

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 418**

51 Int. Cl.:

B29C 64/209 (2007.01)

B29C 64/106 (2007.01)

B29C 64/20 (2007.01)

B33Y 10/00 (2015.01)

B33Y 30/00 (2015.01)

C12N 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014** **PCT/CA2014/050556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014** **WO14197999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014** **E 14810196 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 3007882**

54 Título: **Sistema de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales y método para hacerlo**

30 Prioridad:

13.06.2013 US 201361834420 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2020

73 Titular/es:

ASPECT BIOSYSTEMS LTD. (100.0%)
146 - 2259 Lower Mall
Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, CA

72 Inventor/es:

BEYER, SIMON TRAVIS;
WALUS, KONRAD;
MOHAMED, TAMER y
BSOUL, ANAS AMJAD MOHAMMAD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 770 418 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales y método para hacerlo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a una impresión tridimensional (3D) y a la generación de estructura biológicas tridimensionales a partir de archivos digitales. Concretamente, la invención se refiere a un sistema y a un método de fabricación de estructuras 3D de hidrogel cargadas de células.

10

Antecedentes de la invención

La impresión 3D, una forma de fabricación aditiva (FA), es un proceso para crear objetos tridimensionales directamente a partir de archivos digitales. El software se utiliza para cortar un modelo de diseño asistido por ordenador (CAD) o un escaneo 3D de un objeto en una multitud de capas finas de sección transversal. Esta colección de capas se envía al sistema de FA donde el sistema construye el objeto tridimensional capa a capa. Cada capa se deposita encima de la capa anterior hasta que el objeto se haya construido completamente. Se puede utilizar un material de soporte para soportar características en voladizo y complejas del objeto. Existen varios procesos de FA con los que se pueden construir piezas de plástico, metal, materiales cerámicos y/o biológicos.

20

La fabricación aditiva podría tener aplicaciones en sistemas biológicos. Por ejemplo, hasta hace poco, la mayoría de los estudios de cultivo celular se realizaban en superficies bidimensionales (2D), tales como placas de micropocillos y placas de Petri. Sin embargo, los sistemas de cultivo 2D no emulan el entorno 3D en el que existen células *in vivo*. Los investigadores han descubierto que los cultivos celulares 3D se comportan más como el tejido biológico natural que los cultivos celulares 2D, al menos en parte, porque la disposición 3D de las células en el tejido natural influye en las interacciones entre células, lo que a su vez influye en el crecimiento celular y en la fisiología.

25

Se conocen dispositivos y sistemas de fabricación aditiva para fabricar construcciones celulares. Por ejemplo, se han aplicado técnicas conocidas de deposición de fibras fundidas en materiales biológicos. En la deposición de fibras fundidas, se suministran líquidos de gran viscosidad desde un orificio relativamente estrecho y luego se solidifican rápidamente mediante una variedad de medios. Plásticos biocompatibles, hidrogeles de gelación térmica, polímeros reticulables por UV y alginatos de alta concentración se han utilizado como armazones para estructuras celulares 3D, en donde las células se agregan al armazón después de que este se haya solidificado. Una desventaja de estas técnicas es que requieren que las células se agreguen al armazón después de la impresión, lo que dificulta el control de la colocación de las células. Además, la composición de los sustratos del armazón puede no ser apropiada para facilitar la proliferación y el crecimiento celular.

30

35

Se conocen y se desean sistemas de impresión de estructuras 3D que comprendan la impresión directa de materiales celulares, al menos en parte, porque pueden permitir que las células se depositen dentro de un armazón 3D. Por ejemplo, se ha utilizado la tecnología de impresión por chorro de tinta para imprimir materiales biológicos. Sin embargo, la fuerza de cizalladura implicada en la propulsión de gotas de fluido sobre un sustrato puede dañar las células dispersadas en el fluido. Además, la impresión por chorro de tinta es un proceso lento, que hace que suponga un reto adaptarlo a materiales biológicos, que requieren condiciones ambientales específicas para su supervivencia.

40

Otros sistemas para imprimir directamente células dentro de una estructura 3D incluyen la Patente de EE. UU. n.º: 8.639.484, que se refiere a la utilización de un modelo CAD y una unidad de posicionamiento 3D para depositar materiales celulares a través de una multitud de boquillas, capa a capa, para crear un objeto 3D. Múltiples boquillas permiten incluir múltiples materiales diferentes en el objeto 3D. La Publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º: 2012/0089238 divulga un sistema de impresión de múltiples cartuchos para producir estructuras 3D orgánicas compuestas, de modo que la estructura se construye utilizando al menos dos jeringas, una que comprende un polímero de soporte estructural y otra que comprende una composición de células vivas, que depositan reiteradamente el polímero de soporte estructural y la composición de células vivas sobre una superficie. La Publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º: 2014/0012407 divulga un dispositivo que comprende uno o más cabezales de impresión, cada uno configurado para recibir y contener uno o más cartuchos. Cada cartucho comprende un fluido, tal como una biotinta que comprende células o material de soporte, y un orificio desde el cual se puede suministrar el fluido del cartucho. El documento US 2012/0322154 A1 divulga un aparato de fabricación de armazones de cultivo celular que puede fabricar diversos tipos de armazones de cultivo celular, incluyendo una forma cilíndrica.

45

50

55

Los métodos de la técnica anterior generalmente requieren múltiples boquillas y/o orificios de cartucho para facilitar la impresión de múltiples materiales diferentes (es decir, un material se suministra por una boquilla u orificio de cartucho). La utilización de múltiples boquillas para suministrar diferentes materiales requiere un aumento correspondiente del movimiento del sistema de impresión para posicionar la boquilla o el orificio del cartucho apropiado en una secuencia controlada para suministrar una secuencia de materiales diferentes. Tal aumento del movimiento disminuye la velocidad y eficiencia de la impresión.

60

65

Resulta deseable evitar o mitigar uno o más de los inconvenientes anteriores.

Sumario de la invención

- 5 En un primer aspecto, se proporciona un sistema según la reivindicación 1 de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales. El sistema comprende al menos un cabezal de impresión para recibir y suministrar materiales, comprendiendo los materiales un fluido envolvente y un hidrogel. El cabezal de impresión comprende un orificio para suministrar los materiales; canales microfluídicos que comprenden uno o más primeros canales para recibir y dirigir el fluido envolvente y uno o más segundos canales respectivos para recibir y dirigir el hidrogel, intersecándose los segundos canales en un primer punto de intersección con los primeros canales, uniéndose entre sí los segundos y primeros canales en el primer punto de intersección para formar un canal de suministro que se extiende hasta el orificio; y conmutadores fluídicos, correspondiendo cada conmutador fluídico a uno de los canales microfluídicos del cabezal de impresión y estando configurados para permitir o impedir el flujo de fluido en los canales microfluídicos del cabezal de impresión cuando se accionan. El sistema además comprende una superficie de recepción para recibir una primera capa de los materiales suministrados desde el orificio; una unidad de posicionamiento para posicionar el orificio del cabezal de impresión en un espacio tridimensional, estando la unidad de posicionamiento acoplada operativamente al cabezal de impresión; y un medio de suministro para suministrar los materiales desde el orificio del cabezal de impresión.
- 10
- 15
- 20 En una realización del primer aspecto, el sistema comprende un procesador de control programable para controlar la unidad de posicionamiento y para controlar el suministro de los materiales desde el cabezal de impresión sobre la superficie de recepción.
- 25 En una realización del primer aspecto, el uno o más primeros canales comprenden al menos dos canales, estando el uno o más primeros canales configurados para flanquear los respectivos segundos canales en el primer punto de intersección.
- 30 En una realización del primer aspecto, el fluido envolvente comprende un agente de reticulación para solidificar el hidrogel al entrar en contacto con el mismo en el punto de intersección y/o en el canal de suministro.
- 35 En una realización del primer aspecto, cada segundo canal tiene un diámetro menor que el de los primeros canales y el canal de suministro, de modo que el flujo desde los primeros canales forma una envoltura coaxial alrededor del hidrogel en el canal de suministro.
- 40 En una realización del primer aspecto, el hidrogel comprende células vivas.
- 45 En una realización del primer aspecto, el sistema además comprende una característica de retirada de fluido para retirar el exceso de fluido envolvente suministrado desde el cabezal de impresión.
- 50 En una realización del primer aspecto, la superficie de recepción comprende una membrana porosa que comprende poros dimensionados para permitir el paso del exceso de fluido envolvente a través de los mismos.
- 55 En una realización del primer aspecto, la característica de retirada de fluido comprende material absorbente o un vacío para extraer el exceso de fluido envolvente fuera de la superficie de recepción.
- 60 En una realización del primer aspecto, el material absorbente o un vacío se aplica debajo de una membrana porosa. En una realización del primer aspecto, el vacío se aplica por encima de la superficie de recepción.
- 65 En una realización del primer aspecto, el vacío se aplica a través de uno o más canales de vacío provistos en el cabezal de impresión, teniendo el uno o más canales de vacío un orificio situado cerca del orificio del cabezal de impresión.
- En una realización del primer aspecto, el sistema además comprende depósitos para contener los materiales, estando los depósitos acoplados de manera fluida respectivamente a los canales microfluídicos en el cabezal de impresión.
- En una realización del primer aspecto, el cabezal de impresión además comprende al menos dos entradas para recibir los materiales de los depósitos, estando cada una de las entradas en comunicación fluida con los respectivos canales microfluídicos y los respectivos depósitos.
- En una realización del primer aspecto, los medios de suministro comprenden una unidad de control de presión.
- En una realización del primer aspecto, los conmutadores fluídicos comprenden válvulas.
- En una realización del primer aspecto, el cabezal de impresión además comprende una proyección hueca configurada para extenderse desde el orificio hacia la superficie de recepción.
- En una realización del primer aspecto, el cabezal de impresión comprende dos segundos canales, estando cada uno

de los segundos canales adaptado para transportar los hidrogeles respectivos, intersecándose los dos segundos canales en una segunda intersección y uniéndose entre sí en la segunda intersección para formar un tercer canal que se extiende hasta el primer punto de intersección.

5 En un segundo aspecto, se proporciona un método según la reivindicación 8 de impresión de una estructura tridimensional (3D), comprendiendo el método el proporcionar una impresora 3D, comprendiendo la impresora: un cabezal de impresión que comprende un orificio para suministrar materiales; una superficie de recepción para recibir una primera capa de los materiales suministrados desde el orificio del cabezal de impresión; y una unidad de posicionamiento acoplada operativamente al cabezal de impresión, la unidad de posicionamiento para posicionar el
10 cabezal de impresión en un espacio tridimensional. El método comprende proporcionar los materiales que se van a suministrar, comprendiendo los materiales que se van a suministrar un fluido envolvente y uno o más hidrogeles; codificar la impresora con una estructura 3D que se va a imprimir; suministrar desde el orificio del cabezal de impresión los materiales que se van a suministrar; depositar una primera capa de los materiales suministrados sobre la superficie de recepción; repetir la etapa de deposición depositando material suministrado sucesivamente sobre la primera y cualquier capa sucesiva de material depositado, depositando de ese modo capa sobre capa de materiales depositados en una disposición geométrica según la estructura 3D. En una realización, el método comprende retirar el exceso de fluido envolvente suministrado por el orificio del cabezal de impresión en uno o más puntos temporales durante o entre las etapas de deposición.

20 En una realización del segundo aspecto, el fluido envolvente comprende un agente de reticulación adecuado para reticular y solidificar el hidrogel al entrar en contacto con el mismo, creando el contacto una fibra de hidrogel.

En una realización del segundo aspecto, el fluido envolvente y el hidrogel se suministran en una disposición coaxial, en donde el fluido envolvente envuelve el hidrogel.

25 En una realización del segundo aspecto, la etapa de deposición y la etapa de retirada se efectúan de manera continuada, retirando de ese modo de manera continuada el exceso de fluido envolvente a medida que se depositan las capas de materiales suministrados.

30 En una realización del segundo aspecto, la etapa de retirada se efectúa de manera intermitente entre medias y/o al mismo tiempo que la etapa de deposición, retirando de ese modo de manera intermitente el exceso de fluido envolvente a medida que se depositan las capas de materiales suministrados.

35 En una realización del segundo aspecto, el uno o más hidrogeles están adaptados para soportar el crecimiento y/o la proliferación de las células vivas suministradas en los mismos.

Breve descripción de los dibujos

40 Las características de la invención se volverán más evidentes en la siguiente descripción detallada, en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una vista en perspectiva de una realización del sistema de impresión de la presente invención.

La Figura 2 es una vista en perspectiva de objetos diseñados por software y objetos correspondientes impresos utilizando una realización del sistema de impresión de la presente invención.

45 La Figura 3 es una vista en perspectiva de una realización del cabezal de impresión de la presente invención.

La Figura 4 es una sección transversal de una válvula en el cabezal de impresión de la Figura 3, que incluye la deflexión de una membrana de válvula cuando la válvula se acciona.

La Figura 5 es una sección transversal de una realización alternativa del cabezal de impresión de la Figura 3.

La Figura 6 es una vista superior de una realización alternativa del cabezal de impresión de la Figura 3.

50 La Figura 7 es una vista en perspectiva despiezada de una realización del conjunto de la cama de impresión de la presente invención.

La Figura 8 es una sección transversal de la cama de impresión ensamblado de la Figura 9.

La Figura 9 es una sección transversal de una realización alternativa de la cama de impresión de la Figura 9.

La Figura 10 es una vista en perspectiva de una realización del cabezal de impresión de la presente invención.

55 Descripción detallada de la invención

A continuación, se proporcionan las definiciones de determinados términos tal y como se utilizan en esta memoria descriptiva. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento, por lo general, tienen el mismo significado que el que comúnmente entendería una persona normalmente versada en la materia a la que pertenece esta invención.

65 Como se utiliza en el presente documento, una persona normalmente versada en la materia entenderá el término "aproximadamente" y este variará hasta cierto punto dependiendo del contexto en el que se utilice. Si hay usos del término que no son claros para las personas normalmente versadas en la materia, dado el contexto en el que se utiliza, "aproximadamente" significará más o menos hasta un 10 % del valor indicado.

Como se utiliza en el presente documento, el término "hidrogel" se refiere a una composición que comprende agua y una red o entramado de cadenas poliméricas que son hidrófilas. Los ejemplos de hidrogeles naturales incluyen, por ejemplo, alginato, agarosa, colágeno, fibrinógeno, gelatina, quitosano, geles a base de ácido hialurónico o cualquier combinación de los mismos. Se conoce una variedad de hidrogeles sintéticos y podrían utilizarse en realizaciones de los sistemas y métodos provistos en este documento. Por ejemplo, en realizaciones de los sistemas y métodos provistos en el presente documento, uno o más hidrogeles forman la base estructural para estructuras tridimensionales impresas. En algunas realizaciones, el hidrogel tiene la capacidad de soportar el crecimiento y/o la proliferación de uno o más tipos de células, que pueden dispersarse dentro del hidrogel o agregarse al hidrogel después de que se haya impreso en una configuración tridimensional. En algunas realizaciones, el hidrogel puede reticularse mediante un agente de reticulación química. Por ejemplo, un hidrogel que comprende alginato puede ser reticulable en presencia de un catión divalente, un hidrogel que comprende fibrinógeno puede ser reticulable en presencia de trombina, y un hidrogel que comprende colágeno o quitosano puede ser reticulable en presencia de calor o de una solución básica. La reticulación del hidrogel aumentará la dureza del hidrogel, en algunas realizaciones que permiten la formación de un hidrogel que se comporta como un sólido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "fluido envolvente" se refiere a un líquido que se utiliza, al menos en parte, para recubrir o "envolver" un material que se va a suministrar, tal como, por ejemplo, un hidrogel. En algunas realizaciones, el fluido envolvente comprende uno o más disolventes acuosos, por ejemplo, agua o glicerol, y un agente de reticulación química, por ejemplo, materiales que comprenden cationes divalentes (p. ej., Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , etc.), trombina o productos químicos modificadores del pH como el bicarbonato de sodio.

Como se utiliza en el presente documento, el término "exceso de fluido envolvente" se refiere a una porción del fluido envolvente que se suministra desde el orificio del cabezal de impresión y no forma parte de una estructura tridimensional impresa utilizando una o más realizaciones de los sistemas o métodos provistos en el presente documento. Por ejemplo, el exceso de fluido envolvente puede ser útil para lubricar el paso del hidrogel a través de un canal de suministro en el cabezal de impresión y a través del orificio del cabezal de impresión. Una vez suministrado desde el orificio del cabezal de impresión, el exceso de fluido envolvente puede deslizarse fuera de la superficie de una capa de hidrogel suministrado y llegar a una superficie de recepción, donde puede acumularse o formar un charco.

Como se utiliza en el presente documento, el término "superficie de recepción" se refiere a la superficie sobre la que se deposita una primera capa de material suministrado desde un orificio del cabezal de impresión. La superficie de recepción también recibe un exceso de fluido envolvente que se suministra desde el orificio del cabezal de impresión y que se desliza fuera de una o más capas del material suministrado desde el orificio del cabezal de impresión. En algunas realizaciones, la superficie de recepción está hecha de un material sólido. En algunas realizaciones, la superficie de recepción está hecha de un material poroso. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la porosidad del material poroso es suficiente para permitir el paso del fluido envolvente a través del mismo. En algunas realizaciones, la superficie de recepción es sustancialmente plana, proporcionando de ese modo una superficie plana sobre la que se puede depositar una primera capa de material suministrado. En algunas realizaciones, la superficie de recepción tiene una topografía que corresponde a la estructura tridimensional que se va a imprimir, facilitando de ese modo la impresión de una estructura tridimensional que tiene una primera capa no plana.

En un aspecto, la presente invención se refiere en general a un aparato, a un sistema y a un método de fabricación aditiva de estructuras biológicas tridimensionales (3D).

Descripción general del sistema de impresión

En un aspecto, la invención proporciona un sistema de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales (también denominado en el presente documento "impresora", una "impresora 3D" o un "sistema de impresión" o "el sistema"). El sistema comprende un cabezal de impresión microfluídico, que es un dispositivo de manipulación de líquido microfluídico que comprende uno o más canales microfluídicos para recibir y dirigir materiales que se van a suministrar, conmutadores fluídicos correspondientes a los canales microfluídicos para regular el flujo de los materiales que se van a imprimir y un único orificio para suministrar los materiales que se van a suministrar.

Los materiales que se van a suministrar comprenden un fluido envolvente y al menos un hidrogel. En una realización preferida, el fluido envolvente comprende un agente de reticulación química adecuado para solidificar el hidrogel al entrar en contacto con el mismo. En una realización preferida, el fluido envolvente también sirve como lubricante para el hidrogel solidificado.

Los canales microfluídicos sirven como conductos para dirigir y combinar de manera controlada los materiales que se van a suministrar. Los canales microfluídicos están dispuestos dentro del cabezal de impresión de manera que uno o más primeros canales para recibir y dirigir el fluido envolvente y un segundo canal para recibir y dirigir el hidrogel se intersecan en un primer punto de intersección y se unen entre sí para formar un canal de suministro que se extiende hasta el orificio del cabezal de impresión. En una realización preferida, los primeros canales están configurados para flanquear el segundo canal en el primer punto de intersección. De esta manera, el fluido envolvente se dirige para que fluya a lo largo de ambos lados del hidrogel en el canal de suministro.

En una realización preferida, los materiales en el canal de suministro se dirigen coaxialmente, estando el hidrogel enfocado hacia el centro del canal de suministro y el fluido envolvente que rodea el fluido de hidrogel, formando de ese modo una envoltura alrededor del hidrogel. En realizaciones preferidas donde el fluido envolvente también comprende un agente de reticulación química adecuado para reticular el hidrogel, se forma una fibra de hidrogel solidificada en el canal de suministro y se suministra desde el orificio del cabezal de impresión.

En un aspecto, el sistema además comprende una superficie de recepción para recibir una primera capa de los materiales suministrados desde el orificio y una unidad de posicionamiento para posicionar el orificio del cabezal de impresión en un espacio tridimensional, estando la unidad de posicionamiento acoplada operativamente al cabezal de impresión. Por ejemplo, el cabezal de impresión se puede acoplar a un sistema de posicionamiento motorizado, disponible en el mercado, con tres grados de movimiento para que el cabezal de impresión se pueda posicionar por encima de la superficie de recepción y orientarse para dirigir el material suministrado hacia abajo, hacia la superficie de recepción.

En un aspecto, el sistema comprende un medio para suministrar los materiales desde el orificio del cabezal de impresión y además puede comprender y/o estar en comunicación de datos con un procesador de control programable para regular el posicionamiento del orificio del cabezal de impresión. El procesador de control programable también se puede utilizar para regular el suministro de los materiales que se van a suministrar desde el orificio del cabezal de impresión.

La Figura 1 muestra una vista esquemática, en perspectiva, de una realización del sistema de impresión 3D provisto en el presente documento.

Con referencia a la Figura 1, el sistema comprende un cabezal de impresión microfluídico [100], que comprende un orificio [114] de cabezal de impresión y al menos una entrada para recibir material que se va a suministrar desde el cabezal de impresión [100]. El material que se va a suministrar se almacena en depósitos de material impreso [110] y se administra al cabezal de impresión a través de los respectivos primeros tubos de conexión [122], que proporcionan una comunicación fluida entre el cabezal de impresión y los depósitos de material impreso. En la realización ilustrada, el medio para suministrar el material que se va a suministrar desde el orificio del cabezal de impresión es una unidad de control de presión [112], que está acoplada de manera fluida a los depósitos de material impreso [110] mediante unos segundos tubos de conexión [120] respectivos. La unidad de control de presión es un medio para proporcionar una fuerza para suministrar los materiales que se van a suministrar. La unidad de control de presión administra presión neumática a los depósitos de material impreso [110] a través de los respectivos segundos tubos de conexión [120]. La presión aplicada a los depósitos de material impreso empuja el fluido fuera de los depósitos y hacia dentro del cabezal de impresión a través de los respectivos primeros tubos de conexión [122]. Se podrían utilizar medios alternativos para suministrar el material que se va a suministrar en la realización ilustrada. Por ejemplo, se podría utilizar una serie de bombas de jeringa controladas electrónicamente para proporcionar fuerza para suministrar el material que se va a suministrar desde el orificio del cabezal de impresión.

Con referencia a la Figura 1, el cabezal de impresión microfluídico [100] está acoplado a una estructura motorizada 3D que comprende tres brazos [102, 103 y 104] para posicionar el cabezal de impresión [100] y el orificio [114] del cabezal de impresión en un espacio tridimensional por encima de una cama de impresión [108], que comprende una superficie [109] para recibir material impreso. En una realización, la estructura motorizada 3D (es decir, la unidad de posicionamiento) se puede controlar para posicionar un brazo vertical [104], que se extiende a lo largo del eje z de la estructura motorizada 3D de modo que el orificio [114] del cabezal de impresión esté dirigido hacia abajo. Un primer brazo horizontal [102], que se extiende a lo largo del eje x de la estructura motorizada se asegura a una plataforma base inmóvil [116]. Un segundo brazo horizontal [103], que se extiende a lo largo del eje y de la estructura motorizada se acopla de manera móvil a una superficie superior del primer brazo horizontal [102] de modo que las direcciones longitudinales del primer y segundo brazos horizontales [102 y 103] sean perpendiculares entre sí. Se debe entender que los términos "vertical" y "horizontal", tal y como se han utilizado antes con respecto a los brazos, pretenden describir la manera en la que se mueve el cabezal de impresión y no limitan necesariamente la orientación física de los propios brazos.

