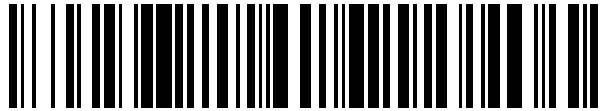


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 296**

51 Int. Cl.:

G03F 7/00 (2006.01)

B81C 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/IB2012/052732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12731717 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2715450**

54 Título: **Método para la fabricación de dispositivos microfluídicos tridimensionales monolíticos**

30 Prioridad:

31.05.2011 IT MI20110995

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**TENSIVE S.R.L. (100.0%)
Vía Timavo 34
20124 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**LENARDI, CRISTINA;
TOCCHIO, ALESSANDRO y
MARTELLO, FEDERICO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 692 296 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

Método para la fabricación de dispositivos microfluídicos tridimensionales monolíticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la fabricación de dispositivos microfluídicos tridimensionales.

10 Técnica anterior

Los dispositivos microfluídicos son artículos fabricados producidos comúnmente a partir de vidrio, silicio o materiales poliméricos que contienen una canalización que se extiende en dos dimensiones (es decir sustancialmente en un plano dentro del dispositivo) o en tres dimensiones, dentro de la que puede hacerse que fluyan fluidos. Los dispositivos tienen generalmente dimensiones de hasta unos pocos centímetros, mientras que los canales tienen secciones transversales con lados (o un diámetro, en el caso de canales de sección transversal circular) generalmente de decenas a cientos de micrómetros (μm) de tamaño; en el significado más amplio del término, los dispositivos microfluídicos también pueden incluir aquellos sistemas en los que los canales tienen secciones transversales del orden de unos pocos milímetros; en el resto del texto y en las reivindicaciones, la definición "dispositivos microfluídicos" se usará en el sentido de este último significado más amplio.

Los dispositivos microfluídicos tienen una variedad de posibles aplicaciones: por ejemplo, con funcionalizaciones apropiadas de las paredes de canal, pueden actuar como detectores de la presencia de uno o más analitos en un fluido (funcionando por tanto como elementos activos de analizadores miniaturizados, también conocidos en el campo mediante la definición en inglés "lab on a chip"), particularmente en aplicaciones en el campo biológico y médico, o como microrreactores químicos. El uso de estos sistemas en el campo biológico ha aumentado en los últimos años, especialmente con respecto a aplicaciones en microscopía, cultivo, recuento de células y manipulación celular, y experimentos de alto rendimiento. Una ventaja extremadamente importante de estos dispositivos es que su funcionamiento requiere cantidades mínimas de reactivos en comparación con los sistemas convencionales, y en consecuencia el uso de cantidades mínimas de reactivos (con frecuencia caros), así como reduce los volúmenes de líquido que debe desecharse, para lo que se requieren normalmente procedimientos especiales.

En una variante particularmente interesante, si están hechos de materiales biocompatibles, estos artículos fabricados pueden usarse en la producción de prótesis vascularizadas, y si dichos materiales también tienen la característica de ser biodegradables o bioabsorbibles en un lapso de tiempo adecuado, estas prótesis pueden funcionar como sitios de regeneración tisular, que después se sustituyen por tejido producido de manera natural (los denominados "estructuras básicas").

Dado el número y la importancia de las posibles áreas de uso, en los últimos años se ha llevado a cabo un volumen considerable de trabajo de investigación y desarrollo en el campo, centrado en la producción y el perfeccionamiento de dispositivos microfluídicos que tengan las características deseadas.

Los primeros dispositivos de este tipo se produjeron usando métodos y materiales derivados del campo de los semiconductores y microactuadores (más conocidos como "micromáquinas" en el sector), con secuencias de deposición y/o eliminación de partes de capas depositadas selectiva; ejemplos de estos métodos se describen en las solicitudes de patente EP 1614467 A2, US 2002/0081787 A1, US 2003/0012866 A1, US 2005/0170670 A1, US 2006/0014271 A1, WO 00/42233 A1, WO 2004/042797 A2, WO 2006/113492 A2, WO 2011/064716 A2, en la patente US 6.753.200 B2 y en los artículos "Synthesis and characterization of photodefinable polycarbonates for use as sacrificial materials in the fabrication of microfluidic devices", C. White *et al.*, proceedings di SPIE, vol. 4690 (2002), páginas 242-253, y "Microsystems manufacturing via embossing of photodefinable thermally material sacrificial", C. White *et al.*, SPIE proceedings, vol. 5374 (2004), páginas 361-370. El principal factor limitante en estos métodos es que solo pueden producir estructuras bidimensionales en un sustrato, en el que la canalización en la práctica se extiende solo en un plano dentro del artículo fabricado, produciendo por tanto dispositivos relativamente simples, también debido a la imposibilidad de superponer o cruzar dos o más canales; a lo sumo, los documentos citados anteriormente describe la posibilidad de producir dispositivos con canalización en más de un plano paralelo aplicando los métodos de producción de canalización plana sucesivamente varias veces, e interconectando los canales en diferente planos por medio de aberturas perpendiculares a los propios planos. Se han obtenido resultados análogos usando los métodos de prensado descritos en las solicitudes de patente WO 2005/084191 A2 y US 2007/0110962 A1.

La patente US 6.321.791 y la solicitud de patente WO 2009/121037 A2 se refieren a dispositivos en los que los canales, aunque tridimensionales, se obtienen superponiendo varias estructuras canalizadas bidimensionales que se encuentran en planos paralelos entre sí, e interconectando dichas estructuras por medio de aberturas perpendiculares a dichos planos. En estos dispositivos, los diferentes niveles pueden obtenerse mediante superposiciones sucesivas, o construyéndolas por separado y uniéndolas después mecánicamente o mediante adhesión. En el primer caso, el proceso para producir una estructura multiplanar es largo y laborioso; en el segundo

caso, los dispositivos obtenidos no son monolíticos, y puede haber imperfecciones de contacto o adhesión entre las superficies de dos capas adyacentes, lo que conduce a problemas en el uso del dispositivo; por ejemplo, un fluido podría difundir desde un canal a intersticios entre dos capas adyacentes, provocando contaminación y/o un funcionamiento incorrecto del dispositivo.

5 Otros documentos proponen un enfoque alternativo a la producción de dispositivos microfluídicos. Según esta vía, se producen estructuras tridimensionales (también denominadas "3D" a continuación) con un material sacrificial, que puede disolverse como resultado de tratamientos apropiados; la estructura se corresponde (en negativo) con la extensión de los canales que deben formarse dentro del dispositivo final; esta estructura se inserta en un molde en el que se vierte entonces un material líquido, material que puede entonces solidificar (o solidificarse); al final del proceso se retira la estructura 3D inicial mediante ataque químico o mediante calentamiento (o ambos), dejando espacios y canales vacíos en su lugar.

15 Este método se usa, por ejemplo, en la solicitud de patente US 2003/0087198 A1. Según este documento, la estructura 3D sacrificial se hace a partir de cera, "extrayendo" filamentos de un baño de cera fundida a través de una "simiente" sólida del mismo material (método análogo al método de Czochralski para hacer crecer monocristales de silicio puro); los filamentos así obtenidos pueden elaborarse o interconectarse entonces para obtener las estructuras 3D deseadas. En el texto de la solicitud, se afirma que la sección transversal de la hebra de cera obtenida (que se corresponderá con la sección transversal de los canales en el dispositivo final) puede controlarse actuando sobre parámetros tales como, entre otros, las temperaturas de la masa fundida y del entorno externo, la viscosidad de la cera fundida, el diámetro de la "simiente" fría y la tasa de crecimiento de la misma. Este sistema tiene el inconveniente de ser complicado de implementar en la práctica, de modo que la producción de cada estructura sacrificial individual lleva mucho tiempo; por tanto, el método de esta solicitud de patente puede ser adecuado para estudios de viabilidad a escala de laboratorio, pero en general no puede usarse en la producción industrial a gran escala.

25 La solicitud de patente US 2007/0012891 A1 describe un sistema análogo al anterior, pero en el que la estructura 3D sacrificial se obtiene trabajando a partir del material sólido, con equipamiento usado para la producción de prototipos (se muestra a modo de ejemplo el instrumento Solidscape T66) en sectores tales como joyería, modelado, o en la producción de modelos mediante mecánica posfusión. También en este caso, el límite del método consiste en el hecho de que tienen que producirse estructuras sacrificiales de una en una mediante mecanizado de precisión, conduciendo a largos tiempos (y por tanto altos costes) de producción, que son incompatibles con aplicaciones industriales.

35 El documento US 7.494.557 B1 describe un método para producir un dispositivo microfluídico monolítico, comprendiendo el método laminar una pila de hojas.

40 Finalmente, la solicitud de patente WO 2010/009320 A1 describe un método que es especialmente adecuado para la producción de estructuras canalizadas que deben usarse como "estructuras básicas" para su uso en medicina regenerativa. Según el método de este documento, se produce una masa filamentosa de fibras alargadas a partir de un material sacrificial mediante extrusión, o usando diversas técnicas que se conocen ampliamente en la producción de fibras poliméricas, que se engloban dentro de la definición general de "hilatura" (métodos citados son hilatura en estado fundido, hilatura en húmedo, hilatura en seco, hilatura en húmedo por chorro seco y electrohilatura); la masa se recoge entonces con, o sobre, uno o más soportes de forma alargada, varillas o tubos sustancialmente largos fabricados a su vez de un material sacrificial, de una manera en general análoga a la preparación de hilo de azúcar (el azúcar es de hecho el material sacrificial preferido indicado en este documento); el conjunto así obtenido se usa entonces como estructura sacrificial 3D de la manera descrita con referencia a los documentos anteriores. Este método está limitado por encima de todo porque la estructura de los canales correspondientes a las fibras es completamente aleatoria y por tanto la reproducibilidad de los resultados no puede controlarse satisfactoriamente; en segundo lugar, las fibras obtenidas son muy delgadas y, en algunos casos, pueden no tener características suficientes en cuanto a la consistencia y estabilidad dimensional, y pueden plegarse y colapsar bajo el peso del material líquido con el que se sumergen en el molde, antes de que este último solidifique.

55 Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método simple para la producción de dispositivos microfluídicos tridimensionales monolíticos que supere los problemas de la técnica anterior, así como proporcionar los artículos fabricados obtenidos por medio de dicho método.

60 Estos objetivos se consiguen según la presente invención que, en un primer aspecto de la misma, consiste en un método para la producción de un dispositivo microfluídico tridimensional monolítico, tal como se define en reivindicación 1.

65 Los términos usados en la definición de la invención facilitados anteriormente, así como en el resto del texto y en las reivindicaciones, deben entenderse en su sentido ordinario a menos que se especifique lo contrario. Definiciones específicas de algunos de los términos usados en la presente descripción se facilitan a continuación:

- en la presente descripción, con el propósito de brevedad, se hace referencia a un material sacrificial y a un precursor, pero mediante estas definiciones también se pretende hacer referencia a mezclas de materiales sacrificiales y materiales precursores;

5 - la estructura final del dispositivo, obtenida tras la retirada del material sacrificial, se indicará con "matriz", y el material obtenido mediante la solidificación del precursor (o una mezcla de precursores) se indicará como "material de la matriz";

10 - "plantilla tridimensional de forma estable" significa una estructura que puede mantener su forma cuando se somete únicamente a la fuerza que consiste en su propio peso, en el aire o cuando se sumerge en el precursor líquido o en la disolución, pero deformable en consecuencia de la aplicación de fuerzas mecánicas (por ejemplo tracción, compresión o torsión); para la brevedad, este elemento se denominará, en lo sucesivo, también simplemente plantilla.

15 Breve descripción de los dibujos

La invención se ilustrará en detalle a continuación con referencia a los dibujos, en los que:

20 - las figuras 1a-f representan, en forma esquemática, la secuencia de etapas del método de la invención dirigidas a la producción de un primer dispositivo microfluídico;

- las figuras 2a-f, análogas a las figuras 1a-f, representan la secuencia de etapas para producir un segundo dispositivo microfluídico, con canales y micropocillos para cultivos celulares; y

25 - las figuras 3a-d ilustran imágenes de fluorescencia que muestran células vivas en un dispositivo vascularizado según una realización preferida de la invención y en un dispositivo análogo según la técnica anterior.

30 Descripción detallada de la invención

La plantilla usada para producir dispositivos microfluídicos según la invención puede producirse de una pieza pero, en particular para la implementación de geometrías complejas, también puede derivar de la unión de una pluralidad de partes; en el resto de la descripción, se hace referencia predominantemente al caso de la plantilla de una sola pieza, pero todas las enseñanzas notificadas en lo sucesivo también son aplicables al caso en el que una pluralidad de estructuras 3D están interconectadas para formar la plantilla final.

35 La primera etapa del método de la invención consiste en obtener la plantilla, que puede estar hecha de cualquier material sacrificial que pueda disolverse fácilmente con un disolvente o licuarse mediante tratamiento térmico, sin que el disolvente o el tratamiento térmico dañe o altere el material de la matriz. El material sacrificial puede seleccionarse, por ejemplo, de ceras o, preferiblemente, polímeros termoplásticos tales como poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarbonato (PC) y poliestireno (PS); dado que los polímeros termoplásticos son los materiales preferidos para implementar la invención, se hará referencia a los mismos en el resto de la descripción, pero sigue entendiéndose que la invención también puede implementarse con materiales sacrificiales de otro tipo.

45 La etapa de producir la plantilla puede realizarse usando cualquier método conocido para elaborar piezas a partir de materiales termoplásticos. La plantilla se produce preferiblemente usando una técnica seleccionada de colada, inyección en caliente en un molde, prensado en caliente, termoconformación y corte por láser.

