

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 974**

51 Int. Cl.:

C12M 1/24 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014 PCT/EP2014/068921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15032889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014 E 14758977 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3041926**

54 Título: **Dispositivo para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos**

30 Prioridad:

05.09.2013 EP 13183063

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

25.11.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT BERN (100.0%)
Verwaltungsdirektion Hochschulstrasse 4
3012 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**GUENAT, OLIVIER THIERRY;
FELDER, MARCEL;
STUCKI, ANDREAS;
STUCKI, JANICK DANIEL y
GEISER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 795 974 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

Dispositivo para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un dispositivo según el preámbulo de la reivindicación independiente 1. Dicho dispositivo que comprende una primera parte de cuerpo con por lo menos una cámara de acceso, una segunda parte de cuerpo con por lo menos una cámara de cultivo y una membrana de cultivo que divide la por lo menos una cámara de acceso respecto de la cámara de cultivo, puede utilizarse para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos.

Antecedentes de la técnica

15 El sector farmacéutico actualmente está realizando esfuerzos por repensar el modo en que puede llevarse a cabo la investigación y desarrollo más eficientemente. Una cuestión importante que necesita resolverse es la falta de modelos eficientes y reproducibles de identificación de fármacos, capaces de predecir la toxicidad y la eficiencia de los compuestos en el ser humano antes del lanzamiento de caros ensayos clínicos.

20 De manera similar, las compañías químicas, así como las autoridades públicas y normativas están buscando métodos *in vitro* alternativos a los ensayos animales. Estos últimos predicen mal la respuesta en el ser humano, son éticamente discutibles y costosos. Sin embargo, la ausencia de modelos *in vitro* eficientes y reproducibles capaces de predecir la toxicidad de los compuestos químicos en el ser humano es un obstáculo que necesita superarse en los ensayos toxicológicos.

25 Esto resulta particularmente cierto para los modelos *in vitro* del pulmón, debido al complejo microambiente celular presente en las vías respiratorias inferiores, en donde tiene lugar el intercambio gaseoso. Las condiciones *in vivo* de los pulmones, tales como la interfaz aire-líquido, los movimientos respiratorios, las tensiones de cizalla inducidas por los líquidos sobre la capa epitelial y en el endotelio, etc., resultan particularmente complejas, lo que constituye un motivo por el que todavía no existen modelos alveolares *in vitro* precisos.

30 Los modelos *in vitro* conocidos del pulmón, tales como los sistemas transpocillo, pueden reproducir las interfaces de tejido entre los alveolos y el endotelio vascular, pero no los procesos mecánicos de respiración fisiológica ni la tensión de cizalla inducida por el torrente sanguíneo y tampoco la eliminación de los productos solubles y los productos de desecho excretados por las células. Además, los grosores de las membranas transpocillo típicamente son de entre diez y veinte micrómetros, que es aproximadamente uno a tres órdenes de magnitud superiores a las dimensiones *in vivo*. Lo anterior puede dificultar seriamente la señalización endotelial epitelial.

35 En este contexto, actualmente están apareciendo plataformas de investigación basadas en las tecnologías de microfluidos y poseen el potencial de mejorar la precisión de los modelos *in vitro* y la eficiencia experimental. Por ejemplo, únicamente en los últimos tres años se ha informado de modelos de pulmón bioartificial microfabricado.

40 En el documento WO 2010/009307 A2, se describe un pulmón-sobre-un-chip que respira, utilizando un cocultivo de células epiteliales/endoteliales. Este pulmón-sobre-chip está constituido por dos microcanales superpuestos, separados por una membrana porosa delgada estirable realizada en polidimetilsiloxano (PDMS). Dicha membrana, sobre la que se cultivan células epiteliales y endoteliales, se estira linealmente de manera cíclica mediante variación de la presión en canales contiguos que permiten la deformación de las paredes de los microcanales sobre los que se adhiere la membrana porosa delgada.

45 Sin embargo, el principio de acción mostrado en el documento WO2010/009307 A2 adolece de importantes limitaciones. En efecto, la precisión del nivel de tensión de la membrana delgada depende de la amplitud de deflexión de las paredes de canal internas, que a su vez es una función de varios parámetros, en particular de las propiedades mecánicas y de la geometría del material de las paredes y la presión del accionamiento, la totalidad de los cuales debe controlarse con precisión. Además, la construcción del dispositivo basado en el ensamblaje de dos partes: la parte superior y la parte inferior, entre las que se interpone la membrana delgada, requiere una alineación precisa para garantizar la reproducibilidad entre lotes de las propiedades mecánicas de las paredes de los canales.

50 Por lo menos dichos factores no permiten un control preciso del nivel de estirado de la membrana delgada y, en última instancia, de las células que se cultivan sobre dicha membrana. Por lo tanto, los procedimientos de fabricación del dispositivo deben ser extremadamente precisos, lo que incrementa los costes de producción y/o puede requerir una costosa calibración de la tensión en la membrana en función de la presión aplicada para cada dispositivo. