

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 903**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/EP2013/001267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13159939**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13720792 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2841941**

54 Título: **Métodos para determinar y/o vigilar estados de un sistema de cultivo celular tridimensional y dispositivo de sensor óptico para llevar a cabo dichos métodos**

30 Prioridad:

**26.04.2012 EP 12165826**  
**26.04.2012 US 201261638780 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2018**

73 Titular/es:

**TISSUSE GMBH (100.0%)**  
**Oudenarder Str. 16**  
**13347 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**MARX, UWE;**  
**KLOKE, LUTZ;**  
**HORLAND, REYK;**  
**HOFFMANN, SILKE;**  
**LORENZ, ALEXANDRA;**  
**BRINCKER, SVEN y**  
**SCHIMEK, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 663 903 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

Métodos para determinar y/o vigilar estados de un sistema de cultivo celular tridimensional y dispositivo de sensor óptico para llevar a cabo dichos métodos.

5 La presente invención se refiere a un método in vitro para determinar y/o vigilar al menos un estado de un sistema de cultivo celular tridimensional que comprende al menos una sección de crecimiento, en donde el al menos un estado comprende un estado fisiológico y comprende además un estado seleccionado del grupo que consiste en vitalidad y estado metabólico. También se describe un dispositivo de sensor óptico configurado para llevar a cabo dicho método.

Antecedentes de la invención

10 Actualmente, los cultivos celulares tridimensionales todavía no son comunes. Necesitan mantenimiento continuo y, por lo tanto, solo se establecen en biorreactores dinámicos, p. ej., perfundidos de forma continua. Se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos para determinar y/o vigilar las condiciones físicas, la vitalidad y el estado metabólico de los cultivos celulares tridimensionales existentes, p. ej. dispositivos de órgano en un chip (OC),  
15 dispositivos de multiórganos en un chip (MOC) o sistemas de circulación. Las dimensiones de los cultivos celulares tridimensionales existentes solo soportan la presencia de volúmenes bajos de fluido, p. ej., la circulación de volúmenes bajos de fluido a través de dichos sistemas. Esto hace que la determinación o vigilancia de las condiciones físicas de dicho sistema sean difíciles.

20 Además, en los cultivos celulares tridimensionales, la determinación o vigilancia de la vitalidad o el estado metabólico son complicados en contraste con la observación de cultivos celulares que comprenden solo monocapas de células, en particular con los medios ópticos comunes, p. ej., lectores de fluorescencia.

25 Además, los sensores ópticos conocidos, p. ej., para vigilar el estado metabólico dentro de dichos cultivos, no funcionan sin contacto y sin ser invasivos. Por ejemplo, dichos sensores deben introducirse o incorporarse en los cultivos tridimensionales de modo que no se puede evitar la intervención directa con el entorno de los sistemas de cultivos celulares tridimensionales. Esto puede conducir a la contaminación o alteración de la atmósfera sensible o estéril en dichos cultivos, lo cual no es deseable.

Por lo tanto, son necesarios nuevos métodos que permitan la determinación o vigilancia de condiciones físicas, la vitalidad y el estado metabólico de cultivos celulares tridimensionales y nuevos sensores ópticos que se puedan usar en estos métodos.

30 Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos métodos que permiten la determinación de condiciones físicas de cultivos celulares tridimensionales, basados en eritrocitos como detectores. El uso de eritrocitos como detectores tiene la ventaja de que no se necesita medición mecánica. Esto significa que no debe introducirse materia extraña en los cultivos celulares tridimensionales que puedan contaminar o alterar la atmósfera sensible y/o estéril en los mismos.

35 Además, los autores de la presente invención han desarrollado métodos que permiten la determinación de la vitalidad y el estado metabólico en dichos cultivos.

40 Además, los autores de la presente invención han desarrollado un sensor óptico que está configurado para permitir llevar a cabo sin contacto y de forma no invasiva los métodos para determinar y/o vigilar las condiciones físicas, la vitalidad y el estado metabólico de los cultivos celulares tridimensionales. El uso de dicho sensor óptico evita, por lo tanto, la intervención directa con el entorno estéril y/o sensible de dichos cultivos. Dicho sensor óptico está configurado además para permitir llevar a cabo los métodos anteriores en cultivos celulares tridimensionales y no solo en una monocapa de células.

Breve resumen de la invención

45 La presente invención se refiere a un método in vitro para determinar y/o vigilar al menos un estado de/en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado comprende un estado fisiológico y comprende además un estado seleccionado del grupo que consiste en

(i) vitalidad, y

(ii) estado metabólico,

50 en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, determinando el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la vitalidad se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD.

También se describe un dispositivo de sensor óptico (1) configurado para llevar a cabo el método para determinar y/o vigilar al menos un estado en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado se selecciona del grupo que consiste en

(i) estado fisiológico,

5 (ii) vitalidad, y

(iii) estado metabólico,

en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD

10 de acuerdo con la presente invención.

También se describe el uso de un dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria para determinar y/o vigilar al menos un estado en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado se selecciona del grupo que consiste en

(i) estado fisiológico,

15 (ii) vitalidad, y

(iii) estado metabólico,

en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD.

20 También se describe el uso del dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria, para vigilar el efecto de un compuesto de ensayo y/o para determinar la eficacia, efectos secundarios, bioseguridad, metabolitos, modo de acción o regeneración de órganos.

El resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

Descripción detallada de la invención

25 Antes de describir la presente invención en detalle más adelante, debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es solo para el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas. Salvo que se define de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende normalmente un experto en la técnica.

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

35 A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones que siguen, salvo que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán para implicar la inclusión de una característica, número entero o etapa o grupo de características, números enteros o etapas expuestos, pero no la exclusión de cualquier otra característica, número entero o etapa o grupo números enteros o etapas. En los siguientes párrafos se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos salvo que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

40 El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con un valor numérico se entiende que abarca valores numéricos dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es 5% menor que el valor numérico indicado y que tiene un límite superior que es 5% mayor que el valor numérico indicado.

45 A lo largo del texto de esta memoria descriptiva se citan varios documentos. Nada en la presente memoria debe considerarse la admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha descripción en virtud de la invención previa.

En lo sucesivo se proporcionan algunas definiciones de términos usados con frecuencia en esta memoria descriptiva. Estos términos en cada caso de su uso en el resto de la memoria descriptiva, tendrán el significado respectivamente definido y significados preferidos:

- 5 El término “células”, como se usa en la presente memoria, significa líneas celulares o células primarias de vertebrados o invertebrados.
- El término “organoides”, como se usa en la presente memoria, significa agregados de células funcionales, generados nuevos, artificiales, de diferentes tipos de células in vitro, que muestran al menos una función de órgano o tejido, preferiblemente muestran la mayoría o esencialmente todas las funciones de órganos o tejidos.
- 10 El término “órgano”, como se usa en la presente memoria, significa agregados de células funcionales, generados nuevos, artificiales, de diferentes tipos de células in vitro, que muestran todas las funciones del órgano natural.
- El término “tejidos”, como se usa en la presente memoria, significa material de biopsia o explantes tomados de pacientes o animales o tejidos generados in vitro.
- 15 La expresión “crecimiento celular”, como se usa en la presente memoria, se refiere al crecimiento de poblaciones de células, donde una célula (“la “célula madre”) crece y se divide para producir dos “células hijas” (fase M”) y se refiere al aumento en el volumen citoplasmático y de orgánulos (fase G1), así como el aumento del material genético antes de replicación (fase G2). Durante el crecimiento y diferenciación celular.
- El término “diferenciación”, como se usa en la presente memoria, significa el desarrollo de funciones específicas de tejido de células cultivadas.
- 20 El término “mantenimiento”, como se usa en la presente memoria, describe la capacidad de mantener todas las funciones de un tejido dado constantes dentro de un proceso de cultivo celular, preferiblemente sin signos significativos de muerte celular y/o apoptosis.
- El término “medio” (forma plural: “medios”), como se usa en la presente memoria, significa líquidos de apoyo del crecimiento con nutrientes y sustancias para cultivo de células. Los ejemplos de medios adecuados comprenden DMEM, F12 de Ham y RPMI.
- 25 El término “complementos”, como se usa en la presente memoria, describe sustancias que se añaden a los medios de cultivo con el fin de inducir o modificar la función celular, que pueden tener una composición definida como, p. ej., citoquinas purificadas o recombinantes o factores de crecimiento, que no está definida como, p. ej., suero.
- 30 El término “matriz”, como se usa en la presente memoria, significa sustancias o mezclas de sustancias, que mantienen la viabilidad, potencian la proliferación, diferenciación y función de las células, agregados de células, tejidos, organoides y/u órganos. El material de la matriz se proporciona preferiblemente en una forma que puede encajar para rellenar el espacio de la sección de crecimiento (3). Las matrices que se pueden usar en el contexto de la presente invención pueden tener una variedad de formas que comprenden, p. ej., hidrogeles, espumas, tejidos o telas no tejidas. El material de matriz puede comprender sustancias de la matriz que se encuentran de forma natural como proteínas de la matriz extracelulares, preferiblemente colágenos, lamininas, elastina, vitronectina, fibronectina, proteínas matricelulares pequeñas, glicoproteínas que se unen a integrina pequeñas, factores de crecimiento o proteoglicanos, o puede incluir sustancias de matriz artificiales como polímeros no degradables tales como fibras de poliamida, metilcelulosa, agarosa o geles de alginato o polímeros degradables, p. ej., polilactida.
- 35 Para superar los problemas asociados con la técnica anterior, la presente invención proporciona un método in vitro para determinar y/o vigilar al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende o consiste en al menos una sección de crecimiento (3), o en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende o consiste en al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, comprende(n) un estado fisiológico y además comprende(n) además un estado seleccionado del grupo que consiste en
- 40 (i) vitalidad, y
- 45 (ii) estado metabólico,
- en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, determinando el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la vitalidad se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD.
- 50 El método anterior para determinar y/o vigilar el al menos un estado antes mencionado, p. ej., al menos uno, dos o tres estados, preferiblemente se lleva a cabo sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. Además, dicho método no requiere la manipulación y/o modificación del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2)

autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación y/o vigilancia sin contacto y no invasiva del al menos un estado, p. ej., al menos uno, dos o tres estados, que no requiere la manipulación y/o modificación del sistema de cultivo celular tridimensional (2), se lleva a cabo en particular usando medios ópticos, en particular usando el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria. En relación con esto, se prefiere además que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), preferiblemente el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecho de un material traslúcido, p. ej., de vidrio, tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato sódico o vidrio de cuarzo, o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular usando medios ópticos, más en particular usando el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

La expresión “sistema de cultivo celular tridimensional (2)”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un conjunto tridimensional (3D) de células que se cultivan. La expresión “cultivo celular” se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural. Este conjunto tridimensional de células preferiblemente está hecho de múltiples capas estructuradas individualmente y/o microestructuradas que están en conexión entre sí estanca para fluidos y es particularmente capaz de proporcionar un entorno estanco a fluidos y, por lo tanto, preferiblemente entorno estéril. Dicho conjunto tridimensional de células preferiblemente se refiere a un conjunto de células de multicapas, un agregado de células, un tejido, un organoide o un órgano. Durante el cultivo, el conjunto de células de multicapas o agregado de células puede desarrollarse más, p. ej., por crecimiento y/o diferenciación celular, en un organoide y órgano. El sistema de cultivo celular tridimensional (2) preferiblemente tiene unas dimensiones para ser usado en configuraciones de alta capacidad estándar, p. ej., que tienen un el tamaño de una tira o placa de microvaloración estándar. Por lo tanto, preferiblemente la anchura es entre 2 y 10 cm, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cm y/o la longitud entre 3 y 15 cm, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 1, 12, 13, 14 o 15 cm y/o la altura entre 0,2 y 10 mm, más preferiblemente entre 1 y 4 mm, es decir 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 mm. Para ajustarse al formato de placa de microvaloración estándar, la anchura y la longitud están preferiblemente en una relación de aproximadamente 1:3. Se prefiere en particular un tamaño de 2,5 cm de ancho, 7,5 cm de longitud y 3 mm de altura.

Los materiales preferidos comprenden SiO<sub>2</sub>, vidrio y polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos preferidos comprenden poliestireno (PS), policarbonato (PC), poliamida (PA), poliimida (PI), polieteretercetona (PEEK), poli(sulfuro de fenileno) (PPSE), resina epoxídica (EP), poliéster insaturado (UP), resina fenólica (PF), polisiloxano, p. ej. polidimetilsiloxano (PDMS), resina de melamina (MF), éster de cianato (CA), politetrafluoroetileno (PTFE) y mezclas de los mismos. Los polímeros sintéticos particularmente preferidos son ópticamente transparentes e incluyen, p. ej. poliestireno (PS), policarbonato (PC), y polisiloxano, p. ej. polidimetilsiloxano (PDMS).

En la forma más sencilla, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) consiste en al menos una sección de crecimiento (3). Dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede tener la forma de un tubo de cultivo celular o pocillo de cultivo celular. Sin embargo, se prefiere en particular que la sección de crecimiento (3) sea una región microestructurada que está comprendida dentro de un sistema de cultivo celular tridimensional (2).

La expresión “sección de crecimiento (3)”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una región que proporciona el microentorno entero para el crecimiento, diferenciación y/o mantenimiento de células, agregados de células, tejidos, organoides y/u órganos. La sección de crecimiento (3) incluye preferiblemente una microentrada, p. ej., una entrada de medio y/o sangre, y/o una microsalida, p. ej., salida de medio y/o sangre, contiene la mayoría de las células que forman los respectivos agregados de células, tejidos, organoides y/u órganos, y/o una superficie abierta, que se puede cubrir de una forma esencialmente impermeable a fluidos y permeable a gas, o impermeable a fluidos y permeable a gas, por medios adecuados, que incluyen una membrana, p. ej., membranas de PTFE, láminas de fibrina, láminas de protectores pulverizados y/o láminas de productos de coagulación, una vez que las células, agregados de células, tejidos, organoides y/u órganos se han cargado en la sección de crecimiento (3) o por láminas flexibles que cubren la abertura, p. ej., rebordes hechos de material flexible tal como polisiloxano, p. ej., PDMS. En una realización preferida, dicha lámina flexible cubre la sección de crecimiento entera y tiene cortes que permiten el acceso a través del corte a las células individuales, agregados de células, tejidos, organoides y/u órganos. Las láminas flexibles tienen la ventaja de que la sección de crecimiento permanece accesible sin la necesidad de volver a sellar la membrana después del acceso. Preferiblemente, la superficie cubierta es impermeable a fluidos pero permeable a gases y, por lo tanto, permite el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> entre las células en la sección de crecimiento (3) y el entorno. Preferiblemente, la sección de crecimiento (3) tiene una forma circular o esencialmente circular, p. ej., la forma de un cilindro plano. La relación del diámetro a la altura de una sección de crecimiento (3) preferiblemente es entre 2:1 y 6:1, más preferiblemente entre 3:1 y 5:1. Preferiblemente, la sección de crecimiento (3) tiene una superficie de 0,1, a 3 cm<sup>2</sup> preferiblemente de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 cm<sup>2</sup>, las secciones de crecimiento (3) particularmente preferidas tienen un área superficial entre 0,3 y 0,7 cm<sup>2</sup>, preferiblemente de 0,56 cm<sup>2</sup>. Si la sección de crecimiento (3) tiene una forma circular se prefiere que tenga un diámetro de entre 0,1 y 1 cm, preferiblemente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0, lo más preferiblemente 0,6 cm. El sistema de cultivo celular tridimensional (2) preferiblemente comprende o consiste en más de una sección de crecimiento (3). Dados los tamaños preferidos indicados de cada sección de crecimiento (3), es posible ajustar números grandes de

secciones de crecimiento (3) separadas en un sistema de cultivo celular tridimensional (2). Preferiblemente, un sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprende o consiste en entre 2 y 2000 secciones de crecimiento (3), p. ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 100, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, o más secciones de crecimiento (3). En un formato de tipo placa de microvaloración preferido, se disponen 2, 4, 6, 24, 96, 384 o incluso 1536 secciones de crecimiento (3) en una matriz rectangular 2:3 en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

La al menos una sección de crecimiento (3) preferiblemente se llena con una matriz que proporciona un armazón de crecimiento para los capilares que se forman o que se formarán por crecimiento de las células, p. ej., células endoteliales en la sección de crecimiento (3). En cuanto a la definición del término "matriz" se remite a la anterior. Por lo tanto, se prefiere que la matriz comprenda microcanales, estructuras y/o redes, que permitan y soporten la formación de capilares por las células, p. ej., por células endoteliales. Preferiblemente, estas estructuras no tienen ellas mismas la forma de los capilares posteriores sino que simplemente proporcionan puntos de unión y/o guía para los capilares formados. Se prefiere que la sección de crecimiento (3) comprenda o consista en una matriz semisólida, biodegradable y/o biocompatible. Alternativamente, las fibras huecas biocompatibles se proporcionan solas o insertadas en una matriz como se ha expuesto antes. Las fibras huecas, microcanales, estructuras y/o redes están conectadas preferiblemente a un lado en la microentrada y en el otro lado en la microsalida, guiando así el crecimiento de las células, p. ej., por células endoteliales.

La sección de crecimiento (3) preferiblemente comprende una cavidad denominada "cavidad de crecimiento" que contiene la mayoría de las células, es decir, al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 98% o más de las células comprendidas en la sección de crecimiento (3). La cavidad de crecimiento preferiblemente tiene las dimensiones, forma y nutrición adecuadas para cada agregado celular, tejido, organoide y/u órgano. Preferiblemente proporciona acceso para introducir elementos necesarios adicionales de microarquitectura o microentorno y/o para cargar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) con la suspensión celular, agrupaciones de células y/o cortes de tejidos, según sea el caso. Preferiblemente está recubierto con materiales adecuados y/o contiene matrices para la guía/atracción/mantenimiento de las células.

La sección de crecimiento (3) preferiblemente comprende un fluido extracapilar y/o colector/depósito de residuos. El drenaje del fluido extracapilar es dirigido por diferencias de presión intracapilares. Esto sirve para los fines de drenar fluidos fuera de los agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos, p. ej., páncreas, riñón, intestino, que segregan fluidos extracapilares. Preferiblemente, el colector de residuos se separa de la matriz y/o fibras huecas descritas antes, de una forma que previene la salida de flujo de las células sanguíneas y/o células de tejidos u organoides de la sección de crecimiento (3). Preferiblemente, el fluido extracapilar y/o colector de residuos está separado del resto de la sección de crecimiento (3) por una membrana de retención celular, es decir, una membrana que tiene un tamaño de poros medio menor que el tamaño medio de las células que crecen en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o por los canales de exclusión celular, que tienen un tamaño para excluir las células que crecen en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

Se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprenda dos o más secciones de crecimiento (3), que preferiblemente comprenden una cavidad de crecimiento, de modo que cada una de las secciones de crecimiento (3) puede proporcionar el microentorno para un agregado celular, tejido, organoide y/u órgano diferente, p. ej., una sección de crecimiento para neuronas, una sección de crecimiento para tejido cardíaco, una sección de crecimiento para cartílago, una sección de crecimiento para hueso y/o una sección de crecimiento para piel vascularizada. De esta forma, por ejemplo, se puede evaluar el efecto de un compuesto de ensayo particular en varios/diferentes agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos simultáneamente. Alternativamente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede comprender dos o más secciones de crecimiento (3), que preferiblemente comprenden una cavidad de crecimiento, que proporciona el microentorno adecuado para el mismo tipo de agregado celular, tejido, organoide y/u órgano, el mismo tipo, p. ej., de secciones de crecimiento para neuronas, tejido cardíaco, cartílago, hueso o piel vascular. Esto permite, por ejemplo, determinar el efecto de un compuesto de ensayo dado con una mayor significación estadística promediando los resultados obtenidos de las dos, tres, cuatro o más secciones de crecimiento (3) en paralelo. Además, una sección de crecimiento (3), que comprende preferiblemente una cavidad de crecimiento, puede comprender células de un tipo celular particular, que pueden servir como una referencia, para cada medición.