50 El método de colada consiste en verter en un molde abierto un polímero, fundido o disuelto en un disolvente adecuado, o un precursor líquido del mismo; dejar que el polímero solidifique; y extraer la pieza formada del molde obteniendo una estructura tridimensional que es una réplica de la cavidad del molde. En el caso de usar un polímero, este se vierte generalmente en el molde en estado fundido, es decir se lleva hasta una temperatura mayor que el punto de fusión, se vierte en el molde y se permite que se enfría hasta una temperatura por debajo del punto de fusión; el polímero es preferiblemente sólido a temperatura ambiental, de modo que no son necesarios sistemas de enfriamiento para su solidificación. En el caso en el que se use un precursor de polímero, el precursor (por ejemplo, oligómeros del mismo) se vierte en el molde y su reticulación se efectúa mediante métodos conocidos, por ejemplo mediante calentamiento, mediante irradiación con UV o con iniciadores de reacción radicalarios. Con el fin de obtener estructuras tridimensionales de la forma deseada, la superficie superior del molde que contiene el polímero fundido o su precursor puede "rebajarse" para retirar todo el polímero o precursor en exceso; al final del proceso puede eliminarse cualquier rebaba (películas delgadas de polímero conectadas a la estructura deseada) mediante métodos mecánicos o mediante ataque químico (porque la tasa de ataque químico es constante en todas las partes, las más delgadas se eliminan cuando la estructura principal de la plantilla está todavía esencialmente inalterada).

65

En el método de inyección en caliente, el material termoplástico en estado fundido se fuerza a entrar a presión en la cavidad de un molde denominado "modelo", que está compuesto de dos o más partes independientes sostenidas juntas mecánicamente durante la inyección, por ejemplo con tornillos, abrazaderas o similares. La posición y las dimensiones de los canales o de los otros espacios vacíos en el modelo replican exactamente las del dispositivo microfluídico final o de una de sus partes. Las diversas partes del modelo pueden producirse usando métodos de microfabricación conocidos, que permiten reproducir detalles del orden de 100 μm e incluso de tamaño menor. Las partes individuales que constituyen el modelo tienen generalmente la forma de paralelepípedos bajos, y se apilan colocando sus superficies más grandes en contacto. Los canales y otros espacios vacíos del modelo pueden estar en la forma de rebajes de geometría apropiada en una de las superficies más grandes de una o más partes, de tal manera que una segunda parte de la que está compuesto el modelo, unida a la que presentan los rebajes, define canales u otros espacios vacíos de forma genérica. Las partes del modelo pueden presentar entonces canales en una dirección perpendicular a las superficies más grandes de la parte; de esta manera se crean pasos de comunicación entre diferentes niveles del conjunto de canales y espacios vacíos, o con el exterior del modelo. En el caso de modelos producidos a partir de una pluralidad de partes, los canales perpendiculares a las superficies más grandes también pueden obtenerse dividiendo una o más de estas partes en dos subpartes, presentando las últimas dentro del modelo ensamblado a lo largo de dos caras perpendiculares a las superficies más grandes y teniendo rebajes formados en al menos una de estas caras. Una vez que se ha ensamblado el modelo, el material sacrificial se inyecta en el interior del mismo a presión y en estado fundido; en estas condiciones, el polímero termoplástico fundido ocupa todos los espacios vacíos dentro del modelo. Tras la solidificación de la masa fundida, es posible desmontar el modelo y extraer una estructura 3D (es decir, la plantilla) de geometría equivalente a la red deseada de canales y espacios vacíos dentro del dispositivo microfluídico final. Alternativamente, tal como se dijo anteriormente, la estructura obtenida de esta manera puede ser equivalente a solo una parte de la plantilla deseada; en este caso, la plantilla completa se obtiene uniendo dos o más estructuras 3D, por ejemplo haciendo que se adhieren mediante calentamiento.

Un ejemplo de aplicación del método de inyección en caliente a la producción de dos posibles estructuras 3D se muestra en las figuras 1.a, 1.b y 2.a, 2.b. La figura 1.a muestra dos partes 10 y 12 de forma paralelepípedica que están previstas para combinarse entre sí para formar el modelo tal como se describió anteriormente; sobre una superficie de la parte 10, se forma una red de canales y cavidades interconectadas, indicada en general en los dibujos como elemento 11. La unión de la parte 10 (en particular la superficie de la misma en la que está presente la red de canales 11) con la parte 12 forma el modelo 13, mostrado en la figura 1.b; el modelo tiene dos aberturas 14 (solo uno visible en los dibujos) al nivel del extremo de la red de canales 11. De manera análoga, la figura 2.a muestra las partes 20 y 22 (teniendo la primera una red de canales y cavidades 21 que es más compleja y articulada que la red 11), que forman el modelo 23 con aberturas 24 de la figura 2.b.

Una plantilla hecha de un material termoplástico también puede obtenerse mediante prensado en caliente (un método conocido mejor en el sector como "estampado en caliente", término que se usará más adelante). Este método consiste en disponer una hoja de un material termoplástico sobre una superficie de una parte de un molde que puede ser completamente plana o tener un grupo de rebajes que se corresponden con la estructura deseada; llevar el polímero termoplástico hasta una temperatura dentro del intervalo entre la de transición vítrea (T_g) y la de fusión del propio polímero, haciendo que se ablande; y apretar la otra parte del molde contra el polímero ablandado. En el caso de que la primera parte ya tenga rebajes, la segunda, que se presiona sobre la masa fundida, puede ser plana o a su vez tener rebajes. Tras el prensado, se permite que el material termoplástico se enfría hasta por debajo de su T_g , se separan las dos partes del molde, y entonces es posible extraer la plantilla del molde. En este caso, las estructuras obtenidas se extienden principalmente en dos direcciones (correspondientes a los planos que entran en contacto en el molde cerrado), con la posibilidad de tener partes que discurren en la tercera dimensión, perpendicular a las dos primeras, derivada de perforaciones que atraviesan y son perpendiculares a las superficies más grandes de las dos partes del molde. Cualquier "rebaba" de prensado puede eliminarse de manera simple mediante un procedimiento de ataque químico o físico (métodos conocidos genéricamente por el nombre de "ataque").

La plantilla también puede obtenerse por medio del proceso de moldeo por compresión e inyección, que combina las ventajas de la fase de inyección y de la posterior fase de compresión, eliminando las desventajas debidas a los largos trayectos recorridos por el material termoplástico en el molde. En una primera fase, se inyecta un volumen de polímero disuelto, correspondiente al volumen de la parte que debe prensarse, en el molde que permanece parcialmente abierto. Gracias al mayor espacio entre las partes del punzón, la inyección se realiza a baja presión, reduciendo así la velocidad y la fuerza de corte del polímero. Tras la fase de inyección, las dos partes del punzón se unen entre sí durante la fase de compresión. Esta fase se subdivide a su vez en un movimiento de velocidad controlada y finalmente, si se alcanza la potencia de compresión deseada, en un mantenimiento de la presión final a una fuerza controlada durante el periodo de enfriamiento.

Otro método posible para producir la plantilla es corte por láser. En este caso se proporciona una hoja del material sacrificial polimérico y se corta con el láser para obtener una estructura bidimensional de la forma deseada.

La plantilla de material sacrificial también puede producirse mediante otros métodos conocidos, por ejemplo mediante termoconformado, tal como resultará evidente para los expertos en el campo.

En el caso de plantillas sacrificiales obtenidas mediante estampado en caliente o corte por láser, puede obtenerse una estructura 3D compleja uniendo simplemente (por ejemplo, mediante fusión localizada) dos o más estructuras primarias, tal como se describe en relación con la inyección en caliente. Alternativamente, es posible deformar estructuras sacrificiales sustancialmente bidimensionales (2D) aprovechando la elasticidad de materiales termoplásticos para conseguir un desarrollo 3D de la estructura; este último método también puede usarse junto con el de unir una pluralidad de estructuras sustancialmente 2D inicialmente.

En una variante del método invención, la plantilla puede estar cubierta completa o parcialmente con un material que tiene una funcionalidad deseada (siempre que dicho material pueda resistir los posteriores tratamientos de producción del dispositivo microfluídico). Por ejemplo, es posible cubrir la superficie de la plantilla con un polvo metálico, sumergiéndolo en polvos metálicos calientes, que provocan la fusión localizada del material termoplástico y la incorporación de una capa de polvo sobre la superficie del mismo tras el enfriamiento. Alternativamente, es posible implantar partículas sobre superficies de la plantilla según las técnicas descritas en los artículos "Micro- and nanoscale modification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by AFM lithography and nanoparticle incorporation", A. Podedstà *et al*, Journal of Nanoscience of Nanotechnology, 5(3), 425-430, 2005, y "Poly(methyl methacrylate)-palladium clusters nanocomposite formation by supersonic cluster beam deposition: a method for microstructured metallization of polymer surfaces", L. Ravagnan *et al.*, Journal of Physics D: Applied Physics, 42(8), 082002/1-082002/5, 2009. El primero describe la producción de un "lecho" de nanopartículas de carbono sobre la superficie interna del molde en el que se vierten entonces los precursores del polímero estudiado; se incorporan partículas de carbono en las capas superficiales del polímero durante la reticulación del mismo; el segundo describe la aplicación de un método para obtener depósitos de nanopartículas metálicas (paladio en el caso del artículo) en un polímero rígido.

La plantilla obtenida según uno cualquier de los métodos descritos anteriormente tiene dimensiones mayores que la red de canales que se desea dentro del dispositivo microfluídico final. En particular, la plantilla estará compuesta de una parte principal de dimensiones mayores, A, correspondiente a los canales del dispositivo microfluídico final y una o más partes, B, B', ... que no tienen correspondencia en dichos canales. Este estado se ilustra en las figuras 1.c y 2.c con referencia a las dos plantillas tridimensionales de forma estable, 15 y 25, que se obtienen a través del uso de los modelos 13 y 23 descritos anteriormente, pero obviamente también se requiere el mismo estado según la invención para plantillas de otras formas 3D, o también obtenidas con cualquiera de los otros métodos mencionados anteriormente (no necesariamente recurriendo al modelo). En las figuras 1.c y 2.c, las partes B y B' (mostradas por separado de las partes A de plantillas 15 y 25 por medio de líneas discontinuas) son extremos de la plantilla que se usan en el procedimiento de producción del dispositivo microfluídico para mantener la propia plantilla en la posición deseada dentro del molde en el que se insertará el precursor de la matriz.

La plantilla así obtenida se inserta entonces en un molde. La plantilla se sostiene lateralmente por medio de las partes B y B'. La figura 1.d muestra la manera de usar la plantilla 15. El molde, 16, tiene una cavidad principal 17 y dos ranuras 18 y 18', cuya profundidad es menor que la de la cavidad; los extremos B y B' de la plantilla 15 están soportados en estas ranuras, permitiendo que la plantilla se mantenga en la posición deseada separada del fondo de la cavidad 17. De manera análoga, la figura 2.d muestra un molde 26 que tiene una cavidad 27 y las ranuras 28 y 28' en las que se insertan las partes B y B' de la plantilla 25, manteniéndola separada del fondo de la cavidad 27.

En la cavidad (17 o 27) del molde se vierte entonces un precursor, líquido o en disolución, de una matriz sólida, para cubrir completamente la plantilla contenida en la cavidad, tal como se muestra en las figuras 1.e y 2.e; en la figura 1.e, el precursor se vierte hasta el nivel mostrado mediante la línea continua, y no llena completamente la cavidad 17, mientras que en la figura 2.e, el precursor llena completamente la cavidad 27.

Para evitar que el precursor líquido (o la disolución que lo contiene) también llene la parte de las ranuras 18, 18' y 28, 28' no ocupada por las partes B y B' de la plantilla, es posible introducir elementos (no mostrados en las figuras y hechos generalmente del mismo material que el molde) en las ranuras, elementos que tienen una anchura igual a la de dichas ranuras, puestos en contacto con las partes B y B' y en posiciones tales como para cerrar la entrada a las ranuras por encima de las partes B y B'. Alternativamente, puede dejarse que el precursor también ocupe las ranuras, y eliminar (por ejemplo, mediante corte) las partes correspondientes del dispositivo microfluídico final. Aunque se muestra el caso de solo dos partes B y B' en los dibujos, que están soportadas en dos únicas ranuras dentro del molde, ranuras que están situadas al mismo nivel, según la invención la plantilla puede tener una pluralidad de partes de tipo B y B', que resultan a diferentes alturas cuando la plantilla se inserta en la cavidad del molde dando lugar así a una pluralidad de puntos de entrada, a diversas alturas, de los canales del dispositivo microfluídico final.

El material sacrificial y el precursor tienen que seleccionarse para satisfacer varias condiciones durante las etapas de llevar a cabo el método.

El precursor tiene que poder solidificar por medio de reacción química o transformación física, y dicha reacción o transformación tiene que conllevar el uso de compuestos químicos, la adopción de estados físicos, y etapas operativas, de modo que la plantilla permanezca sustancialmente inalterada, o al menos mantenga su continuidad,

durante el tiempo necesario para la solidificación del precursor; la definición “mantener la continuidad” referida a la plantilla indica que, incluso si esta puede estar parcialmente disuelta en su superficie, la disolución tiene que ser de poca entidad, y de modo que la continuidad de la plantilla no se interrumpa en ningún punto.

5 Este estado puede alcanzarse de la manera más simple seleccionando como precursor un compuesto químico líquido en el que el material sacrificial de la plantilla sea insoluble; o, en el caso en el que el precursor se use en disolución, el material sacrificial tiene que ser insoluble en el disolvente.