En la realización ilustrada en la Figura 1, la cama de impresión [108] se posiciona encima de una plataforma [118], estando la plataforma acoplada a una superficie superior del segundo brazo horizontal [103]. En la realización, los brazos de la estructura motorizada 3D [102, 103 y 104] se accionan mediante tres motores [105, 106 y 107] correspondientes, respectivamente, y se controlan mediante un procesador de control programable, tal como un ordenador (no se muestra). En una realización preferida, el cabezal de impresión [100] y la cama de impresión [108] se pueden mover colectivamente a lo largo de los tres ejes primarios de un sistema de coordenadas cartesianas mediante la estructura motorizada 3D, y el movimiento de la estructura se define utilizando software informático.

Se debe entender que la invención no se limita solo al sistema de posicionamiento descrito y que se conocen otros sistemas de posicionamiento en la materia.

En la realización ilustrada en la Figura 1, a medida que se suministra material desde el orificio [114] del cabezal de

impresión, la unidad de posicionamiento se mueve en un patrón controlado por software, creando de ese modo una primera capa del material suministrado sobre la superficie de recepción [109]. Las capas adicionales de material suministrado se apilan la una encima de la otra de tal manera que la geometría 3D final de las capas de material suministrado es generalmente una réplica del diseño de la geometría 3D provista por el software. El diseño 3D puede crearse utilizando el típico software de CAD 3D (diseño asistido por ordenador) o generarse a partir de imágenes digitales, como se conoce en la técnica. Además, si la geometría generada por el software contiene información sobre los materiales específicos que se van a utilizar, es posible, de acuerdo con una realización de la invención, asignar un tipo de material específico a diferentes ubicaciones geométricas. Por ejemplo, la Figura 2 muestra tres estructuras 3D impresas utilizando una realización del sistema provisto en el presente documento: un cubo [128], un cilindro hueco [129] y un cilindro coaxial hueco [130]. Se utilizó software para generar los diseños del cubo, del cilindro hueco y del cilindro coaxial hueco ([125], [126] y [127], respectivamente), comprendiendo cada diseño dos tipos diferentes de materiales (alginato teñido), que se tiñeron de diferentes colores para proporcionar claridad visual a los materiales utilizados para generar el cubo y el cilindro hueco impresos.

Cualquier software, aplicación o módulo al que se hace referencia en este documento puede implementarse utilizando instrucciones legibles/ejecutables por ordenador que pueden almacenarse o guardarse de otro modo en dichos medios legibles por ordenador.

Cabezal de impresión

La Figura 3 muestra una vista esquemática en perspectiva de una realización de un cabezal de impresión microfluídico [100] para su utilización en el sistema provisto.

Con referencia a la Figura 3, la realización ilustrada representa un cabezal de impresión microfluídico [100] que comprende canales microfluídicos para transportar diversos fluidos. En la realización ilustrada, los canales microfluídicos tienen una forma cilíndrica. Sin embargo, también se podrían utilizar otras formas de canal que no sean cilíndricas en el cabezal de impresión provisto en el presente documento. El canal [200] es un conducto para un agente de reticulación, el canal [202] es un conducto para el agua. En la realización ilustrada, el agente de reticulación y el agua, por separado o juntos, sirven como "fluido envolvente". El canal [204] es un conducto para una primera composición de hidrogel (denominado "hidrogel A") y el canal [206] es un conducto para una segunda composición de hidrogel (denominada "hidrogel B"). En una realización preferida, uno o más tipos de células vivas son compatibles con y opcionalmente están dispersas dentro de los hidrogeles A y/o B. En la realización ilustrada, cada canal microfluídico comprende una entrada de fluido [208a, 208b, 208c, 208d], que permite que el fluido contenido en los tubos de conexión [122] pase al interior de los canales respectivos del cabezal de impresión [100]. Aguas abajo de las entradas de fluido [208a, 208b, 208c, 208d] están las válvulas [210, 212, 214, 216] correspondientes de cada canal. En la realización ilustrada, las válvulas sirven como "conmutadores fluidicos", que pueden activarse para permitir e impedir el flujo de fluido a través de un canal, teniendo cada válvula una entrada [218, 218a, 218b, 218c, 218d] correspondiente, lo que facilita la activación y desactivación de la válvula. En una realización, las válvulas [210, 212, 214, 216] pueden activarse electrónicamente. En otra realización, las válvulas [210, 212, 214, 216] pueden activarse mediante un cambio en la presión aplicada, por ejemplo, por medio de pistones solenoides. La activación electrónica o por presión de diferentes válvulas facilita un rápido cambio del material suministrado, permitiendo de ese modo que los materiales suministrados se compongan de una secuencia controlada de diferentes materiales.

Con referencia adicional a la Figura 3, en la realización ilustrada, los canales del agente de reticulación [200] y los canales de agua [202] se intersecan en los puntos de intersección [203], tal como en una configuración "en forma de y", uniéndose entre sí para formar unos canales, denominados en el presente documento "canales de flujo envolvente" [224], inmediatamente aguas abajo del agente de reticulación y unos canales de agua [200, 202]. Los canales de hidrogel A e hidrogel B [204, 206] se intersecan en un punto de intersección [207], tal como en una configuración "en forma de y", uniéndose entre sí para formar un canal, denominado en el presente documento "canal de focalización" [226], inmediatamente aguas abajo de los dos canales de hidrogel. Los canales de flujo envolvente [224] y el canal de focalización [226] se intersecan en un punto de intersección [228] en una configuración de tres puntas, para la realización descrita, en donde el canal de focalización [226] está flanqueado por los canales de flujo envolvente [224], uniéndose entre sí para formar un canal, que en el presente documento se denomina canal de suministro [220]. El canal de suministro [220] termina en el orificio de suministro [222]. En la realización preferida ilustrada en la Figura 1, el canal de suministro se proyecta desde el cabezal de impresión [100] que termina en el orificio de suministro [114].

Con referencia adicional a la Figura 3, en la realización ilustrada, los canales de flujo envolvente [224] y el canal de suministro [220] tienen diámetros mayores que el canal de focalización [226]. Cuando se aplica presión hidráulica al flujo envolvente [224] y a los canales de focalización [226], el líquido en el canal de focalización [226] se comprime lateralmente y se "focaliza" en una corriente estrecha a lo largo del eje central del canal de focalización [226]. En la intersección con el canal de focalización [226] en el punto de intersección [228], el fluido de los canales de flujo envolvente de mayor diámetro [224] rodea y envuelve la corriente focalizada más estrecha de hidrogel suministrado desde el canal de focalización [226].

En una realización preferida, el líquido de los canales de flujo envolvente [224] comprende un agente de reticulación química y el líquido del canal de focalización [226] comprende uno o más hidrogeles químicamente reticulables que

comprenden uno o más tipos de células vivas. Cuando el uno o más hidrogeles químicamente reticulables se focalizan en una corriente estrecha en el canal de focalización [226] y luego son envueltos por el agente de reticulación en el canal de suministro [220], al menos la superficie exterior del uno o más hidrogeles químicamente reticulables se solidifica en el canal de suministro [220], creando de ese modo una fibra de hidrogel reticulada o "sólida". La fibra de hidrogel se suministra entonces desde el orificio de suministro [222] sobre la superficie de recepción de una manera controlada, construyendo una estructura 3D, capa a capa.

En una realización especialmente preferida, el fluido envolvente que rodea la fibra de hidrogel también puede actuar para lubricar el paso de la fibra de hidrogel a través del canal de suministro [220] hasta que este se suministre desde el orificio del cabezal de impresión [222].

En una realización, el fluido envolvente comprende un agente de reticulación química, agua o una combinación de los mismos. En realizaciones en las que el fluido envolvente carece de un agente de reticulación química, el hidrogel no se solidificará y se suministrará como un líquido. Para ajustar la composición del fluido envolvente e iniciar y/o detener la solidificación del hidrogel, se pueden accionar una válvula del canal del agente de reticulación [210] y una válvula del canal de agua [212]. Se contempla que el suministrar un líquido en lugar de un hidrogel sólido, o suministrar solo fluido envolvente, podría ser deseable para construir algunos aspectos de varios objetos tridimensionales.

En una realización, el cabezal de impresión [100] puede configurarse para recibir y suministrar solo un material de hidrogel. En una realización, el cabezal de impresión puede configurarse para recibir y suministrar dos o más materiales de hidrogel. Por ejemplo, en una realización donde el cabezal de impresión [100] está configurado para recibir dos materiales de hidrogel, comprendiendo cada uno, por ejemplo, un tipo de célula diferente, el sistema provisto en el presente documento puede programarse para suministrar una estructura celular heterogénea, en donde el primer y segundo tipos de células pueden depositarse en patrones controlados dentro y entre las capas, solos y/o combinados entre sí. Los límites entre los dos materiales están controlados, p. ej., por software, y el procesador de control programable se utiliza para dar instrucciones al conmutador fluido (p. ej., de una o más válvulas [210], [212], [214], [216]) para cambiar el flujo de material dentro de uno o más canales microfluídicos, cambiando de ese modo el contenido del material que se está suministrando desde el orificio del cabezal de impresión. El número de materiales de hidrogel que se puede recibir y suministrar desde el cabezal de impresión provisto en el presente documento está limitado solo por el tamaño del cabezal de impresión que el usuario considere práctico.

Con referencia a la Figura 4, en una realización, el conmutador fluido es una válvula que comprende una membrana [332] dispuesta sobre una característica en forma de cuenco [318] formada en un canal microfluídico [308]. Cuando se aplica presión neumática (representada por flechas en la Figura 4) en la superficie expuesta de la membrana de la válvula [332], la membrana de la válvula [332] se comba hacia la característica en forma de cuenco [318], bloqueando de este modo el paso de fluido a través del canal microfluídico [308]. En una realización preferida, el grosor de la membrana de la válvula [332] es de aproximadamente 150 µm. En realizaciones donde el grosor de la membrana de la válvula sea mayor, un experto en la materia entenderá que en consecuencia se debe aumentar la presión de accionamiento que se aplica en la válvula neumática. De manera similar, una membrana de válvula formada con un material menos elástico requerirá una mayor presión de accionamiento. Un experto en la materia entenderá cómo ajustar la presión de accionamiento para adaptarse al material específico de la membrana de la válvula.

En una realización, el cabezal de impresión comprende conmutadores fluidos alternos para regular los materiales que se van a suministrar desde el orificio del cabezal de impresión. Por ejemplo, en lugar de utilizar válvulas, se podría utilizar un mecanismo para activar o desactivar la presión aplicada en cada canal para regular el flujo de material en los canales microfluídicos.

En una realización, el cabezal de impresión además comprende una punta de prolongación que comprende un orificio para suministrar materiales desde el cabezal de impresión. Tal punta de prolongación facilita el suministro preciso de materiales y su depósito en áreas confinadas tales como, por ejemplo, un pocillo en una placa de múltiples pocillos (p. ej., una placa de microtitulación estándar, una placa de micropocillos o microplaca que tiene 6, 24, 96 pocillos, etc.) o una placa de Petri. Con referencia a la realización ilustrada en la Figura 5, una porción [500] del canal de suministro [220] más próxima al orificio de suministro [222] tiene un diámetro mayor que la porción aguas arriba del canal de suministro [220]. La punta de prolongación [502] comprende un tubo (p. ej., hecho de plástico, vidrio o metal) que tiene un exterior configurado para encajar en la porción de gran diámetro [500] del canal de suministro y una superficie interna (que define un espacio hueco en el tubo) configurada para alinearse con el canal de suministro [220]. La punta de prolongación [502] puede insertarse en la porción de gran diámetro [500] del canal de suministro, prolongando, de este modo, la longitud del canal de suministro [220], lo que facilita la deposición del material suministrado desde un orificio [503] de la punta de prolongación [502] en espacios confinados, tal como un inserto de placa de pocillos [504] o placa de Petri (no se muestra).

Con referencia a la realización ilustrada en la Figura 1, la punta de prolongación [130] es una proyección que se extiende desde el cabezal de impresión [100], terminándose la punta de prolongación [130] en el orificio [114] del cabezal de impresión. En esta realización, la punta de prolongación [130] forma parte integral del cabezal de impresión.

En una realización, dos o más materiales de hidrogel pueden disponerse coaxialmente en una fibra de hidrogel

suministrada desde el sistema provisto en el presente documento. Con referencia a la Figura 6, en la realización ilustrada, el cabezal de impresión [100] comprende canales microfluídicos dispuestos para producir una fibra de hidrogel coaxial que comprende un material de núcleo de hidrogel y un material de cubierta de hidrogel. En la realización ilustrada, el material de cubierta, transportado por los canales [508], es un hidrogel de gelificación rápida, como el alginato y el material del núcleo, transportado por el canal [506], es un hidrogel diferente elegido por el usuario (p. ej., colágeno o fibrinógeno). Los canales [508] y el canal [506] se intersecan en un punto de intersección de focalización de hidrogel [510], por ejemplo, en una configuración en "forma de y" (similar a la intersección [528] que se muestra en la Figura 3) uniéndose entre sí para formar un canal de focalización [226] aguas abajo de los canales [506] y [508]. En la intersección de focalización de hidrogel [510], el material de cubierta focaliza el material del núcleo coaxialmente de modo que el material de cubierta forme una envoltura alrededor del material del núcleo. En realizaciones preferidas, los canales [508] y [226] tienen un diámetro mayor que el canal [506] para facilitar la focalización coaxial de los materiales del núcleo y de la cubierta. En una realización preferida, la finalidad del material de la cubierta es proporcionar al material del núcleo un soporte estructural físico para que pueda conformarse con una geometría 3D. El núcleo puede solidificarse después de depositar el material, siendo el método preciso de solidificación específico para diferentes materiales del núcleo. Por ejemplo, el núcleo puede comprender un material que se solidifique muy lentamente. En otra realización, los materiales del núcleo y de la cubierta comprenden los mismos materiales. En otra realización más, el material de la cubierta comprende un hidrogel que se solidifica rápidamente y el material del núcleo comprende un material que no se gelificará, facilitando de ese modo la generación de una fibra hueca.

En una realización, el cabezal de impresión [100] representado en la Figura 6 además podría comprender canales adicionales de material del núcleo, cada uno con un conmutador fluídico correspondiente, por ejemplo, una válvula, para regular el flujo del material en los mismos. El conmutador fluídico facilita los ajustes rápidos y frecuentes de la composición del material de núcleo en la fibra que se está suministrando, por ejemplo, mediante unos comandos provistos por el procesador de control programable.

En una realización, se pueden disponer varios cabezales de impresión, por ejemplo, en paralelo, para permitir la impresión simultánea de múltiples estructuras. Esto aumentaría el rendimiento de producción.

En algunas realizaciones, el cabezal de impresión es desechable. La utilización de cabezales de impresión desechables puede reducir la probabilidad de contaminación de los materiales utilizados en diferentes trabajos de impresión.

El cabezal de impresión se puede fabricar, por ejemplo, utilizando técnicas de moldeo microfluídico conocidas (p. ej., por colada, impronta o moldeo por inyección) y uno o más polímeros moldeables, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS). Como alternativa, la tecnología de impresión 3D disponible comercialmente podría utilizarse para fabricar el cabezal de impresión.

Característica de retirada de fluidos

En un aspecto, la invención proporciona un sistema de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales que comprende una característica para retirar el exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción donde se deposita una primera capa de material suministrado desde el orificio del cabezal de impresión y, opcionalmente, desde una superficie del hidrogel suministrado. Durante la impresión, es posible que el exceso de fluido envolvente se acumule o "forme charcos" en la superficie de recepción o en una superficie del hidrogel suministrado. Tal acumulación puede interferir con la deposición del hidrogel suministrado desde el orificio del cabezal de impresión sobre la superficie de recepción y/o sobre una o más capas del hidrogel suministrado. Por ejemplo, el líquido envolvente acumulado puede hacer que una fibra de hidrogel suministrada se resbale desde su posición prevista en la estructura 3D que se está imprimiendo. Por lo tanto, en unas realizaciones del sistema, la eliminación del exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción y, opcionalmente, de una superficie del hidrogel suministrado, mediante una característica de retirada fluídica puede mejorar la fabricación aditiva de estructuras tridimensionales.

El exceso de fluido envolvente puede retirarse de la superficie de recepción o de una superficie de una o más capas de hidrogel suministrado extrayendo el fluido fuera de esas superficies, permitiendo o facilitando la evaporación del fluido envolvente de esas superficies o, en realizaciones donde la superficie de recepción es porosa, el exceso de líquido envolvente puede retirarse extrayéndolo a través de la superficie porosa.

En una realización preferida, la superficie de recepción comprende un material poroso, estando los poros dimensionados para facilitar el paso del fluido envolvente a través de los mismos y estando dimensionados para soportar una o más capas de hidrogel depositadas sobre los mismos.

Con referencia a las figuras 7 y 8, en las realizaciones ilustradas, una cama de impresión [108] comprende una membrana porosa [400], que sirve como superficie para recibir una primera capa de material suministrado (es decir, la superficie de recepción). La membrana porosa [400] se mantiene en su sitio en la cama de impresión [108] entre una pieza de caja [408] y una pieza de tapa [402]. La pieza de caja [408] es un contenedor, que puede tener cualquier forma adecuada para recibir y contener líquido (p. ej., cuadrada, redonda). El espacio de dentro de la pieza de caja

[408] se denomina cámara [404]. La pieza de caja [408] tiene una superficie superior [409] que comprende un labio rebajado [412] que extiende el perímetro de la superficie superior [409] de la pieza de caja [408]. La superficie superior [409] comprende una abertura definida por una o más paredes [410], estando la abertura rodeada por el labio rebajado [412] y extendiéndose hacia la pieza de caja [408].

Con referencia adicional a las realizaciones ilustradas en las figuras 7 y 8, la pieza de tapa [402] comprende una superficie superior [403] que tiene una abertura [416] que se extiende a través de la misma y paredes laterales [418] configuradas para ajustarse alrededor del labio rebajado [412] de la pieza de caja [408], facilitando de este modo la colocación de la pieza de tapa [402] en la superficie superior [409] de la pieza de caja [408]. Cuando la pieza de tapa [402] se coloca sobre la pieza de caja [408], las aberturas de la caja y la pieza de tapa [416] se alinean. En funcionamiento, la membrana porosa [400] se coloca sobre la superficie superior [409] de la pieza de caja [408] de modo que se extienda sobre la abertura de la superficie superior [409] de la pieza de caja [408], la pieza de la tapa [402] se coloca entonces encima de la pieza de caja [408] y se presiona hacia abajo. La presión hacia abajo de la pieza de tapa [402] estira la membrana porosa [400] sobre la abertura de la superficie superior [409] de la pieza de caja [408], reteniendo de este modo la membrana porosa [400] entre la pieza de caja [408] y la pieza de tapa [402]. En realizaciones preferidas, la pieza de tapa [402] y la pieza de caja [408] encajan perfectamente entre sí, proporcionando de este modo una conexión que permanecerá segura durante el funcionamiento del sistema provisto en el presente documento.

Con referencia adicional a las realizaciones ilustradas en las figuras 7 y 8, la pieza de caja [408] comprende una base sólida [414] y al menos un conducto de salida [406] para dirigir el fluido hacia fuera de la cámara [404] y una fuente de vacío (no mostrada) en comunicación fluida con el conducto de salida [406] de la cámara [404]. La membrana porosa [400] comprende poros dimensionados para facilitar el paso del fluido envolvente. La fuente de vacío (no mostrada) acoplada al conducto de salida [406] puede activarse para extraer el exceso de fluido envolvente que se acumula sobre la membrana porosa [400] a través de la membrana porosa [400] al interior de la cámara [404] y desde la cámara [404] a través de la salida [406], dejando la fibra de hidrogel en su configuración suministrada sobre la membrana porosa [400].

En una realización preferida, se puede incluir una característica para retirar el exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción y, opcionalmente, de una superficie del hidrogel suministrado, en un sistema configurado para suministrar materiales en una placa de múltiples pocillos o placa de Petri. Por ejemplo, con referencia a la Figura 9, en la realización ilustrada, un inserto de placa de pocillos [504] disponible en el mercado, se coloca encima de la pieza de caja [408]. Algunos insertos de placa de pocillos [504] tienen forma de cesta con una base hecha con un material de membrana porosa [512]. En la realización ilustrada, se coloca una junta [514] entre el inserto de la placa de pocillos [512] y la pieza de caja [408] para mejorar el sellado entre las dos piezas [504 y 408]. En dichas realizaciones, la membrana porosa [512] del inserto de placa de pocillos [504] serviría como "superficie de recepción" y cualquier exceso de fluido envolvente podría retirarse de la misma utilizando un vacío acoplado al conducto de salida [406], como se ha descrito anteriormente, o utilizando una de las otras características de retirada de fluidos descritas a continuación.

En una realización (no mostrada), la superficie de recepción en la cama de impresión comprende o se coloca adyacente a un material absorbente, lo que facilita la absorción del exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción. Por ejemplo, un inserto de placa de pocillos que tenga una base hecha de un material de membrana porosa (por ejemplo, como se muestra en la Figura 9), o cualquier otro sustrato de membrana porosa, podría colocarse encima o adyacente a un material absorbente, tal como, por ejemplo, una esponja. El material de absorción actuaría para extraer fuera de la superficie de recepción el exceso de fluido envolvente. En realizaciones donde el material absorbente se dispone debajo de una superficie de recepción porosa, el exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción se extraería a través de la superficie de recepción porosa y al interior del material absorbente, evitando de ese modo que el exceso de fluido envolvente se acumule sobre la superficie de recepción. En realizaciones donde el material absorbente se dispone inmediatamente al lado o encima de una porción de la superficie de recepción (p. ej., en la periferia de la superficie de recepción para no interferir con la deposición del material suministrado, el exceso de fluido envolvente se extraería fuera de la superficie de recepción y al interior del material absorbente.

En una realización (no mostrada), en lugar de utilizar una de las camas de impresión descritas anteriormente, se pueden proporcionar uno o más tubos en un área cerca de la superficie de recepción y cerca del orificio del cabezal de impresión. El uno o más tubos pueden estar acoplados de manera fluida a una fuente de vacío (no mostrada), que puede proporcionar succión para retirar el exceso de fluido de la cubierta de la superficie de recepción y, opcionalmente, de una superficie de hidrogel suministrado. En dichas realizaciones, también se puede utilizar una superficie de recepción sólida o porosa.

En una realización, ilustrada en la figura 10, el cabezal de impresión está configurado para comprender además uno o más canales de vacío [700a, 700b], teniendo cada uno del uno o más canales de vacío un orificio [702a, 702b] situado cerca del orificio del cabezal de impresión [222]. El uno o más canales de vacío [700a, 700b] tienen, cada uno, una entrada [704a, 704b] configurada para facilitar la comunicación fluida con uno o más vacíos (no se muestran). Cuando el cabezal de impresión [100] está en comunicación fluida con un vacío, el uno o más canales de vacío [702a, 702b] dirige la presión negativa a un área de la superficie de recepción donde se están suministrando o se han

suministrado los materiales desde el orificio del cabezal de impresión [222] y/o a una porción del área superficial del hidrogel suministrado, extrayendo de ese modo el exceso de fluido envolvente de la superficie de recepción y, opcionalmente, de una superficie del hidrogel suministrado, eliminando de ese modo la acumulación de fluido envolvente sobre la superficie de recepción y/o el hidrogel suministrado.

En una realización, el uno o más tubos de vacío está provisto, al menos en parte, en una o más prolongaciones que se proyectan desde el cabezal de impresión, proyectándose las prolongaciones en la misma dirección general que la extensión que comprende el orificio del cabezal de impresión y el canal de suministro (véase, por ejemplo, la Figura 10). En dichas realizaciones, la una o más prolongaciones que comprenden tubos de vacío no se extienden más allá de la prolongación que comprende el orificio del cabezal de impresión y el canal de suministro para no interferir con el hidrogel suministrado y depositado.

Se contempla que, en algunas realizaciones, la característica de retirada de fluido pueda ser una característica de la propia composición de fluido envolvente. Por ejemplo, la composición del fluido envolvente puede estar diseñada para evaporarse después de haberse suministrado desde el orificio del cabezal de impresión, eliminando así la acumulación del exceso de fluido envolvente sobre la superficie de recepción o sobre las superficies del hidrogel suministrado. Por ejemplo, el fluido envolvente puede tener un punto de ebullición que haga que se evapore después de ser suministrado, mientras permanece en estado líquido antes de ser suministrado.

Método de impresión de una estructura tridimensional

En un aspecto, se proporciona un método de impresión de una estructura tridimensional (3D).

El método comprende proporcionar en primer lugar un diseño para que se imprima una estructura 3D. El diseño puede crearse utilizando software CAD comercialmente disponible. En una realización, el diseño comprende información sobre materiales específicos (p. ej., para estructuras heterogéneas que comprenden múltiples materiales) que se van a asignar a ubicaciones geométricas específicas del diseño.

El método comprende la utilización de una impresora 3D, comprendiendo la impresora: un cabezal de impresión, una superficie de recepción para recibir un material suministrado por el cabezal de impresión; y una unidad de posicionamiento acoplada operativamente a la superficie de recepción, siendo la unidad de posicionamiento para posicionar el cabezal de impresión en una ubicación en un espacio tridimensional por encima de la superficie de recepción. Por ejemplo, se pueden utilizar diversas realizaciones del sistema de impresión provistas en el presente documento con el método de impresión de una estructura 3D.

El método comprende proporcionar al menos dos materiales para ser suministrados por el cabezal de impresión, tal como un fluido envolvente y un fluido de hidrogel. En realizaciones preferidas, uno o más tipos de células son compatibles con y, opcionalmente, se suministran dentro de hidrogel. En una realización preferida, el fluido envolvente sirve como agente lubricante para lubricar el movimiento del hidrogel dentro y desde el cabezal de impresión. En una realización preferida, el fluido envolvente comprende un agente de reticulación para solidificar al menos una porción del hidrogel antes o mientras se está suministrado desde el cabezal de impresión.

El método comprende comunicar el diseño a la impresora 3D. La comunicación se puede realizar, por ejemplo, mediante un procesador de control programable.

El método comprende controlar el posicionamiento relativo del cabezal de impresión y la superficie de recepción en un espacio tridimensional y suministrar simultáneamente desde el cabezal de impresión el fluido envolvente y el hidrogel, solos o combinados. En realizaciones preferidas, los materiales suministrados desde el cabezal de impresión se suministran coaxialmente, de manera que el fluido envolvente envuelva el hidrogel. Tal disposición coaxial permite que el agente de reticulación solidifique el hidrogel, lo que da como resultado una fibra sólida de hidrogel, que se suministra desde el cabezal de la impresora.

El método comprende depositar una primera capa de los materiales suministrados sobre la superficie de recepción, comprendiendo la primera capa una disposición del material especificada por el diseño y repetir iterativamente la etapa de deposición, depositar el material sucesivo sobre la primera y las sucesivas capas de material, depositando de ese modo capa sobre capa de materiales suministrados en una disposición geométrica especificada por el diseño para producir la estructura 3D cargada de células.

En realizaciones preferidas, una pluralidad de materiales, por ejemplo, múltiples hidrogeles, de los cuales al menos algunos comprenden uno o más tipos de célula, se depositan en una secuencia controlada, permitiendo de ese modo una disposición controlada de los hidrogeles y tipos de célula que se van a depositar en una disposición geométrica especificada por el diseño.

En realizaciones preferidas, el método comprende retirar el exceso de fluido de la cubierta de la superficie de recepción y, opcionalmente, de la superficie del hidrogel suministrado. Por ejemplo, la etapa de eliminar el exceso de líquido envolvente se puede hacer de manera continua durante todo el proceso de impresión, retirando así el exceso de fluido

que de otro modo podría interferir con la estratificación de los materiales suministrados en la disposición geométrica proporcionada por el diseño. Como alternativa, la etapa de retirar el exceso de fluido envolvente se puede realizar de manera intermitente durante todo el proceso de impresión secuencial o simultáneamente con una o más etapas de deposición. En algunas realizaciones, la retirada del exceso de fluido envolvente se realiza extrayendo el fluido fuera de la superficie de recepción y, opcionalmente, fuera de una superficie del hidrogel suministrado. En otra realización, la retirada del exceso de fluido envolvente se realiza extrayendo el exceso de fluido a través de la superficie de recepción, comprendiendo la superficie de recepción poros dimensionados para permitir el paso del fluido envolvente. En otra realización, la retirada del exceso de fluido envolvente se consigue proporcionando un fluido envolvente que se evapora después de suministrarse desde el orificio del cabezal de impresión.

Usos ejemplares de realizaciones del sistema y método de impresión de estructuras tridimensionales cargadas de células

En algunas realizaciones, utilizando el sistema y el método provistos en el presente documento, las estructuras generadas pueden ser útiles en el campo del descubrimiento de fármacos, donde, por ejemplo, la determinación de respuestas celulares a varios compuestos y composiciones químicas revisten gran interés. La utilización de cultivos de células 3D obtenidos utilizando realizaciones de los sistemas y métodos provistos en este documento puede proporcionar condiciones experimentales que se asemejen más a condiciones celulares y tisulares *in vivo* relativas a cultivos celulares 2D. La disposición 3D de las células puede imitar mejor las interacciones entre células *in vivo* y las respuestas a estímulos externos y la naturaleza heterogénea de las estructuras 3D que se pueden generar utilizando el aparato y los métodos provistos permite el estudio de tejidos y potencialmente de órganos. Se contempla que las estructuras 3D cargadas de células fabricadas utilizando realizaciones de los sistemas y métodos provistos en el presente documento pueden proporcionar un beneficio similar a la industria cosmética al ofrecer un medio alternativo para probar productos cosméticos.

En algunas realizaciones, diversas realizaciones del sistema y el método provistos en el presente documento son compatibles con la tecnología estándar de placa de pocillos. Las placas de pocillos o los insertos de placa de pocillos se pueden utilizar con o como parte de la cama de impresión en los métodos y sistemas provistos en el presente documento. Por lo tanto, diversas realizaciones del sistema y método provistos en el presente documento son compatibles con instrumentos y prácticas que utilizan placas de pocillos, lo que les permite integrarse fácilmente en los flujos de los procesos existentes.

En algunas realizaciones, los canales microfluídicos dentro del cabezal de impresión son compatibles con otros módulos microfluídicos. Por ejemplo, los módulos microfluídicos conocidos pueden incluirse en el cabezal de impresión de los sistemas provistos en el presente documento, aguas arriba del orificio del cabezal de impresión. Tales módulos pueden incluir, por ejemplo, recuento celular, clasificación celular, análisis de células y/o módulos de generación de gradiente de concentración.

En algunas realizaciones, el rendimiento de la impresión 3D se puede aumentar agregando al sistema cabezales de impresión adicionales, en paralelo. Cada cabezal de impresión comprende todos los elementos necesarios para imprimir una estructura de múltiples materiales, permitiendo así que se impriman varias estructuras 3D simultáneamente al incluir cabezales de impresión adicionales en el sistema.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a ciertas realizaciones específicas, diversas modificaciones de los mismos serán evidentes para los expertos en la materia sin desviarse del propósito y el alcance de la invención tal y como se describe en las reivindicaciones adjuntas a la misma. Todos los ejemplos provistos en el presente documento se han incluido únicamente con el propósito de ilustrar la invención y no pretenden limitar la invención en modo alguno. Todos los dibujos provistos en el presente documento tienen el único propósito de ilustrar diversos aspectos de la invención y no pretenden estar dibujados a escala ni limitar la invención en modo alguno.

Referencias

Las siguientes referencias se proporcionan como ejemplos del estado de la técnica conocida relacionada con la presente invención.

1. Su-Jung Shin, Ji-Young Park, Jin-Young Lee, Ho Park, Yong-Doo Park, Kyu-Back Lee, Chang-Mo Whang y Sang-Hoon Lee, "On the fly" continuous generation of alginate fibers using a microfluidic device", *Langmuir*, Vol. 23, 2007, págs. 9104-9108.
2. Saif Khalil y Wei Sun, "Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs", *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 131, 2009, págs. 111002-1 - 111002-8.
3. Min Hu, Rensheng Deng, Karl M. Schumacher, Motoichi Kurisawa, Hongye Ye, Kristy Purnamawati y Jackie Y. Ying, "Hydrodynamic spinning of hydrogel fibers", *Biomaterials*, Vol. 31, 2010, págs. 863-869.
4. Byung Kim, Intae Kim, Wooseok Choi, Sun Won Kim, JooSung Kim y Geunbae Lim, "Fabrication of cell-encapsulated alginate microfiber scaffold using microfluidic channel", *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, Vol. 130, 2008, págs. 021016-1 - 021016-6.
5. Edward Kang, Su-Jung Shin, Kwang Ho Lee y Sang-Hoon Lee, "Novel PDMS cylindrical channels that generate

coaxial flow, and application to fabrication of microfibers and particles", Lab on a Chip, Vol. 10, 2010, págs. 1856-1861.

6. Hiroaki Onoe, Riho Gojo, Yukiko Tsuda, Daisuke Kiriya and y Shoji Takeuchi, "Core-shell gel wires for the construction of large area heterogeneous structures with biomaterials", Conferencia IEEE MEMS, 2010, págs. 248-251.

7. Setareh Ghorbanian (2010), Microfluidic probe for direct write of soft cell scaffolds, M.Eng. Tesis. Universidad McGill: Canadá.

8. Edward Kang, Gi Seok Jeong, Yoon Young Choi, Kwang Ho Lee, Ali Khademhosseini y Sang-Hoon Lee, "Digitally tunable physicochemical coding of material composition and topography in continuous microfibers", Nature Materials, Vol. 10, 2011, págs. 877-883.

