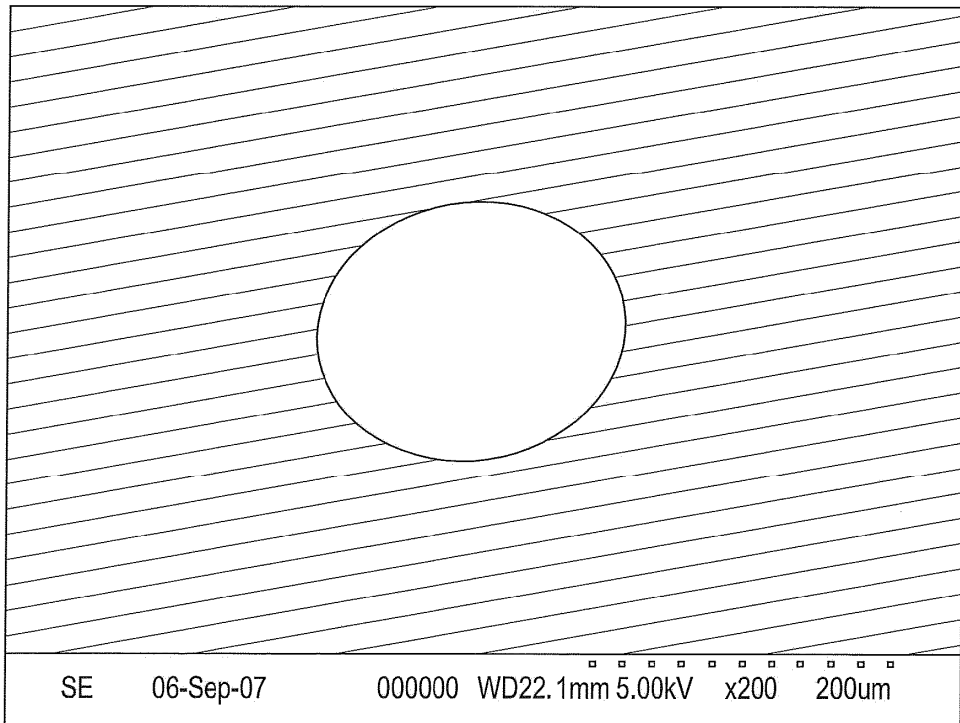


FIG. 5B

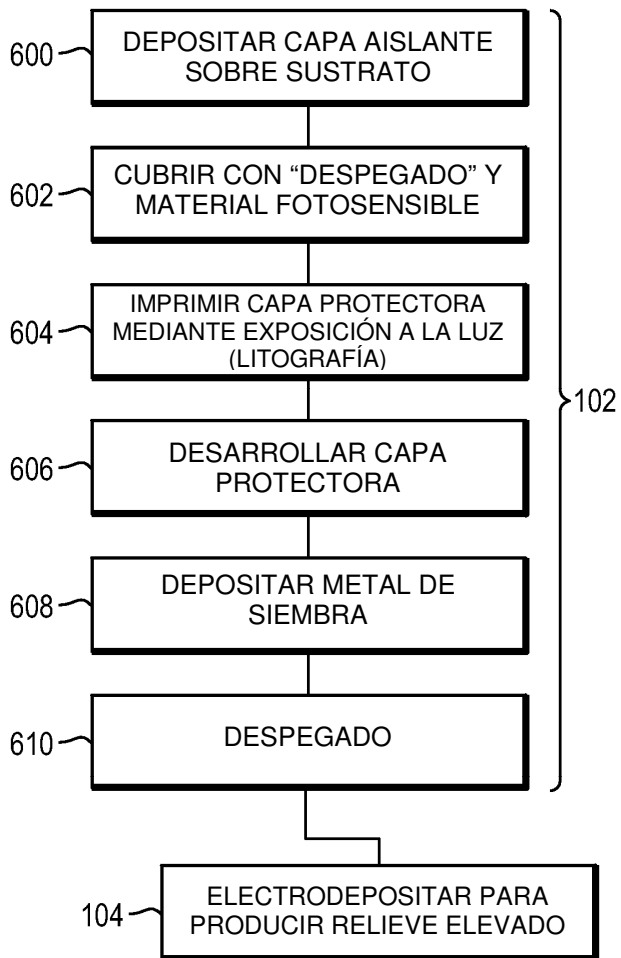


FIG. 6A