10 También es posible que el material sacrificial sea ligeramente soluble en el precursor (líquido) o en el disolvente del mismo (si se usa en disolución). En este caso es necesario que la solubilidad del material sacrificial en el precursor o en el disolvente sea suficientemente baja como para hacer posible que la plantilla siga siendo continua durante todo el tiempo necesario para la solidificación del precursor, de modo que en ningún punto el material de la matriz pase a bloquear un canal o una cavidad deseada en la red de canales del dispositivo final.

15 A su vez, el material de la matriz (cuya elección depende de la elección de precursor) tiene que ser insoluble en el disolvente del material sacrificial, en el caso de que la eliminación del mismo suceda mediante medios químicos, o inalterable a la temperatura de fusión del material sacrificial en el caso de que este se elimine mediante tratamiento térmico. En particular, si el método seleccionado para la eliminación del material sacrificial es la fusión, el material de la matriz tiene que tener una temperatura de fusión, y preferiblemente también una T_g , mayor que la temperatura de fusión del material sacrificial.

20 En el caso de que se desee aumentar la incompatibilidad química del material de la plantilla con la de la matriz, para mejorar la capacidad de replicación de la geometría de dicha plantilla en los canales de la matriz final, también es posible – antes de verter el precursor (o una disolución del mismo) en el molde – para cubrir la plantilla con un agente químico adecuado; por ejemplo, si el material de la matriz consiste en hidrogel de polietilenglicol (PEG), la superficie de la plantilla puede cubrirse con una capa delgada de un aceite de silicio.

25 Ya sea líquido o esté en disolución, el precursor puede estar compuesto de monómeros u oligómeros de un polímero, que se hacen polimerizar *in situ* (por ejemplo, desencadenando la polimerización con iniciadores radicalarios, irradiando con lugar de una longitud de onda adecuada, normalmente dentro del rango UV o, de nuevo, térmicamente). En general, el material de la matriz puede ser cualquier polímero reticulado o no reticulado, y más generalmente cualquier material que pueda solidificar partiendo de un precursor líquido, siempre que, una vez sólido, sea compatible con la eliminación del material sacrificial.

30 Entre los posibles materiales de matriz, el preferido para diversas aplicaciones es polidimetilsiloxano (PDMS) debido a la facilidad de su producción y uso, porque es transparente, permeable a los gases y flexible.

35 Otro material adecuado para la producción de la matriz del dispositivo es poliestireno (PS), usado ampliamente en aplicaciones biomédicas y cultivo de células debido al bajo coste de producción, no toxicidad y transparencia excelente.

40 En una variante de interés particular, el material de la matriz se produce a partir de una disolución que contiene especies que polimerizan para formar hidrogeles, produciendo un dispositivo final, cuya matriz contiene dosis altas (normalmente de aproximadamente el 2% al 99% en peso) de agua; un dispositivo microfluídico de este diseño normalmente es especialmente adecuado para la producción de estructuras básicas para su uso en implantes en el cuerpo humano (o animal).

45 En particular, estos materiales consisten en polímeros reticulados insolubles en agua que atrapan físicamente cantidades elevadas de agua, incluso hasta el 99% en peso; ejemplos típicos de polímeros que pueden formar hidrogeles son las poliamidoaminas y poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA). También es posible usar polímeros solubles que sean insolubles una vez reticulados; ejemplos de estos polímeros son poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL), colágeno, agarosa, quitosano y alginato.

50 Pares de material sacrificial/material de matriz típicos en el caso de la eliminación del primero mediante fusión son PMMA/PDMS y PS/resinas epoxi; cuando la eliminación del material sacrificial es mediante disolvente, pares típicos son PMMA-PDMS (disolventes: acetona, ácido acético), PMMA-PHEMA (disolventes: acetona, ácido acético), PVA-PHEMA (disolvente: agua), PVA-PDMS (disolvente: agua), PVA-PS (disolvente: agua), PVA-PEG (disolvente: agua), PS-colágeno (disolvente: acetona), PMMA-quitosano (disolvente: acetona) y PMMA-PCL (disolvente: acetona).

55 Entonces se permite que el precursor solidifique, y el cuerpo sólido obtenido se retira del molde.

60 Finalmente, el conjunto que consiste en el cuerpo sólido así obtenido, que todavía contiene la plantilla, se somete a un tratamiento de eliminación selectiva de la última. En el caso de eliminación mediante tratamiento térmico, dicho conjunto se lleva hasta una temperatura mayor que el punto de fusión del material sacrificial, pero menor que la del material del cuerpo del dispositivo (y preferiblemente menor que la T_g del último). Alternativamente, dicho conjunto se inserta en un recipiente (comúnmente de dimensiones mayores que el molde en el que se ha formado), en el que

se introduce un disolvente del material sacrificial, hasta la disolución total del último. En ambos casos se obtiene un cuerpo sólido que contiene una red tridimensional de canales y otros espacios vacíos, según el diseño deseado. Las figuras 1.f y 2.f muestran los dos dispositivos microfluídicos obtenidos, 19 y 29, mediante la secuencia de etapas del método en el caso de usar las plantillas tridimensionales 15 y 25 respectivamente; los dispositivos mostrados son transparentes para hacer evidente la red tridimensional de canales internos.

En el caso en el que la superficie de la plantilla tridimensional sacrificial se ha cubierto (incluso solo parcialmente) con un material funcional (por ejemplo partículas metálicas) antes de la inmersión en el precursor líquido, dicho material funcional sigue estando adherente o parcialmente consolidado en el material de la matriz durante su formación; tras la disolución y la eliminación de la plantilla, el material funcional se transfiere así a la superficie interna de los canales o de los otros espacios vacíos del dispositivo. Ejemplos de materiales que pueden transferirse de esta manera a las superficies internas de los canales son proteínas y nanopartículas metálicas.

El método de la presente invención también permite la producción de estructuras básicas vascularizadas que presentan una mejor supervivencia de las células contenidas en las mismas. Las estructuras básicas de este tipo también pueden usarse para numerosas aplicaciones de cultivo de células, por ejemplo para la producción de productos biofarmacéuticos *in vitro* y/o para la selección de productos farmacéuticos o terapias *in vitro*, o para la producción de implantes y prótesis para aplicaciones quirúrgicas. En el caso de implantes y prótesis quirúrgicas, estas estructuras básicas constituyen un soporte, permanente o temporal, para la colonización mediante las células del cuerpo; en el caso de implantes permanentes, la colonización de las superficies de la estructura básica permite la integración y la compatibilidad con los tejidos del cuerpo, mientras que, en el caso de implantes temporales, las estructuras básicas tienen que ofrecer un soporte provisional a las células del tejido, y entonces degradarse mediante los fluidos corporales en el plazo de tiempos compatibles con aquellos del nuevo crecimiento de células, o metabolizarse mediante las mismas células en la fase de crecimiento. Como es sabido, estos sistemas presentan canalizaciones, no necesariamente ordenadas o de geometría regular, que tienen el propósito de posibilitar el transporte de fluidos corporales que portan oxígeno y elementos nutritivos a las células. Un problema de los sistemas vascularizados de la técnica conocida es que el transporte de fluidos dentro de los materiales de los que están compuestos dichos sistemas es difícil. La consecuencia es que, aunque las células presentes en las superficies de la estructura básica, incluyendo aquellas de los canales internos, tienen tiempos de supervivencia adecuados, las células más distantes de dichas superficies tienen tiempos de supervivencia que son demasiado cortos y no permiten tasas de reproducción de células y por tanto de regeneración tisular compatible con los objetivos indicados anteriormente.

La solicitud de patente WO 2010/009320 A1, analizada previamente, aborda el problema y ofrece un medio de formación de estructuras básicas con vascularizaciones principales de sección transversal relativamente grande, rodeadas por una red difusa de microcanales dentro de las estructuras básicas; sin embargo, la solución propuesta por este documento tiene las desventajas descritas anteriormente, que es relativamente compleja de producir y que no puede garantizarse que los filamentos de materiales sacrificiales, destinados a formar los microcanales, no colapsen bajo el peso del precursor líquido de la matriz de estructura básica.

El método de la presente invención, en una variante, permite superar los problemas de la técnica anterior.

Según este método, se repiten las etapas de proceso descritas anteriormente, con la única diferencia de que se introducen materiales porogénicos en el precursor líquido (o que contiene los precursores) de la matriz de estructura básica.

Estos materiales porogénicos pueden ser polvos de un material sacrificial, que puede ser el mismo o diferente del usado para formar la plantilla. Otros materiales porogénicos que pueden usarse son aquellos que desprenderán gas en disolución (por ejemplo NaHCO_3), o tensioactivos o materiales similares que dan lugar a emulsiones o espumas, con la solidificación consecuente del precursor en la forma de una espuma.

Además de los canales principales obtenidos mediante la eliminación de la plantilla, la matriz de estructura básica así producida tiene una estructura de aberturas secundaria compuesta de poros interconectados. Esta estructura secundaria se llena de células por medio de inyección en la matriz o siembra a través de los canales. Las células colonizan de manera homogénea la estructura básica gracias a la posibilidad de migrar a través de las interconexiones entre poros. Estas células son preferiblemente autólogas, es decir, recogidas del mismo individuo en el que debe implantarse la estructura básica o el tejido que vuelve a crecer a partir de la misma, evitando así problemas de rechazo. Para producir la matriz, se usan preferiblemente materiales que se degradan completamente una vez insertados en el cuerpo del paciente (humano o animal), sin generar efectos inflamatorios. Ejemplos de estos materiales son PCL, colágeno y quitosano.

En una variante de producción de estos dispositivos, las células pueden insertarse directamente en el precursor líquido de un hidrogel antes de o durante la encapsulación de la plantilla y de posibles porógenos; los hidrogeles que contienen células vivas se denominan en el campo mediante la definición "cargados con células". El material sacrificial (de la plantilla y de cualquier porógeno) se elimina entonces con disolventes compatibles con las células,

en general soluciones salinas. En este caso se obtiene un hidrogel cargado con células con canales microfluídicos y posiblemente porosidad.

La invención se ilustrará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

5 Se usaron los siguientes materiales cuando se llevaron a cabo las pruebas notificadas en los ejemplos:

- poli(metacrilato de metilo) (PMMA), 445746-1KG (Sigma-Aldrich)
- 10 - poli(alcohol vinílico) (Mowiol), Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich)
- poli(alcohol vinílico) (PVA), Mowiflex TC253 (Kuraray)
- 15 - polidimetilsiloxano (PDMS), Silgard 184 (Dow Corning)
- metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), código 128635 (Sigma-Aldrich)
- dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), código 335681 (Sigma-Aldrich)
- 20 - N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), código T22500 (Sigma-Aldrich)
- persulfato de amonio (APS), código A3426 (Sigma-Aldrich)
- etanol, código 51976 (Sigma-Aldrich)
- 25 - aceite de ricino, código 259853 (Sigma-Aldrich)
- diacrilato de polietilenglicol MW6000 (PEGDA), código 701963 (Sigma-Aldrich)
- 30 - dimetilsulfóxido (DMSO), código 472301 (Sigma-Aldrich)
- aditivo fotoiniciador Irgacure 2959 (CIBA)
- producto de desmoldeo Nano HS (BPItech)
- 35 - pulverización de silicona ALS (AMSOIL)
- cloruro de sodio, código 71376 (Sigma-Aldrich)
- 40 - medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), código D5546 (Sigma-Aldrich)
- tampón fosfato salino (PBS), código P5493 (Sigma-Aldrich)
- 45 - acrilolil-poli(etilenglicol)-RGDS (APEG-RGDS), sintetizado tal como se describe en el artículo "Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: the fourth of synthetic ECM analogs for tissue engineering", B. K. Mann *et al*, Biomaterials (2001) vol. 22, páginas 3045-51
- kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD[®], para células de mamífero, código L-3224 (Invitrogen).

50 EJEMPLO 1

Este ejemplo se refiere a la producción de un dispositivo a base de elastómero que tiene canales y micropocillos internos de 500 µm para aplicaciones biológicas, usando el método con modelo descrito con referencia a la figura 1.

55 Producción de la plantilla: en un modelo de aluminio (modelo 13, figura 1.b) pretratado con Nano HS y calentado hasta 140°C, se inyecta PVA fundido a 190°C a través de la abertura lateral 14, hasta que los espacios internos están completamente llenos. El modelo se enfría entonces hasta temperatura ambiental, las dos partes componentes se separan y la plantilla de PVA 15 así formada se retira mecánicamente.

60 Producción de la matriz a base de PDMS: el precursor de PDMS líquido Silgard 184 (13,5 g) y el agente reticulante relevante (1,5 g) (incluido en el paquete de venta de Silgard 184) se introducen, por orden, en un vaso de precipitados de 250 ml, y se mezclan manualmente usando una varilla de vidrio durante aproximadamente 1 minuto. La mezcla se coloca entonces en una cámara a presión reducida (10 mbar) durante 60 minutos para eliminar las burbujas presentes en el líquido, tras lo cual la mezcla se vierte en el molde de PMMA 16 que contiene la plantilla 15; la plantilla se suspende en el molde no en contacto con el suelo de la cavidad 17, por medio de sus dos extremos insertados en las ranuras 18 y 18'. El molde se sella entonces para impedir el escape de líquido y se

permite que tenga lugar la reacción a temperatura ambiental durante 48 horas (alternativamente, es posible un funcionamiento a 60°C durante 6 horas). El molde se abre entonces y se retira el bloque de PDMS sólido.

5 Eliminación de la plantilla: el bloque de PDMS que contiene la plantilla se sumerge en agua bidestilada mientras se mantiene el conjunto con agitación magnética durante 24 horas a 90°C. De esta manera, la plantilla se solubiliza en agua sin dejar trazas en la matriz de PDMS. Al final de este procedimiento, el dispositivo 19 con canalizaciones y micropocillos está listo para su uso.