Una cavidad de crecimiento dentro de una sección de crecimiento (3) típicamente tiene un volumen entre  $1 \times 10^2$  y  $0,01 \text{ mm}^3$ , preferiblemente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06 y  $0,05 \text{ mm}^3$ , preferiblemente  $1 \text{ mm}^3$ .

Se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sea un sistema que sea autónomo. También se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sea un sistema de circulación. Más preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) es un sistema autónomo y de circulación.

El término "autónomo" se refiere al hecho de que los medios, sangre y complementos requeridos para la diferenciación y mantenimiento de las células, agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos en la al menos una sección de crecimiento (3), son proporcionados por el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Para este fin, preferiblemente dentro del sistema de cultivo celular tridimensional (2) está contenido un depósito de fluido tal como

depósito de medio y/o sangre. El al menos un depósito de fluido tal como depósito de medio y/o sangre preferiblemente está conectado por al menos un canal microfluídico dentro del sistema de cultivo celular tridimensional (2) a la al menos una sección de crecimiento (3). Por lo tanto, no hay una conexión fluidica que proporcione fluido desde un depósito de fluido externo. Por consiguiente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo se puede manipular y mover sin el peligro de contaminar el medio, sangre y posteriormente las células, agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos dentro de la al menos una sección de crecimiento (3). Además, se prefiere que se proporcione el medio gaseoso, p. ej., O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, a la al menos una sección de crecimiento (3) de una forma pasiva, es decir, por difusión en el medio a través de la membrana o lámina de polímero biocompatible desde el entorno. Esta membrana o lámina de polímero preferiblemente es impermeable a fluidos. De nuevo, se prefiere esto para permitir la manipulación del sistema de cultivo celular tridimensional (2). Preferiblemente, la membrana o lámina cubre al menos parcialmente, más preferiblemente totalmente, la sección de crecimiento (3), permitiendo así que el O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> se difunda en el fluido tal como medio o sangre fluyendo a través de los canales microfluídicos y/o a través de la al menos una sección de crecimiento (3). En una realización preferida, la membrana se forma o une después de que las células, agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos se hayan cargado en la sección de crecimiento (3) o forma una parte integral del sistema de cultivo celular tridimensional (2). Por consiguiente, en una realización preferida, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) no comprende conectores a un suministro de medio gaseoso externo y/o no comprende un dispositivo para airear activamente el medio.

El flujo de fluidos a través del sistema microfluídico del sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo se puede lograr por gravedad o fuerzas capilares. Sin embargo, para evaluar el flujo de medio a través del sistema se prefiere que el depósito de medio o sangre y/o el depósito de residuos comprendan un material hidrófilo, que, una vez humedecido, absorbe el medio y, por lo tanto, proporciona una succión que es adecuada para proporcionar un flujo de fluido. Alternativamente, se puede disponer una microbomba en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., entre el al menos un depósito de medio y/o sangre y entre la al menos una sección de crecimiento (3).

Se describe un sistema de cultivo celular tridimensional (2) preferido, preferiblemente sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo, en el documento WO 2009/146911 A2 de la página 2, línea 22 a la página 3, línea 4, de la página 11, línea 25 a la página 36, línea 35, y de la página 38, línea 24 a la página 39, línea 15, y en las reivindicaciones 1 a 32, y se muestra en las figuras 1 a 8 (véase las leyendas de las figuras de la página 4, línea 4 a la página 9, línea 3) del documento WO 2009/146911 A2. Se describe además un método para producir dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" preferido en el documento WO 2009/146911 A2 de la página 3, líneas 6 a 20, página 37, página 1 a la página 38, línea 2, y de la página 38, línea 24 a la página 39, línea 15, y en las reivindicaciones 33, y de 38 a 42.

El término "circulación" se refiere al hecho de que el fluido, p. ej., medio y/o sangre, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) circula dentro de dicho sistema de cultivo celular. Un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de circulación preferido, comprende al menos una sección de crecimiento (3) y al menos un dispositivo de bombeo direccional. En dicho sistema, el fluido, p. ej., medio y/o sangre, preferiblemente se hace circular entre la al menos una sección de crecimiento (3) y el al menos un dispositivo de bombeo direccional, en particular por uno o más canales microfluídicos. Se prefiere que el fluido, p. ej., medio y/o sangre, circule dentro del sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" descrito antes. En este caso, el fluido, p. ej., medio y/o sangre, preferiblemente se hace circular entre el al menos un depósito de fluido tal como depósito de medio y/o sangre y la al menos una sección de crecimiento (3), en particular por uno o más canales microfluídicos. Dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" de "circulación" comprende además preferiblemente al menos un dispositivo de bombeo direccional. En este caso, el fluido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" de "circulación" circula entre el al menos un dispositivo de bombeo direccional, la al menos una sección de crecimiento (3) y el al menos un depósito de fluido tal como depósito de medio y/o sangre, en particular por uno o más canales microfluídicos.

Se describe un sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" de "circulación" preferido en el documento WO 2012/016711 A1 en la página 3, líneas 6 a 13, de la página 5, línea 20 a la página 14, línea 34, de la página 16, línea 19 a la página 19, línea 9, y en la página 20, líneas 5 a 23, y en las reivindicaciones 1 a 17, y se muestra en las figuras 1 a 5 (véase las leyendas de las figuras en la página 20, línea 24 a la página 21, línea 31) del documento WO 2012/016711 A1. Se describe además un método para producir dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" de "circulación" en el documento WO 2012/016711 A1 en la página 3, líneas 14 a 21, de la página 15, línea 1 a la página 16, línea 14, en la página 19, líneas 10 a 33, página 20, líneas 5 a 23, y de la página 22, línea 1 a la página 23, línea 8 y en las reivindicaciones 18 a 20.

Durante la operación del sistema de cultivo celular tridimensional (2), los dos, tres, cuatro, cinco o más agregados celulares, tejidos, organoides u órganos iguales o diferentes que se forman o mantienen por separado en dos, tres, cuatro, cinco o más secciones de crecimiento (3), preferiblemente en las dos, tres, cuatro, cinco o más cavidades de crecimiento comprendidas en dichas secciones de crecimiento (3), pueden interactuar unas con otras. Se puede producir interacción entre las secciones de crecimiento (3), preferiblemente entre las cavidades de crecimiento, p. ej., por extensión de nervios y/o microcapilares de una sección de crecimiento (3), en particular cavidad de crecimiento, a otra sección de crecimiento (3), en particular cavidad de crecimiento. Dicha interacción puede ocurrir por canales y/o aberturas de conexión proporcionados por separado entre las diferentes secciones de crecimiento

(3), en particular cavidades de crecimiento. Dichos canales y/o aberturas de conexión se pueden abrir o cerrar según se desee.

Aunque se pueden evaluar varias propiedades de los agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos comprendidos en la al menos una sección de crecimiento (3), en particular en la al menos una cavidad de crecimiento comprendida en la misma, por medios ópticos, en particular con un sensor óptico, más en particular con un dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria, se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, se pueda observar por microscopio. Cada parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2) se puede fabricar hasta el final con un material ópticamente transparente. Preferiblemente, la al menos una sección de crecimiento (3), la al menos una cavidad de crecimiento comprendida en la misma, el al menos un canal microfluídico, el depósito de fluido, p. ej., depósito de medio y/o sangre, y/o el depósito de residuos, se pueden observar por microscopio.

El depósito de medio o sangre que puede estar comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo contiene el medio, sangre y/o complementos necesarios para diferenciar y/o mantener los agregados celulares, tejidos, organoides u órganos, en la al menos una sección de crecimiento (3). El tamaño del depósito de medio o sangre en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo se determina por varios parámetros que incluyen: (i) periodo de cultivo autónomo requerido y (ii) tasa de cambio de medio requerida. Típicamente, el depósito de medio o sangre comprende medio en exceso de un volumen de cavidad de crecimiento por día de cultivo multiplicado por el número de días de cultivo, y, complementos si es necesario. En una realización preferida, el periodo de cultivo autónomo es al menos 3 días, 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 90 días 180 días, 365 días, o más. En una realización típica, el depósito de medio o sangre comprendido dentro del dispositivo de órgano en un chip autónomo tiene un volumen entre 5  $\mu\text{l}$  y 5000  $\mu\text{l}$ , preferiblemente un volumen entre 20  $\mu\text{l}$  y 200  $\mu\text{l}$ .

El depósito de sangre comprende sangre, en particular sangre entera o una fracción tal como plasma, suero, o células sanguíneas (también conocidas como células hematopoyéticas), p. ej., de vertebrados tales como mamíferos como seres humanos, o invertebrados. La expresión "células hematopoyéticas" se refiere a tipos de células maduras y sus precursores inmaduros que son identificables por morfología, o principalmente, por un patrón distinto de marcadores de superficie celular. La expresión se usa para distinguir esas células de otros tipos de células encontradas en el cuerpo y también incluyen linfocitos T y subconjuntos distintivos, que son las únicas células hematopoyéticas que no son generadas en la médula ósea. Preferiblemente, las células sanguíneas son eritrocitos, leucocitos y/o trombocitos. Más preferiblemente, el depósito de sangre comprende sangre entera o plasma sanguíneo (ambos comprenden eritrocitos). Las células sanguíneas, p. ej., eritrocitos, también pueden estar comprendidos en el medio que está comprendido en el depósito de medio. El uso de sangre, preferiblemente sangre entera, determina un sistema de tamponamiento fuerte, proporciona todas las proteínas necesarias del plasma a los tejidos, mantiene el transporte de oxígeno a través de los eritrocitos y proporciona actividades inmunológicas contra microorganismos contaminantes a través de leucocitos.

Como se ha mencionado antes, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, puede comprender al menos un canal microfluídico. Preferiblemente, dicho al menos un canal microfluídico conecta el al menos un depósito de medio o sangre con la al menos una sección de crecimiento (3), conecta de forma fluida el al menos un dispositivo de bombeo direccional con la al menos una sección de crecimiento (3) o conecta de forma fluida el al menos un depósito de medio o sangre, la al menos una sección de crecimiento (3) y el al menos un dispositivo de bombeo direccional, unos con otros. El diámetro de los canales microfluídicos preferiblemente es entre 100 nm y 1 mm, preferiblemente entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . Se prefiere que el canal microfluídico se proporcione con una salida adicional, que permite la administración de complementos y/o compuestos de ensayo a las secciones de crecimiento (3) por separado.

Se prefiere que el dispositivo de bombeo direccional sea una bomba biológica, bomba hidráulica, bomba piezoeléctrica, bomba peristáltica, bomba neumática, bomba electromagnética o bomba magnética. Una bomba biológica se forma, p. ej., mediante cardiomiocitos, que se siembran preferiblemente sobre polímeros elásticos de una forma que soporta el flujo pulsado en la contracción de cardiomiocitos (Tanaka et al., 2006, *Lab Chip*, 6, 362-386). Los espasmos de los cardiomiocitos proporcionan la contracción necesaria para la acción de bombeo.

El sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede comprender además un puerto de inyección y/o rechazo. La expresión "puerto de inyección" se refiere a una abertura que permite la inyección de material, p. ej., sustancias tales como nutrientes, fluidos tales como medio y/o sangre, compuestos de ensayo, productos químicos tales como colorantes fluorescentes vitales. La expresión "puerto de rechazo" se refiere a una abertura que permite el rechazo de material, p. ej., fluidos tales como medio y/o sangre. En realizaciones preferidas, el puerto está configurado para permitir tanto la inyección como el rechazo de material, p. ej., con el fin de eliminar/intercambiar los fluidos, p. ej., medio y/o sangre en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). El puerto de inyección y/o rechazo preferiblemente está situado en un canal de transporte microfluídico o conectado a la al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2). Por ejemplo, si se deben reponer o añadir sustancias, p. ej., nutrientes, fluidos tales como medio y/o sangre, compuestos de ensayo, productos químicos tales como colorantes fluorescentes vitales, durante el curso de la incubación en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se prefiere que dichas sustancias sean suministradas de forma discontinua por un puerto de

inyección, que preferiblemente está situado en un canal de transporte microfluídico o conectado a la al menos una sección de crecimiento (3).

5 Preferiblemente, las dimensiones del sistema de cultivo celular tridimensional (2) de "circulación" soportan la circulación continua de entre 5 y 5000  $\mu\text{l}$ , más preferiblemente de entre 20 y 200  $\mu\text{l}$ , de sangre o medio a través de dicho sistema. El sistema de cultivo celular tridimensional (2) "autónomo" y/o de "circulación" descrito antes, preferiblemente permite el suministro de nutrientes y eliminación de residuo continuos.

10 Como se ha mencionado antes, la presente invención se refiere a un método in vitro para determinar y/o vigilar al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende o consiste en al menos una sección de crecimiento (3), o en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende o consiste en al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, comprende(n) un estado fisiológico y además comprende(n) un estado seleccionado del grupo que consiste en

(i) vitalidad, y

(ii) estado metabólico,

15 en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, determinando el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la vitalidad se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia del NADH (NADH = forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina) y/o FAD (FAD = forma oxidada del dinucleótido de flavina y adenina), y/o determinando la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ( $\text{NAD}^+$  = forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina) y/o  $\text{NADH}/\text{FAD}$ .

20 Preferiblemente, los (dos o tres) estados determinados y/o vigilados son (i) el estado fisiológico y la vitalidad, (ii) el estado fisiológico y el estado metabólico, o (iii) el estado fisiológico, la vitalidad y el estado metabólico, en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o  $\text{NADH}/\text{FAD}$ .

25 La expresión "vitalidad celular", como se usa en la presente memoria, significa la viveza de las células caracterizada por la capacidad de realizar algunas funciones vitales esenciales tales como crecimiento, reproducción, alguna forma de sensibilidad y adaptabilidad. En el método de la presente invención, la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas.

30 La expresión "metabolismo celular", como se usa en la presente memoria, significa el total de todos los procesos químicos que se producen en células vivas que dan como resultado crecimiento, producción de energía, eliminación del material residual y detoxificación de sustancias externas. En el método de la presente invención, el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o  $\text{NADH}/\text{FAD}$ .

35 La expresión "estado fisiológico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un estado del medio interno de las células, p. ej., pH, concentración de oxígeno y/o concentración de glucosa. El estado fisiológico preferiblemente es el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el caudal de fluidos, tales como sangre y/o plasma, que fluyen a través de, circulan en o perfunden el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la osmolalidad fisiológica de los fluidos tales como sangre y/o plasma, comprendida en el sistema de cultivo celular tridimensional, en particular que perfunden el conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), comprendidos en al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2), y/o el consumo de oxígeno del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2).

40 En el método de la presente invención, el estado fisiológico en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2), se determina usando eritrocitos como detectores dicho estado. De acuerdo con la presente invención se usan eritrocitos como detectores para determinar el caudal, osmolalidad fisiológica y/o consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., (i) el caudal y la osmolalidad fisiológica, (ii) el caudal y el consumo de oxígeno, (iii) la osmolalidad fisiológica y el consumo de oxígeno, o (iv) el caudal, la osmolalidad fisiológica y el consumo de oxígeno. Por ejemplo, se pueden usar eritrocitos como detectores para determinar el caudal de fluidos, tales como sangre y/o plasma, que fluye a través de, circula en o perfunde el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la osmolalidad

fisiológica de los fluidos, tales como sangre y/o plasma, comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional, en particular que perfunden el conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en la al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2), y/o el consumo de oxígeno del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en la al menos una sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2).

En una realización preferida, el método para determinar el caudal en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:

(i) proporcionar un sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible que comprende al menos una sección de crecimiento (3),

(ii) tomar fotos de los eritrocitos en dicho sistema de cultivo celular al menos en dos tiempos de medición diferentes, p. ej., 2, 3 o 4 tiempos de medición diferentes (y así obtener al menos dos fotos, p. ej., 2, 3 o 4 fotos),

(iii) seleccionar al menos un eritrocito, p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 eritrocitos, y determinar la posición de al menos un eritrocito, p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 eritrocitos, en las al menos dos fotos, p. ej. 2, 3, o 4 fotos,

(iv) asignar un vector de movimiento a el al menos un eritrocito, p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 eritrocitos, que representa el cambio de posición de dicho al menos un eritrocito, p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 eritrocitos, en las al menos dos fotos, p. ej. 2, 3, o 4 fotos, y

(v) determinar el caudal en dicho sistema de cultivo celular basado en el vector de movimiento.

El método para determinar el caudal en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se lleva a cabo preferiblemente sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación sin contacto y no invasiva del caudal se lleva a cabo en particular usando medios ópticos.

El uso de eritrocitos como detectores para determinar el caudal en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) tiene la ventaja de que no se requieren mediciones mecánicas. Eso significa que no debe introducirse materia extraña en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que pueda contaminar o alterar la atmósfera sensible y/o estéril en dicho sistema. Además, las dimensiones del sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación soportan la circulación continua de pequeñas cantidades de fluido, p. ej., sangre o medio, preferiblemente de 4 a 15  $\mu$ l y más preferiblemente de 4 a 8  $\mu$ l de fluido, p. ej., sangre o medio, a través de dicho sistema de modo que se complica el uso de instrumentos de medición mecánica comunes. Sin embargo, los eritrocitos, como parte de la sangre, ya están comprendidos en las realizaciones preferidas del sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación y se pueden detectar con medios ópticos. Además, los eritrocitos, como componentes naturales de los sistemas de órganos, se pueden añadir también fácilmente al medio que perfunde el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sin destruir el entorno sensible de dichos sistemas. Las células, conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se proporcionan, en realizaciones preferidas, con todos los componentes vitales necesarios a través de la sangre que comprende, por naturaleza, eritrocitos. La sangre es un sistema de tampón fuerte. Proporciona todas las proteínas necesarias del plasma a las células, conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), mantiene el transporte de oxígeno a través de eritrocitos, y proporciona actividades inmunológicas contra microorganismos contaminantes a través de los leucocitos. Además, el uso de eritrocitos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) tiene la ventaja de que no se tienen que introducir sustancias extrañas. p. ej., productos químicos, que podrían ser tóxicos para las células o que podrían tener efectos secundarios, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) para determinar el caudal en dicho sistema. Además, los eritrocitos son rojos y, por lo tanto, claramente visibles, p. ej., usando un microscopio tal como un microscopio de fluorescencia.

Un sistema de cultivo celular tridimensional (2) "perfundible" es un sistema de cultivo celular tridimensional que se puede perfundir mediante un fluido tal como sangre o medio. Debería estar claro para el experto en la técnica que dicho sistema es perfundido por un fluido tal como sangre o medio al menos en el tiempo de medición en el que se hace la determinación del caudal.

El sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible consiste en la forma más sencilla de al menos una sección de crecimiento (3) con una microentrada a través de la cual puede fluir hacia dentro un fluido que contiene eritrocitos, p. ej., sangre y/o medio, p. ej., una entrada de medio y/o sangre, y con una microsalida a través de la cual puede fluir hacia fuera un fluido que contiene eritrocitos, p. ej., salida de medio y/o sangre. Dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible puede tener la forma de un tubo de cultivo celular o pocillo de cultivo celular. Sin embargo, se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema que comprende al menos una sección de crecimiento (3) con una microentrada a través de la cual puede fluir hacia dentro un fluido que contiene eritrocitos, p. ej., sangre y/o medio, p. ej., una entrada de medio y/o sangre, y con una

microsalida a través de la cual puede fluir hacia fuera un fluido que contiene eritrocitos, p. ej., salida de medio y/o sangre. Dicho sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible preferiblemente comprende además un canal microfluídico que está conectado con la entrada de la sección de crecimiento (3) y un canal microfluídico que está conectado con la salida de la sección de crecimiento (3). Se prefiere en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, como se ha descrito antes.

Se prefiere además que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) "perfundible", en particular el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2) "perfundible" esté hecho de un material traslúcido, p. ej., vidrio tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva descrita antes del sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando medios ópticos. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

El caudal se puede determinar en diferentes regiones del sistema de cultivo celular tridimensional (2) o en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., en el canal microfluídico en la sección de crecimiento (3), en particular en la cavidad de crecimiento comprendida en la sección de crecimiento (3), en la microentrada de la sección de crecimiento (3), en la microsalida de la sección de crecimiento (3), en el canal microfluídico de entrada de la sección de crecimiento (3) o en el canal microfluídico de salida de la sección de crecimiento (3). Cuando se determina el caudal, se puede tomar una primera foto de una región en un primer tiempo de medición y se puede tomar una segunda foto de la misma región en un segundo tiempo de medición. Alternativamente, se puede tomar una primera foto de una región en un primer tiempo de medición, se puede tomar una segunda foto de la misma región en un segundo tiempo de medición y se puede tomar una tercera foto de la misma región en un tercer tiempo de medición, o se puede tomar una primera foto de una región en un primer tiempo de medición, se puede tomar una segunda foto de la misma región en un segundo tiempo de medición, se puede tomar una tercera foto de la misma región en un tercer tiempo de medición y se puede tomar una cuarta foto de la misma región en un cuarto tiempo de medición. Se prefiere que cuando se determina el caudal se tome una primera foto de una región en un primer tiempo de medición y se tome una segunda foto de la misma región en un segundo tiempo de medición. El intervalo entre ambos tiempos de medición preferiblemente es una cantidad de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 segundos. Las fotos se pueden tomar con medios ópticos. Preferiblemente, las fotos se toman con un microscopio, más preferiblemente con un microscopio de fluorescencia. También se pueden generar dos fotos en las mismas regiones en diferentes tiempos de medición a partir de una grabación de video. La asignación de un vector de movimiento a el al menos un eritrocito que representa el cambio de posición de dicho al menos un eritrocito en las al menos dos fotos, y la determinación del caudal en dicho sistema de cultivo celular basado en el vector de movimiento se describe en Adrian, R.J.; Westerweel, J. (2011). *Particle Image Velocimetry*. Adrian, R.J.; Westerweel, J. (2011). Particle Image Velocimetry. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-44008-0. Preferiblemente, las fotos se analizan con el programa de PIV de código abierto URAPIV. Si se determina el caudal de más de un eritrocito en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), el caudal medio en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se calcula basándose en todos los datos de medición. Preferiblemente, sangre, en particular sangre entera o una fracción de la sangre tal como plasma o eritrocitos, o medio que contiene eritrocitos, perfunde el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

En otra realización preferida, el método para determinar la osmolalidad fisiológica en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:

(i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), y

(ii) determinar la forma de al menos un eritrocito, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 eritrocitos, en dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular.

El método para determinar la osmolalidad fisiológica en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se lleva a cabo preferiblemente sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación sin contacto y no invasiva de la osmolalidad fisiológica se lleva a cabo en particular usando medios ópticos.

La expresión "osmolalidad fisiológica", como se usa en la presente memoria, se refiere a la presión osmótica media producida por partículas de soluto, p. ej., partículas de sal y/o azúcar, que están presentes en un entorno fisiológico normal, p. ej., en la sangre. Dicha osmolalidad fisiológica también debería estar presente en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el fluido, p. ej., medio o sangre, que está comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Dicho entorno es especialmente deseado para permitir el crecimiento, diferenciación y/o mantenimiento ideales de agregados celulares, tejidos, organoides y/u órganos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

El uso de eritrocitos como detectores para la determinación de la osmolalidad fisiológica en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) tiene la ventaja de que no se requiere medición mecánica. Por ejemplo, la osmolalidad se puede medir en un instrumento analítico llamado un osmómetro. Esto significa que no debe introducirse materia

5 extraña en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que pueda contaminar o alterar la atmósfera sensible y/o estéril en dicho sistema. Además, las dimensiones del sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación soportan la circulación continua de pequeñas cantidades de fluido, p. ej., sangre o medio, preferiblemente entre 5 a 5000 µl y más preferiblemente entre 20 y 200 µl de fluido, p. ej., sangre o medio, a través de dicho sistema de modo que se complica el uso de instrumentos de medición mecánica comunes. Sin embargo, los eritrocitos, como parte de la sangre, ya están comprendidos en las realizaciones preferidas del sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación y se pueden detectar con medios ópticos. Además, los eritrocitos, como componentes naturales de los sistemas de órganos, se pueden añadir también fácilmente al medio que está comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sin destruir el entorno sensible de dichos sistemas.

10 Las células, conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se proporcionan, en realizaciones preferidas, con todos los componentes vitales necesarios a través de la sangre que comprende, por naturaleza, eritrocitos. Además, el uso de eritrocitos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) tiene la ventaja de que no se tienen que introducir sustancias extrañas. p. ej., productos químicos, que podrían ser tóxicos para las células o  
15 que podrían tener efectos secundarios, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) para determinar la osmolalidad fisiológica en dicho sistema. Además, los eritrocitos son rojos y, por lo tanto, claramente visibles, p. ej., usando un microscopio tal como un microscopio de fluorescencia.

20 El sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes. Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional perfundible como se ha descrito antes. Se prefiere en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Se prefiere más en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2) esté hecho de un material traslúcido, p. ej., vidrio tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación  
25 sin contacto y no invasiva descrita antes del sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando medios ópticos. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

Se prefiere en particular que perfunda el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sangre, en particular sangre entera o una fracción de la sangre, tal como plasma o eritrocitos, o medio que contiene eritrocitos.

30 Como se ha mencionado antes, los eritrocitos son indicadores de la osmolalidad de la sangre, en particular el plasma, por naturaleza. La osmolalidad del medio que comprende eritrocitos o la osmolalidad de la sangre, en particular del plasma, influye en el volumen y forma de los eritrocitos. Los eritrocitos, en particular los eritrocitos de mamífero, típicamente tienen forma de discos bicóncavos: aplanados y deprimidos en el centro, con un corte transversal en forma de mancuerna y un borde en forma de toro en el extremo del disco. La forma bicóncava distintiva optimiza las propiedades de flujo de la sangre en los vasos grandes, tal como maximización del flujo laminar y minimización de la dispersión de plaquetas, que suprime su actividad aterogénica en estos vasos grandes.  
35 El mantenimiento de la forma de los eritrocitos normalmente depende de factores dentro de las células, así como del entorno exterior. Si estos se alteran, la célula se puede volver esférica. Se han descrito al menos tres conjuntos de circunstancias ambientales que dan como resultado la forma esférica: el hinchamiento osmótico (hipotónico), la transformación discocito-equinocito, y la transformación dicocito-estomatocito. Hasta cierto punto, los tres tipos de cambio de forma son reversibles. El hinchamiento osmótico se produce cuando los eritrocitos se suspenden en soluciones hipotónicas. En dichas circunstancias, la célula adquiere agua y se hincha, convirtiéndose primero en forma de copa y después esférica. Estos cambios están asociados con un aumento en el volumen, mientras que la superficie específica de la célula sigue siendo la misma o aumenta solo ligeramente. A medida que se aproxima a la forma esférica, el diámetro de la célula disminuye, una observación que demuestra la naturaleza elástica de la  
40 membrana. La transformación de discocito-equinocito tiene lugar cuando el trifosfato de adenosina (ATP) intracelular se reduce, cuando el calcio intracelular aumenta, cuando la célula se expone a plasma almacenado, pH alto, detergentes aniónicos, lisolecitina o ácidos grasos. La transformación de discocito-estomatocito ocurre cuando los glóbulos rojos son expuestos a detergentes catiónicos de pH bajo. A medida que avanza el cambio, la célula pierde el hundimiento en un lado, y el hoyo opuesto aumenta de profundidad, produciendo una célula con forma de copa.  
45 Puesto que en los frotis fijos dichas células parece que tienen un "estoma" tipo boca en lugar de un área redonda de palidez central, se conocen como estomatocitos. La célula también puede tener forma dentada. El encogimiento osmótico (hipertónico) puede dar como resultado una forma dentada.

50 Basado en lo anterior, los eritrocitos son indicadores adecuados de la osmolalidad fisiológica en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular de la osmolalidad fisiológica del fluido, p. ej., medio o sangre, comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., que perfunde a través de o circula en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). En especial, incluso solo un cambio de 10% en la osmolalidad tiene una influencia drástica en los parámetros ópticos, lo cual parece ser del mismo orden que cambios de 10% de hematocritos y saturación de oxígeno.  
55

60 Por lo tanto, preferiblemente, la forma esférica del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica disminuye (estado hipotónico, concentración demasiado baja de las partículas de soluto, p. ej., partículas de sal y/o azúcar), una forma dentada del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica aumenta (estado

hipertónico, concentración demasiado alta de partículas de soluto, p. ej., partículas de sal y/o azúcar), o una forma bicóncava del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica es estable (estado fisiológico).

5 Cuando la osmolalidad fisiológica disminuye, está presente un estado hipotónico en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el fluido, p. ej., medio o sangre, comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). En otras palabras, la concentración de las partículas de soluto, p. ej., partículas de sal y/o azúcar, es demasiado baja. Además, cuando la osmolalidad fisiológica aumenta, está presente un estado hipertónico en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el fluido, p. ej., medio o sangre, comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). En otras palabras, la concentración de las partículas de soluto, p. ej., partículas de sal y/o azúcar, es demasiado alta. Además, cuando la osmolalidad fisiológica es estable, está presente un estado isotónico en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el fluido, p. ej., medio o sangre, comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). En otras palabras, la concentración salina es normal/ideal.

15 La forma de al menos un eritrocito en dicho sistema de cultivo celular se puede determinar en cualquier tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular. El término "cultivo" se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Preferiblemente, la forma del al menos un eritrocito en dicho sistema de cultivo celular se determina en tiempos de medición periódicos durante el cultivo, p. ej., cada hora o cada día. Se prefiere en particular que la forma del al menos un eritrocito se determine después del cambio de medio/sangre, después de la adición de complementos y/o después de la adición de compuestos de ensayo (véase más adelante).

25 La forma del al menos un eritrocito se puede analizar por medios ópticos. Preferiblemente, la forma del al menos un eritrocito se analiza con un microscopio, más preferiblemente con un microscopio de fluorescencia. Por lo tanto, preferiblemente se usa un software de detección. Si se determina la forma de más de un eritrocito en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se puede calcular la forma media de los eritrocitos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., basándose en todos los datos de medición, usando un programa de ordenador adecuado.

En una realización preferida adicional, el método para determinar el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:

- (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3),
- 30 (ii) determinar la saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos en una primera posición y en una segunda posición en dicho sistema de cultivo celular, y
- (iii) calcular el consumo de oxígeno en dicho sistema de cultivo celular basado en la saturación media de la hemoglobina en diferentes posiciones.

35 El método para determinar el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) se lleva a cabo preferiblemente sin contacto y de forma no invasiva, preferiblemente para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación sin contacto y no invasiva del consumo de oxígeno se lleva a cabo en particular usando medios ópticos.

40 El sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes. Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional perfundible como se ha descrito antes. Se prefiere en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Se prefiere más en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2) esté hecho de un material traslúcido, p. ej., vidrio tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva descrita antes del sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando medios ópticos. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

Se prefiere en particular que perfunda el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sangre, en particular sangre entera o una fracción de la sangre, tal como plasma o eritrocitos, o medio que contiene eritrocitos.

50 Para el crecimiento, diferenciación y/o mantenimiento ideal del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular comprendidos en la sección de crecimiento (3), debe proporcionarse medio gaseoso, p. ej.,  $O_2/CO_2$ . El medio gaseoso, p. ej.,  $O_2/CO_2$ , se puede proporcionar de una forma activa o pasiva. Por ejemplo, el medio gaseoso se puede complementar por una fuente gaseosa externa, p. ej.,  $O_2/CO_2$ , al sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular a la al menos una sección de crecimiento (3) comprendida en el mismo. Sin embargo, se prefiere que el medio gaseoso, p. ej.,  $O_2/CO_2$ , se proporcione al sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular a la al menos una sección de crecimiento (3) comprendida en el mismo de una forma pasiva, p. ej., por difusión en la sección de crecimiento (3) a través de

- una membrana o lámina de polímero permeable a gas y/o a través de canales microfluídicos del entorno. Esta membrana o lámina de polímero preferiblemente es impermeable a fluidos. El gas, p. ej., O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, se acumula directamente en el(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular comprendidos en la sección de crecimiento (3), y/o disueltos en el fluido, p. ej., medio o sangre, comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular comprendido en los canales microfluídicos de dicho sistema. Para proporcionar condiciones de cultivo óptimas, es muy deseable la observación del consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Un consumo de oxígeno alto indica, por ejemplo, un suministro de energía aeróbico y un consumo de oxígeno bajo indica, por ejemplo, un suministro de energía por glicolisis.
- Como se ha mencionado antes, basándose en la saturación media de la hemoglobina en diferentes posiciones en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se puede calcular el consumo de oxígeno en dicho sistema de cultivo celular.
- La hemoglobina es una metaloproteína que transporta oxígeno que contiene hierro en los eritrocitos de casi todos los vertebrados. La hemoglobina en la sangre lleva oxígeno desde los órganos respiratorios (pulmones o agallas) al resto del cuerpo (es decir, los tejidos) donde libera el oxígeno para quemar nutrientes para proporcionar energía para alimentar las funciones del organismo, y recoge el dióxido de carbono resultante para llevarlo de nuevo a los órganos respiratorios para ser dispensado del organismo. La hemoglobina puede estar saturada con moléculas de oxígeno (oxihemoglobina), o desaturada de moléculas de oxígeno (desoxihemoglobina).
- En general, la saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos se puede determinar en cualquier posición en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., dentro de los canales microfluídicos. Sin embargo, se prefiere que la saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos se determine en una posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en una posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3). En particular, para determinar el consumo de oxígeno del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) u órgano(s) comprendidos en la sección de crecimiento (3) del sistema de cultivo celular tridimensional (2), se prefiere que la saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos se determine en una posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en una posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3). En otras palabras, la saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos se mide preferiblemente en una posición antes de que el fluido (enriquecido en oxígeno), p. ej., sangre o medio que contiene eritrocitos, fluya a la al menos una sección de crecimiento (3), p. ej., en la microentrada o canal microfluídico de entrada de la al menos una sección de crecimiento (3), y en una posición después de que el fluido (reducido en oxígeno), p. ej., sangre o medio que contiene eritrocitos, fluya fuera de la al menos una sección de crecimiento (3), p. ej., en la microsaldada o canal microfluídico de salida de la al menos una sección de crecimiento.
- La saturación de la hemoglobina se puede medir usando medios ópticos. La saturación de la hemoglobina se mide preferiblemente usando una fuente de luz infrarroja y una fuente de luz roja, p. ej., usando un emisor de luz con una fuente de luz roja y de luz infrarroja tal como un emisor de luz con LED de luz roja y luz infrarroja, y un fotodetector. En realizaciones preferidas, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) está hecho de un material translucido de modo que el emisor de luz con luz roja y la fuente de luz infrarroja, p. ej., LED, brilla a través del sitio de medición. Como se ha mencionado antes, el sitio de medición está en una primera y una segunda posición dentro del sistema de cultivo celular tridimensional (2), preferiblemente en una posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en una posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3). La luz preferiblemente se envía a través del sitio de medición por el método de transmisión y reflexión. En el método de transmisión, el emisor de luz y el fotodetector pueden estar enfrentados uno a otro con el sitio de medición entre ellos. La luz puede entonces pasar a través del sitio. En el método de reflexión, el emisor de luz y el fotodetector pueden estar al lado uno de otro en la parte superior o inferior, preferiblemente inferior, del sitio de medición. La luz va del emisor al detector a través del sitio.
- La medición de la saturación de la hemoglobina se basa además en las características de absorción de luz roja e infrarroja de la hemoglobina oxigenada y desoxigenada. En particular, la hemoglobina oxigenada absorbe más luz infrarroja y permite que pase a través más luz roja. La hemoglobina desoxigenada (o reducida) absorbe más luz roja y permite que pase a través más luz infrarroja. Para determinar la saturación de la hemoglobina en la primera y la segunda posición en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., en la posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en la posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3), dichas posiciones preferiblemente se irradian con luz infrarroja y luz roja. La luz roja preferiblemente se emite a una longitud de onda de 600-750 nm y/o la absorción de luz roja preferiblemente se emite a una longitud de onda de 850-1000 nm. Esto se basa en particular en el hecho de que la luz roja es absorbida en la banda de longitud de onda de 600-750 nm y la luz infrarroja es absorbida en la banda de longitud de onda de 850-1000 nm. Después de que las señales roja (R) e infrarroja (IR) transmitidas o reflejadas pasen a través de la primera y segunda posición en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., en la posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en la posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3), y sean recibidas en el fotodetector, se calcula preferiblemente la relación R/IR. La relación R/IR determinada en la primera posición y en la segunda posición del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., en la posición corriente arriba de la al menos una sección de crecimiento (3) y en la posición corriente abajo de la al menos una sección de crecimiento (3), después se compra preferiblemente con una tabla de referencias o curva de calibración (compuesta de fórmulas

empíricas) que convierten la relación en un valor de saturación de la hemoglobina. La determinación de la saturación de la hemoglobina posteriormente permite el cálculo del consumo de oxígeno.

5 Más preferiblemente, la saturación de la hemoglobina se mide con el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria. Dicho dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente comprende al menos una fibra de excitación de luz (4) y al menos una fibra de emisión de luz (5), en particular una fibra de emisión infrarroja (9). En cuanto a las realizaciones preferidas de dicho dispositivo de sensor óptico (1), se remite a la presente descripción. De nuevo, la determinación de la saturación de la hemoglobina posteriormente permite el cálculo del consumo de oxígeno.

10 Además, en una realización preferida, el método para determinar y/o vigilar la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo colorantes fluorescentes para células vivas comprende las etapas de:

(i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3) que se carga con colorantes fluorescentes para células vivas, y

15 (ii) medir la intensidad media de fluorescencia en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un primer tiempo de medición y en un segundo tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, y/o

20 (iib) medir la intensidad media de fluorescencia en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia de dicho tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia de al menos un cultivo celular de control.

25 El método para determinar y/o vigilar la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2) se lleva a cabo preferiblemente sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación y/o vigilancia sin contacto y no invasiva de la vitalidad se lleva a cabo en particular usando medios ópticos.

30 El sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes. Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional perfundible como se ha descrito antes. Se prefiere en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Se prefiere más en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2) esté hecho de un material traslúcido, p. ej., vidrio tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva descrita antes del sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando medios ópticos. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

35 Se prefiere en particular que perfunda el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sangre, en particular sangre entera o una fracción de la sangre, tal como plasma o eritrocitos, o medio que contiene eritrocitos.

40 Como se ha mencionado antes, la intensidad media de fluorescencia se determina en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3), preferiblemente en toda la al menos una sección de crecimiento (3), de dicho sistema de cultivo celular. Dicha parte de la al menos una sección de crecimiento (3) preferiblemente tiene un tamaño que es representativo del estado de vitalidad de toda la al menos una sección de crecimiento (3), y, por lo tanto, del estado de vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo. Dicha parte de la al menos una sección de crecimiento (3) puede ser una capa de células, múltiples capas de células (p. ej., una zona de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más capas de células) o un área de 50x50x50 µm, 100x100x100 µm, 150x150x150 µm, 200x200x200 µm, 250x250x250 µm, 300x300x300 µm, 350x350x350 µm, 400x400x400 µm, 450x450x450 µm, o 500x500x500 µm.

50 La expresión "colorantes fluorescentes vitales", como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas fluorescentes que son retenidas en células vivas y vitales a lo largo de varias generaciones, p. ej., los colorantes fluorescentes vitales QTracker son heredados por células hijas durante al menos seis generaciones. Los colorantes fluorescentes vitales son heredados por células hijas después de fusión celular y no son transferidos a células adyacentes en la población. Dichos colorantes fluorescentes vitales solo son retenidos en células vivas que tienen membranas intactas. Las células que mueren o células muertas no tienen una membrana celular intacta y, por lo tanto, no son capaces de incorporar los colorantes fluorescentes vitales. La membrana celular de células que mueren o muertas, por ejemplo, tiene fugas o es permeable debido a agujeros y fisuras en la misma. Dichas células ya no son vitales o tienen una vitalidad reducida. En general, los colorantes fluorescentes vitales se pierden rápidamente en todas las condiciones que producen lisis celular, p. ej., apoptosis celular. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia de los colorantes fluorescentes vitales medida en diferentes tiempos de medición durante el cultivo representa un indicador significativo de la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en

particular del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo (véase más adelante).

5 Los colorantes fluorescentes vitales se pueden cargar en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) añadiendo el reactivo al fluido, p. ej., sangre o medio, comprendido en el mismo. Por ejemplo, los colorantes fluorescentes vitales se pueden cargar en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) añadiendo el reactivo al depósito de fluido tal como depósito de sangre o medio. También se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, se cargue con los colorantes fluorescentes por un puerto de inyección. Como se ha mencionado antes, el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, puede comprender un puerto de inyección a través del cual se pueden aplicar en modo discontinuo sustancias, p. ej., compuestos de ensayo, nutrientes, fluidos, productos químicos tales como colorantes fluorescentes vitales, durante el curso de la incubación. Dicho puerto de inyección preferiblemente está situado en un canal de transporte microfluídico o conectado a la al menos una sección de crecimiento (3).

15 Los colorantes fluorescentes vitales pueden pasar libremente a través de las membranas celulares, pero una vez dentro de las células, son transformados en productos de reacción impermeables a las células. Son particularmente preferidos los colorantes fluorescentes vitales CellTracker. Los colorantes fluorescentes vitales CellTracker, por ejemplo, contienen un grupo clorometilo o bromometilo que reacciona con tioles, p. ej., en una reacción mediada por glutatión S-transferasa. En la mayoría de las células, los niveles de glutatión son altos (hasta 10 mM) y la glutatión S-transferasa es ubicua. Dichos colorantes preferiblemente se transforman en aductos de colorante fluorescente impermeable a la célula-tioéter cuya fluorescencia se puede detectar. Los colorantes fluorescentes vitales CellTracker incluyen los derivados de clorometilo de amino, hidroxilo y difluorhidroxycumarina (CMAC, CMHC y CMF2HC) azul-fluorescentes, los derivados de clorometilo de diacetato de fluoresceína (CMFDA) verde fluorescentes, y un colorante BODIPY®, el CMTMR y CMRA naranja fluorescentes y CMTPX rojo fluorescente. CMAC, CMHC y CMF2HC azul CellTracker™, Violeta CellTracker™, el derivado de bromometilo de cumarina (BMQC) violeta fluorescente, BODIPY verde CellTracker™, CMTMR naranja CellTracker™, y CMTPX rojo CellTracker™, no requieren la escisión enzimática para activar su fluorescencia, mientras que CMFDA verde y CMRA naranja requieren la escisión enzimática.

30 Otro colorante fluorescente vital preferido es la calceína AM. Los derivados de éster de acetoximetilo (AM) de los indicadores y quelantes fluorescentes forman otro grupo útil de compuestos para el estudio de la vitalidad de las células. La modificación de los ácidos carboxílicos con grupos éster AM produce una molécula no cargada que puede permear las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, los grupos bloqueadores lipófilos son escindidos por esterases no específicas, produciendo una forma cargada que se escapa de las células mucho más lentamente que su compuesto original. La calceína AM es retenida en las células que tienen las membranas intactas. No marca células muertas y se pierde rápidamente en condiciones que producen la lisis celular. Esta propiedad permite llevar a cabo ensayos de citometría de flujo o basados en fluorescencia para la viabilidad celular.

También se prefieren los colorantes fluorescentes vitales Qtracker. Una vez dentro de las células, los colorantes fluorescentes vitales Qtracker proporcionan fluorescencia intensa, estable, que se puede seguir a lo largo de varias generaciones, y no es transferido a células adyacentes en una población.

También se pueden usar moléculas CellMask o FluoSpheres para teñir células vivas.

40 Se prefiere que el método de vigilancia de la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo los colorantes fluorescentes para células vivas, comprenda las etapas de:

(i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3) que se carga con colorantes fluorescentes de células vivas, y

45 (ii) medir la intensidad media de fluorescencia (de dichos colorantes fluorescentes de células vivas) en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un primer tiempo de medición y en un segundo tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición.

50 El intervalo entre ambos tiempos de medición, es decir, entre el primer y el segundo tiempo de medición durante el cultivo, preferiblemente es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días, 1, 2, 3 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses o 1 año. El término "cultivo", se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

55 Se prefiere en particular que una disminución de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del primer tiempo de medición, indique que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

También se prefiere en particular que una retención de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, indique que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) se mantiene.

5 El sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, se puede exponer además a un compuesto de ensayo, en particular a uno o más compuestos de ensayo o a una composición de ensayo, p. ej., con el fin de llevar a cabo estudios de exposición a largo plazo del compuesto de ensayo. Esto permite, por ejemplo, determinar si dicho(s) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) impacto en la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en la vitalidad del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, p. ej., si el(los) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) efectos secundarios, p. ej., inhibe(n) el crecimiento y/o diferenciación de las células, o es(son) tóxico(s) para las células.

10 La aplicación de un compuesto de ensayo al circuito microfluídico, por ejemplo, puede parecerse a la administración intravenosa del compuesto de ensayo, la aplicación de un compuesto de ensayo a la piel comprendido en la sección de crecimiento (3), puede parecerse a la administración dérmica del compuesto de ensayo, la aplicación de un compuesto de ensayo al pulmón, representa la administración del compuesto de ensayo por inhalación, y la aplicación de un compuesto de ensayo al intestino, puede representar la administración oral del compuesto de ensayo.

15 Por lo tanto, además/adicionalmente se prefiere que dicho sistema de cultivo celular (2) se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de ensayo.

20 La expresión "compuesto de ensayo", como se usa en la presente memoria, significa cualquier compuesto adecuado para el suministro farmacéutico. El compuesto de ensayo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en células, virus, bacterias, células genéticamente modificadas, ácidos nucleicos (p. ej., vectores que comprenden un transgén), proteínas, péptidos, hormonas, anticuerpos, ARN, preferiblemente ARNip o ARNbc, moléculas pequeñas tales como moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas, preferiblemente de aproximadamente 800 Daltons, más preferiblemente aproximadamente 500 Daltons, fármacos, sustancias farmacéuticamente activas, metabolitos, compuestos naturales, o muestras de suelo, plantas o de origen marino. Los compuestos de ensayo se pueden diseñar específicamente o se pueden obtener de bibliotecas ya disponibles. El término "biblioteca", como se usa en la presente memoria, se refiere a una colección de muestras. Preferiblemente, el compuesto de ensayo se proporciona en forma de una biblioteca de compuestos químicos. Las bibliotecas de compuestos químicos incluyen una pluralidad de compuestos químicos y se han agrupado a partir de cualquiera de múltiples fuentes, incluyendo moléculas químicamente sintetizadas o productos naturales, o se han generado por técnicas de química combinatoria. Son especialmente adecuadas para el cribado de alta capacidad y pueden estar compuestas de compuestos químicos de una estructura particular o compuestos de un organismo particular tal como una planta. Por ejemplo, están disponibles en el comercio bibliotecas de compuestos sintéticos de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), ChemBridge Corporation (San Diego, CA), o Aldrich (Milwaukee, WI). Hay disponible una biblioteca de compuestos naturales, por ejemplo, de TimTec LLC (Newark, DE). Alternativamente, se pueden usar bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. El compuesto de ensayo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un agente dermatológico, un agente cardiovascular, un agente hepático, un agente intestinal y un agente neurotóxico. El agente dermatológico se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en ingredientes cosméticos y productos químicos de consumo, el agente cardiovascular se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en contractores del músculo cardíaco y relajantes del músculo cardíaco, el agente hepático se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en agentes moduladores de la fase I metabólica o agentes moduladores de la fase II metabólica, el agente intestinal se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en aditivos alimentarios, y el agente neurotóxico se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en agentes neurotóxicos del sistema nervioso periférico y agentes neurotóxicos del sistema nervioso central.

50 El compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo o la composición de compuesto de ensayo, se pueden cargar en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) mediante la adición del compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuesto(s) de ensayo o la composición de ensayo, al depósito de fluido tal como depósito de sangre o medio. También se prefiere que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, se cargue con el compuesto de ensayo, en particular con el uno o más compuestos de ensayo o con la composición de compuesto de ensayo, por un puerto de inyección. Como se ha mencionado antes, el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, puede comprender un puerto de inyección a través del cual se pueden aplicar de modo discontinuo sustancias, p. ej., compuestos de ensayo, nutrientes, fluidos, compuestos químicos tales como colorantes fluorescentes vitales, durante el curso de la incubación. Dicho puerto de inyección preferiblemente está localizado en un canal de transporte microfluídico o conectado a la al menos una sección de crecimiento (3).

60 Se prefiere en particular que el compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo o la composición de compuesto de ensayo, se cargue(n) en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) antes de determinar la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición, p. ej., 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 meses,

3, 2, 1 semanas, 6, 5, 4, 3, 2, 1 día(s), 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 horas, antes o inmediatamente antes de la determinación de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición. También es particularmente preferido que el compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo o la composición de compuesto de ensayo, se cargue(n) en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) después de determinar la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, p. ej., 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 meses, 3, 2, 1 semanas, 6, 5, 4, 3, 2, 1 días, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 horas después o inmediatamente después de la determinación de la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, preferiblemente inmediatamente después de la determinación de la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición. De esta forma, se puede estudiar el efecto del compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo en el sistema de cultivo celular tridimensional.

El compuesto de ensayo puede influir o no influir en la intensidad media de fluorescencia de los colorantes fluorescentes vitales. Una alteración o una retención de la intensidad media de fluorescencia de los colorantes fluorescentes vitales puede ser indicativa de la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2).

Se prefiere en particular que una disminución de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del primer tiempo de medición, indique que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

También se prefiere en particular que una retención de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, indique que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) se mantiene.

Adicional o alternativamente, también se prefiere que el método para determinar la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo los colorantes fluorescentes vitales comprenda las etapas de:

(i) proporcionar un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), que se carga con colorantes fluorescentes vitales,

(ii) medir la intensidad media de fluorescencia (de dichos colorantes fluorescentes vitales) en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia de dicho tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia de al menos un sistema de cultivo celular de control.

La intensidad media de fluorescencia se puede medir en un tiempo de medición de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días, 1, 2, 3 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses o 1 año después de empezar el proceso de cultivo del sistema de cultivo celular tridimensional (2). El término "cultivo", se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

El sistema de cultivo celular de control puede ser cualquier sistema que permita, por comparación de su intensidad media de fluorescencia con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular tridimensional (2), la formulación de una afirmación sobre la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2). El sistema de cultivo celular de control preferiblemente no se carga con colorantes fluorescentes vitales, preferiblemente con los colorantes fluorescentes vitales específicos mencionados antes. Se prefiere que el sistema de cultivo celular de control que no se carga con colorantes fluorescentes vitales sea un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes, p. ej., un sistema de cultivo celular tridimensional autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Es más preferido que el sistema de cultivo celular de control sea el mismo sistema de cultivo celular tridimensional proporcionado en la etapa (i) pero no cargado con los colorantes fluorescentes vitales.

Se prefiere en particular que un aumento de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control indique que dicho sistema de cultivo celular (2) es vital.

También se prefiere en particular que la equivalencia de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control indique que dicho sistema de cultivo celular (2) no es vital.

Como se ha mencionado antes, el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, se puede exponer además a un compuesto de ensayo, en particular a uno o más compuestos de ensayo o a una composición de compuesto de ensayo, p. ej., con el fin de llevar a cabo estudios de exposición a largo plazo del compuesto de ensayo. Esto permite, por ejemplo, determinar si dicho(s) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) impacto en la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en la vitalidad del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, p. ej., si el(los) compuesto(s)

de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) efectos secundarios, p. ej., inhibe(n) el crecimiento y/o diferenciación de las células, o es(son) tóxico(s) para las células.

- 5 Por lo tanto, se prefiere además/adicionalmente que dicho sistema de cultivo celular (2) se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de compuesto de ensayo, y que el sistema de cultivo celular de control no se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de compuesto de ensayo.

En cuanto a la definición de las expresiones "compuesto de ensayo" y "biblioteca", las realizaciones preferidas del "compuesto de ensayo" y en cuanto a las formas específicas de "compuesto de ensayo" que se carga en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se remite a las definiciones y explicaciones anteriores.

- 10 El sistema de cultivo celular de control no tratado con el compuesto de ensayo preferiblemente es un sistema de cultivo celular tridimensional. Se prefiere que el sistema de cultivo celular de control que no se trata con el compuesto de ensayo sea un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes, p. ej., un sistema de cultivo celular tridimensional autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Es más preferido que el sistema de cultivo celular de control sea el mismo sistema de cultivo celular tridimensional proporcionado en la etapa
- 15 (i) pero no tratado con el compuesto de ensayo. Lo más preferido es que los sistemas de cultivo celular de control mencionados antes no se caguen con colorantes fluorescentes vitales, preferiblemente con los colorantes fluorescentes vitales específicos mencionados antes.

- 20 El compuesto de ensayo puede influir o no influir en la intensidad media de fluorescencia de los colorantes fluorescentes vitales. Una alteración o una retención de la intensidad media de fluorescencia de los colorantes fluorescentes vitales puede ser indicativa de la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2).

Se prefiere en particular que un aumento de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control (en particular no cargado con el compuesto de ensayo y/o no cargado con colorantes fluorescentes vitales) indique que dicho sistema de cultivo celular (2) es vital.

- 25 También se prefiere en particular que la equivalencia de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control (en particular no cargado con el compuesto de ensayo y/o no cargado con colorantes fluorescentes vitales) indique que dicho sistema de cultivo celular (2) no es vital.

- 30 Se prefiere que las condiciones de cultivo del sistema de cultivo celular de control descrito antes y el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sean iguales y/o que los tiempos de medición en ambos sistemas se emparejen entre sí con el fin de mejorar la compatibilidad de los datos de medición.

- 35 Preferiblemente, la determinación/medición de la intensidad media de autofluorescencia, se lleva a cabo por espectrometría (p. ej., espectrometría UV/VIS), preferiblemente usando un fluorómetro, lector de fluorescencia y/o microscopio de fluorescencia. Más preferiblemente, la intensidad media de autofluorescencia se determina/mide usando el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria. Dicho dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente comprende al menos una fibra de excitación de luz (4) y al menos una fibra de emisión de luz (5), en particular una fibra de emisión de fluorescencia (8). En cuanto a las realizaciones preferidas de dicho dispositivo de sensor óptico (1), se remite a la presente descripción.

- 40 Además, en una realización preferida, el método para determinar y/o vigilar el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD, comprende las etapas de:

- (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3),

- 45 (ii) activar el NADH y/o FAD comprendido en la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular (preferiblemente con luz UV), y

(iia) medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, determinar la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y/o determinar la relación NADH/FAD en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un primer tiempo de medición y en un segundo tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y

- 50 comparar la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación NADH/FAD en el segundo tiempo de medición con la intensidad media de autofluorescencia del NADH, a intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación NADH/FAD en el primer tiempo de medición, y/o

(iiib) medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, determinar la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o determinar la relación  $\text{NADH}/\text{FAD}$  en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y

- 5 comparar la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o la relación  $\text{NADH}/\text{FAD}$  en dicho tiempo de medición con la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o la relación  $\text{NADH}/\text{FAD}$  de un sistema de cultivo celular de control.

10 El método para determinar y/o vigilar el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2) se lleva a cabo preferiblemente sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. La determinación y/o vigilancia sin contacto y no invasiva del estado metabólico se lleva a cabo en particular usando medios ópticos.

15 El sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes. Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) puede ser un sistema de cultivo celular tridimensional perfundible como se ha descrito antes. Se prefiere en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible sea un sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Se prefiere más en particular que el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecho de un material traslúcido, p. ej., vidrio tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva descrita antes del sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando medios ópticos. En particular, permite el análisis del sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

Se prefiere en particular que perfunda el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sangre, en particular sangre entera o una fracción de la sangre, tal como plasma o eritrocitos, o medio que contiene eritrocitos.

25 Como se ha mencionado antes, la intensidad media de fluorescencia se determina en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3), preferiblemente en toda la al menos una sección de crecimiento (3), de dicho sistema de cultivo celular. Dicha parte de la al menos una sección de crecimiento (3) preferiblemente tiene un tamaño que es representativo del estado de vitalidad de toda la al menos una sección de crecimiento (3), y, por lo tanto, del estado de vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo. Dicha parte de la al menos una sección de crecimiento (3) puede ser una capa de células, múltiples capas de células (p. ej., una zona de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más capas de células) o un área de  $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}$ ,  $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}$ ,  $150 \times 150 \times 150 \mu\text{m}$ ,  $200 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 250 \times 250 \mu\text{m}$ ,  $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}$ ,  $350 \times 350 \times 350 \mu\text{m}$ ,  $400 \times 400 \times 400 \mu\text{m}$ ,  $450 \times 450 \times 450 \mu\text{m}$ , o  $500 \times 500 \times 500 \mu\text{m}$ .

35 La expresión "metabolismo celular", como se usa en la presente memoria, significa el total de todos los procesos químicos que se producen en células vivas que dan como resultado crecimiento, producción de energía, eliminación del material residual y detoxificación de sustancias externas. En el método de la presente invención, el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular del conjunto/conjuntos de células en multicapas, agregado(s) de células, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s), comprendidos en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o  $\text{NADH}/\text{FAD}$ .

40 El término "autofluorescencia", como se usa en la presente memoria, significa la emisión natural de luz por estructuras biológicas tales como mitocondrias y lisosomas, cuando han absorbido luz. Las moléculas autofluorescentes observadas con más frecuencia son NADPH (NADH = forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina) y FAD (FAD = forma oxidada del dinucleótido de flavina y adenina). El metabolismo dentro de una célula, y por lo tanto, en un agregado celular, tejido, organoide u órgano, se puede caracterizar por la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ( $\text{NAD}^+$  = forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina) y/o la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$ . Dichas moléculas funcionan en los mecanismos básicos de generación de energía tales como la glucólisis, ciclo del ácido cítrico y cadena respiratoria como transportador de electrones con el fin de permitir la conversión del difosfato de adenosina (ADP) en el trifosfato de adenosina (ATP) durante la fosforilación oxidativa.