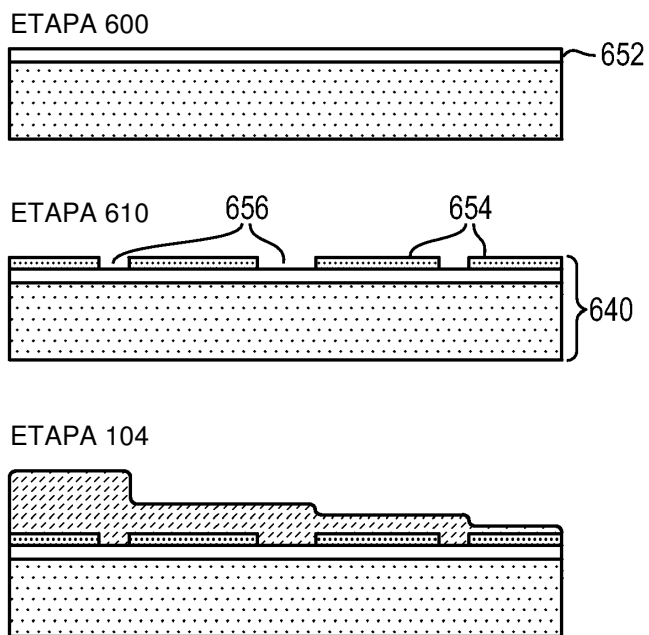


FIG. 6B

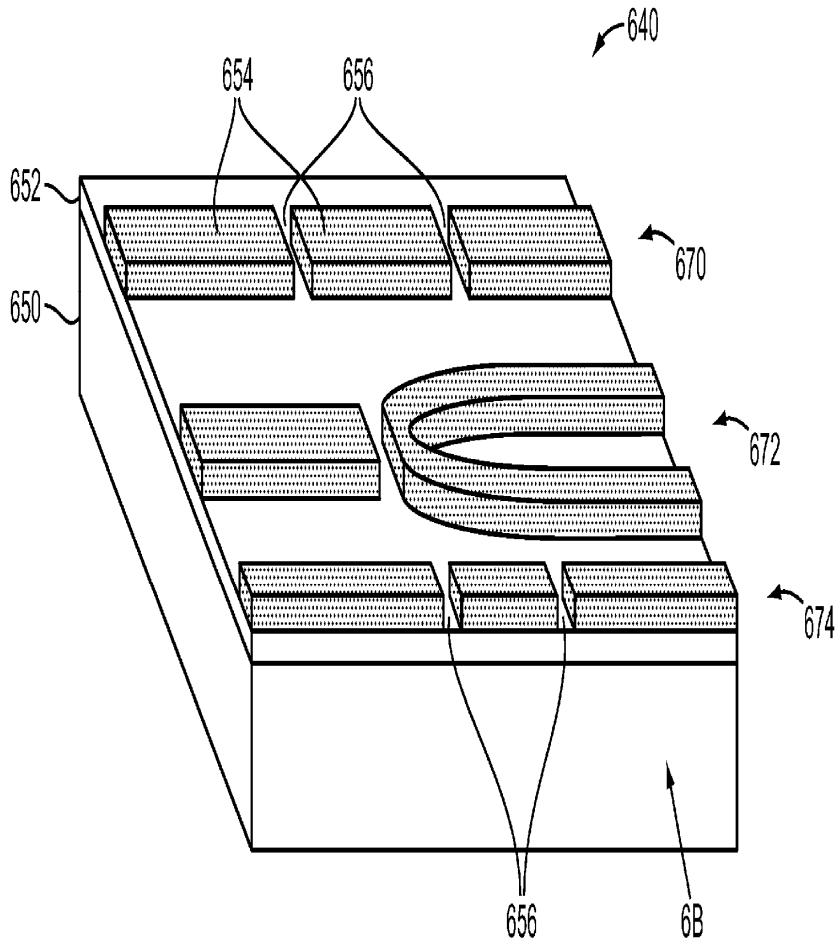


FIG. 6C