10 EJEMPLO 2

Este ejemplo se refiere a la producción de un dispositivo a base de elastómero que tiene canales y micropocillos internos de 500 µm para aplicaciones biológicas, y es una variante del ejemplo 1.

15 Producción de la plantilla: sobre una parte microfabricada del tipo 10 mostrada en la figura 1.a, situada dentro de un molde y pretratada con Nano HS y calentada hasta 50°C, se vierte una disolución acuosa de Mowiol (50/50 en peso) calentada hasta 70°C, depositando una película de aproximadamente 1-3 mm sobre toda la superficie del molde (pieza colada). El molde se enfría entonces hasta temperatura ambiental y se permite que el disolvente se evapore durante 24 horas bajo una corriente de aire. Por medio de un proceso de ataque (usando un trapo empapado en agua y etanol), la capa de Mowiol se lleva a una alineación perfecta con el límite superior de las cavidades que resultan de las microfabricaciones. Tras colocar el molde en una cámara de presión reducida (10 mbar) 4 horas, se elimina la plantilla de Mowiol así moldeada.

25 Producción de la matriz a base de PDMS: el precursor de PDMS líquido Silgard 184 (13,5 g) y el agente reticulante relevante (1,5 g) (incluido en el paquete de venta de Silgard 184) se introducen, por orden, en un vaso de precipitados de 250 ml, y se mezclan manualmente usando una varilla de vidrio durante aproximadamente 1 minuto. La mezcla se coloca entonces en una cámara de presión reducida (10 mbar) durante 60 minutos para eliminar las burbujas presentes en el líquido, tras lo cual la mezcla se vierte en el molde de PMMA 16 que contiene la estructura sacrificial de Mowiol soportada por las dos partes B y B' en las ranuras 18 y 18'. El molde se sella entonces para impedir el escape de líquido y se permite que tenga lugar la reacción a temperatura ambiental durante 48 horas (alternativamente, a 60°C durante 6 horas). El molde se abre entonces y se retira el bloque de PDMS sólido.

35 Eliminación de la plantilla: el bloque de PDMS que contiene la plantilla de Mowiol se sumerge en agua bidestilada manteniendo el conjunto con agitación magnética durante 24 horas a 90°C, cambiando la disolución cada 8 horas. De esta manera, la plantilla se solubiliza en agua no dejando ninguna traza en la matriz de PDMS. Al final de este procedimiento, el dispositivo 19 con canalizaciones y micropocillos está listo para su uso.

40 EJEMPLO 3

Este ejemplo se refiere a la producción de un dispositivo a base de hidrogel que tiene canalizaciones y micropocillos internos de 500 µm para aplicaciones biológicas.

Producción de la plantilla: procedimiento como en el ejemplo 1, siendo la única diferencia que el modelo 13 se calienta hasta 120°C, y, en lugar de PVA, se inyecta PMMA fundido en el modelo a 170°C.

45 Producción de la matriz a base de hidrogel de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA): se introducen HEMA (6,00 g, 46,1 mmol), agua (3 ml), EGDMA (60,0 mg, 0,303 mmol) y TEMED (81,4 mg, 0,701 mmol), por orden, en un matraz de 50 ml, mezclando durante 30 s con un agitador magnético tras la adición de cada componente. Se añade entonces una disolución acuosa del 10% en peso de APS (75,0 µl, 0,0322 mmol), se agita a mano durante 30 s, entonces la mezcla se vierte en el molde de PMMA (16) que contiene la estructura sacrificial. El molde se sella entonces para impedir la evaporación de los componentes líquidos y se permite que la mezcla reaccione durante 24 horas a temperatura ambiental. El molde se desmonta entonces, el hidrogel moldeado que contiene la plantilla se retira y se sumerge en una disolución acuosa de etanol (50% v/v, 30 ml), cambiando la disolución cada 4 horas tres veces seguidas.

55 Eliminación de la estructura sacrificial: el hidrogel del PHEMA que contiene la estructura sacrificial de PMMA se sumerge en acetona, con agitación magnética durante 48 horas a 50°C, cambiando la disolución cada 12 horas. De esta manera, la plantilla de PMMA se solubiliza no dejando ninguna traza en el hidrogel. Posteriormente, el hidrogel se sumerge en una disolución de etanol durante 4 horas y entonces, durante el mismo tiempo, en una disolución acuosa de etanol (50% v/v, 30 ml), después se realiza un lavado en agua bidestilada (50 ml), cambiando la disolución cada 4 horas tres veces seguidas. Al final de este procedimiento, el dispositivo con canalización y micropocillos 19 está listo para su uso.

60 EJEMPLO 4

65 Este ejemplo se refiere a la producción de un dispositivo a base de hidrogel que tiene canalizaciones y micropocillos internos de 500 µm para aplicaciones biológicas, y es una variante del ejemplo 3.

- 5 Producción de la estructura sacrificial: el modelo de aluminio de tipo 13 pretratado con Nano HS se deja parcialmente abierto y se calienta hasta 120°C. En el espacio que se deja entre las dos partes (10 y 12) del molde se inyecta PMMA fundido a 170°C. Tras esta fase de inyección, las dos partes del molde se unen por medio de una prensa usando una fuerza de compresión de 10.000 kg. Cuando se alcanza la fuerza de compresión deseada, empieza la fase de mantenimiento, con fuerza controlada de la presión final hasta el enfriamiento completo del molde. Al final del proceso descrito, las dos partes que constituyen el molde se separan y la plantilla de PMMA 15 formada se retira mecánicamente.
- 10 Producción de la matriz a base de hidrogel de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA): se introducen HEMA (6,00 g, 46,1 mmol), agua (3 ml), EGDMA (60,0 mg, 0,303 mmol) y TEMED (81,4 mg, 0,701 mmol), por orden, en un matraz de 50 ml, mezclando durante 30 s con un agitador magnético tras la adición de cada componente. Entonces se añade una disolución acuosa del 10% en peso de APS (75,0 µl, 0,0322 mmol), se agita a mano durante 30 s, entonces la mezcla se vierte en el molde de PMMA (16) que contiene la plantilla. El molde se sella para impedir la evaporación de los componentes líquidos y se permite que la mezcla reaccione durante 24 horas a temperatura ambiental. El molde se desmonta entonces, el hidrogel moldeado que contiene la estructura sacrificial se retira y se sumerge en una disolución acuosa de etanol (50% v/v, 30 ml), cambiando la disolución cada 4 horas tres veces seguidas.
- 15
- 20 Eliminación de la plantilla: el hidrogel de PHEMA que contiene la estructura sacrificial de PMMA se sumerge en acetona, con agitación magnética durante 48 horas a 50°C, cambiando la disolución cada 12 horas. De esta manera, la plantilla de PMMA se solubiliza no dejando ninguna traza sobre el hidrogel. Posteriormente, el hidrogel se sumerge en una disolución de etanol durante 4 horas y entonces en una disolución acuosa de etanol (50%, v/v, 30 ml) durante el mismo tiempo, después se realiza un lavado en agua bidestilada (50 ml), cambiando la disolución cada 4 horas tres veces seguidas. Al final de este procedimiento, el dispositivo 19 con canalizaciones y micropocillos está listo para su uso.
- 25

EJEMPLO 5

- 30 Este ejemplo se refiere a la producción de una estructura básica porosa y vascularizada a base de hidrogel, para aplicaciones en ingeniería tisular.

35 Producción de la plantilla de tamaño mínimo de 200 µm: en un modelo de aluminio de tipo 23, mostrado en la figura 2.b, pretratado con Nano HS y calentado hasta 120°C, se inyecta PMMA fundido a 170°C a través de la abertura lateral 24, hasta que los espacios internos están completamente llenos. El modelo se enfría entonces hasta temperatura ambiental, las dos partes componente se separan y la estructura de PMMA así moldeada se retira mecánicamente.

40 Producción de la matriz a base de hidrogel de polietilenglicol (PEG): se introducen PEGDA 6000 (6,500 mg, 1,08 mmol), una disolución saturada de cloruro de sodio (7,2 ml), una disolución de Irgacure 2959 en etanol (450 µl, 100 mg de Irgacure/ml de etanol), polvo de cloruro de sodio con función porogénica (3.500 mg, 59,89 mmol), por orden, en un matraz de 50 ml y se mezclan con un agitador magnético durante 10 minutos. La mezcla se vierte en el molde de PMMA 26 que contiene la plantilla de PMMA (figura 2.e), el molde se sella entonces para impedir la evaporación de los componentes líquidos y se permite que la mezcla reaccione durante 10 minutos bajo irradiación UV (365 nm, bombilla de vapor de mercurio de 120 W, distancia 20 cm) a temperatura ambiental. El molde se desmonta entonces, el hidrogel moldeado que contiene la plantilla se retira y se sumerge en una disolución acuosa de etanol (50% v/v, 30 ml), cambiando la disolución cada 4 horas tres veces seguidas.

45

50 Eliminación de la plantilla y porógeno: el hidrogel que contiene la estructura sacrificial de PMMA se sumerge en acetona, con agitación magnética durante 48 horas a 50°C, cambiando la disolución cada 12 horas. De esta manera, la estructura sacrificial de PMMA se solubiliza no dejando ninguna traza sobre el hidrogel.

55 Posteriormente, el hidrogel se sumerge en una disolución de etanol durante 4 horas y entonces en una disolución acuosa de etanol (50%, v/v, 30 ml) durante el mismo tiempo, después se realiza un lavado en agua bidestilada (50 ml) a 50°C durante 72 horas, cambiando la disolución cada 12 horas seis veces seguidas. El lavado en agua permite que las partículas de sal incluidas en la matriz se solubilicen, dejando la estructura porosa en su sitio. Finalmente, el hidrogel se sumerge en primer lugar en una solución salina (PBS, 30 ml) durante 4 horas y entonces en el medio de cultivo (DMEM 1640, 30 ml) durante 4 horas. Al final de este procedimiento, la estructura básica porosa y vascularizada 29 está lista para su uso con las células.

60

EJEMPLO 6

65 Este ejemplo se refiere a la producción de una estructura básica vascularizada a base de hidrogel de polietilenglicol (PEG) cargado con células para aplicaciones de ingeniería tisular.

Producción de la plantilla: en un modelo de aluminio de tipo 23, mostrado en la figura 2.b, pretratado con Nano HS y calentado hasta 140°C, se inyecta PVA fundido a 190°C a través de la abertura lateral 24, hasta que los espacios internos están completamente llenos. El modelo se enfría entonces hasta temperatura ambiental, las dos partes que constituyen el molde se separan y la plantilla de PVA así formada se retira mecánicamente. En este caso, la superficie de la plantilla se trata con pulverización de silicio ALS para convertirla en hidrófoba.

Producción de la matriz a base de hidrogel de polietilenglicol (PEG): se introducen PEGDA (1.500 mg, 0,250 mmol), APEG-RGDS (164 mg, 0,0450 mmol), una disolución de PBS (13,5 ml, pH 7,4) con fibroblastos 3T3 en suspensión (10^6 células/ml), una disolución de Irgacure 2959 en DMSO (300 μ l, 200 mg de Irgacure/ml de DMSO), por orden, en un matraz de 50 ml, y se mezclan con un agitador magnético durante 2 min. La mezcla se vierte en el molde de PMMA 26 que contiene la plantilla de PVA (figura 2.e). El molde se sella para impedir la evaporación de los componentes líquidos y se permite que la mezcla reaccione durante 3 minutos bajo irradiación UV (365 nm, bombilla de vapor de mercurio de 120 W, distancia 20 cm) a temperatura ambiental. La alta concentración de solutos en la mezcla acuosa y el recubrimiento hidrófobo no permite que el PVA se disuelva durante la polimerización de la matriz a base de hidrogel. El molde se desmonta entonces y el hidrogel moldeado que contiene la plantilla se retira.

Eliminación de la plantilla: el hidrogel se sumerge en una solución salina (PBS, 30 ml) durante 2 horas, y entonces en el medio de cultivo (DMEM 1640, 30 ml) durante 8 horas, permitiendo la solubilización completa de la plantilla de PVA. Al final de este procedimiento, la estructura básica porosa y vascularizada 29 con células precargadas está lista para su uso.

EJEMPLO 7

Se repite el ejemplo 2, usando una disolución de aceite de ricino en etanol (3 ml, 200 mg de aceite de ricino/ml) en lugar de Nano HS para pretratar el molde; los resultados obtenidos son los mismos que los del ejemplo 2.

EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra la capacidad de una estructura básica vascularizada de la invención para mantener vivas las células contenidas en la misma.

Las estructuras básicas producidas en el ejemplo 6 están conectadas a una bomba de jeringa y se alimentan durante tres días con medio de cultivo DMEM para células a una velocidad de 10 microlitros por minuto. Durante la prueba, la estructura básica se mantiene en una incubadora a 37°C y el 5% de CO₂, dentro de un recipiente esterilizado. Al final de la prueba, se corta una rodaja de estructura básica de 1 mm de grosor y perpendicular al canal al que se conectó la jeringa, usando un bisturí quirúrgico; la rodaja se somete a una prueba de fluorescencia que detecta las células vivas por medio del método LIVE/DEAD usando el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD[®]. Los resultados de la prueba se muestran en la parte superior de la figura 3, que muestra la estructura básica al inicio (imagen 3.a) y al final (imagen 3.b) de la misma prueba, tras 72 horas; la línea discontinua circular indica la posición del canal microfluídico.

EJEMPLO 9 (COMPARATIVO)

La prueba en el ejemplo 8 se repite con una estructura básica no según la invención, producida en particular mediante el mismo método que en el ejemplo 6, excepto por la inserción de la plantilla sacrificial, y por tanto sin la canalización microfluídica. La parte inferior de la figura 3 muestra la estructura básica al inicio (imagen 3.c) y al final (imagen 3.d) de esta prueba.