45 Las parejas de oxidorreducción  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  ( $\text{FADH}_2$  = forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina) tienen, dependiendo de su estado de oxidación, un comportamiento fluorescente diferente. En la pareja de oxidorreducción  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , el NADH normalmente es fluorescente entre aproximadamente 400 y 490 nm, si tiene lugar una excitación entre aproximadamente 320 y 350 nm. A diferencia del NADH, el NAD no es fluorescente. En la pareja de oxidorreducción  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$ , el FAD normalmente es fluorescente entre aproximadamente 500 y 560 nm, si tiene lugar una excitación entre aproximadamente 300 y 380 nm o entre aproximadamente 430 y 480 nm. A diferencia del FAD, el  $\text{FADH}_2$  no es fluorescente. Puesto que solo el NADH y no el  $\text{NAD}^+$  tiene este comportamiento de fluorescencia, se puede distinguir entre estos dos componentes de oxidorreducción y puesto que solo el FAD y no el  $\text{FADH}_2$  tiene este comportamiento de fluorescencia, se puede distinguir entre estos dos componentes de oxidorreducción. La relación de  $\text{NAD}^+$  a NADH normalmente es de 0,05 dentro de una célula. Debido a la posición central del NADH y  $\text{NAD}^+$  así como del FAD y  $\text{FADH}_2$  dentro de la función de una célula, también se puede tomar

una decisión sobre el potencial de oxidorreducción intracelular así como sobre el estado de generación de energía y, por lo tanto, sobre el metabolismo celular, basándose en la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD. Una concentración alta de NADH, por ejemplo, representa una eficacia reducida de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, solo la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> muestra un cambio específico que depende de la generación de energía mitocondrial.

La relación de NADH/NAD<sup>+</sup> o la relación de NADH/FAD se determinan preferiblemente con espectrometría, p. ej., con una fuente de luz UV tal como un láser UV y un espectrómetro de UV/VIS. Para este fin, se puede usar un emisor de luz conectado a un espectrómetro de UV/VIS, el cual se pone en contacto con el sitio de medición. Para el NADH, las células en la zona del sitio de medición se pueden excitar con un láser UV que tiene una longitud de onda de 337 nm. La autofluorescencia del NADH se puede medir a una longitud de onda de 450 o 460 nm usando un fotomultiplicador. Para el FAD, las células en la zona del sitio de medición se pueden excitar con un láser UV que tiene una longitud de onda de 330 nm (primer pico de absorción). La autofluorescencia del FAD se puede medir a una longitud de onda de 520 o 530 nm usando un fotomultiplicador. Para el FAD, las células en la zona del sitio de medición se pueden excitar además con un láser UV que tiene una longitud de onda de 450 nm (segundo pico de absorción). La autofluorescencia del FAD también se puede medir a una longitud de onda de 520 o 530 nm usando un fotomultiplicador.

El NADH se activa preferiblemente a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 320 y 340 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 337 nm, p. ej. usando una fuente de luz UV, y la autofluorescencia del NADH se mide preferiblemente a una longitud de onda de entre aproximadamente 400 y 490 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 420 y 460 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 450 o 460 nm, p. ej., usando un espectrómetro de UV/VIS. El FAD preferiblemente se activa a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 330 y 360 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 330 nm, o a una longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 440 y 460 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 450 nm, p. ej., usando una fuente de luz UV, y la autofluorescencia del FAD se mide preferiblemente a una longitud de onda de entre aproximadamente 500 y 560 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 520 y 540 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 520 o 530 nm, p. ej. usando un espectrómetro de UV/VIS.

Se prefiere en particular que la intensidad media de autofluorescencia del NADH y/o FAD se mida y/o que la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD se determine usando el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria. Dicho dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente comprende al menos una fibra de excitación de luz (4) y al menos una fibra de emisión de luz (5). Más preferiblemente, dicho dispositivo de sensor óptico (1) comprende (i) una fibra de excitación de luz UV, (ia) que permite en particular la activación del NADH a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, p. ej. a 337 nm, (ib) que permite en particular la activación del FAD a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm, p. ej. a 330 nm, y/o a una longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480 nm, p. ej. a 450 nm, o (ic) que permite en particular la activación del NADH a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, p. ej. a 337 nm, y que permite en particular la activación del FAD a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm, p. ej. a 330 nm, y/o a una longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480 nm, p. ej. a 450 nm, (ii) una fibra de emisión de NADH (6), que permite en particular la detección de la autofluorescencia del NADH a una longitud de onda de entre aproximadamente 400 y 490 nm, p. ej. a 450 o 460 nm, y/o (iii) una fibra de emisión de FAD (7), que permite en particular la detección de la autofluorescencia del FAD a una longitud de onda de entre aproximadamente 500 y 560 nm., p. ej. a 520 o 530 nm. En cuanto a las realizaciones preferidas de dicho dispositivo de sensor óptico (1), se remite a la presente descripción.

Se prefiere que el método para vigilar el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo la autofluorescencia del NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD comprenda las etapas de:

(i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3),

(ii) activar el NADH y/o FAD comprendidos en la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular (con luz UV), y

(iii) medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o determinar la relación de NADH/FAD en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un primer tiempo de medición y en un segundo tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y

comparar la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación NADH/FAD en el primer tiempo de medición.

El intervalo entre ambos tiempos de medición, es decir, entre el primer y el segundo tiempo de medición durante el cultivo, preferiblemente es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días, 1, 2, 3 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses, o 1 año. El término "cultivo", se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

Se prefiere en particular que la retención de la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) es estable.

Se prefiere además en particular que

(i) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del NADH en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

(ii) una disminución de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

(iii) una disminución de la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado, y/o

(iv) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado.

También se prefiere en particular que

(i) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del NADH en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

(ii) un aumento de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

(iii) un aumento de la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido, y/o

(iv) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

El sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el(los) agregado(s) celular(es), tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, se pueden exponer además a un compuesto de ensayo, en particular a uno o más compuestos de ensayo o a una composición de compuesto de ensayo, p. ej., con el fin de llevar a cabo estudios de exposición a largo plazo del compuesto de ensayo. Esto permite, por ejemplo, determinar si dicho(s) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) impacto en el metabolismo del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular un impacto en el metabolismo del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, p. ej., si el(los) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) una influencia en el NADH, FAD, la relación de NADH/FAD y/o la relación de NADH/NAD<sup>+</sup>.

La aplicación de un compuesto de ensayo al circuito microfluídico, por ejemplo, puede parecerse a la administración intravenosa del compuesto de ensayo, la aplicación de un compuesto de ensayo a la piel comprendido en la sección de crecimiento (3), puede parecerse a la administración dérmica del compuesto de ensayo, la aplicación de un compuesto de ensayo al pulmón, representa la administración del compuesto de ensayo por inhalación, y la aplicación de un compuesto de ensayo al intestino, puede representar la administración oral del compuesto de ensayo.

Por lo tanto, además/adicionalmente se prefiere que dicho sistema de cultivo celular (2) se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de compuesto de ensayo.

En cuanto a la definición de las expresiones “compuesto de ensayo” y “biblioteca”, las realizaciones preferidas del “compuesto de ensayo” y en cuanto a las formas específicas del “compuesto de ensayo” cargadas en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se remite a las definiciones y explicaciones anteriores.

5 Se prefiere en particular que el compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo o la composición de compuesto de ensayo, se cargue(n) en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) antes de medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, antes de determinar la intensidad media de autofluorescencia del FAD, antes de determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o antes de determinar la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición, p. ej. 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 meses, 3, 2, 1 semanas, 6, 5, 4, 3, 2, 1 día(s), 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 hora(s) antes o inmediatamente antes de medir la  
10 intensidad media de autofluorescencia del NADH, antes de medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, antes de determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o antes de determinar la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición. También se prefiere en particular que el compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo o la composición de compuesto de ensayo, se cargue(n) en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) después de medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, después de medir la  
15 intensidad media de autofluorescencia del FAD, después de determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o después de determinar la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición, p. ej. 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 meses, 3, 2, 1 semanas, 6, 5, 4, 3, 2, 1 días, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 horas después o inmediatamente después de medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, después de medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, después de determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o después  
20 de determinar la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición, preferiblemente inmediatamente después de la(s) medición(es) y/o determinación(es) anterior(es) en el primer tiempo de medición. De esta forma, se puede estudiar el efecto del compuesto de ensayo, en particular el uno o más compuestos de ensayo en el sistema de cultivo celular tridimensional.

25 El compuesto de ensayo puede influir o no influir en la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup>, y/o la relación de NADH/FAD. Una alteración de dicha intensidad/intensidades medias de autofluorescencia y/o dicha(s) relación(es) puede ser indicativa del estado metabólico de dicho sistema de cultivo celular (2).

Se prefiere en particular que

30 (i) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del NADH en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

(ii) una disminución de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

35 (iii) una disminución de la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado, y/o

40 (iv) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado.

También se prefiere en particular que

(i) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del NADH en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

45 (ii) un aumento de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

(iii) un aumento de la relación de NADH/FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la relación de NADH/FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha  
50 disminuido, y/o

(iv) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia del FAD en el primer tiempo de medición indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

También se prefiere, adicional o alternativamente, que el método para determinar el estado metabólico del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo la autofluorescencia del NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD comprenda las etapas de:

5 (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3),

(ii) activar el NADH y/o FAD comprendidos en la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular (con luz UV), y

10 (iii) medir la intensidad media de autofluorescencia del NADH, medir la intensidad media de autofluorescencia del FAD, determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o determinar la relación de NADH/FAD en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un punto de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y

15 comparar la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD en dicho tiempo de medición con la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD de un sistema de cultivo celular de control.

20 Se puede medir la intensidad media de fluorescencia del NADH, se puede medir la intensidad media de fluorescencia del FAD, se puede determinar la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o se puede determinar la relación de NADH/FAD en un tiempo de medición de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días, 1, 2, 3 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses, o 1 año después de empezar el procedimiento de cultivo del sistema de cultivo celular tridimensional (2). El término "cultivo", se refiere a un procedimiento complejo que permite el crecimiento, la diferenciación y/o el mantenimiento de células en condiciones controladas, en general fuera de su entorno natural en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

25 El sistema de cultivo celular de control preferiblemente es un sistema que representa el estado metabólico en el punto de inicio del cultivo o en cualquier otro punto interesante durante el cultivo, p. ej., el punto antes/después de la adaptación del fluido, p. ej., sangre o medio, o el punto antes/después del ajuste de las condiciones de cultivo tales como la temperatura, presión y/o pH. Se prefiere que dicho sistema de cultivo celular de control sea un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes, p. ej., un sistema de cultivo celular tridimensional autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Es más preferido que el sistema de cultivo celular de control sea el mismo sistema de cultivo celular tridimensional proporcionado en la etapa (i), p. ej., que representa el estado metabólico en el punto de inicio del cultivo.

35 Se prefiere en particular que la equivalencia de la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD en dicho tiempo de medición, con la intensidad media de fluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la relación de NADH/FAD del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) es estable.

También se prefiere en particular que

40 (i) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del NADH del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

(ii) una disminución de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en dicho tiempo de medición comparada con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

45 (iii) una disminución de la relación de NADH/FAD en dicho tiempo de medición comparada con la relación de NADH/FAD del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado, y/o

(iv) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del FAD del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado.

Se prefiere además en particular que

50 (i) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del NADH del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

(ii) un aumento de la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  en dicho tiempo de medición comparada con la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

5 (iii) un aumento de la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  en dicho tiempo de medición comparada con la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido, y/o

(iv) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del FAD del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

10 Como se ha mencionado antes, el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el(los) agregado(s) celular(es), tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, se pueden exponer además a un compuesto de ensayo, en particular a uno o más compuestos de ensayo o a una composición de compuesto de ensayo, p. ej., con el fin de llevar a cabo estudios de exposición a largo plazo del compuesto de ensayo. Esto permite, por ejemplo, determinar si dicho(s) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo  
15 tiene(n) impacto en el metabolismo del sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular un impacto en el metabolismo del(los) agregado(s) celulares, tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, p. ej., si el(los) compuesto(s) de ensayo o composición de compuesto de ensayo tiene(n) una influencia en el NADH, FAD, la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  y/o la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ .

20 Por lo tanto, se prefiere además/adicionalmente que dicho sistema de cultivo celular (2) se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de compuesto de ensayo, y que el sistema de cultivo celular de control no se trate con un compuesto de ensayo, en particular con uno o más compuestos de ensayo o con una composición de compuesto de ensayo.

25 En cuanto a la definición de las expresiones “compuesto de ensayo” y “biblioteca”, en cuanto a las realizaciones preferidas del “compuesto de ensayo”, y en cuanto a las formas específicas de “compuesto de ensayo” que se carga en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), se remite a las definiciones y explicaciones anteriores.

30 El sistema de cultivo celular de control no tratado con el compuesto de ensayo preferiblemente es un sistema de cultivo celular tridimensional. Se prefiere que el sistema de cultivo celular de control que no se trata con el compuesto de ensayo sea un sistema de cultivo celular tridimensional como se ha descrito antes, p. ej., un sistema de cultivo celular tridimensional autónomo y/o de circulación como se ha descrito antes. Es más preferido que el sistema de cultivo celular de control sea el mismo sistema de cultivo celular tridimensional proporcionado en la etapa (i) pero no tratado con el compuesto de ensayo.

35 El compuesto de ensayo puede influir o no influir en la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , y/o la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$ . Una alteración o una retención de dicha intensidad/intensidades medias de autofluorescencia y/o dicha(s) relación(es) puede ser indicativa del estado metabólico de dicho sistema de cultivo celular (2).

40 Se prefiere en particular que la equivalencia de la intensidad media de autofluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  en dicho tiempo de medición, con la intensidad media de fluorescencia del NADH, la intensidad media de autofluorescencia del FAD, la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y/o la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) es estable.

También se prefiere en particular que

(i) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del NADH del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

45 (ii) una disminución de la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  en dicho tiempo de medición comparada con la relación de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado,

50 (iii) una disminución de la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  en dicho tiempo de medición comparada con la relación de  $\text{NADH}/\text{FAD}$  del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado, y/o

(iv) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del FAD del sistema de cultivo celular de control, indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha aumentado.

Se prefiere además en particular que

(i) un aumento de la intensidad media de autofluorescencia del NADH en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del NADH del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

5 (ii) un aumento de la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> en dicho tiempo de medición comparada con la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido,

(iii) un aumento de la relación de NADH/FAD en dicho tiempo de medición comparada con la relación de NADH/FAD del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido, y/o

10 (iv) una disminución de la intensidad media de autofluorescencia del FAD en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de autofluorescencia del FAD del sistema de cultivo celular de control indique que el metabolismo de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido.

15 Se prefiere que las condiciones de cultivo del sistema de cultivo celular de control descrito antes y el sistema de cultivo celular tridimensional (2) sean iguales y/o que los tiempos de medición en ambos sistemas se emparejen entre sí con el fin de mejorar la compatibilidad de los datos de medición.

20 Preferiblemente, la medición de la intensidad media de autofluorescencia, se lleva a cabo por espectrometría (p. ej., espectrometría UV/VIS), preferiblemente usando un fluorómetro, lector de fluorescencia o microscopio de fluorescencia. Como ya se ha mencionado anteriormente, se prefiere en particular que la intensidad media de autofluorescencia del NADH y/o FAD se mida y/o que la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o de NADH/FAD se determine usando el dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria.

25 El método descrito antes se puede usar en particular para el análisis in vitro de células nerviosas/agregados de células nerviosas, p. ej., ganglios nerviosos/agregados de ganglios nerviosos. Para el establecimiento de un potencial de acción en las células nerviosas, p. ej., los ganglios nerviosos, se requieren notables recursos energéticos. La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa unida a membrana establece el potencial de excitación por el transporte activo de sodio (Na<sup>+</sup>) en la zona extracelular y potasio (K<sup>+</sup>) en el citosol. La energía requerida para este transporte se logra por desfosforilación del ADP. Para la regeneración del transportador de energía, el NADH es oxidado en la cadena respiratoria. Por lo tanto, con la determinación de la relación de NADH<sup>+</sup>/NAD, como se ha descrito antes, se puede hacer una declaración en cuanto al potencial de excitación de las células nerviosas/agregados de células nerviosas, p. ej., ganglios nerviosos/agregados de ganglios nerviosos, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, con el método descrito antes, se puede vigilar un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende células nerviosas/agregados de células nerviosas, p. ej., ganglios nerviosos/agregados de ganglios nerviosos, en particular después de aplicar un compuesto de ensayo.

35 En los métodos descritos antes, se prefiere que la al menos una sección de crecimiento (3) comprende un conjunto de multicapas celulares, un agregado celular, un tejido, un organoide o un órgano. Es más preferido que el agregado celular sea un agregado de células nerviosas, en particular un agregado de ganglios nerviosos. Es más preferido además que el organoide sea un lóbulo hepático, nefronas del riñón, la dermis y/o epidermis de la piel, mucosa intestinal, islotes de Langerhans del páncreas, materia gris y blanca de la corteza cerebral y cerebelo, o nichos de citoblastos que promueven la quiescencia en adultos. También se prefiere más que el órgano sea un micropulmón, microcorazón, micropiel, microintestino, microcerebro, micromédula ósea, microhueso, microbazo, micropáncreas, microtestículos o microhígado. Es particularmente más preferido que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprenda más de una sección de crecimiento (3), p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secciones de crecimiento (3), en donde cada sección de crecimiento (3) comprende el mismo conjunto de multicapas celulares, agregado celular, tejido, organoide u órgano. Por ejemplo, cada sección de crecimiento (3) puede comprender un organoide seleccionado del grupo que consiste en un lóbulo hepático, nefronas del riñón, la dermis y/o epidermis de la piel, mucosa intestinal, islotes de Langerhans del páncreas, materia gris y blanca de la corteza cerebral y cerebelo, y nichos de citoblastos que promueven la quiescencia en adultos. Cada sección de crecimiento (3) puede comprender un órgano seleccionado del grupo que consiste en un micropulmón, microcorazón, micropiel, microintestino, microcerebro, micromédula ósea, microhueso, microbazo, micropáncreas, microtestículos o microhígado. También es particularmente más preferido que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprenda más de una sección de crecimiento (3), p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secciones de crecimiento (3), en donde cada sección de crecimiento (3) comprende otro conjunto de multicapas celulares, agregado celular, tejido, organoide u órgano. Por ejemplo, cada sección de crecimiento (3) puede comprender un organoide seleccionado (independientemente) del grupo que consiste en un lóbulo hepático, nefronas del riñón, la dermis y/o epidermis de la piel, mucosa intestinal, islotes de Langerhans del páncreas, materia gris y blanca de la corteza cerebral y cerebelo, y nichos de citoblastos que promueven la quiescencia en adultos. Cada sección de crecimiento (3) puede comprender un órgano seleccionado (independientemente) del grupo que consiste en un micropulmón, microcorazón, micropiel, microintestino, microcerebro, micromédula ósea, microhueso, microbazo, micropáncreas, microtestículos o microhígado. Por lo tanto, en una realización más preferida, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) es un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de multiagregados de células, multitejidos, multiorganoides y/o

multiórganos, p. ej., un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de multiorganoides, en donde los organoides se seleccionan (independientemente) del grupo que consiste en un lóbulo hepático, nefronas del riñón, la dermis y/o epidermis de la piel, mucosa intestinal, islotes de Langerhans del páncreas, materia gris y blanca de la corteza cerebral y cerebelo, y nichos de citoblastos que promueven la quiescencia en adultos, o un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de multiórganos, en donde los órganos se seleccionan (independientemente) del grupo que consiste en un micropulmón, microcorazón, micropiel, microintestino, microcerebro, micromédula ósea, microhueso, microbazo, micropáncreas, microtestículos o microhígado. Un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de multiórganos se puede denominar también multiórganos en un chip (MOC).

También se describe el uso de un dispositivo de sensor óptico (1) configurado para llevar a cabo el método para determinar y/o vigilar al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), o en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, se selecciona(n) del grupo que consiste en

(i) estado fisiológico,

(ii) vitalidad, y

(iii) estado metabólico,

en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD, de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, los (dos o tres) estados determinados y/o vigilados son (i) el estado fisiológico y la vitalidad, (ii) el estado fisiológico y el estado metabólico, (iii) la vitalidad y el estado metabólico, o (iv) el estado fisiológico, la vitalidad y el estado metabólico, en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia del NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD.

En cuanto a la definición de las expresiones “vitalidad celular”, “metabolismo celular”, “estado fisiológico”, se remite a la presente invención como se define en la presente memoria.

El estado fisiológico preferiblemente es el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o del sistema de cultivo celular tridimensional (2). Se prefiere que se usen los eritrocitos como detectores para determinar el caudal, osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) o del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., (i) el caudal y la osmolalidad fisiológica, (ii) el caudal y el consumo de oxígeno, (iii) la osmolalidad fisiológica y el consumo de oxígeno, o (iv) el caudal, el estado fisiológico y el consumo de oxígeno.

En cuanto a las realizaciones preferidas del método, se remite a la presente invención como se define en la presente memoria.

El dispositivo de sensor óptico (1) se configura preferiblemente para llevar a cabo el método mencionado antes, para determinar y/o vigilar el al menos un estado mencionado antes, p. ej., al menos uno, dos o tres estados, sin contacto y de forma no invasiva, en particular para evitar la intervención directa con el entorno del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril. Por lo tanto, el dispositivo de sensor óptico (1) se configura preferiblemente para permitir la medición desde el exterior del sistema de cultivo celular tridimensional (2), por ejemplo, directamente a través del cuerpo del sistema de cultivo celular tridimensional (2) que puede ser traslúcido, y, por ejemplo, sin contacto directo entre el dispositivo de sensor óptico (1) y el sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., sin inserción del dispositivo de sensor óptico (1) en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular en el(los) agregado(s) celular(es), tejido(s), organoide(s) y/u órgano(s) comprendidos en el mismo, en la al menos una sección de crecimiento (3).

Además, dicho dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente no requiere la manipulación y/o modificación del sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., el sistema de cultivo celular tridimensional (2) autónomo y/o de circulación, estéril, con el fin de llevar a cabo el método anterior para determinar y/o vigilar el al menos un estado mencionado antes, p. ej., al menos uno, dos o tres estados. Dicha manipulación preferiblemente reduce el riesgo de contaminación y mantiene el entorno estéril en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Esto es particularmente importante puesto que el sistema de cultivo celular tridimensional (2) es muy complejo y frágil.

Además, el dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente permite llevar a cabo de forma automática el método anterior, en particular, la vigilancia continua del al menos un estado mencionado antes, p. ej., al menos uno, dos o tres estados.

Además, el dispositivo de sensor óptico (1) tiene la ventaja de que permite llevar a cabo los métodos descritos antes en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) y no solo en una monocapa de células. Como indica su nombre, un sistema de cultivo celular tridimensional (2) es un conjunto tridimensional (3D) de células, p. ej., un agregado celular, un tejido, un organoide o un órgano. Como se ha mencionado antes, el conjunto tridimensional (3D) de células, p. ej., un agregado celular, un tejido, un organoide o un órgano, está preferiblemente comprendido en al menos una sección de crecimiento (3) que es parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2). Dicha sección de crecimiento (3) o al menos una parte de dicha sección de crecimiento (3) que comprende, p. ej., un agregado celular, un tejido, un organoide o un órgano, preferiblemente se mide con el dispositivo de sensor óptico (1). En particular, el dispositivo de sensor óptico (1) permite llevar a cabo los métodos descritos antes en un área de al menos 50x50x50 µm, 100x100x100 µm, 150x150x150 µm, 200x200x200 µm, 250x250x250 µm, 300x300x300 µm, 350x350x350 µm, 400x400x400 µm, 450x450x450 µm, o 500x500x500 µm, más en particular en un área de al menos 500x500x500 µm, p. ej. la determinación de la intensidad media de fluorescencia de todos los colorantes fluorescentes vitales comprendidos en este área, la determinación de la intensidad media de fluorescencia de todas las células comprendidas en este área, y la determinación de la autofluorescencia del NADH y/o FAD en este área. Este área preferiblemente se encuentra dentro del sistema de cultivo celular tridimensional (2) y no en la superficie de dicho sistema, en particular a una profundidad de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µm, más en particular a una profundidad de al menos 500 µm. Más en particular, el dispositivo de sensor óptico (1) permite llevar a cabo los métodos descritos antes en un área de al menos 50x50x50 µm, 100x100x100 µm, 150x150x150 µm, 200x200x200 µm, 250x250x250 µm, 300x300x300 µm, 350x350x350 µm, 400x400x400 µm, 450x450x450 µm o 500x500x500 µm, lo más en particular en un área de al menos 500x500x500 µm, y a una profundidad de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µm, lo más en particular a una profundidad de al menos 500 µm. Esto se basa en el hecho de que el dispositivo de sensor óptico (1) comprende al menos una fibra de excitación (4) que está configurada para excitar células o moléculas, p. ej. NADH y/o FAD, comprendidas en estas células que se encuentran a estas profundidades y/o en estas áreas, y al menos una fibra de emisión (5) que está configurada para detectar todas las señales emitidas por las células o moléculas, p. ej. NADH y/o FAD, comprendidas en estas células que se encuentran a estas profundidades y/o en estas áreas. A diferencia de esto, la técnica anterior solo permite la detección de células fluorescentes o moléculas fluorescente, p. ej. colorantes fluorescentes vitales, en un cultivo celular de monocapa, p. ej., usando un lector fluorescente.

Por consiguiente, el dispositivo de sensor óptico (1) preferiblemente comprende al menos una fibra de excitación de luz (4), p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más fibras de excitación de luz (4), y al menos una fibra de emisión de luz (5), p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más fibras de emisión de luz (5). Un dispositivo de sensor óptico (1) preferido que comprende una fibra de excitación de luz (4) y una fibra de emisión de luz (5) se muestra en la figura 1A.

La expresión "fibra de excitación de luz (4)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación, en particular de una fuente de luz, y/o para suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica. La expresión "fibra de emisión de luz (5)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz de la muestra óptica y/o para suministrarla a un detector de luz.

Se prefiere además que la al menos una fibra de excitación de luz (4) sea una fibra de excitación de luz ultravioleta (UV), una fibra de excitación de luz VIS, una fibra de excitación de luz NIR, una fibra de excitación de luz UV/VIS, una fibra de excitación de luz UV/NIR, una fibra de excitación de luz VIS/NIR o una fibra de excitación de luz UV/VIS/NIR. La expresión "fibra de excitación de luz UV", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz UV, en particular de una fuente de luz tal como de un láser o una diodo de emisión de luz (LED), y para suministrar al menos una parte de la luz UV a la muestra óptica. La luz UV es radiación electromagnética con una longitud de onda más corta que la de la luz visible, pero más larga que los rayos X, en el intervalo entre aproximadamente 10 nm y 400 nm, y energías de 3 eV a 124 eV. La fibra de excitación de luz UV está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 320 y 340 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 337 nm, p. ej. a 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350 nm, que es una longitud de onda adecuada para activar el NADH. La respectiva fuente de luz preferiblemente es un láser, más preferiblemente un láser de nitrógeno (337 nm, 30 Hz), o un diodo de emisión de luz (LED). En otra realización, la fibra de excitación de luz UV está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 330 y 360 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 330 nm, p. ej. a 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375 o 380 nm, y/o la fibra de excitación de luz UV está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480 nm, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 440 y 460 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 450 nm, p. ej. a 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, o 480 nm, que es una longitud de onda adecuada para activar el FAD. La respectiva fuente de luz es preferiblemente un láser, más preferiblemente un láser de nitrógeno o un diodo emisor de luz (LED). La fibra de excitación de luz UV está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, p. ej. a una longitud de onda de 337 nm, que es una longitud de onda adecuada para activar el NADH, y para recibir y suministrar luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm, p. ej. a una longitud de onda de 330 nm, y/o a una

longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480, p. ej. a una longitud de onda de 450 nm, que es una longitud de onda adecuada para activar el FAD. En cuanto a las fuentes de luz preferidas, se remite a lo anterior.

5 La expresión "fibra de excitación de luz VIS" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro VIS, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

La expresión "fibra de excitación de luz NIR" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro NIR, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

10 La expresión "fibra de excitación de luz UV/VIS" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro UV y VIS, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

La expresión "fibra de excitación de luz UV/NIR" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro UV y NIR, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

15 La expresión "fibra de excitación de luz VIS/NIR" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro VIS y NIR, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

20 La expresión "fibra de excitación de luz UV/VIS/NIR" se refiere a una fibra configurada para recibir luz de excitación en el intervalo del espectro UV, VIS y NIR, en particular de una fuente de luz, y suministrar al menos una parte de la luz de excitación a la muestra óptica.

Adicional o alternativamente, también se prefiere que la al menos una fibra de emisión de luz (5) se seleccione del grupo que consiste en

(i) una fibra de emisión de NADH (6),

(ii) una fibra de emisión de FAD (7),

25 (iii) una fibra de emisión de fluorescencia (8), y

(iv) una fibra de emisión de infrarrojo (9).

Un dispositivo de sensor óptico (1) preferido comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9), y se muestra en la figura 1B.

30 Más preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) comprende

(i) una fibra de emisión de NADH (6) y una fibra de emisión de FAD (7),

(ii) una fibra de emisión de NADH (6) y una emisión de fluorescencia (8),

(iii) una fibra de emisión de NADH (6) una fibra de emisión de infrarrojo (9),

(iv) una fibra de emisión de FAD (7) y una fibra de emisión de fluorescencia (8),

35 (v) una fibra de emisión de FAD (7) y una fibra de emisión de infrarrojo (9)

(vi) una fibra de emisión de fluorescencia (8) y una fibra de emisión de infrarrojo (9),

(vi) una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), y una fibra de emisión de fluorescencia (8),

(vii) una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9),

40 (viii) una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), y una fibra de emisión de infrarrojo (9),

(ix) una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), y una fibra de emisión de infrarrojo (9),

(x) una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9), y

45 (xi) una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9).

El dispositivo de sensor óptico (1) lo más preferiblemente es un dispositivo de combinación que comprende al menos una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6) y una fibra de emisión de FAD (7).

La expresión "fibra de emisión de NADH (6)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz de NADH (o autofluorescencia de NADH) de una muestra óptica y suministrarla a un detector de luz. La fibra de emisión de NADH (6) está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz (o autofluorescencia) a una longitud de onda de entre aproximadamente 400 y 490 nm, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 420 y 460 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 450 nm o 460 nm, p. ej. a 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485 o 490 nm. Como ya se ha mencionado, el NADH puede ser activado a una longitud de onda de entre aproximadamente 320 y 350 nm, p. ej. a 337 nm, y la autofluorescencia del NADH se puede medir a una longitud de onda de entre aproximadamente 400 y 490 nm, p. ej. a 450 o 460 nm.

La expresión "fibra de emisión de FAD (7)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz de FAD (o autofluorescencia de FAD) de la muestra óptica y suministrarla a un detector de luz. La fibra de emisión de FAD (7) está configurada más preferiblemente para recibir y suministrar luz (o autofluorescencia) a una longitud de onda de entre aproximadamente 500 y 560 nm, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 520 y 540 nm, y lo más preferiblemente a una longitud de onda de 520 o 530 nm, p. ej. a 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, o 560 nm. Como ya se ha mencionado antes, el FAD puede ser activado a una longitud de onda de entre aproximadamente 300 y 380 nm o a una longitud de onda de entre aproximadamente 430 y 480 nm y la autofluorescencia del FAD se puede medir a una longitud de onda de entre aproximadamente 500 y 560 nm, p. ej. a 520 o 530 nm.

La expresión "fibra de emisión de fluorescencia (8)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz fluorescente de la muestra óptica y suministrarla a un detector de luz. La fluorescencia es la emisión de luz por una muestra óptica que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética. Es una forma de luminiscencia. En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda mayor, y por lo tanto menor energía, que la radiación absorbida. El espectro de emisión está dominado por una línea UV de onda corta a 254 nm, acompañada por emisión de luz visible a 436 nm (azul), 546 nm (verde) y 579 nm (amarillo-naranja). La fibra de emisión de fluorescencia (8) está configurada más preferiblemente para recibir luz a una longitud de onda de entre 500 y 620 nm, preferiblemente a una longitud de onda de 517 o 602 nm.

La expresión "fibra de emisión de infrarrojo (IR) (9)", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fibra configurada para recibir luz infrarroja (IR) de la muestra óptica y suministrarla a un detector de luz. La luz infrarroja (IR) es radiación electromagnética con longitudes de onda mayores que las de la luz visible, que se extiende desde el borde de rojo nominal del espectro visible a 0,74 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) a 300  $\mu\text{m}$ . Este intervalo de longitudes de ondas corresponde a un intervalo de frecuencia de aproximadamente 1 a 400 THz, e incluye la mayor parte de la radiación térmica emitida por objetos cercanos a temperatura ambiente. La fibra de emisión de IR (9) está configurada lo más preferiblemente para recibir luz en el espectro del IR cercano.

La fuente de luz preferiblemente es un láser o un diodo de emisión de luz (LED). Más preferiblemente, el láser es un láser de nitrógeno, láser de argón o láser de TiSa.

El detector de luz preferiblemente es un espectrómetro, más preferiblemente un espectrómetro de UV, espectrómetro de VIS, espectrómetro de NIR, espectrómetro de UV/VIS, espectrómetro de UV/NIR, espectrómetro de VIS/NIR o un espectrómetro de UV/VIS/NIR, lo más preferiblemente un espectrómetro de UV/VIS/NIR.

La muestra óptica preferiblemente es el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular una parte del mismo, p. ej., el al menos un canal microfluídico, el al menos un depósito de fluido, p. ej., depósito de medio y/o sangre, la al menos una sección de crecimiento (3) o la al menos una parte del mismo comprendido en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). La al menos sección de crecimiento (3) preferiblemente comprende un agregado celular, un tejido, un organoide o un órgano.

Se prefiere además que la al menos una fibra de excitación de luz (4) y que la al menos una fibra de emisión de luz (5) tengan una forma redonda o cuadrada. El uso de fibra(s) de excitación de luz (4) y fibra(s) de emisión de luz (5) que tienen una forma cuadrada tiene la ventaja de que se puede lograr una densidad de fibra mayor con una circunferencia constante del dispositivo de sensor óptico (1).

Además, preferiblemente o alternativamente, se prefiere que la fibra de excitación de luz redonda tenga un diámetro más pequeño que la fibra de emisión de luz redonda y/o que la fibra de excitación de luz cuadrada tenga una longitud de borde menor que la fibra de emisión de luz cuadrada. Esto tiene la ventaja de que es posible una detección integral de la señal de emisión. Por lo tanto, la transmisión de los datos es más precisa.

Las fibras (de emisión y/o excitación) comprendidas en el dispositivo de sensor óptico (1) se disponen preferiblemente en paralelo. Esto, de nuevo tiene la ventaja de que aumenta la densidad de empaquetamiento del dispositivo de sensor óptico (1).

Preferiblemente o alternativamente, también se prefiere que las fibras estén recubiertas con una capa aislante (10), preferiblemente una capa aislante de aluminio o adhesivo epoxídico, o el espacio entre las fibras se llena con un material aislante (11), preferiblemente un material aislante de adhesivo epoxídico.

5 Un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8) y una fibra de emisión de infrarrojo (9), en donde cada fibra está recubierta con una capa aislante (10), se muestra en la figura 1C.

Además, un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8) y una fibra de emisión de infrarrojo (9), en donde el espacio entre fibras está relleno con un material aislante (10), se muestra en la figura 1D.

10 En una realización preferida, el dispositivo de sensor óptico (1) está comprendido en un aparato (12) para la operación automática de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3).

Preferiblemente, el aparato (12) comprende una plataforma portadora (13) configurada para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 sistemas de cultivo celular tridimensionales (2), p. ej. al menos 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más sistemas de cultivo celular tridimensionales (2), que comprenden al menos una sección de crecimiento (3), más preferiblemente entre 1 y 2000 secciones de crecimiento (3), p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 100, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, o más secciones de crecimiento (3). En un formato preferido de tipo placa de microvaloración, están dispuestas 2, 4, 6, 24, 96, 384 o incluso 1536 secciones de crecimiento (3) en una matriz rectangular 2:3 en el sistema de cultivo celular tridimensional (2).

Preferiblemente, la plataforma portadora (13) comprende al menos una abertura, más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 aberturas, p. ej. al menos 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aberturas, y/o al menos un elemento de elevación, más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 elementos de elevación, p. ej. al menos 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más elementos de elevación, configurados para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2).

30 En cuanto a las definiciones de las expresiones "sistema de cultivo celular tridimensional (2)" y "sección de crecimiento (3)" y en cuanto a las realizaciones preferidas del "sistema de cultivo celular tridimensional (2)" y la "sección de crecimiento (3)", se remite a la presente invención como se describe en la presente memoria. Se prefiere en particular que el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecho de un material traslúcido, p. ej., de vidrio, tal como vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de calcio o vidrio de cuarzo o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva de el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular con dispositivo de sensor óptico (1). En particular, permite el análisis de el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

La plataforma portadora (13) preferiblemente se puede ajustar en temperatura. Esto permite el ajuste fácil de la temperatura de cultivo del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), que puede ser recibido por la plataforma portadora (13). La temperatura del cultivo preferiblemente es 37°C.

Se prefiere que la plataforma portadora (13), que comprende en particular al menos un elemento de elevación configurado para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecho también de un material traslúcido, preferiblemente vidrio, más preferiblemente vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de calcio o vidrio de cuarzo o plástico. El uso de un material traslúcido para la plataforma portadora (13) facilita la observación y/o el análisis de el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), que puede ser recibido por la plataforma portadora (13) con el dispositivo de sensor óptico (1).

Se prefiere que la plataforma portadora (13) comprenda una primera superficie (14) configurada para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) y una segunda superficie (15) colocada opuesta a la primera superficie (14). Se prefiere en particular que el dispositivo de sensor óptico (1) esté situado en la segunda superficie (15) o en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13).

Preferiblemente, el aparato 12 comprende además una unidad funcional (16). Se prefiere en particular que la unidad funcional (16) esté situada en la primera superficie (14) o en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13).

Se prefiere más en particular que la unidad funcional (16) esté situada en una superficie diferente de la del dispositivo de sensor óptico (1). Lo más preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) está situado en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13), mientras que la unidad funcional (16) está situada en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13).

La unidad funcional (16) está configurada preferiblemente para permitir la carga, intercambio y/o aplicación de material. Preferiblemente, la unidad funcional (16) comprende un sistema de inyección (17), un sistema de rechazo (18) o una combinación de los mismos (17/18). El sistema de inyección (17) está configurado para permitir el suministro/aplicación de material, p. ej., suministro de fluido tal como suministro de medio o sangre, la aplicación de sustancias tales como nutrientes, la aplicación de las sustancias de ensayo o colorantes fluorescentes para células vivas, p. ej., por un puerto de inyección que es parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2), y/o el sistema de rechazo (18) está configurado para permitir la eliminación de material, p. ej., eliminación de fluido tal como eliminación de medio o sangre, p. ej., por un puerto de rechazo que es parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2). En una realización preferida, el sistema de inyección y/o rechazo (17/18) es una pipeta (p. ej., una pipeta multicanal). Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprende un puerto, que permite la inyección así como el rechazo de material, p. ej., la eliminación/intercambio de fluido tal como medio y/o sangre.