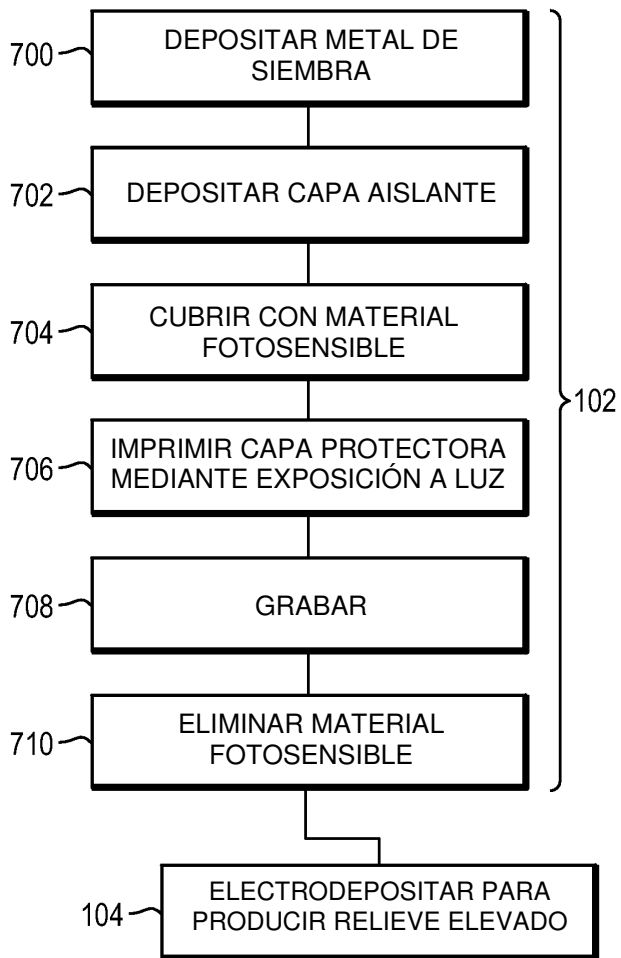


FIG. 7A

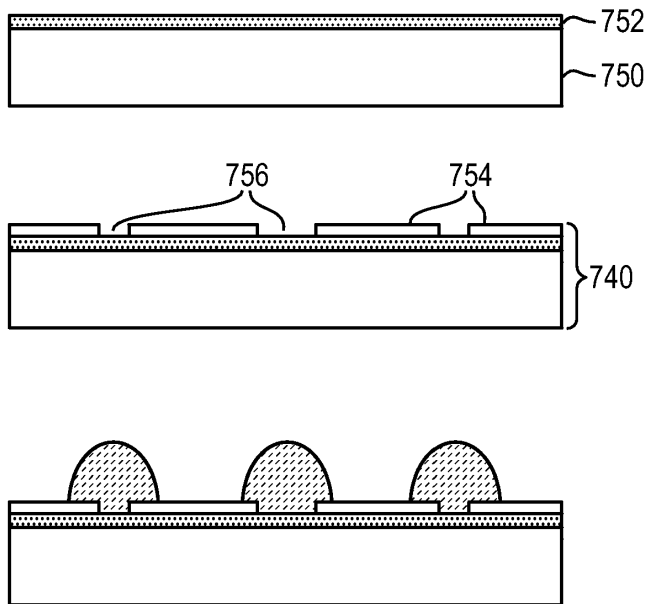


FIG. 7B

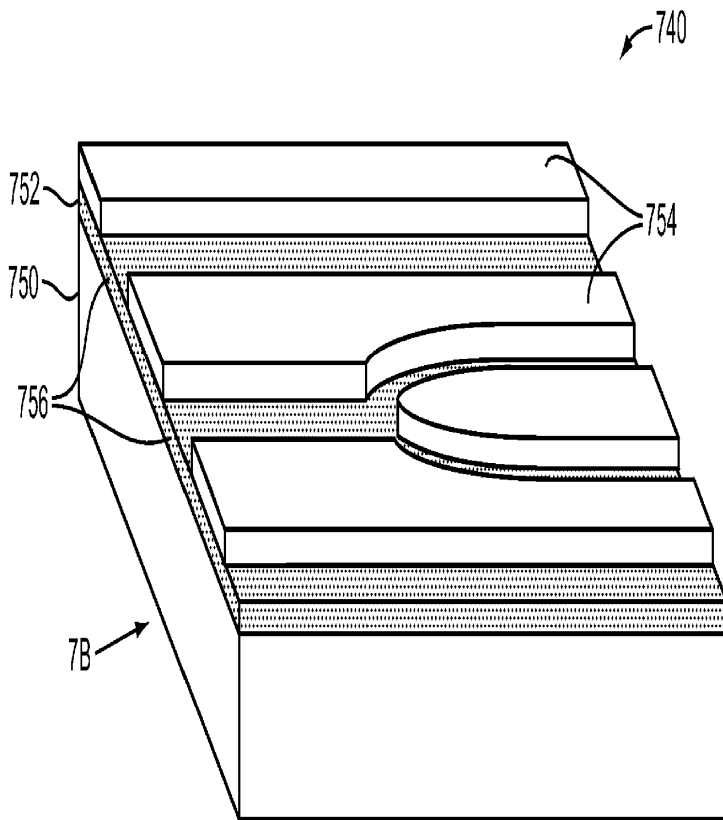


FIG. 7C

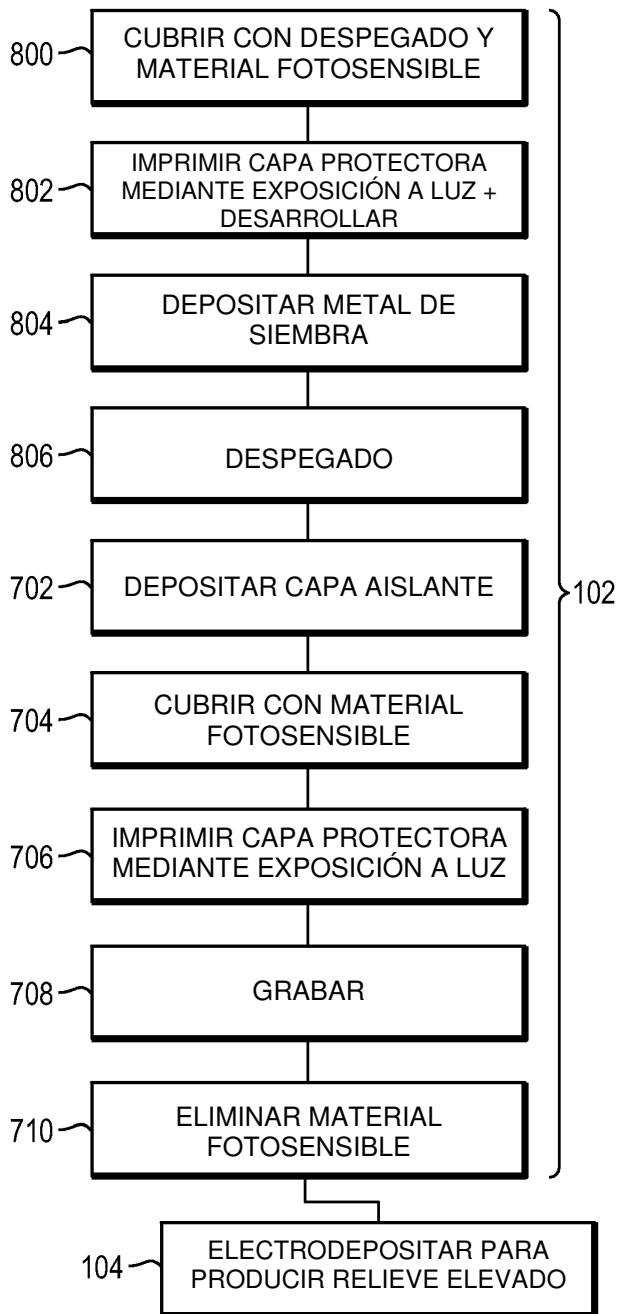


FIG. 8A