9. EP 2489779 A1

10. US 2006/0105011 A1

11. US 2011/0136162 A1

12. US 2012/0089238 A1

13. WO 2012009363 A1

14. US 2012/0322154 A1

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de fabricación aditiva de estructuras tridimensionales, comprendiendo el sistema:

- 5 - al menos un cabezal de impresión (100) para recibir y suministrar materiales, comprendiendo los materiales al menos un primer material, comprendiendo el primer material un fluido envolvente y al menos un segundo material, comprendiendo el segundo material un hidrogel, comprendiendo el cabezal de impresión:
 - un orificio (114) para suministrar los materiales;
 - 10 - canales microfluídicos que comprenden uno o más primeros canales (200, 202) para recibir y dirigir el primer material y uno o más segundos canales (204, 206) respectivos para recibir y dirigir el segundo material, intersecándose los segundos canales en un primer punto de intersección (228) con los primeros canales, uniéndose entre sí los segundos y primeros canales en el primer punto de intersección para formar el canal de suministro (220) que se extiende hasta el orificio (114); y
 - 15 - conmutadores fluidicos (210, 212, 214, 216), correspondiendo cada conmutador fluidico a uno de los canales microfluídicos del cabezal de impresión y estando configurados para permitir o impedir el flujo de fluido en los canales microfluídicos del cabezal de impresión (100) cuando se accionan;
 - una superficie de recepción (109) para recibir una primera capa de los materiales suministrados desde el orificio;
 - 20 - una unidad de posicionamiento para posicionar el orificio (114) del cabezal de impresión (100) en un espacio tridimensional, estando la unidad de posicionamiento acoplada operativamente al cabezal de impresión (100); y
 - un medio de suministro para suministrar los materiales desde el orificio (114) del cabezal de impresión (100).

25 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde el al menos un primer material además comprende un agente de reticulación para solidificar el al menos un segundo material al entrar en contacto con el mismo en el punto de inserción y/o en el canal de suministro.

30 3. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde cada segundo canal tiene un diámetro menor que el de los primeros canales y el canal de suministro, de modo que el flujo desde los primeros canales forma una envoltura coaxial alrededor del al menos un segundo material en el canal de suministro.

4. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el al menos un segundo material además comprende células vivas.

35 5. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende una característica de retirada de fluido para retirar el exceso del primer material suministrado desde el orificio.

40 6. El sistema de la reivindicación 5, en donde la característica de retirada de fluido comprende: un vacío para extraer el exceso de primer material de o a través de la superficie de recepción y/o del segundo material suministrado en la superficie de recepción; o un material absorbente para extraer fuera de la superficie de recepción el exceso de primer material.

45 7. El sistema de la reivindicación 6, en donde el cabezal de impresión incluye uno o más canales de vacío, teniendo el uno o más canales de vacío un orificio situado cerca del orificio del cabezal de impresión, y en donde el vacío se aplica por encima de la superficie de recepción y a través del uno o más canales de vacío.

8. Un método de impresión de una estructura tridimensional (3D), comprendiendo el método:

- 50 - proporcionar una impresora 3D, comprendiendo la impresora:
 - al menos un cabezal de impresión (100) que comprende un orificio (114) para suministrar materiales;
 - una superficie de recepción (109) para recibir una primera capa de los materiales suministrados desde el orificio (114) del cabezal de impresión (100); y
 - 55 - una unidad de posicionamiento acoplada operativamente al cabezal de impresión (100), siendo la unidad de posicionamiento para posicionar el cabezal de impresión en un espacio tridimensional;
 - proporcionar los materiales que se van a suministrar, comprendiendo los materiales que se van a suministrar un fluido envolvente y uno o más hidrogeles;
 - codificar la impresora con una estructura 3D que se va a imprimir;
 - 60 - suministrar desde el orificio del cabezal de impresión (114) los materiales que se van a suministrar, en donde:
 - el fluido envolvente se suministra a través de uno o más primeros canales microfluídicos y el uno o más hidrogeles se suministran a través del uno o más segundos canales microfluídicos;
 - los primeros y segundos canales microfluídicos se unen en un punto de intersección para formar un canal de suministro que se extiende hasta el orificio del cabezal de impresión; y,
 - 65 - el flujo del fluido envolvente y los hidrogeles a través de los primeros y segundos canales microfluídicos está

permitido o impedido por el accionamiento de los conmutadores fluídicos (210, 212, 214, 216), correspondiendo cada conmutador fluídico a uno de los canales microfluídicos del cabezal de impresión;

- de modo que el fluido envolvente y el hidrogel se suministran en una disposición coaxial, y en donde el fluido envolvente envuelve el hidrogel;

- 5 - depositar una primera capa de los materiales suministrados sobre la superficie de recepción (109); y,
 - repetir la etapa de deposición depositando material suministrado sucesivamente sobre la primera y cualquier capa sucesiva de material depositado, depositando de ese modo capa sobre capa de materiales depositados en una disposición geométrica según la estructura 3D

10 9. El método de la reivindicación 8, en donde el fluido envolvente comprende un agente de reticulación adecuado para reticular y solidificar el hidrogel al entrar en contacto con el mismo, creando el contacto una fibra de hidrogel.

15 10. El método de la reivindicación 8 o 9, que además comprende retirar el exceso de fluido envolvente suministrado por el orificio del cabezal de impresión en uno o más puntos temporales durante o entre las etapas de deposición.

 11. El método de la reivindicación 10, en donde la etapa de deposición y la etapa de retirada se efectúan de manera continuada, retirando de ese modo de manera continuada el exceso de fluido envolvente a medida que se depositan las capas de materiales suministrados.

20 12. El método de la reivindicación 10, en donde la etapa de retirada se efectúa de manera intermitente entre medias y/o al mismo tiempo que la etapa de deposición, retirando de ese modo de manera intermitente el exceso de fluido envolvente a medida que se depositan las capas de materiales suministrados.

25 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el uno o más hidrogeles están adaptados para soportar el crecimiento y/o la proliferación de células vivas suministradas en los mismos.