En una realización preferida, el aparato (12) comprende al menos un, preferiblemente 2 o 3, elemento(s) de soporte, p. ej., puente(s) sencillo(s) (26) y/o puente(s) doble(s) (23), y/o una placa base (22). Se prefiere que el al menos un, preferiblemente 2 o 3, elemento(s) de soporte, p. ej., puente(s) sencillo(s) (26) y/o puente(s) doble(s) (23), esté(n) conectado(s) con la placa base (22).

Preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en dicho elemento de soporte. La unidad funcional (16) también puede estar dispuesta en dicho elemento de soporte. Se prefiere en particular que el dispositivo de sensor óptico (1) y la unidad funcional (16) estén dispuestos en dicho elemento de soporte.

Más preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en un puente sencillo (26) o puente doble (23). La unidad funcional (16) también puede estar dispuesta en un puente sencillo (26) o puente doble (23). El un puente sencillo (26) comprende preferiblemente un (primer) elemento de pasarela (27). Se prefiere en particular que el dispositivo de sensor óptico (1) esté situado en el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26). La unidad funcional (16) también puede estar situada en el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26). Preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) y la unidad funcional (16) están dispuestos en diferentes puentes sencillos (26). En este caso, el dispositivo de sensor óptico (1) y la unidad funcional (16) están situados preferiblemente uno frente a otro.

El puente doble (23) preferiblemente comprende un primer elemento de pasarela (24) y un segundo elemento de pasarela (25). El dispositivo de sensor óptico (1) puede estar situado en el primer elemento de pasarela (24) o en el segundo elemento de pasarela (25). La unidad funcional (16) también puede estar situada en el primer elemento de pasarela (24) o en el segundo elemento de pasarela (25). Es más preferido que el dispositivo de sensor óptico (1) y la unidad funcional (16) estén dispuestos en un puente doble (23). Lo más preferido es que el dispositivo de sensor óptico (1) esté situado en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23). Dicho puente doble (23) preferiblemente comprende además la unidad funcional (16) que está situada en el primer elemento de pasarela (24).

El primer elemento de pasarela (24) descrito antes del puente doble (23) está situado en particular en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) y el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23) está situado en particular en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13).

Además, el (primer) elemento de pasarela (27) descrito antes del puente sencillo (26) puede estar situado en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) o en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13).

Se prefiere además que la plataforma portadora (13) esté conectada con el al menos un, preferiblemente 2 o 3, elemento(s) de soporte, p. ej., puente(s) sencillo(s) (26) y/o puente(s) doble(s) (23).

En una realización preferida, el aparato (12) que comprende el dispositivo de sensor óptico (1) contiene al menos un, preferiblemente 2 o 3, elementos de soporte móviles, p. ej., puente(s) sencillo(s) móvil(es) (26) y/o puente(s) doble(s) móvil(es) (23). Preferiblemente, dicho al menos un, preferiblemente 2 o 3, elemento(s) de soporte, p. ej., puente(s) sencillo(s) (26) y/o puente(s) doble(s) (23), es(son) móviles a lo largo del eje longitudinal de la placa base (22) y/o la plataforma portadora (13). Más preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) está situado en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23) móvil. Dicho puente doble (23) móvil preferiblemente comprende además la unidad funcional (16) que está situada en el primer elemento de pasarela (24). La plataforma portadora (13) y la placa base (22) están dispuestas preferiblemente en paralelo.

En una realización preferida adicional, el dispositivo de sensor óptico (1) es móvil a lo largo del eje longitudinal y/o el eje lateral de la plataforma portadora (13) y/o la placa base (22). La unidad funcional (16) también puede ser móvil a lo largo del eje longitudinal y/o eje lateral de la plataforma portadora (13) y/o la placa base (22).

En otra realización preferida, el dispositivo de sensor óptico (1) es móvil hacia la plataforma portadora (13). Preferiblemente, el dispositivo de sensor óptico (1) que está dispuesto en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23) es móvil hacia la plataforma portadora (13). Más preferiblemente, la al menos una fibra de excitación de luz (4) y la al menos una fibra de emisión de luz (5) en dicho dispositivo de sensor óptico (1) son móviles hacia la plataforma portadora (13), o el haz de fibras de las fibras de excitación de luz y emisión de luz (19)

es móvil hacia la plataforma portadora (13). Lo más preferiblemente, la al menos una fibra de excitación de luz (4) y la al menos una fibra de emisión de luz (5) comprendidas en dicho dispositivo de sensor óptico (1) que está dispuesto en el segundo elemento de pasarela (25) en el puente doble (23), son móviles hacia la plataforma portadora (13). La unidad funcional (16) también puede móvil hacia la plataforma portadora (13). La unidad funcional (16) que está dispuesta en el primer elemento de pasarela (24) del puente doble (23) puede ser móvil hacia la plataforma portadora (13). Más preferiblemente, el sistema de inyección (17), sistema de rechazo (18) o una combinación de los mismos (17/18) comprendido en dicha unidad funcional (16) es móvil hacia la plataforma portadora (13). Más preferiblemente, el sistema de inyección (17), sistema de rechazo (18) o una combinación de los mismos (17/18) comprendido en dicha unidad funcional (16) que está dispuesto en el primer elemento de pasarela (24) del puente doble (23) es móvil hacia la plataforma portadora (13). La distancia entre el dispositivo de sensor óptico (1) y la plataforma portadora (13) es entre 0 y 1 mm, preferiblemente entre 0 y 500  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente 0  $\mu\text{m}$ .

La plataforma portadora (13) del aparato (12) está configurada además preferiblemente para recibir una muestra de medio (20) y/o una muestra de compuesto de ensayo (21), p. ej., para suministrar el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por la unidad funcional (16), p. ej., el sistema de inyección (17), con medio, y/o para aplicar a el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por la unidad funcional (16), p. ej., el sistema de inyección (17), el compuesto de ensayo.

Una disposición preferida del dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria en el aparato (12) como se ha descrito antes, se muestra en la figura 2.

También se describe el uso de un dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria, para determinar y/o vigilar al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado, preferiblemente dos o tres estados, se selecciona(n) del grupo que consiste en

- (i) estado fisiológico,
- (ii) vitalidad, y
- (iii) estado metabólico,

en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD, de acuerdo con la presente invención. En cuanto a la determinación o vigilancia del al menos un estado mencionado antes, preferiblemente dos o tres estados, en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), se remite a las definiciones y realizaciones preferidas como se describen en el contexto de la presente invención.

También se describe el uso de un dispositivo de sensor óptico (1) descrito en la presente memoria, para la vigilancia del efecto de un compuesto de ensayo y/o para determinar la eficacia, efectos secundarios, bioseguridad, metabolitos, modo de acción o regeneración de órganos. En cuanto a la definición de la expresión "compuesto de ensayo" y en cuanto a las realizaciones preferidas del "compuesto de ensayo", se remite a la presente invención como se define en la presente memoria.

También se describe un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende al menos una fibra de excitación de luz (4), p. ej. al menos 1, 2, 3, 4, 5, o más fibras de excitación de luz (4), y al menos una fibra de emisión de luz (5), p. ej. al menos 1, 2, 3, 4, 5, o más fibras de emisión de luz (5). Preferiblemente, la al menos una fibra de emisión de luz (5) se selecciona del grupo que consiste en

- (i) una fibra de emisión de NADH (6),
- (ii) una fibra de emisión de FAD (7),
- (iii) una fibra de emisión de fluorescencia (8), y
- (iv) una fibra de emisión de infrarrojo (9).

Dicho dispositivo de sensor óptico (1) está configurado preferiblemente para llevar a cabo el método para la determinar y/o vigilar al menos un estado en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado se selecciona del grupo que consiste en

- (i) estado fisiológico,
- (ii) vitalidad, y
- (iii) estado metabólico,

en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia de NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD, de acuerdo con la presente invención.

5 En cuanto a la definición de las expresiones "fibra de excitación de luz (4)", "fibra de emisión de luz (5)", "fibra de emisión de NADH (6)", "fibra de emisión de FAD (7)", "fibra de emisión de fluorescencia (8)", y "fibra de emisión de infrarrojo (9)" y en cuanto a otras realizaciones preferidas del dispositivo de sensor óptico (1), se remite a la presente descripción. En cuanto al método que se lleva a cabo preferiblemente con el dispositivo de sensor óptico (1) y en  
10 cuanto a las definiciones específicas usadas en este contexto, se remite a la presente invención como se define en el presente documento.

También se describe un aparato (12) para el establecimiento y/u operación automático del sistema de cultivo celular tridimensional (2), que comprende

(i) una plataforma portadora (13) configurada para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3),

15 (ii) al menos una unidad funcional (16),

(iii) al menos un dispositivo de sensor óptico (1),

(iv) al menos un elemento de soporte (p. ej. 1, 2, o 3 elementos de soporte), preferiblemente al menos un puente doble (23) o al menos dos puentes sencillos (26), y

(v) una placa base (22),

20 en donde el al menos un elemento de soporte, preferiblemente al menos un puente doble (23) o al menos dos puentes sencillos (26), está(n) conectados con la placa base (22), la al menos una unidad funcional (16) y/o el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en el al menos un elemento de soporte, preferiblemente al menos un puente doble (23) o al menos dos puentes sencillos (26) (p. ej., la al menos una unidad funcional (16) está  
25 dispuesta en un puente sencillo (26) y el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en otro puente sencillo (26)), y la al menos una unidad funcional (16) y el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) están situados uno frente a otro.

La disposición específica de la al menos una unidad funcional (16) y de el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) en el aparato (12) tiene la ventaja de que permite (i) el suministro simultáneo a el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) de material, p. ej. fluidos tales como medios y/o sangre, sustancias tales como nutrientes,  
30 sustancias de ensayo y/o productos químicos tales como colorantes fluorescentes para células vivas, por la unidad funcional (16), y (ii) la vigilancia de el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) por el dispositivo de sensor óptico (1).

Preferiblemente, la plataforma portadora (13) comprende al menos un abertura, más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 aberturas, p. ej. al menos 1, 10,  
35 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aberturas, y/o al menos un elemento de elevación, más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 elementos de elevación, p. ej. al menos 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más elementos de elevación, configurados para recibir un sistema de cultivo celular tridimensional (2).

40 En cuanto a la definición de las expresiones "sistema de cultivo celular tridimensional (2)" y "sección de crecimiento (3)" y en cuanto a las realizaciones preferidas del "sistema de cultivo celular tridimensional (2)" y la "sección de crecimiento (3)", se remite a la presente invención como se define en el presente documento. Se prefiere en particular que el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular el cuerpo del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecho de un material traslúcido, p. ej., de vidrio, tal como vidrio de  
45 carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo, o plástico. Esto permite la observación sin contacto y no invasiva del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular con el dispositivo de sensor óptico (1). En particular, permite el análisis del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) desde el exterior.

La plataforma portadora (13) preferiblemente se puede ajustar de temperatura. Esto permite el ajuste fácil de la temperatura del cultivo del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), que puede ser recibido por la  
50 plataforma portadora (13). La temperatura del cultivo preferiblemente es 37°C.

Se prefiere que la plataforma portadora (13), que comprende en particular al menos un elemento de elevación configurado para recibir al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), esté hecha también de un material traslúcido, preferiblemente vidrio, más preferiblemente vidrio de carbonato de calcio/bicarbonato de sodio o vidrio de cuarzo, o plástico. El uso de un material traslúcido para la plataforma portadora (13) facilita la observación y/o el

análisis del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), que puede ser recibido por la plataforma portadora (13) desde el exterior, en particular con el dispositivo de sensor óptico (1).

La plataforma portadora (13) preferiblemente comprende una primera superficie (14) configurada para recibir el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2) y una segunda superficie (15) situada opuesta a la primera superficie (14). La al menos una unidad funcional (16) puede estar situada en la primera superficie (14) o en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13). Se prefiere en particular que la al menos una unidad funcional (16) esté situada en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13). El al menos un dispositivo de sensor óptico (1) puede estar situado en la segunda superficie (15) o en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13). Se prefiere en particular que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) esté situado en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13). Es más preferido en particular que la al menos una unidad funcional (16) esté situada en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) y que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) esté situado en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13). La al menos una unidad funcional (16) está configurada preferiblemente para permitir la carga, intercambio y/o aplicación de material. Preferiblemente, la al menos una unidad funcional (16) comprende un sistema de inyección (17), un sistema de rechazo (18), o una combinación de los mismos (17/18). El sistema de inyección (17) está configurado para permitir el suministro/aplicación de material, p. ej., suministro de fluido tal como suministro de medio o sangre, la aplicación de sustancias tales como nutrientes, la aplicación de sustancias de ensayo o colorantes fluorescentes para células vivas, p. ej., por un puerto de inyección que es parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2), y/o el sistema de rechazo (18) está configurado para permitir la eliminación de material, p. ej., eliminación de fluido tal como eliminación de medio o sangre, p. ej. por un puerto de rechazo que es parte del sistema de cultivo celular tridimensional (2). En una realización preferida, el sistema de inyección y/o rechazo (17/18) es una pipeta (p. ej. una pipeta multicanal). Preferiblemente, el sistema de cultivo celular tridimensional (2) comprende un puerto que permite la inyección, así como el rechazo de material, p. ej., la eliminación/intercambio de fluido tal como medio y/o sangre.

Se prefiere que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) esté configurado para permitir la vigilancia sin contacto, no invasiva, del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2).

Preferiblemente, la plataforma portadora (13) está unida a el al menos un elemento de soporte, p. ej. 1, 2 o 3 elementos de soporte, y/o la placa base (22) está unida a el al menos un elemento de soporte, p. ej. 1, 2 o 3 elementos de soportes.

Se prefiere que la al menos una unidad funcional (16) o el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) esté dispuesto en un puente sencillo (26). Por ejemplo, la al menos una unidad funcional (16) está dispuesta en un puente sencillo (26) y el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en otro puente sencillo (26), con la condición de que la al menos una unidad funcional (16) y que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) estén situados opuestos uno respecto al otro.

También se prefiere que la al menos una unidad funcional (16) o el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) esté dispuesto en un puente doble (23). Por ejemplo, la al menos una unidad funcional (16) está dispuesta en un puente doble (23) y el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) está dispuesto en otro puente doble (23), con la condición de que la al menos una unidad funcional (16) y que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) estén situados opuestos uno respecto al otro.

Es más preferido que la al menos una unidad funcional (16) y que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) estén dispuestos en un puente doble (23).

Se prefiere en particular que el puente sencillo (26) comprenda un (primer) elemento de pasarela (27). La unidad funcional (16) puede estar situada en el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26) y/o el dispositivo de sensor óptico (1) puede estar situado en el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26). Por ejemplo, la al menos una unidad funcional (16) está situada en el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26) y el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) está situado en el (primer) elemento de pasarela (27) de otro puente sencillo (26), con la condición de que la al menos una unidad funcional (16) y que el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) estén situados opuestos uno respecto al otro. En particular es más preferido que el puente doble (23) comprenda un primer elemento de pasarela (24) y un segundo elemento de pasarela (25). La unidad funcional (16) puede estar situada en el primer elemento de pasarela (24) y el dispositivo de sensor óptico (1) puede estar situado en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23), o la unidad funcional (16) puede estar situada en el segundo elemento de pasarela (25) y el dispositivo de sensor óptico (1) puede estar situado en el primer elemento de pasarela (24) del puente doble (23). En particular lo más preferido es que la al menos una unidad funcional (16) está situada en el primer elemento de pasarela (24) y que el dispositivo de sensor óptico (1) está situado en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23).

El primer elemento de pasarela (24) del puente doble (23) descrito antes, está situado en particular en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) y el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23) está situado en particular en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13).

Además, el (primer) elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26) descrito antes, puede estar situado en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) o en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13).

5 Se prefiere además que la plataforma portadora (13) y la placa base (22) estén dispuestas en paralelo. Se prefiere además en particular que la al menos una unidad funcional (16) y/o el al menos un dispositivo de sensor óptico (1) se puedan mover uno respecto a otro. Esto permite dirigir de forma separada o en común el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej., con el fin de cambiar el fluido, p. ej. medio y/o sangre, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) por la unidad funcional (16), suministrar un compuesto de ensayo al sistema de cultivo celular tridimensional (2) por la unidad funcional (16) y vigilar el efecto del compuesto de ensayo en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) por el dispositivo de sensor óptico (1), en particular en el mismo tiempo de medición durante el cultivo.

10 Se prefiere en particular que la plataforma portadora (13) sea móvil a lo largo del eje longitudinal de la placa base (22) y/o el elemento de soporte, p. ej. puente doble (23) o puente sencillo (26). También se prefiere en particular que la unidad funcional (16) y/o el dispositivo de sensor óptico (1) sean móviles a lo largo del eje lateral de la plataforma portadora (13). Se prefiere además en particular que el dispositivo de sensor óptico (1) sea móvil hacia la plataforma portadora (13) y/o la unidad funcional (16) sea móvil hacia la plataforma portadora (13). En particular es más preferido que el haz de fibras de excitación de luz y de emisión de luz (19) comprendido en el dispositivo de sensor óptico (1) sea móvil hacia la plataforma portadora (13) y/o que la combinación del sistema de inyección/rechazo (17/18) comprendida en la unidad funcional (16) sea móvil hacia la plataforma portadora (13). Como se ha mencionado antes, el dispositivo de sensor óptico (1) permite la vigilancia sin contacto y no invasiva del al menos un cultivo celular tridimensional. Por lo tanto, dicho dispositivo de sensor óptico (1) se puede llevar cerca del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), pero nunca se inserta o introduce en dicho sistema. Preferiblemente, la distancia entre el dispositivo de sensor óptico (1) y la plataforma portadora (13) es entre 0 y 1 mm, preferiblemente entre 0 y 500 µm, más preferiblemente 0 µm.

25 El aparato (12) preferiblemente está equipado además con una unidad de control que permite la operación de dicho aparato (12) de una forma automática. Dicho aparato permite el establecimiento y/u operación automática del al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), más preferiblemente entre 1 y 500, incluso más preferiblemente entre 25 y 200, y lo más preferiblemente entre 25 y 150 sistemas de cultivo celular tridimensionales (2), p. ej. al menos 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más sistemas de cultivo celular tridimensionales (2). El establecimiento y/u operación automática de los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) es económico y además ahorra tiempo en comparación con la operación manual de los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2).

30 El establecimiento automático del sistema de cultivo celular tridimensional (2) preferiblemente comprende las etapas de (i) sembrar células tales como células endoteliales, en particular por la al menos una unidad funcional (16) del aparato (12), en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por el puerto de inyección de dicho sistema, y/o (ii) incubar el sistema de cultivo celular tridimensional (2), al menos hasta que se haya formado un cultivo celular, cultivo tisular u organoide en el sistema de cultivo celular tridimensional (2). Opcionalmente, el establecimiento automático del sistema de ensayo (11) comprende además, la etapa de inyectar sangre entera o medio, en particular por la al menos una unidad funcional (16) del aparato (12), en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por el puerto de inyección de dicho sistema.

35 La operación automática del sistema de cultivo celular tridimensional (2) preferiblemente comprende las etapas de intercambio de fluido, p. ej. intercambio de sangre y/o medio, en particular por la al menos una unidad funcional (16) del aparato (12), llevar a cabo los ensayos de toxicidad normalizados, es decir, ensayos para estudiar el efecto tóxico de una o más sustancias de ensayo sobre el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), p. ej. aplicando el compuesto de ensayo, en particular por el puerto de inyección, al sistema de cultivo celular tridimensional (2), y llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención, en particular por el dispositivo de sensor óptico (1) del aparato (12).