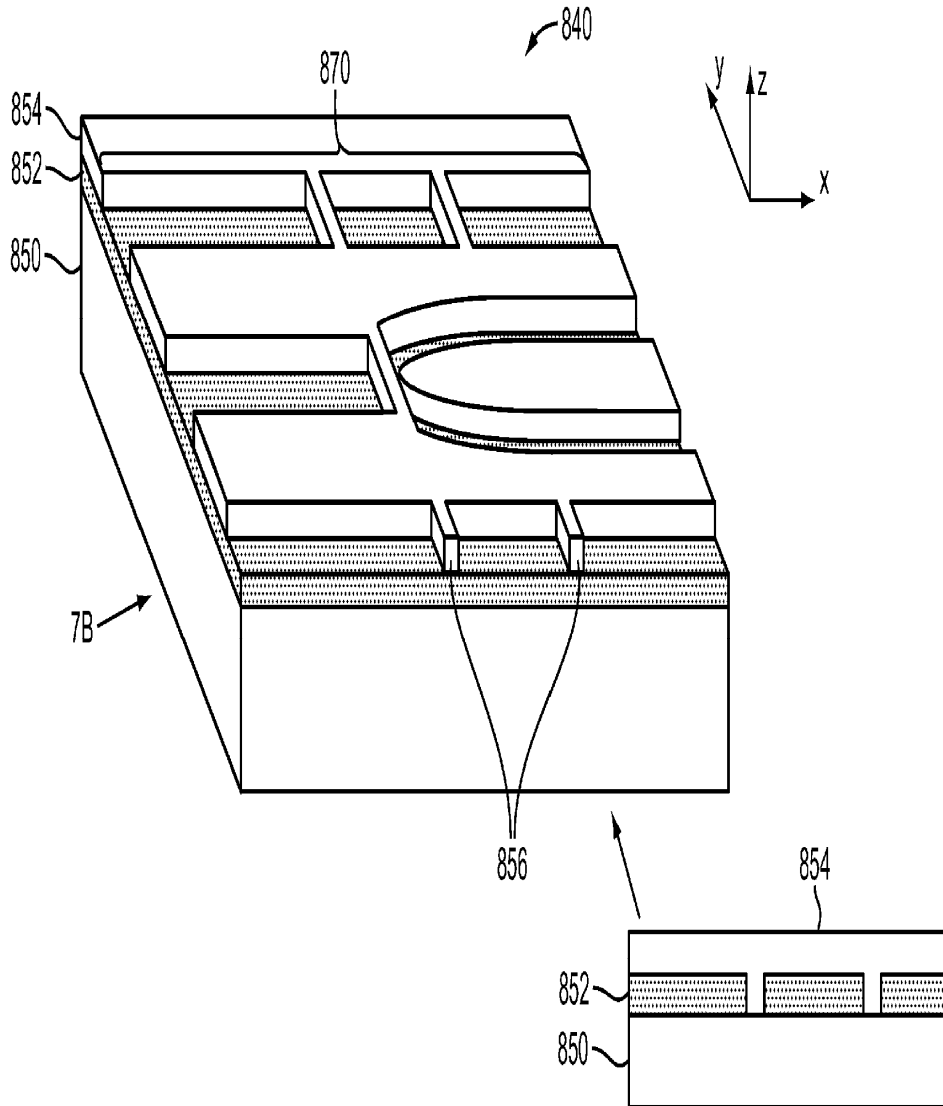


FIG. 8B

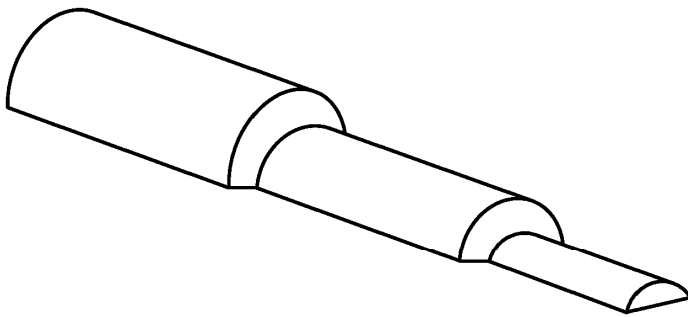


FIG. 8C