Como puede observarse a partir de la comparación de las imágenes 3.b y 3.d, tras tres días de pruebas en el caso de la estructura básica de la invención, el número de células vivas es mucho mayor que en el caso sin canalización; se cree que la capacidad mucho mayor de la estructura básica de la invención para mantener las células contenidas en su matriz vivas se debe a la posibilidad mucho mayor de intercambio de material con el entorno exterior, en particular para llevar nutrientes y oxígeno a las células y para eliminar los productos de desecho generados mediante las propias células.

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para producir un dispositivo microfluídico tridimensional monolítico (19; 29), que comprende las siguientes etapas:
- 5 - producir, con un material sacrificial, una plantilla tridimensional (15; 25) de forma estable, que consiste en una parte (A), que se corresponde con la canalización del dispositivo microfluídico, y una o más partes (B, B'), que no se corresponden con dicha canalización;
- 10 - colocar dicha plantilla tridimensional en un molde (16; 26) suspendiéndola de al menos una de dicha una o más partes (B, B') que no se corresponden con dicha canalización;
- 15 - recubrir dicha plantilla tridimensional excluyendo dicha una o más partes (B, B') que no se corresponden con dicha canalización, con un precursor, líquido o en disolución, de una matriz sólida, pudiendo solidificar dicho precursor mediante reacción química o transformación física formando una matriz que constituye el cuerpo del dispositivo final;
- 20 - provocar la solidificación de dicho precursor;
- retirar de manera selectiva el material sacrificial mediante un tratamiento térmico y/o mediante disolución con un disolvente del mismo;
- 25 en el que la matriz se produce con un material poroso obtenido introduciendo en el precursor líquido o en la disolución del precursor de matriz, polvos de un material sacrificial porogénico, que puede ser igual o diferente del usado para formar la plantilla tridimensional.
- 2.- Método según la reivindicación 1, en el que la plantilla tridimensional está compuesta por la unión de dos o más partes independientes.
- 3.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la plantilla tridimensional se obtiene mediante la deformación de una estructura hecha de un material sacrificial.
- 30 4.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, antes de la etapa de recubrir la plantilla tridimensional en el molde con dicho líquido precursor o en disolución, la superficie de dicha plantilla se recubre completa o parcialmente con una capa de un material que difiere del material sacrificial y del precursor que, tras la disolución del material sacrificial, permanece adherido a la superficie interna de la matriz del dispositivo.
- 35 5.- Método según la reivindicación 4, en el que dicho material que difiere del material sacrificial y del precursor es insoluble en el precursor y/o en su disolvente.
- 40 6.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material sacrificial es una cera o un polímero termoplástico seleccionado de poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarbonato (PC) y poliestireno (PS).
- 45 7.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material que forma el cuerpo del dispositivo final se selecciona de resinas epoxi, polidimetilsiloxano (PDMS), poliuretano (PU), poliamidoaminas (PAA), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm), polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(alcohol vinílico) (PVA) hidrogel, colágeno, agarosa, quitosano, alginato, fibrinógeno, ácido hialurónico, gelatina y dextrano.
- 50 8.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material sacrificial se retira mediante disolución con un disolvente y los pares material sacrificial/material del cuerpo del dispositivo se seleccionan de PMMA-PDMS (disolvente: acetona), PMMA-PHEMA (disolvente: acetona), PVA-PHEMA (disolvente: agua), PVA-PDMS (disolvente: agua) y PVA-PEG (disolvente: agua).
- 55 9.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material porogénico, diferente del de la plantilla tridimensional se selecciona de los materiales que desprenden gas en disolución, disolventes, aceites, tensioactivos o agentes de espumación.
- 60 10.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para producir soportes vascularizados para aplicaciones de cultivo celular, en el que la matriz del dispositivo está hecha de un material biocompatible y/o biodegradable.
- 65 11.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se insertan células viables en la matriz.

12.- Método según la reivindicación 11, en el que dichas células se insertan en la matriz cargándolas en el precursor líquido o en la disolución de precursor a partir del/de la que se produce la matriz.