40 La plataforma portadora (13) del aparato (12) está además preferiblemente configurada para recibir una muestra de medio (20) y/o una muestra de compuesto de ensayo (21), p. ej. para suministrar a el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por la unidad funcional (16), p. ej. sistema de inyección (17), medios, y/o para aplicar a el al menos un sistema de cultivo celular tridimensional (2), en particular por la unidad funcional (16), p. ej. el sistema de inyección (17), el compuesto de ensayo.

45 Un aparato (12) preferido para el establecimiento y/u operación automática de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) descrito en la presente memoria, que comprende un dispositivo de sensor óptico (1) se muestra en la figura 2.

Lista de números de referencia

- (1) dispositivo de sensor óptico
- (2) sistema de cultivo celular tridimensional

- (3) sección de crecimiento
- (4) fibra de excitación de luz
- (5) fibra de emisión de luz
- (6) fibra de emisión de NADH
- 5 (7) fibra de emisión de FAD
- (8) fibra de emisión de fluorescencia
- (9) fibra de emisión de infrarrojo
- (10) capa de aislamiento
- (11) material aislante
- 10 (12) aparato
- (13) plataforma portadora
- (14) primera superficie de la plataforma portadora
- (15) segunda superficie de la plataforma portadora
- (16) unidad funcional
- 15 (17) sistema de inyección
- (18) sistema de rechazo
- (19) haz de fibras de fibras de excitación de luz y de emisión de luz
- (20) muestra de medio
- (21) muestra de compuesto de ensayo
- 20 (22) placa base
- (23) puente doble
- (24) primer elemento de pasarela
- (25) segundo elemento de pasarela
- (26) puente sencillo
- 25 (27) elemento de pasarela

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Cortes transversales de dispositivos de sensores ópticos (1). (A) Corte transversal de un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4) y una fibra de emisión de luz (5); (B) corte transversal de un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9); (C) corte transversal de un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9), en donde cada fibra está recubierta con una capa aislante (10); y (D) corte transversal de un dispositivo de sensor óptico (1) que comprende una fibra de excitación de luz (4), una fibra de emisión de NADH (6), una fibra de emisión de FAD (7), una fibra de emisión de fluorescencia (8), y una fibra de emisión de infrarrojo (9), en donde el espacio entre las fibras está relleno con un material aislante (11).

Figura 2: Muestra un dibujo de un aparato (12) para el establecimiento y/u operación automática de un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende (i) una plataforma portadora (13) que lleva sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) que comprenden una sección de crecimiento (3), (ii) una unidad funcional (16) que comprende una combinación de un sistema de inyección/rechazo (17/18), (iii) un dispositivo de sensor óptico (1) con haces de fibras de fibras de excitación de luz y de emisión de luz (19), (iv) un puente doble (23) y dos puentes sencillos (26), y (v) una placa base (22), en donde el un puente doble (23) y los dos puentes sencillos (26) están conectados con la placa base (22), la una unidad funcional (16) que comprende una combinación de un sistema de inyección/rechazo (17/18) y/o el un dispositivo de sensor óptico (1) están dispuestos opuestos uno respecto al otro

en el puente doble (23). La plataforma portadora (13) es ajustable en temperatura y está hecha de un material traslúcido. Los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) también están hechos de un material traslúcido. La plataforma portadora (13) comprende una primera superficie (14) que lleva los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) y una segunda superficie (15) situada opuesta a la primera superficie (14). El puente doble (23) comprende un primer elemento de pasarela (24) y un segundo elemento de pasarela (25). Dicho primer elemento de pasarela (24) del puente doble (23) está situado en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13) y el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23) está situado en la segunda superficie (15) de la plataforma portadora (13). La una unidad funcional (16) que comprende una combinación de un sistema de inyección/rechazo (17/18) está situada en el primer elemento de pasarela (24) y el dispositivo de sensor óptico (1) está situado en el segundo elemento de pasarela (25) del puente doble (23). Los dos puentes sencillos (26) comprenden un elemento de pasarela (27). Dicho elemento de pasarela (27) del puente sencillo (26) está situado en la primera superficie (14) de la plataforma portadora (13). La plataforma portadora (13) está unida además al un puente doble (23) y los dos puentes sencillos (26). La plataforma portadora (13) del aparato (12) lleva además una muestra de medio (20) y una muestra de compuesto de ensayo (21), p. ej. para suministrar medios a los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) por el sistema de inyección (17) de la unidad funcional (16), y/o para aplicar uno o más compuestos de ensayo a los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) por el sistema de inyección (17) de la unidad funcional (16). La plataforma portadora (13) y la placa base (22) están dispuestas en paralelo. La plataforma portadora (13) es móvil a lo largo del eje longitudinal de la placa base (22). La una unidad funcional (16) que comprende una combinación de un sistema de inyección/rechazo (17/18) y el un dispositivo de sensor óptico (1) son móviles uno respecto al otro. Esto permitir dirigir de forma separada o en común los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2), p. ej. con el fin de cambiar fluido, p. ej. medio y/o sangre, en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) por el sistema de inyección (17) de la unidad funcional (16), para suministrar uno o más compuestos de ensayo a los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) por el sistema de inyección (17) de la unidad funcional (16) y vigilar el efecto de el uno o más compuestos de ensayo en los sistemas de cultivo celular tridimensionales (2) por el dispositivo de sensor óptico (1), en particular en el mismo tiempo de medición durante el cultivo. El dispositivo de sensor óptico (1) es móvil a lo largo del eje lateral de la plataforma portadora (13), y la unidad funcional (16) que comprende una combinación de un sistema de inyección/rechazo (17/18) es móvil a lo largo del eje lateral de la plataforma portadora (13). El haz de fibras de fibras de excitación de luz y de emisión de luz (19) comprendido en el dispositivo de sensor óptico (1) además es móvil hacia la plataforma portadora (13) y la combinación del sistema de inyección/rechazo (17/18) comprendido en la unidad funcional (16) es móvil hacia la plataforma portadora (13). El dispositivo de sensor óptico (1) permite la vigilancia sin contacto y no invasiva del cultivo celular tridimensional hecho de un material traslúcido que lleva desde la plataforma portadora (13) hecha también de un material traslúcido. Dicho dispositivo de sensor óptico (1) se puede llevar cerca el sistema de cultivo celular tridimensional (2) pero no se inserta o introduce nunca en dicho sistema. La distancia entre el dispositivo de sensor óptico (1) y la plataforma portadora (13) puede ser entre 0 y 1 mm o entre 0 y 500  $\mu\text{m}$ . Las flechas dobles de color blanco en los dibujos representan las direcciones de movimiento descritas antes.

#### Breve descripción de los ejemplos

##### Experimento 1:

El siguiente experimento se usará para evaluar la autofluorescencia del NADH de diferentes agregados celulares, organoides u órganos en un dispositivo de multiórganos en un chip (MOC). Por lo tanto, se creará un MOC y se montará en un soporte. El MOC se lavará y cargará con medio. Después, se van a poner diferentes tipos de células en diferentes concentraciones dentro de las secciones de crecimiento en el MOC. Dichos diferentes tipos de células se desarrollarán en diferentes agregados celulares, organoides u órganos durante el cultivo continuo. El establecimiento de dicho MOC se describe, por ejemplo, en el documento WO 2009/146911 A2 (véase en particular la página 3, líneas 6 a 20, página 37, de la página 1 a la página 38, línea 2, y de la página 38, línea 24 a la página 39, línea 15, y en las reivindicaciones 33 y 38 a 42) o el documento WO 2012/016711 A1 (véase en particular la página 3, líneas 14 a 21, de la página 15, línea 1 a la página 16, línea 14, página 19, líneas 10 a 33, página 20, líneas 5 a 23, y de la página 22, línea 1 a la página 23, línea 8 y en las reivindicaciones 18 a 20). Para medir la autofluorescencia del NADH en dicho MOC, se usará un dispositivo de sensor óptico que comprende una fibra de excitación y una fibra de emisión. La fibra de excitación está conectada a una fuente de luz (p. ej., un láser o LED) que emite luz a 337 nm. La fibra de excitación recibe dicha luz y la suministra a los diferentes agregados celulares, organoides u órganos comprendidos en el MOC. El NADH puede ser activado a una longitud de onda de 337 nm. La fibra de emisión recibe la autofluorescencia del NADH en los diferentes agregados celulares, organoides u órganos y la suministra a un detector de luz (p. ej., un espectrómetro). El detector evalúa la emisión del NADH a la longitud de onda de 450 nm. La fibra de emisión se une al portaobjetos del fondo del MOC. El dispositivo de sensor óptico se usa para excitar la autofluorescencia del NADH a 337 nm dentro del chip y detectar las emisiones del NADH a la longitud de onda de 450 nm. Se pueden usar potenciales filtros de paso de banda para purificar la emisión detectada. La señal se va a medir en el cultivo estático y en un MOC perfundido. Dentro del experimento también se usarán varias fibras y detectores diferentes.

##### Experimento 2:

El siguiente experimento se usará para evaluar la autofluorescencia del FAD de diferentes agregados celulares, organoides u órganos en un dispositivo de multiórganos en un chip (MOC). Por lo tanto, se creará un MOC y se

montará en un soporte. El MOC se lavará y cargará con medio. Después, se van a poner diferentes tipos de células en diferentes concentraciones dentro de las secciones de crecimiento en el MOC. Dichos diferentes tipos de células se desarrollarán en diferentes agregados celulares, organoides u órganos durante el cultivo continuo. El establecimiento de dicho MOC se describe, por ejemplo, en el documento WO 2009/146911 A2 (véase en particular la página 3, líneas 6 a 20, página 37, de la página 1 a la página 38, línea 2, y de la página 38, línea 24 a la página 39, línea 15, y en las reivindicaciones 33 y 38 a 42) o el documento WO 2012/016711 A1 (véase en particular la página 3, líneas 14 a 21, de la página 15, línea 1 a la página 16, línea 14, página 19, líneas 10 a 33, página 20, líneas 5 a 23, y de la página 22, línea 1 a la página 23, línea 8 y en las reivindicaciones 18 a 20). Para medir la autofluorescencia del FAD en dicho MOC, se usará un dispositivo de sensor óptico que comprende una fibra de excitación y una fibra de emisión. La fibra de excitación está conectada a una fuente de luz (p. ej., un láser o LED) que emite luz a 450 nm. La fibra de excitación recibe dicha luz y la suministra a los diferentes agregados celulares, organoides u órganos comprendidos en el MOC. El FAD puede ser activado a una longitud de onda de 450 nm. La fibra de emisión recibe la autofluorescencia del FAD en los diferentes agregados celulares, organoides u órganos y la suministra a un detector de luz (p. ej., un espectrómetro). El detector evalúa la emisión del FAD a la longitud de onda de 520 nm. La fibra de emisión está unida al portaobjetos del fondo del MOC. El dispositivo de sensor óptico se usa para excitar la autofluorescencia del FAD a 450 nm dentro del chip y detectar las emisiones del FAD a la longitud de onda de 520 nm. Se pueden usar potenciales filtros de paso de banda para purificar la emisión detectada. La señal se va a medir en el cultivo estático y en un MOC perfundido. Dentro del experimento también se usarán varias fibras y detectores diferentes.

#### 20 Experimento 3:

Para tener mayor detalle sobre el consumo de oxígeno de órganos cultivos en secciones de crecimiento, se medirá la saturación de la hemoglobina de los eritrocitos. Basándose en la saturación de la hemoglobina, se determinará el consumo de oxígeno. Por lo tanto, se producirán MOC y se pondrán en un soporte como se ha descrito antes. En lugar de medio de cultivo celular, el chip se va a cargar con sangre humana y se perfunde. Después, se mide la saturación de la hemoglobina antes y después de la sección de crecimiento en el chip. Entre estos dos tiempos/posiciones, el medio debe perfundir la sección de crecimiento llena con organoides, órganos o agregados celulares, etc. Con la ayuda de una fuente de luz infrarroja y un detector, se puede medir la saturación de la hemoglobina. Basándose en la saturación de la hemoglobina en los diferentes tiempos/posiciones, se calculará el consumo de oxígeno. La caída de potencial de la hemoglobina se debe lo más probablemente al consumo de oxígeno dentro de la sección de crecimiento. La cantidad de oxígeno consumida está relacionada además con la actividad metabólica de la célula.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para determinar y/o vigilar al menos un estado de/en un sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento (3), en donde el al menos un estado comprende un estado fisiológico y además comprende un estado seleccionado del grupo que consiste en
- 5 (i) vitalidad, y
- (ii) estado metabólico,
- en donde el estado fisiológico se determina usando eritrocitos como detectores para dicho estado, determinando el caudal, la osmolalidad fisiológica y/o el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2), la vitalidad se determina y/o vigila midiendo colorantes fluorescentes para células vivas, y el estado metabólico se
- 10 determina y/o vigila midiendo la autofluorescencia del NADH y/o FAD, y/o determinando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o NADH/FAD.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método para determinar el caudal en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:
- (i) proporcionar un sistema de cultivo celular tridimensional (2) perfundible que comprende al menos una sección de
- 15 crecimiento (3),
- (ii) tomar fotos de los eritrocitos en dicho sistema de cultivo celular al menos en dos tiempos de medición diferentes,
- (iii) seleccionar al menos un eritrocito y determinar la posición del al menos un eritrocito, en las al menos dos fotos,
- (iv) asignar un vector de movimiento a el al menos un eritrocito que representa el cambio de posición de dicho al menos un eritrocito en las al menos dos fotos, y
- 20 (v) determinar el caudal en dicho sistema de cultivo celular basado en el vector de movimiento.
3. El método de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el método para determinar la osmolalidad fisiológica en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:
- (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento
- (3), y
- 25 (ii) determinar la forma de al menos un eritrocito en dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular.
4. El método de la reivindicación 3, en donde
- (i) una forma esférica del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica ha disminuido (estado hipotónico), o
- 30 (ii) una forma dentada del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica ha aumentado (estado hipertónico), o
- (iii) una forma bicóncava del al menos un eritrocito indica que la osmolalidad fisiológica es estable (estado isotónico).
5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método para determinar el consumo de oxígeno en el sistema de cultivo celular tridimensional (2) usando eritrocitos como detectores comprende las etapas de:
- (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento
- (3),
- (ii) determinar una saturación media de la hemoglobina de los eritrocitos en una primera posición y en una segunda
- 35 posición en dicho sistema de cultivo celular, y
- (iii) calcular el consumo de oxígeno en dicho sistema de cultivo celular basado en la saturación media de la hemoglobina en las diferentes posiciones.
- 40
6. El método de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el sistema de cultivo celular tridimensional (2) es perfundible.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el método para determinar y/o vigilar la vitalidad del sistema de cultivo celular tridimensional (2) midiendo colorantes fluorescentes para células vivas comprende las etapas de:
- (i) proporcionar el sistema de cultivo celular tridimensional (2) que comprende al menos una sección de crecimiento
- (3) que se carga con colorantes fluorescentes para células vivas, y
- 45

(iia) medir la intensidad media de fluorescencia en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un primer tiempo de medición y en un segundo tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición, y/o

5 (iib) medir la intensidad media de fluorescencia en al menos una parte de la al menos una sección de crecimiento (3) de dicho sistema de cultivo celular en un tiempo de medición durante el cultivo de dicho sistema de cultivo celular, y comparar la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia del al menos un sistema de cultivo celular de control.

8. El método de la reivindicación 7, en donde

10 (i) una disminución de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición indica que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) ha disminuido, o

15 (ii) una retención de la intensidad media de fluorescencia en el segundo tiempo de medición cuando se compara con la intensidad media de fluorescencia en el primer tiempo de medición indica que la vitalidad de dicho sistema de cultivo celular (2) se mantiene.

9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde

(i) un aumento de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición comparada con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control indica que dicho sistema de cultivo celular (2) es vital, o

20 (ii) la equivalencia de la intensidad media de fluorescencia en dicho tiempo de medición con la intensidad media de fluorescencia del sistema de cultivo celular de control indica que dicho sistema de cultivo celular (2) no es vital.

10. El método de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la al menos una sección de crecimiento (3) comprende un conjunto de células en multicapas, un tejido, un organoide o un órgano.

Figura 1

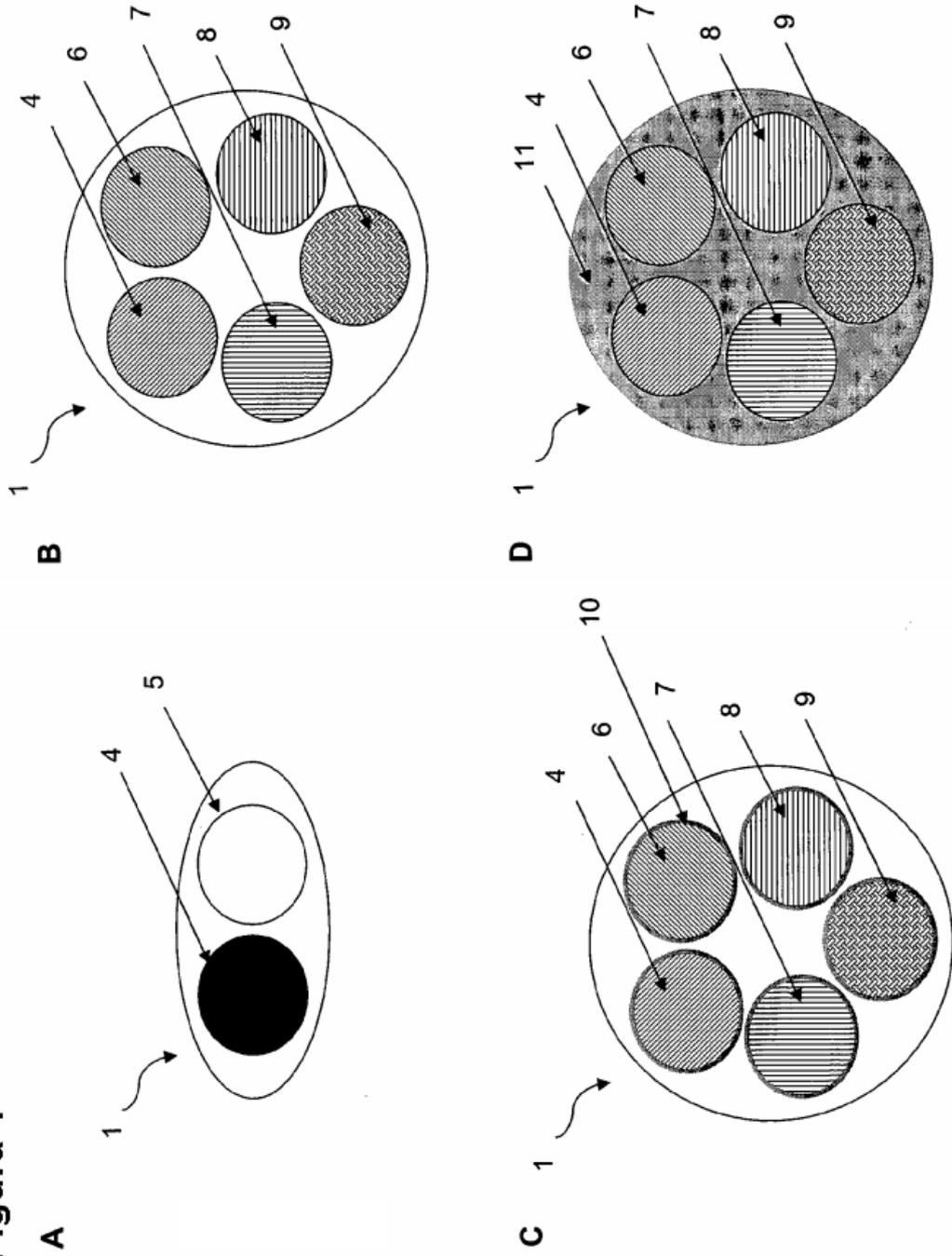


Figura 2