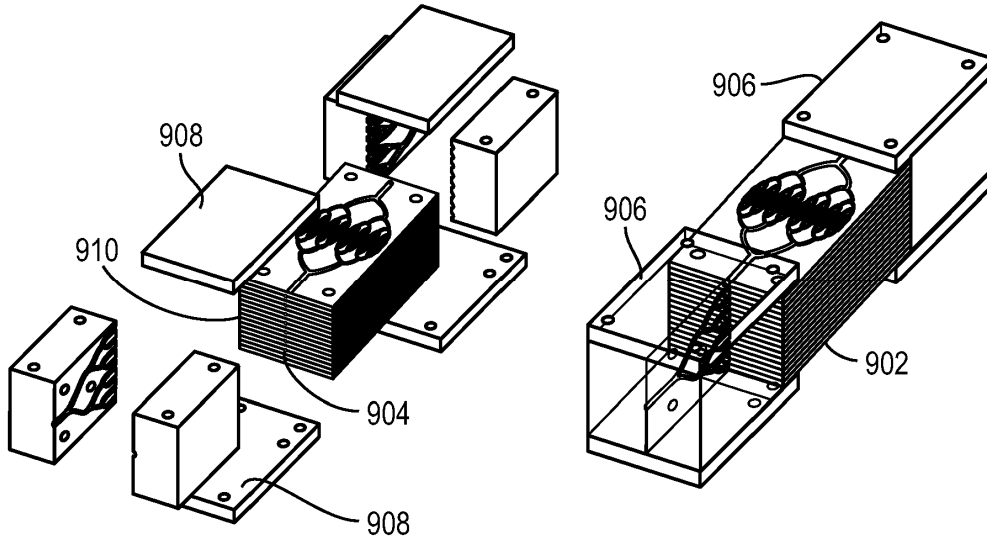


FIG. 9A

FIG. 9B

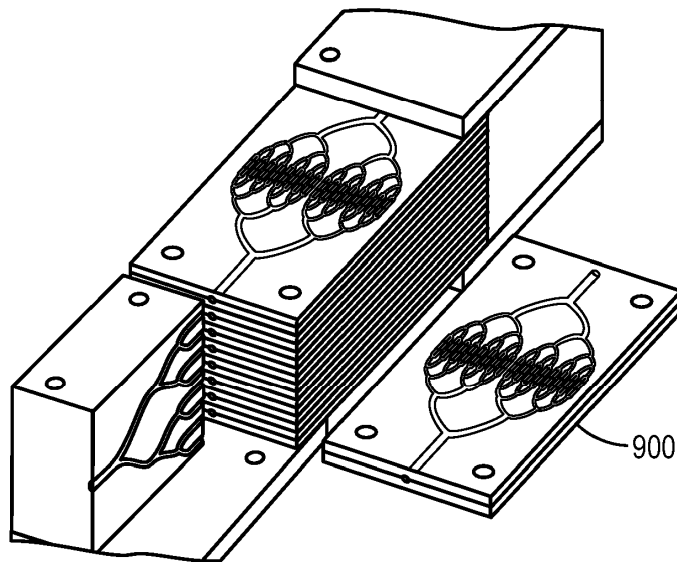


FIG. 9C