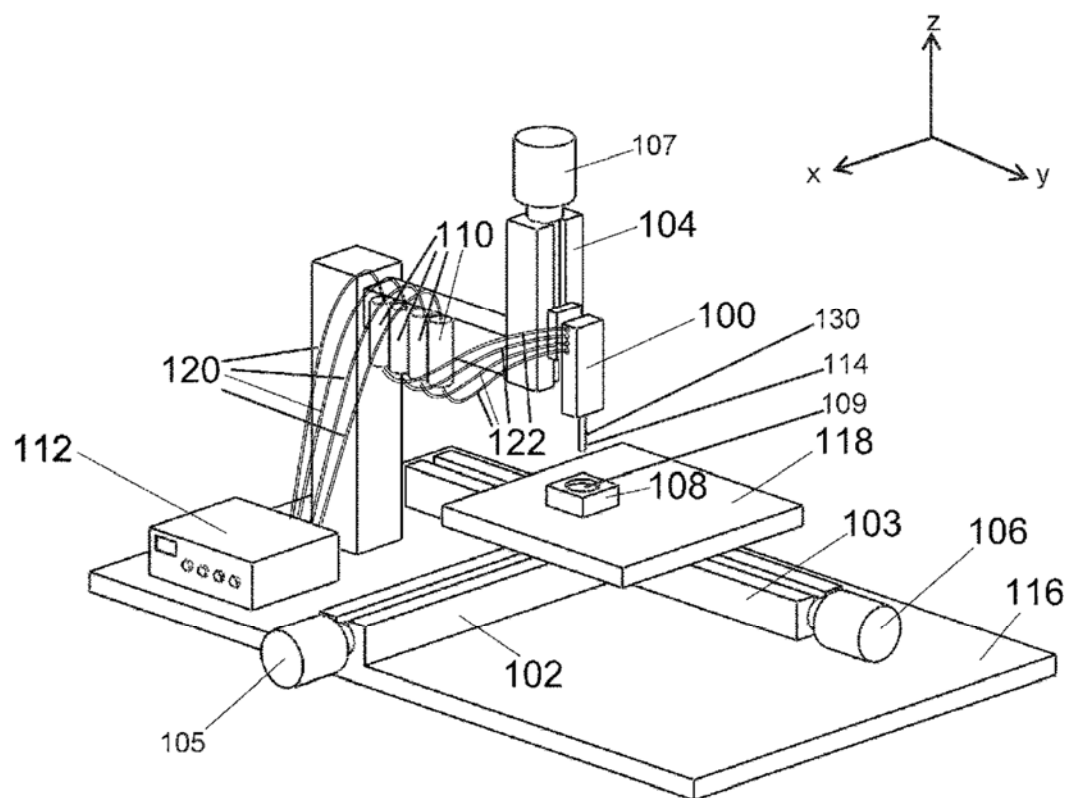


FIG. 1

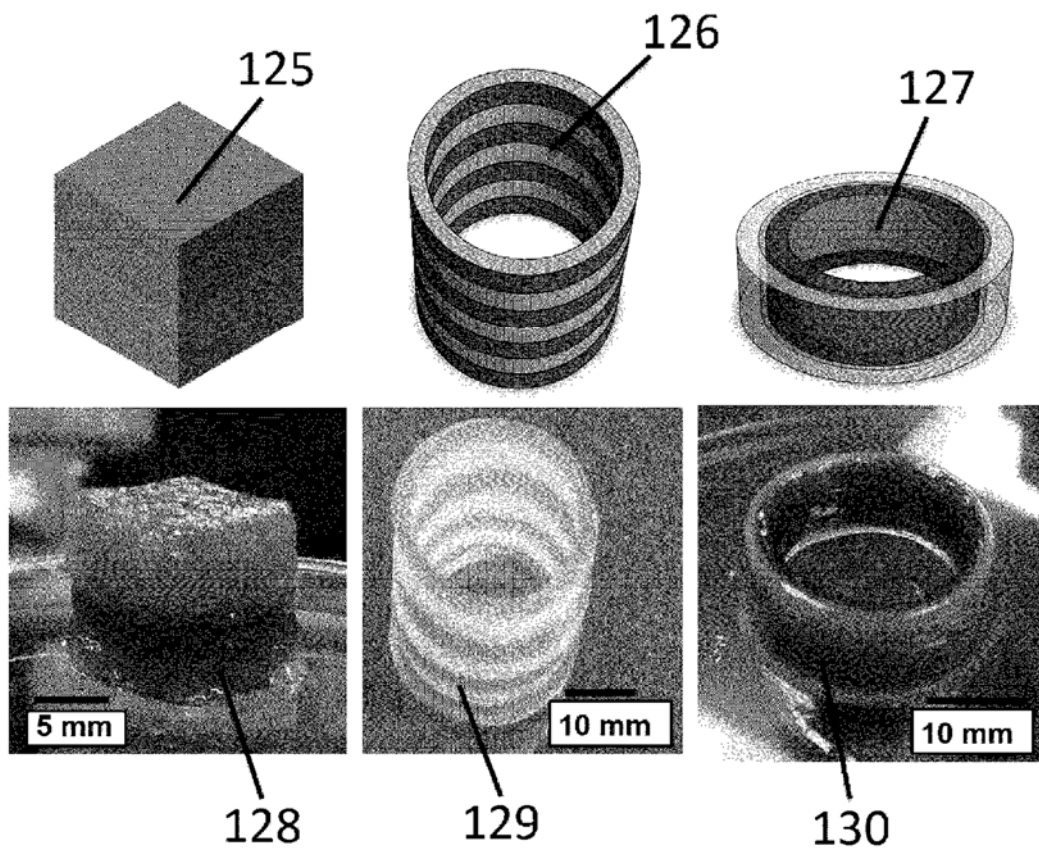


FIG. 2

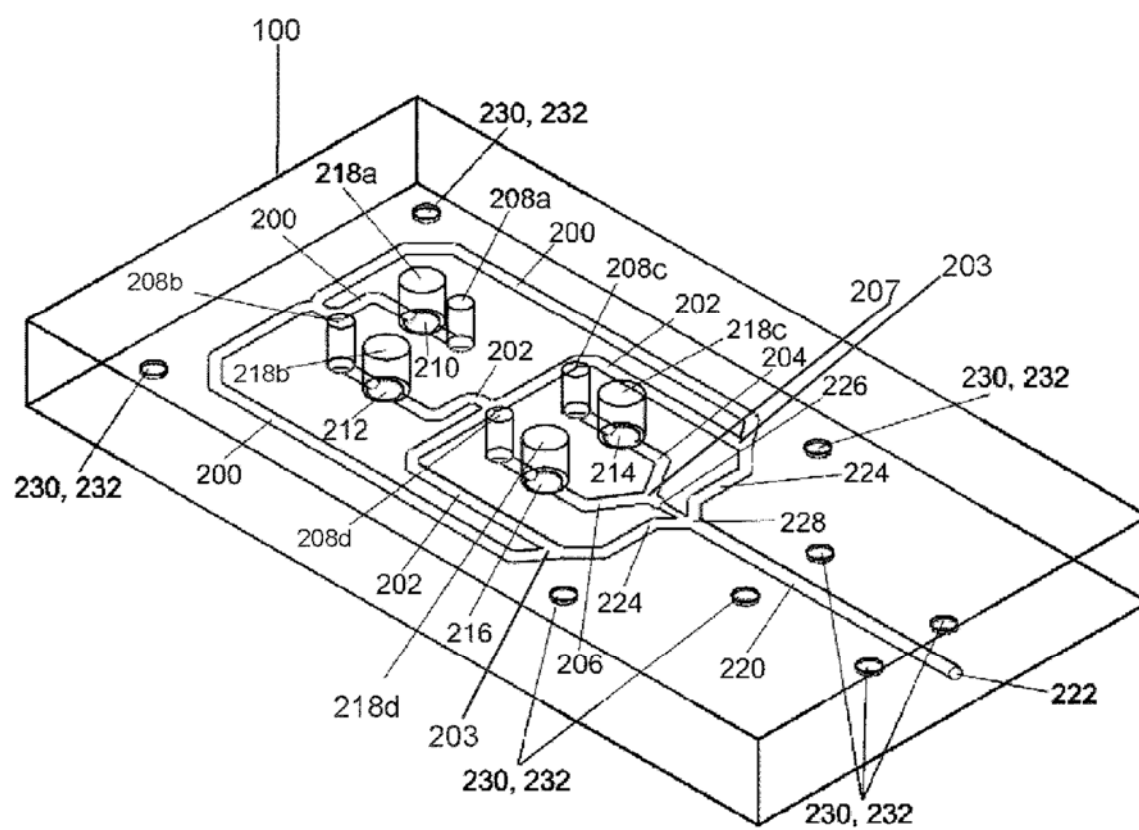


FIG. 3

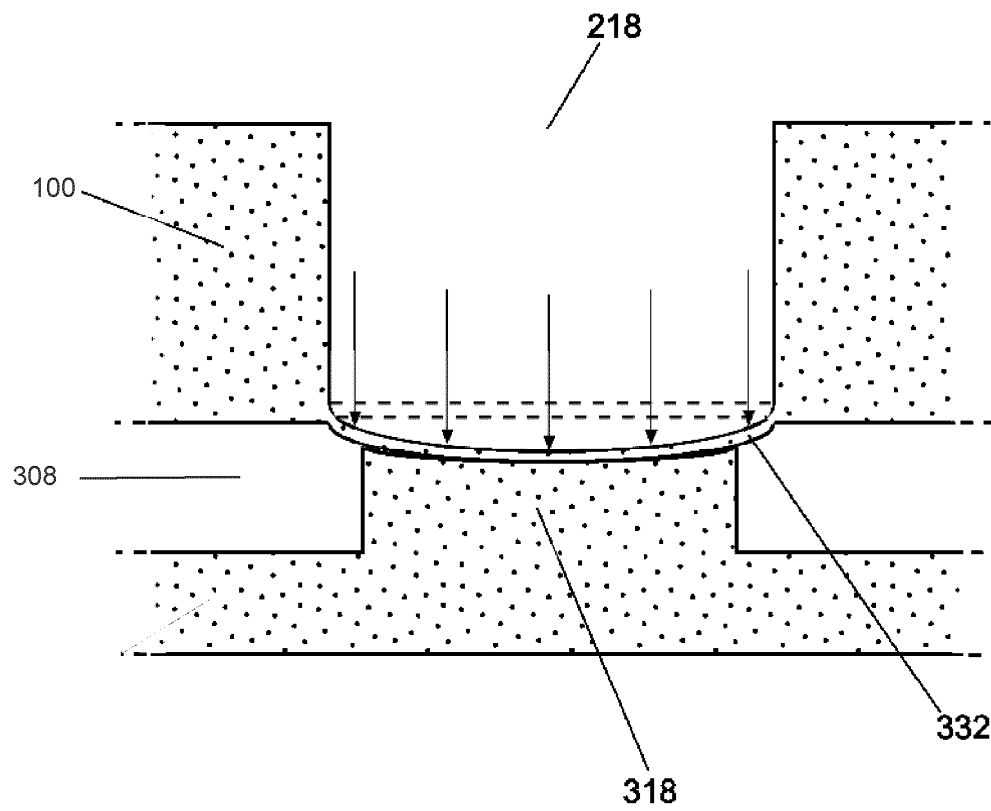


FIG. 4

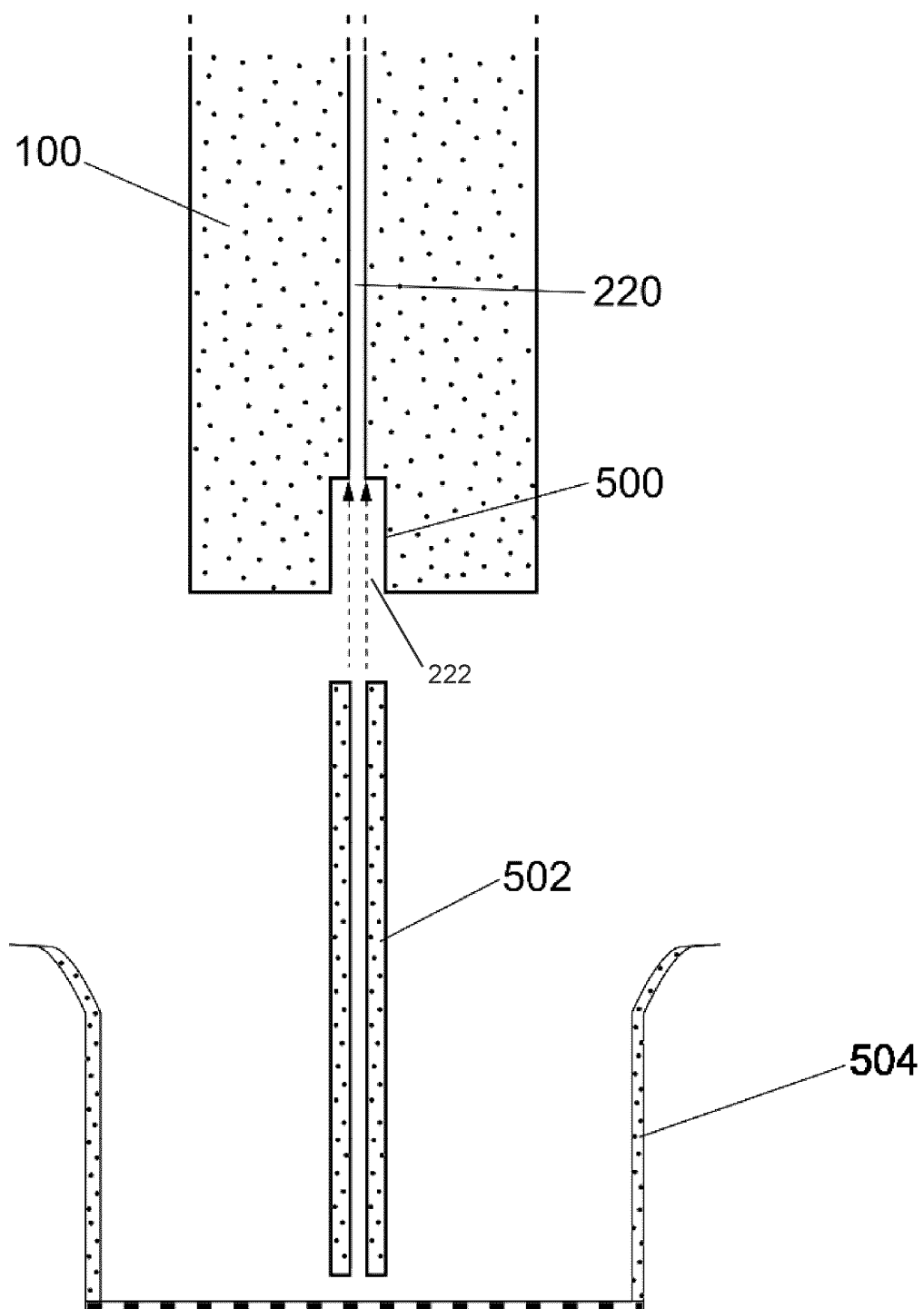


FIG. 5