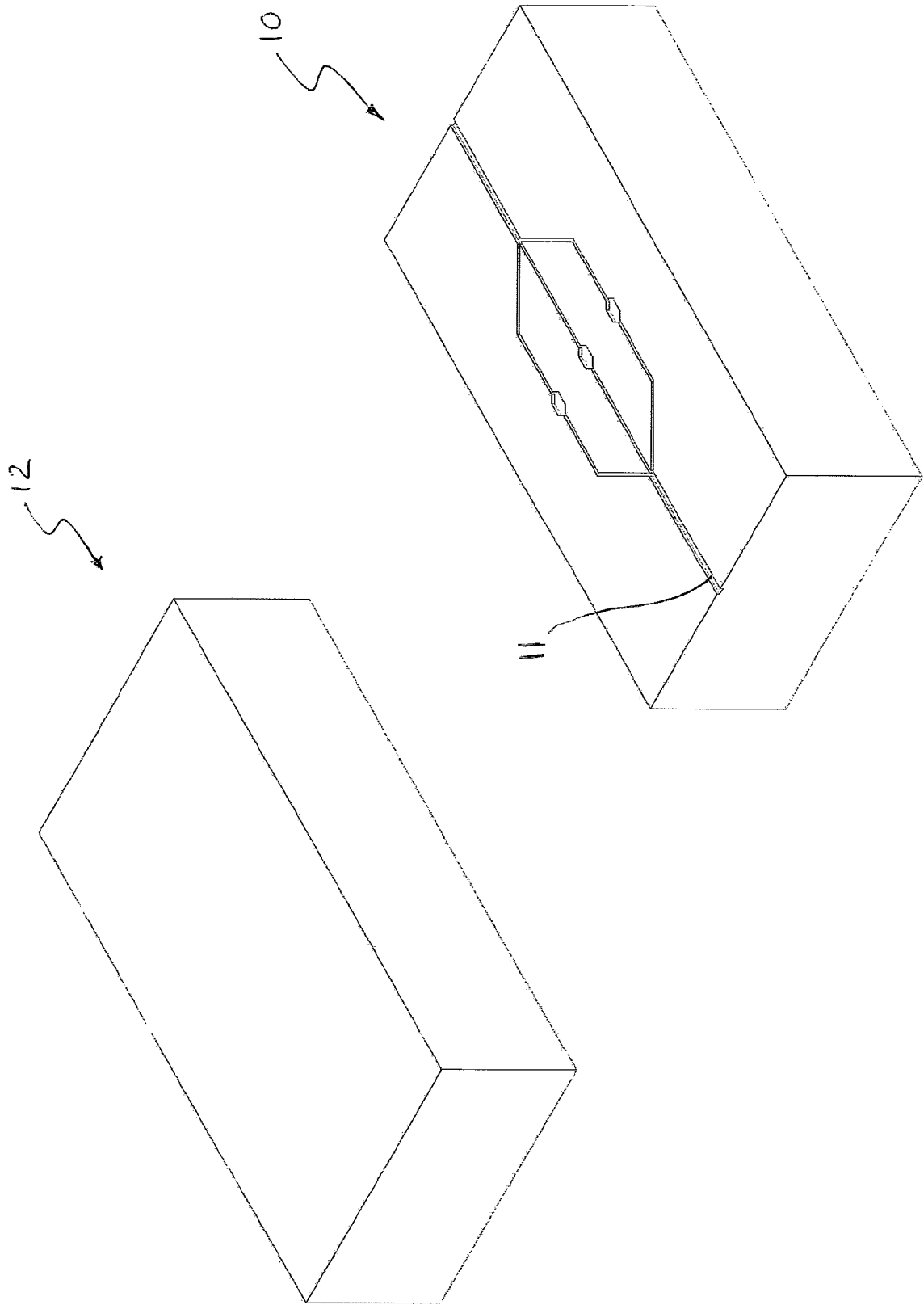


Fig. 1.a

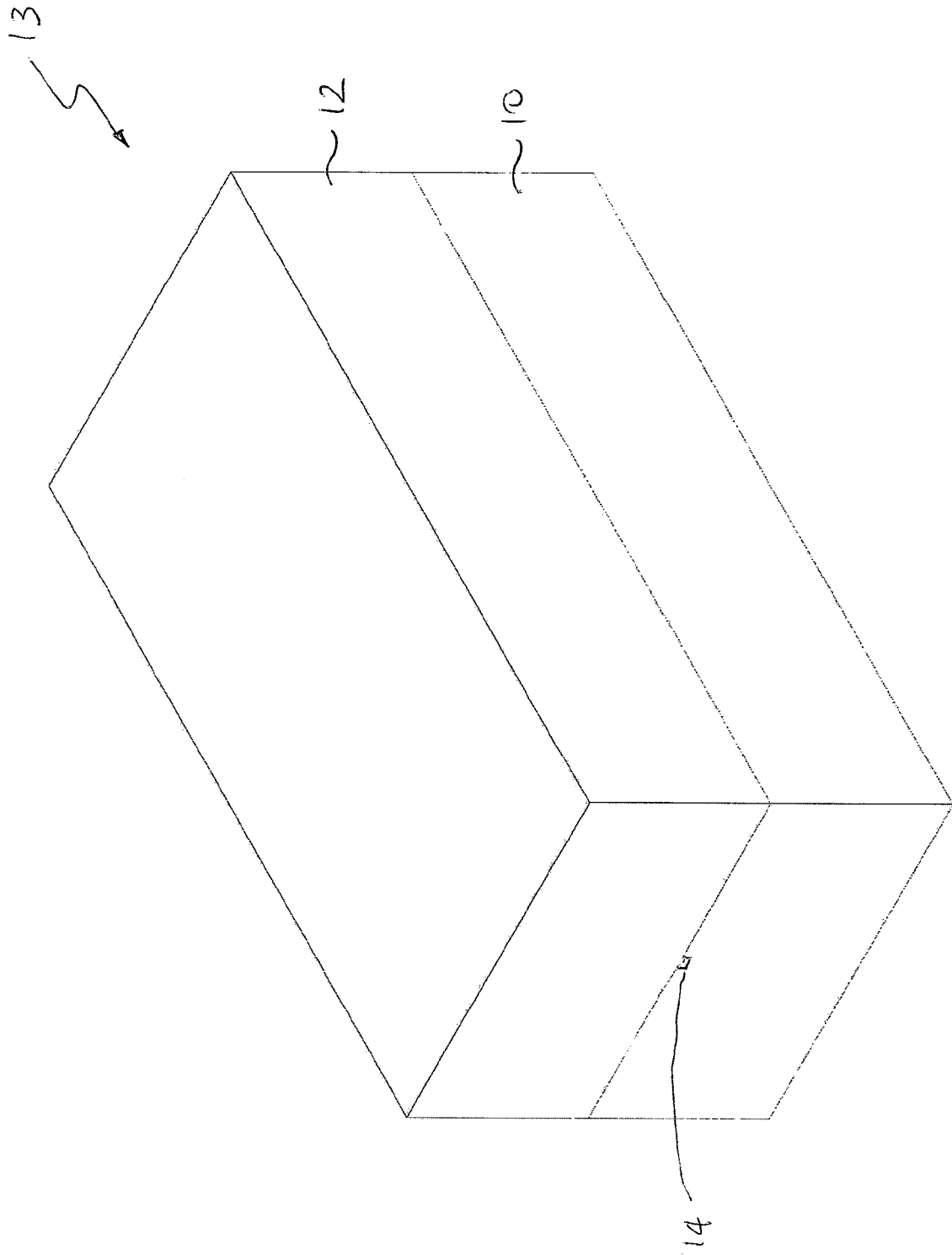


Fig. 1.b

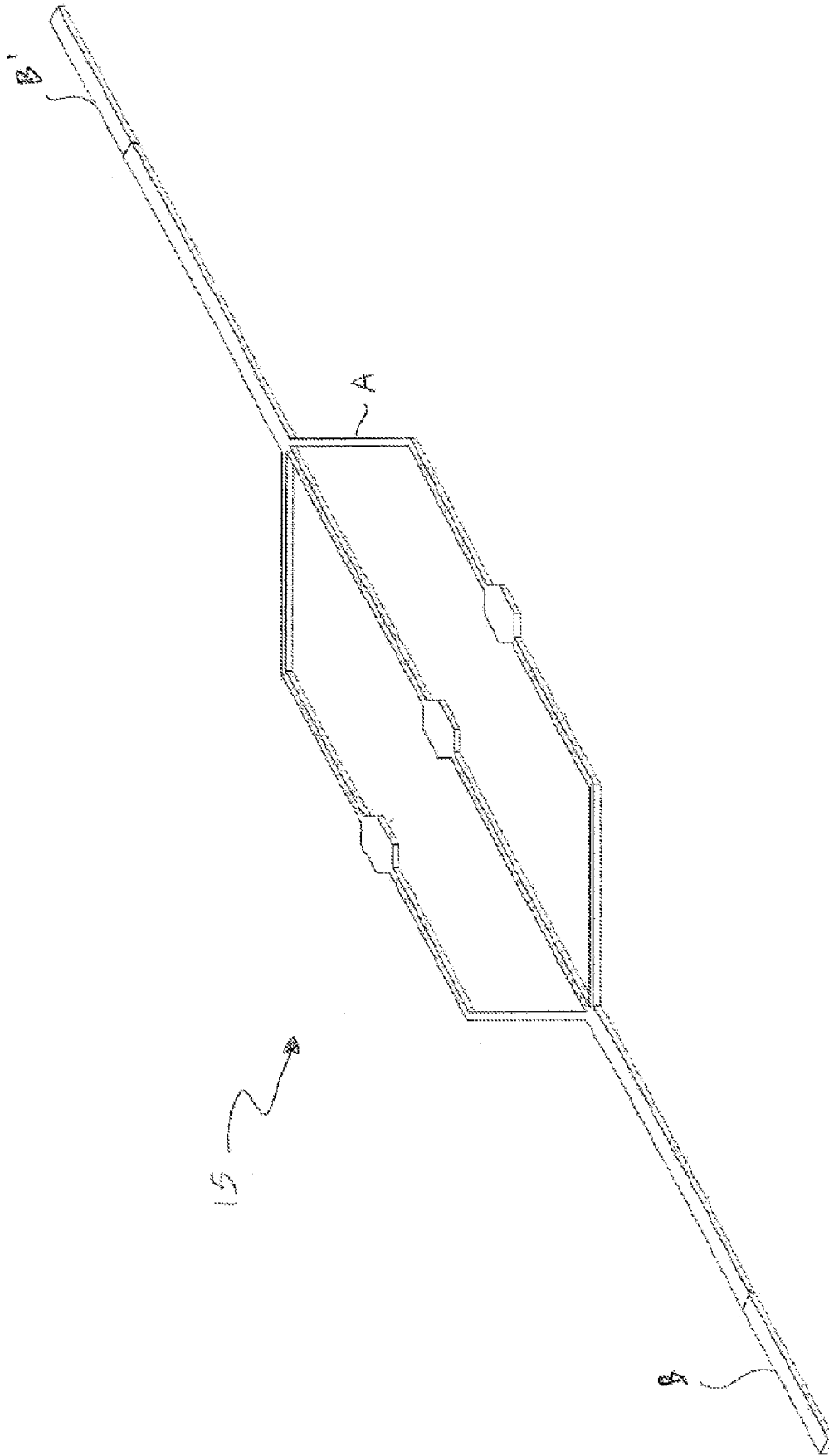


Fig. 1.c

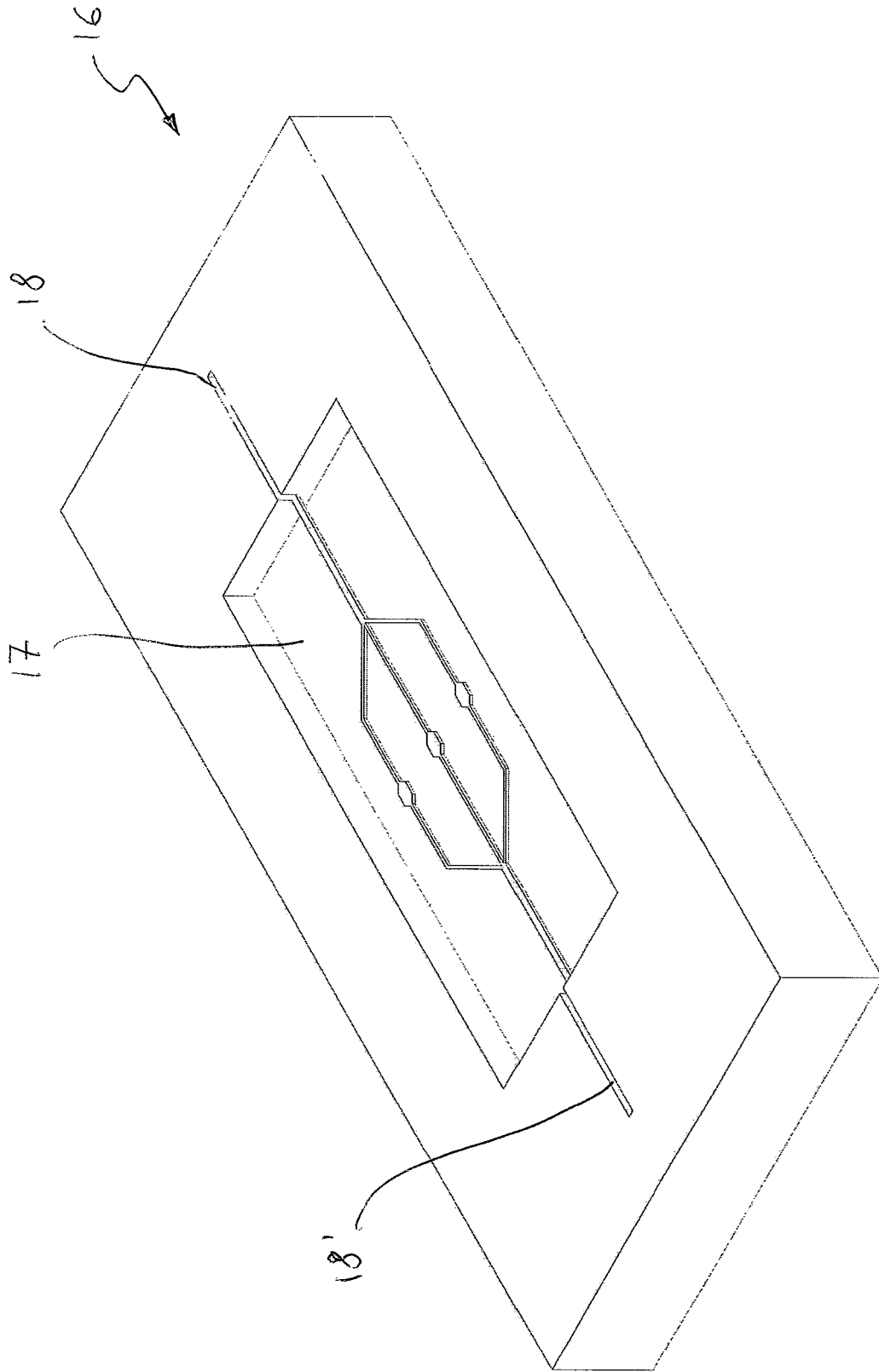


Fig. 1.d

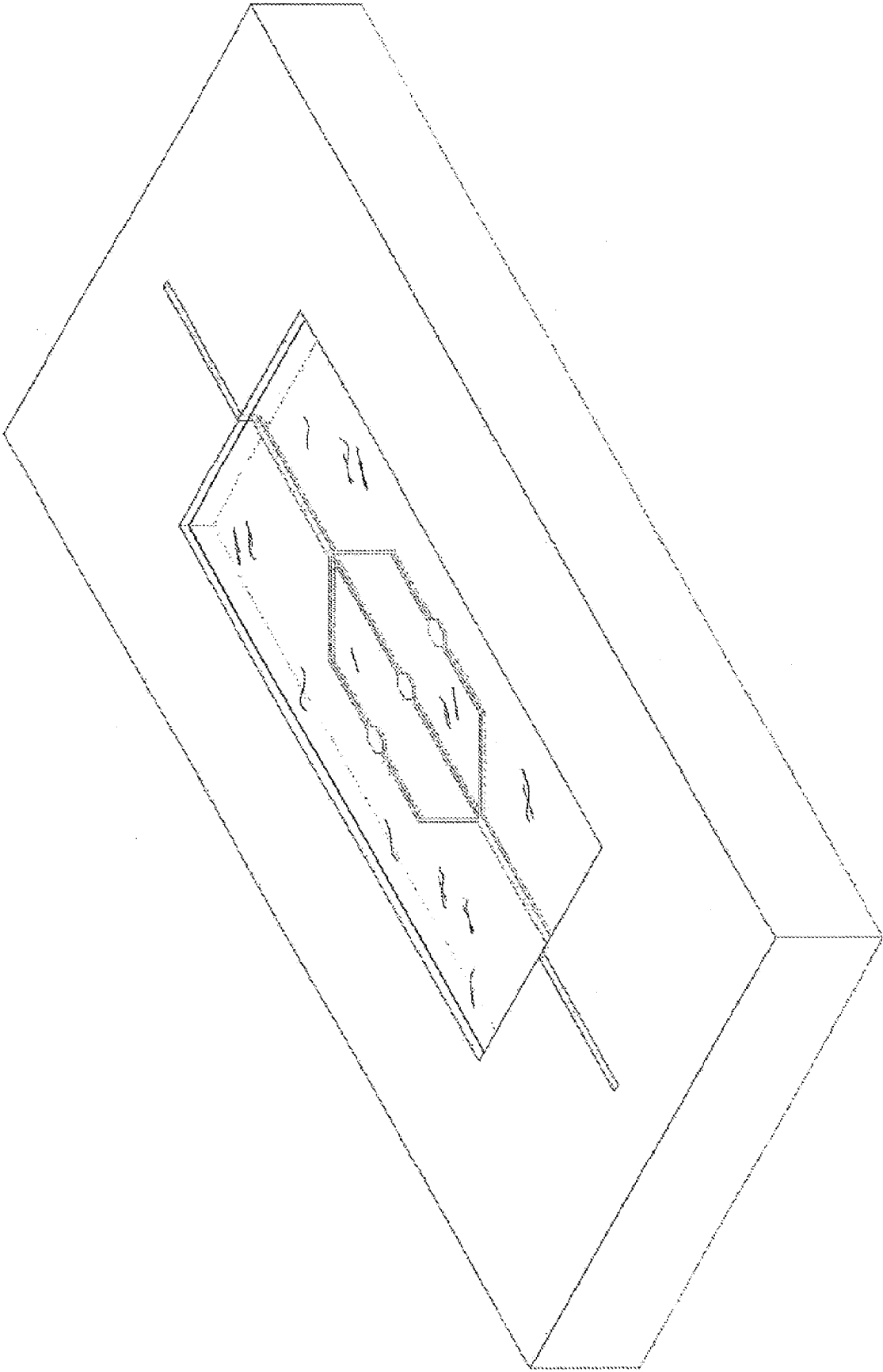


Fig. 1.e

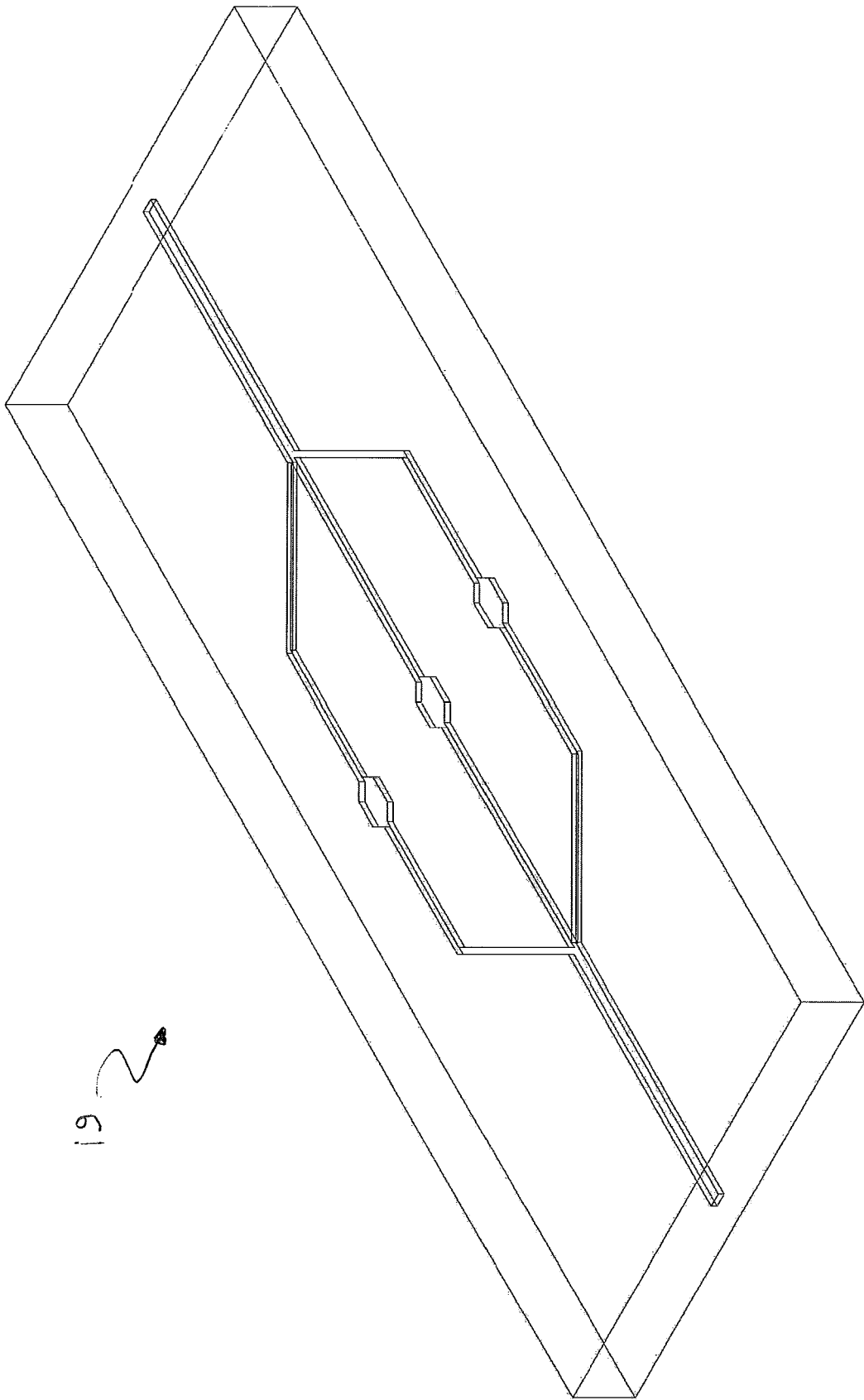


Fig. 1.f

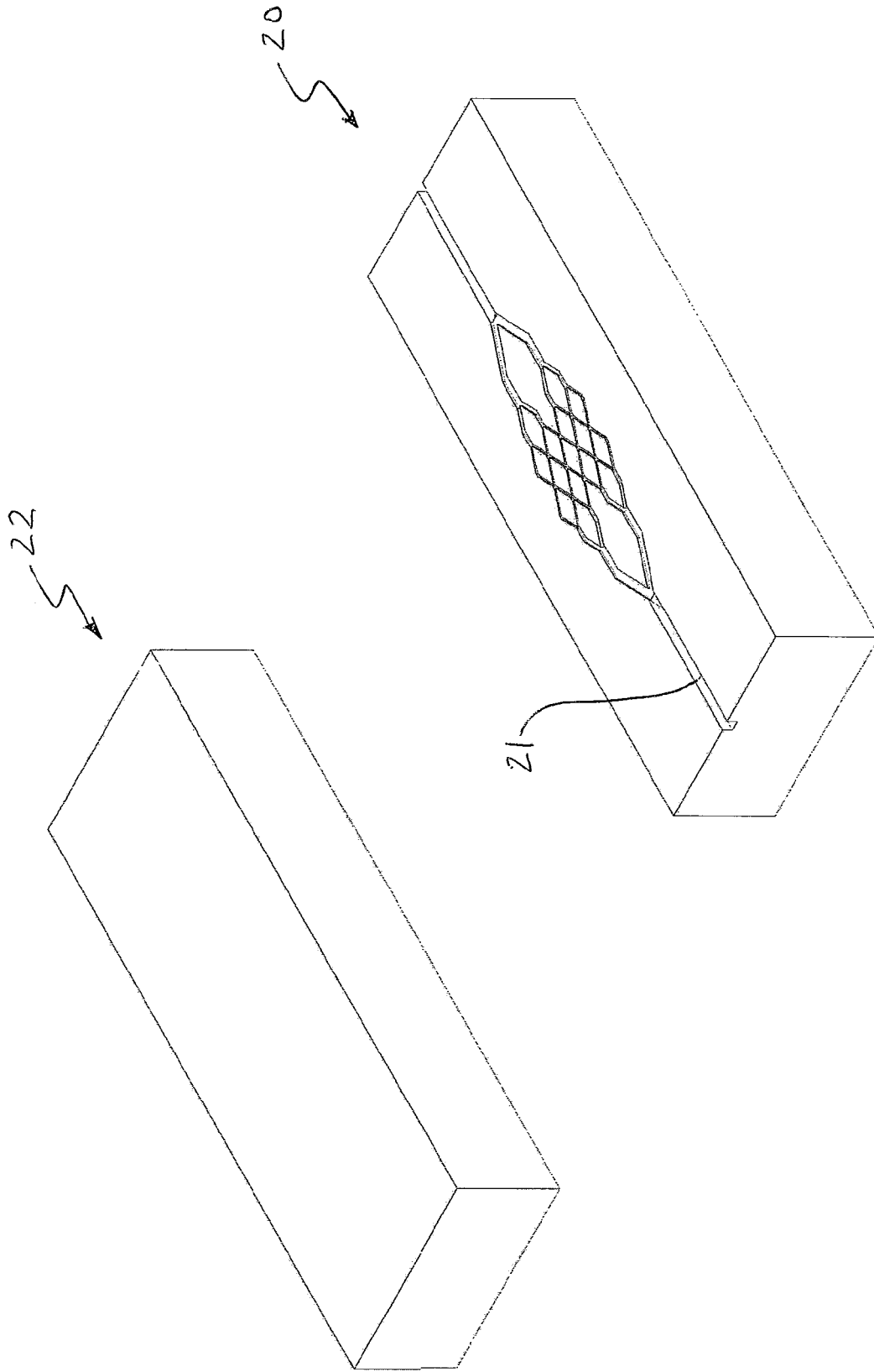


Fig. 2.a

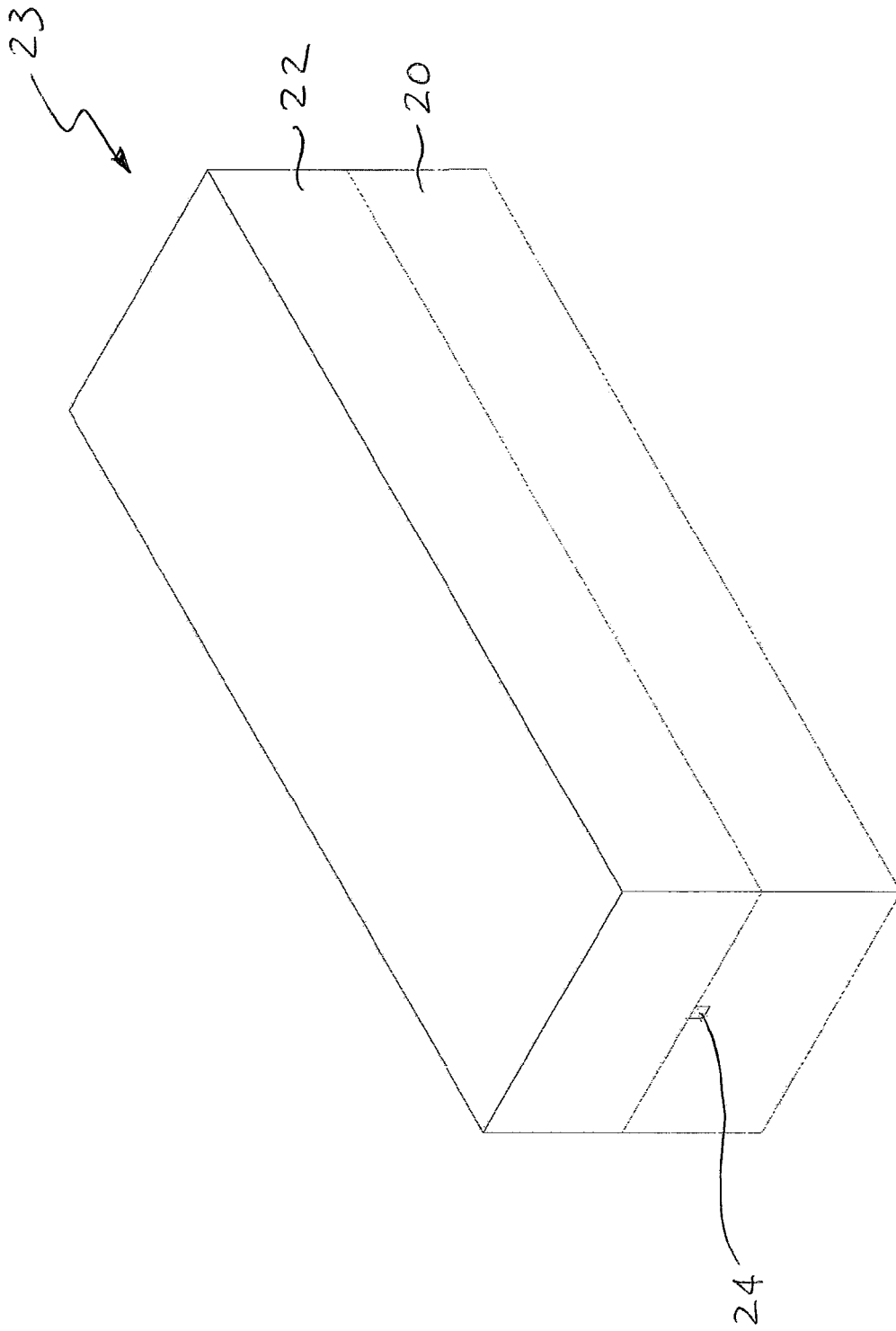


Fig. 2.b

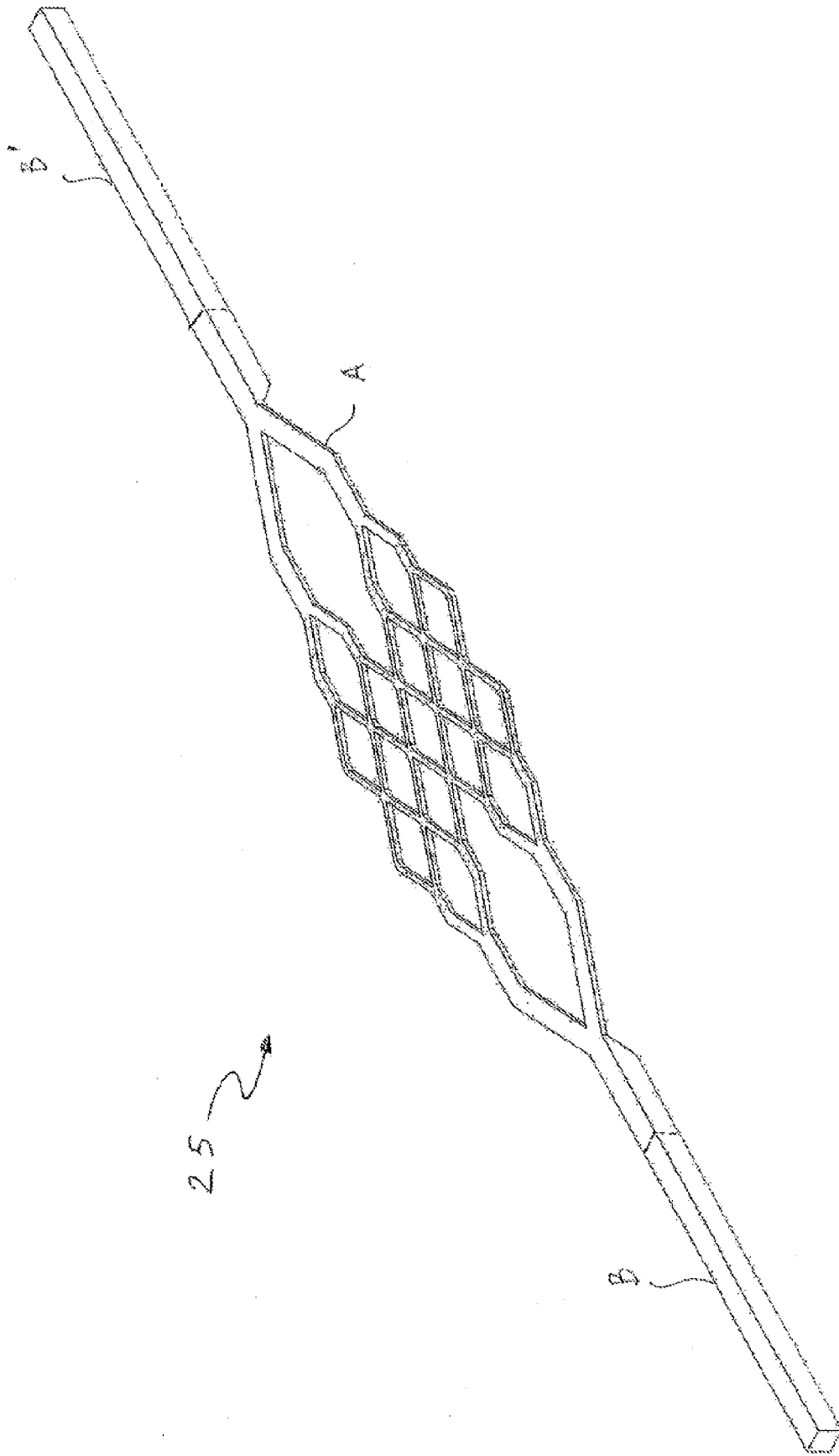


Fig. 2.c

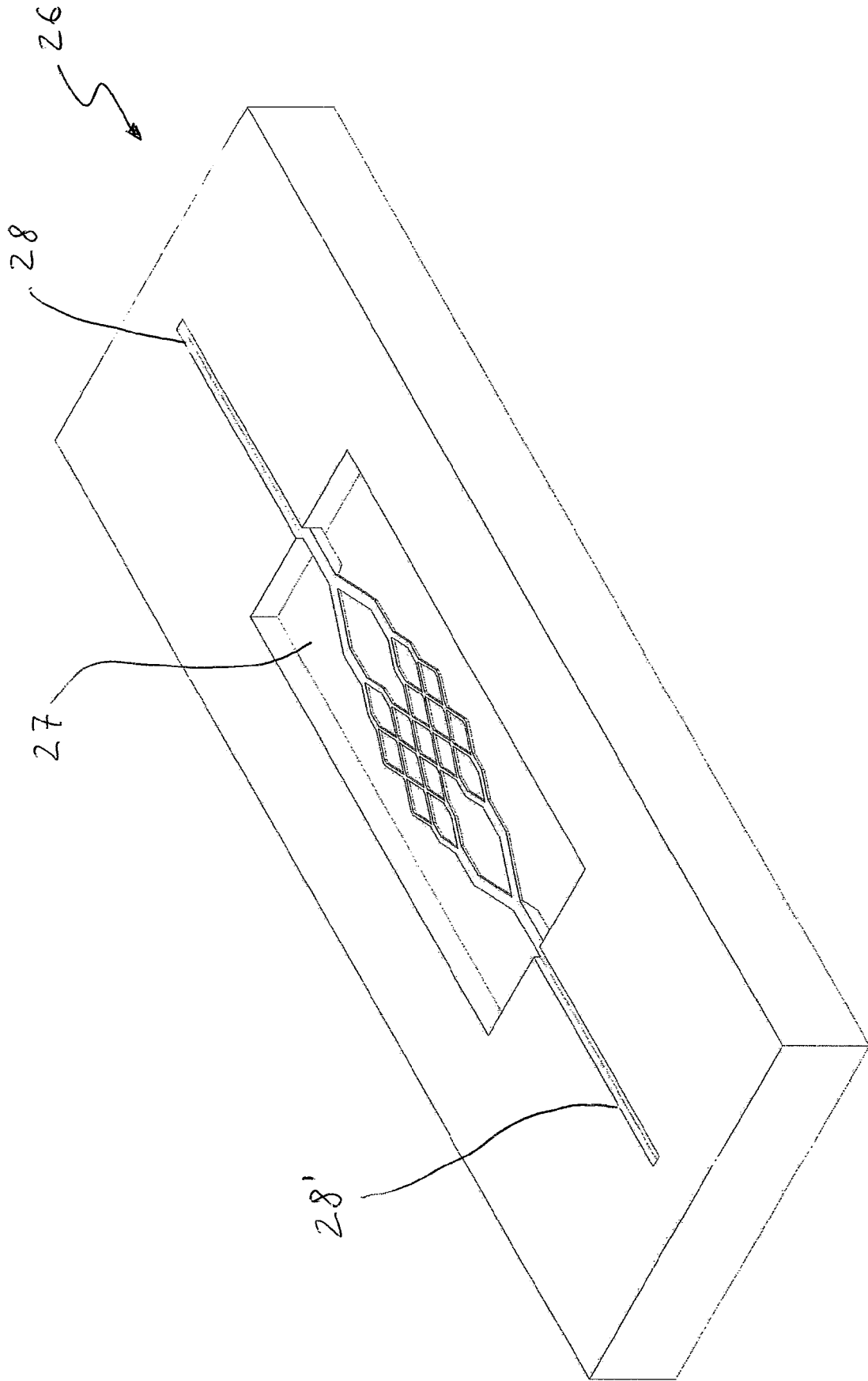


Fig. 2.d

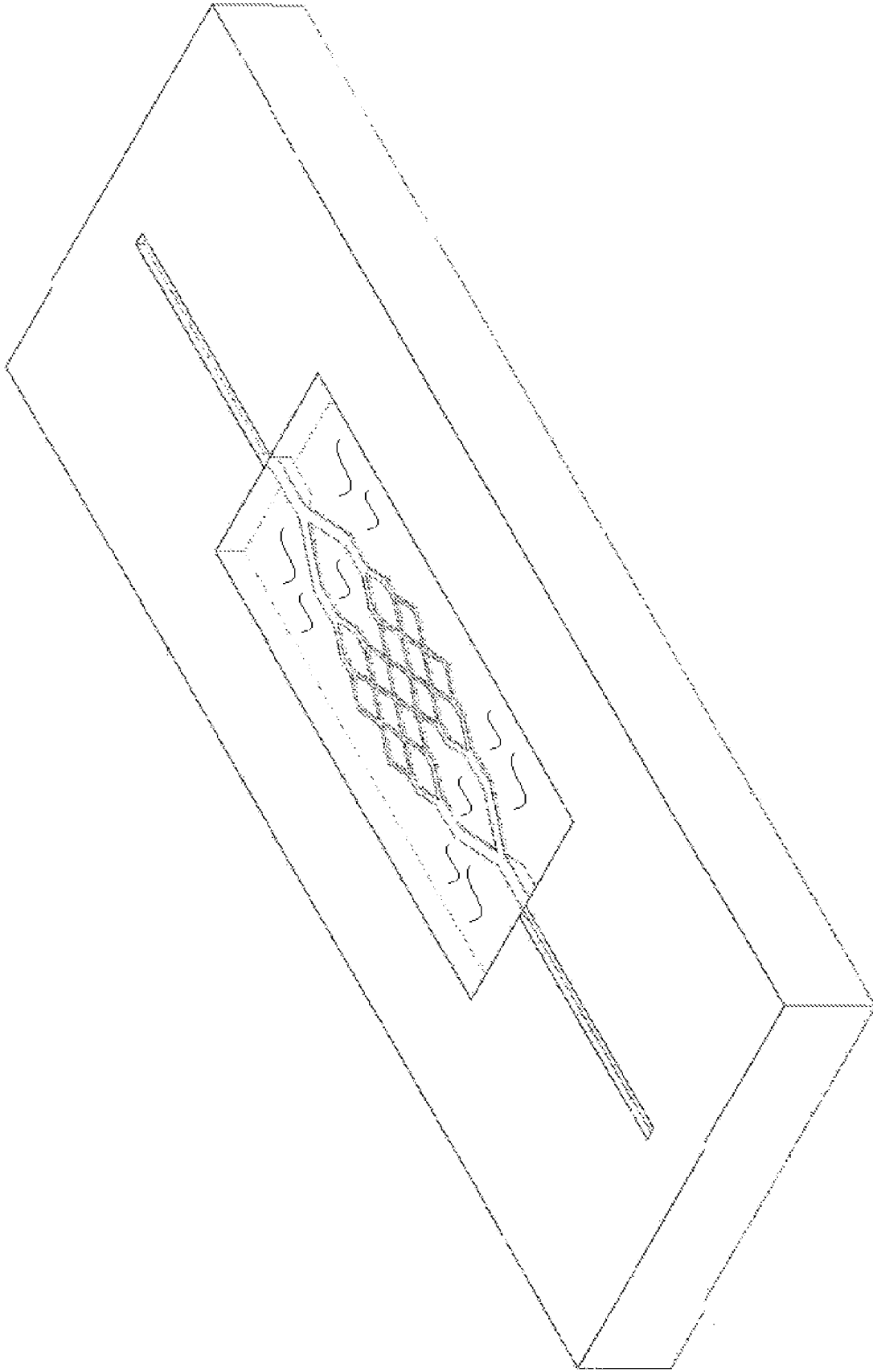


Fig. 2.e

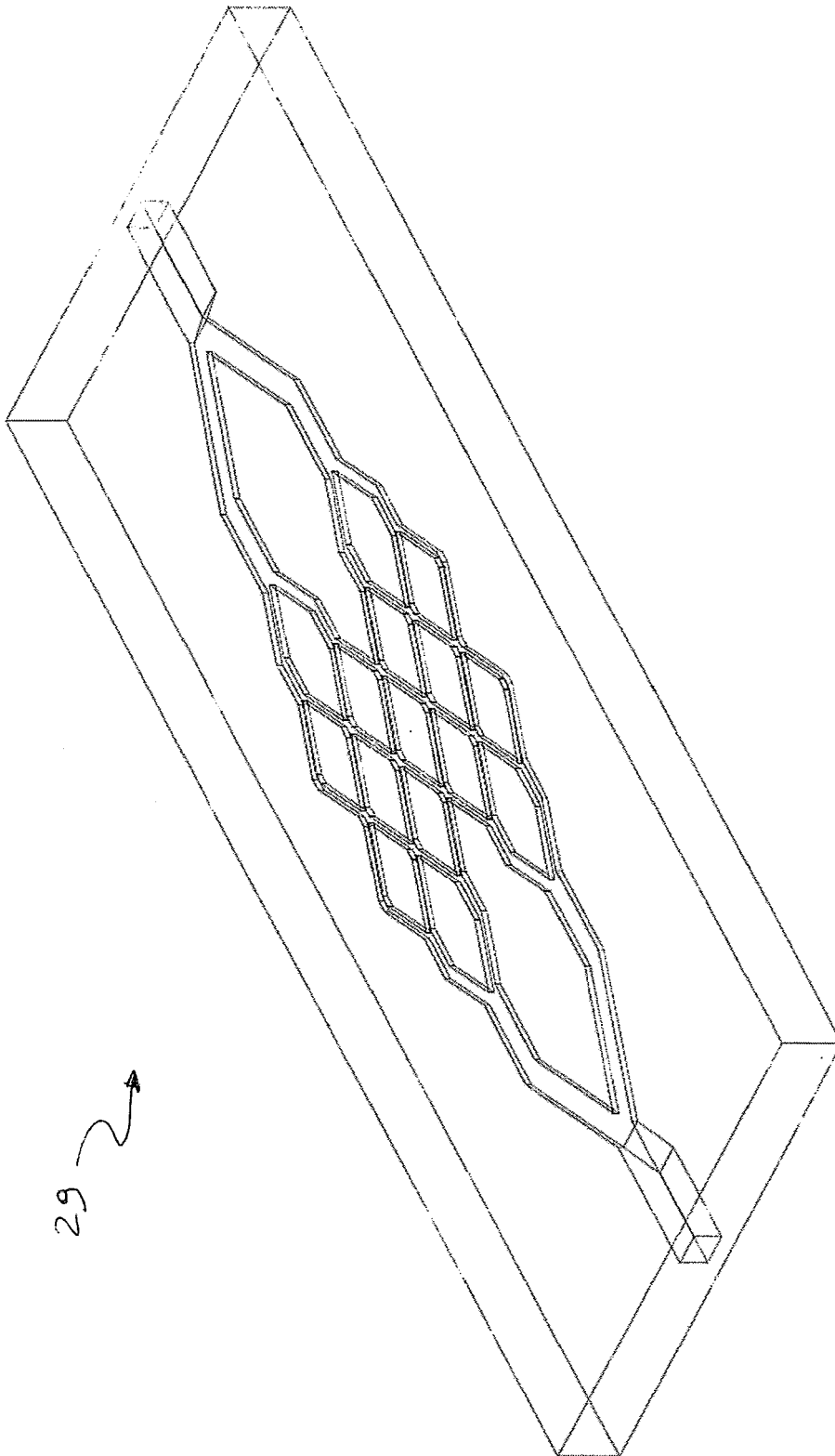
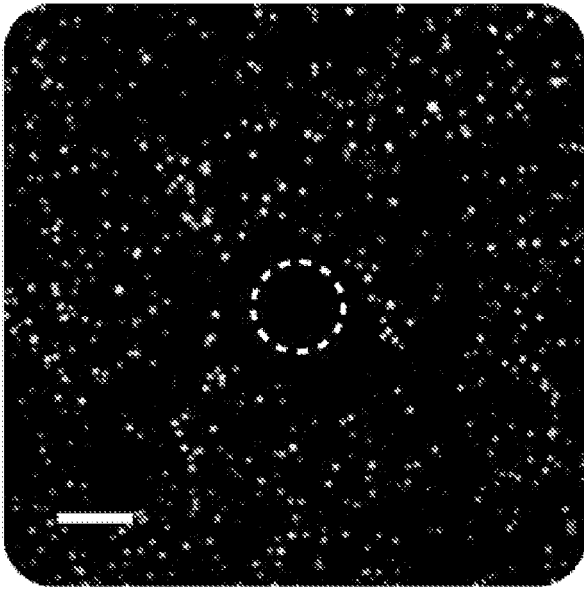
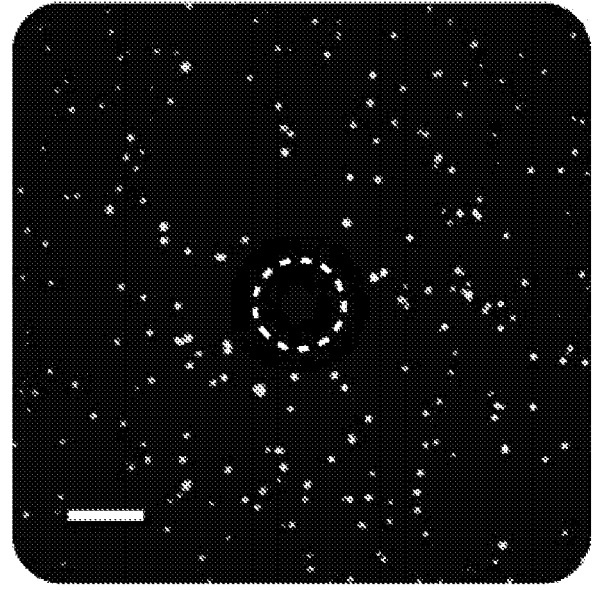


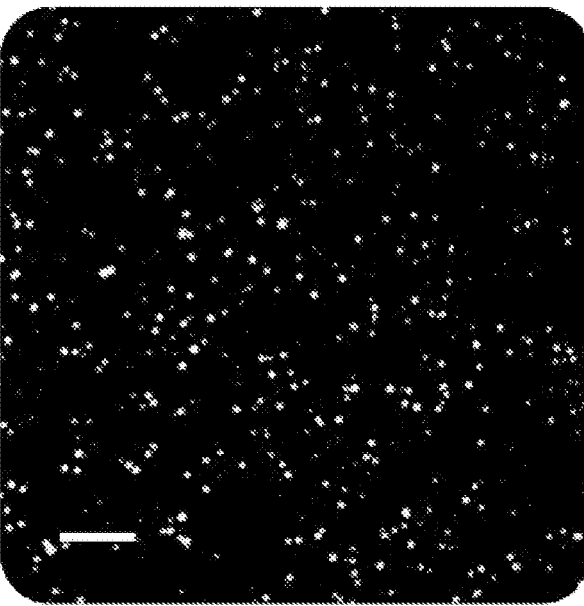
Fig. 2.f



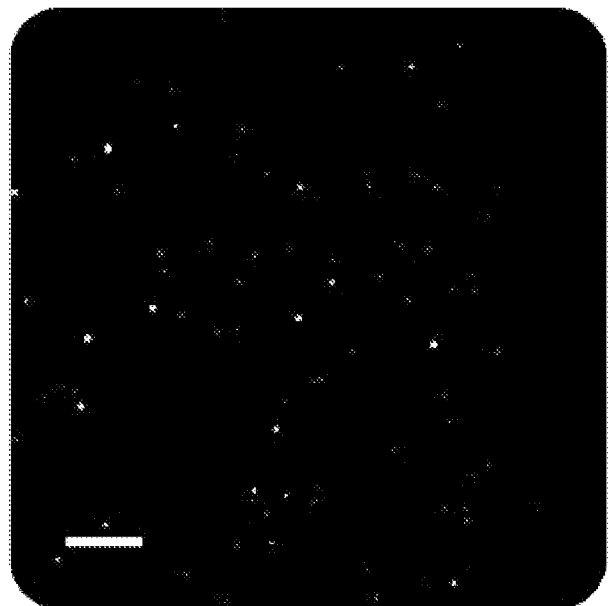
3.a



3.b



3.c



3.d

Fig. 3