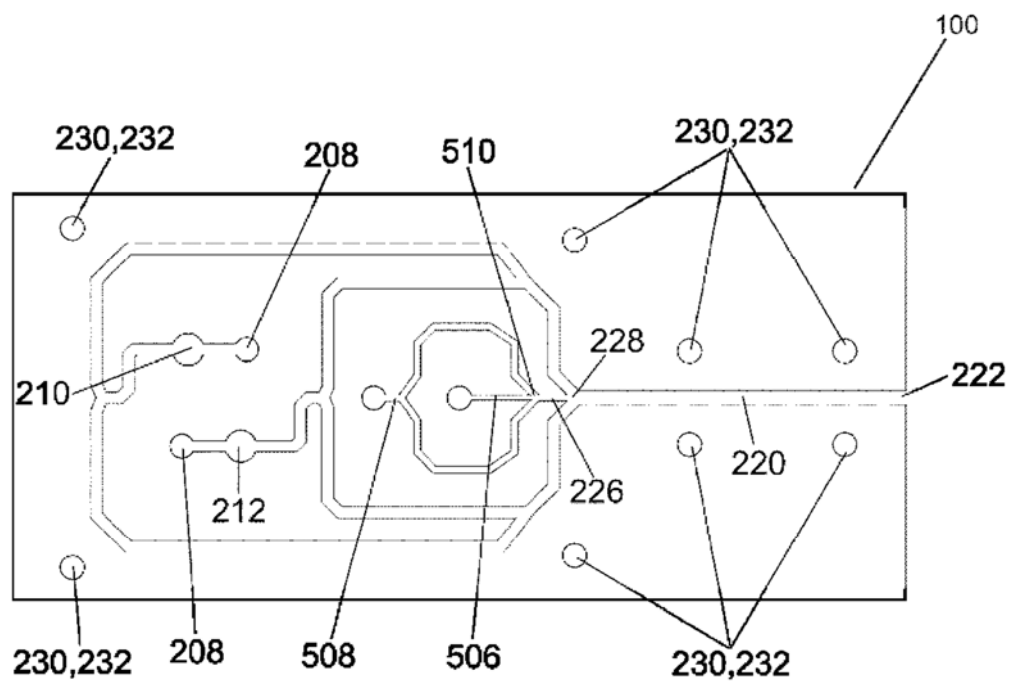


FIG. 6

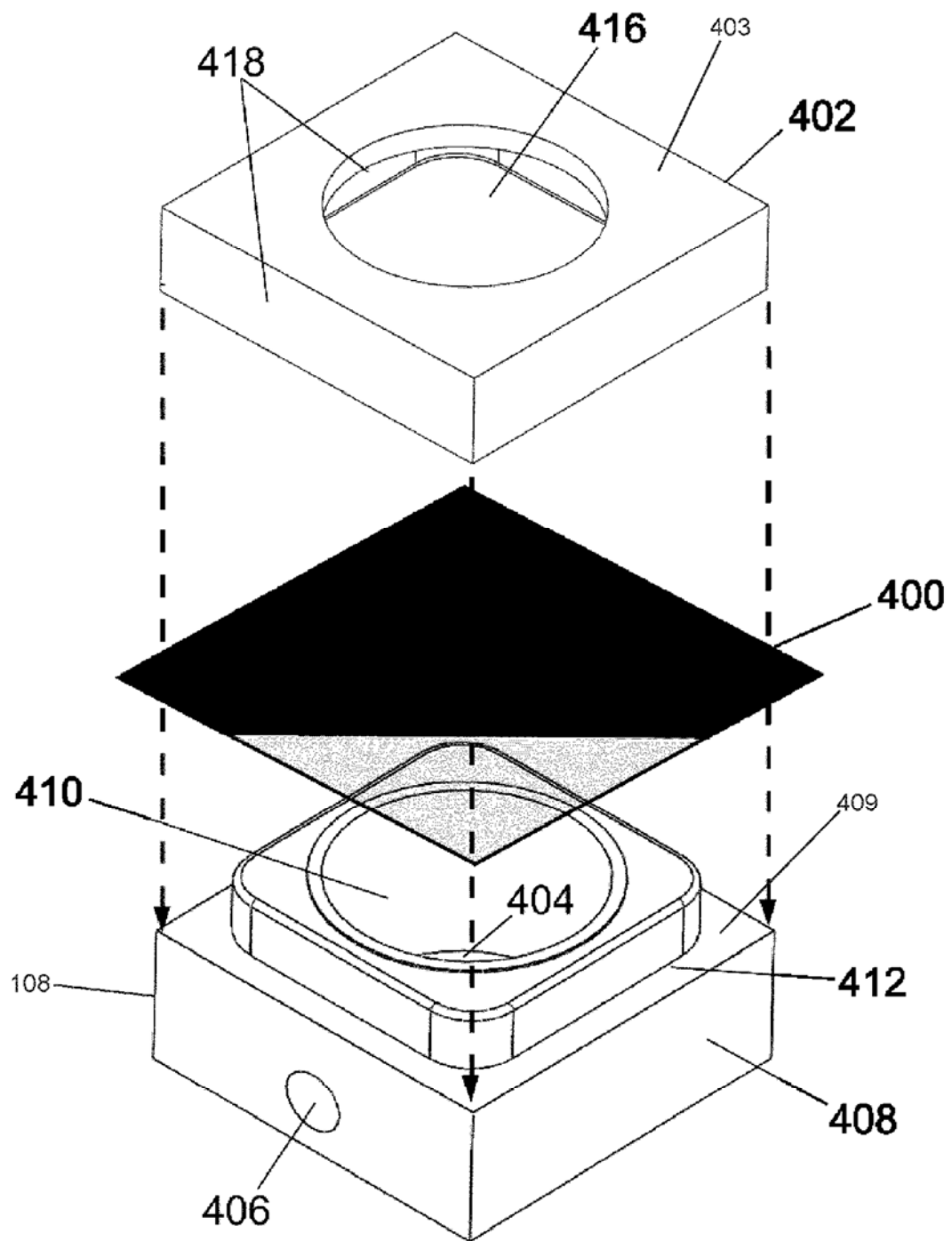


FIG. 7

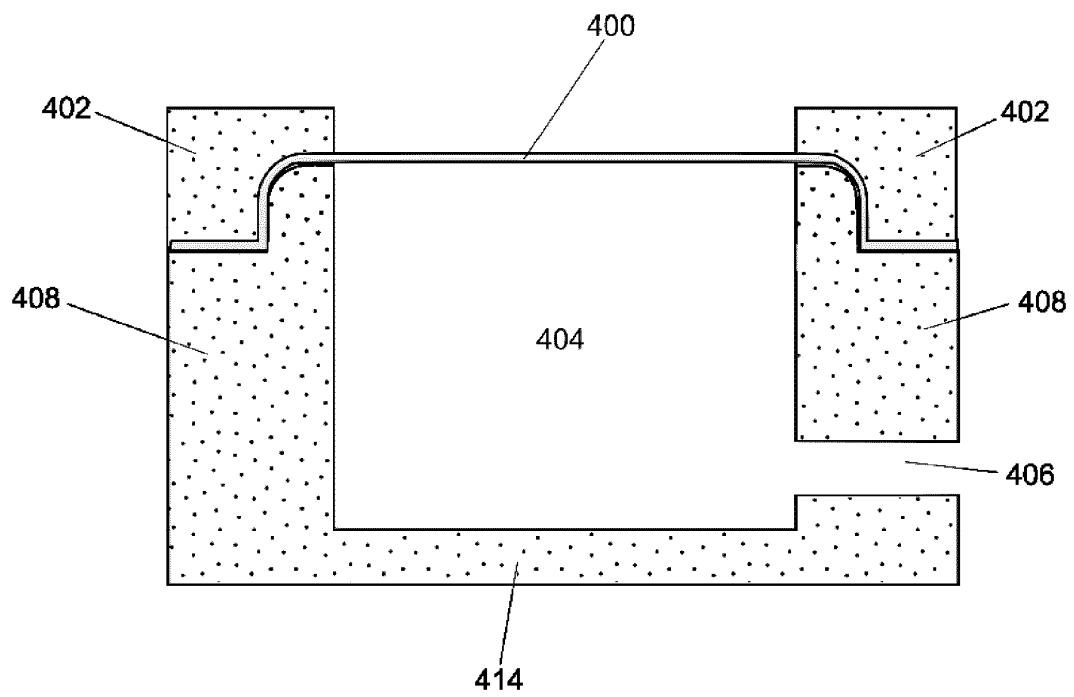


FIG. 8

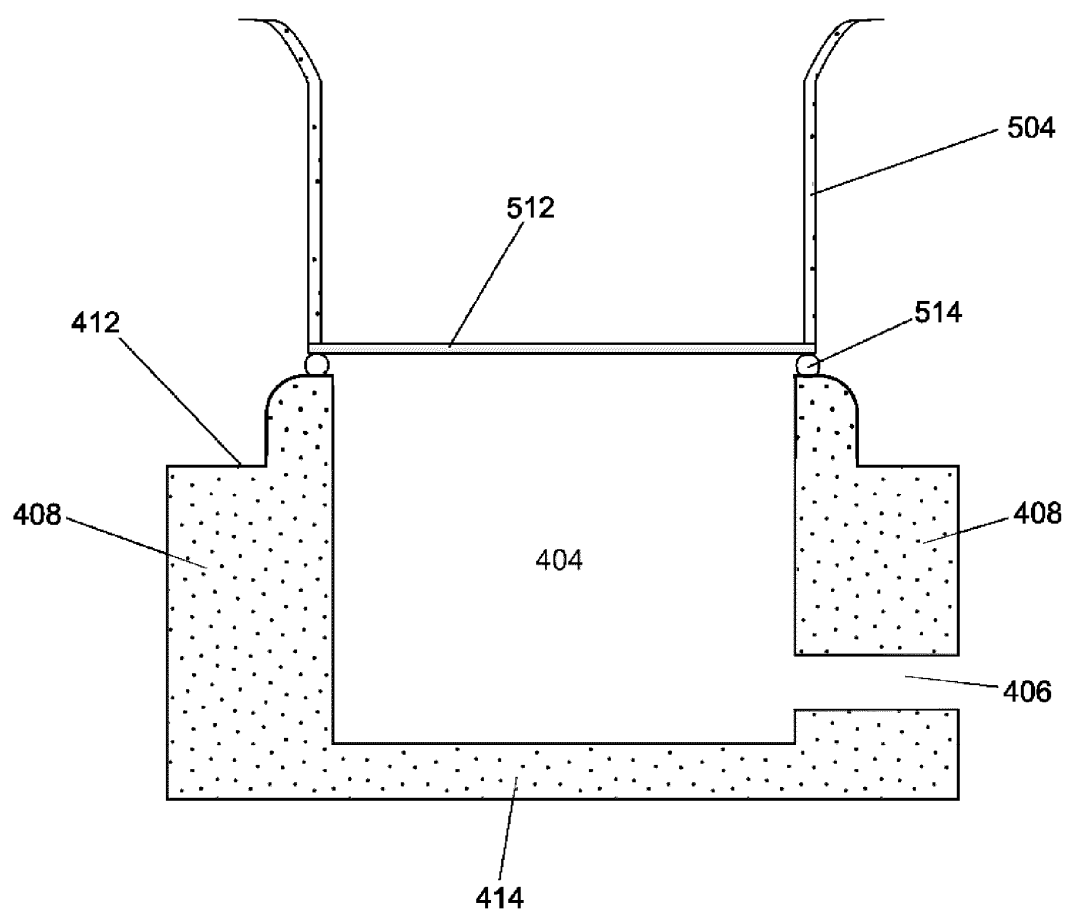


FIG. 9

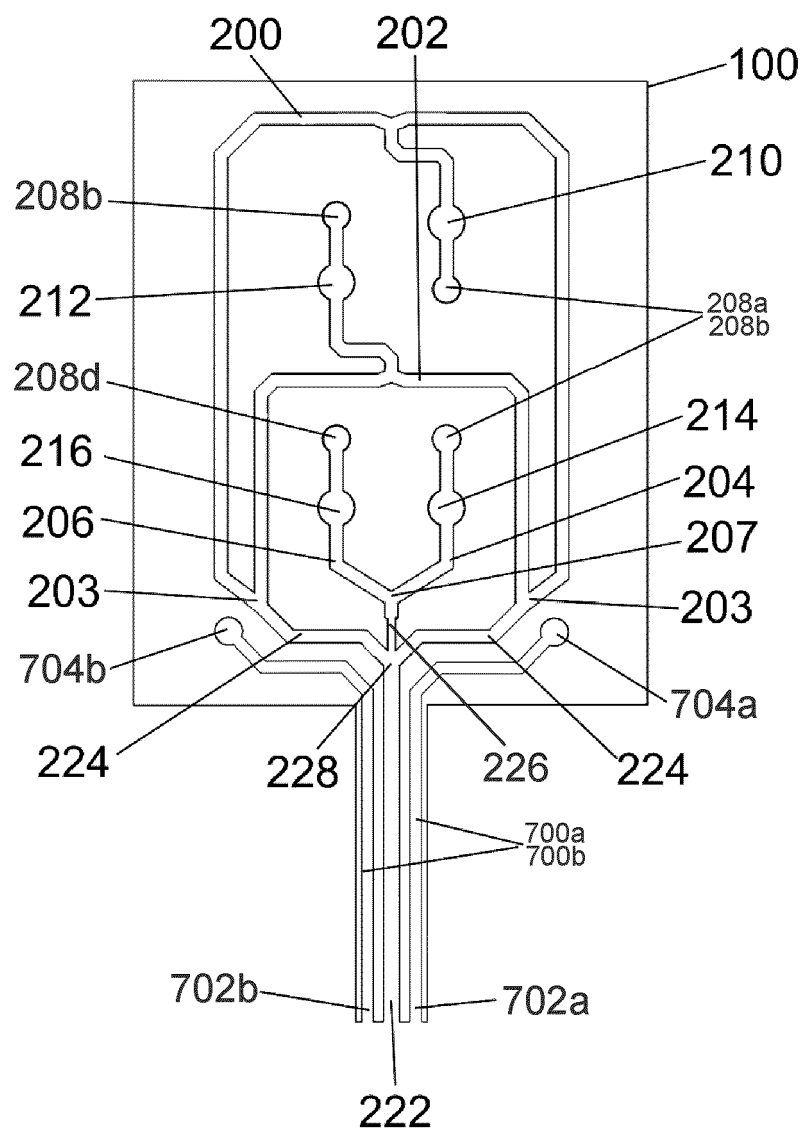


FIG. 10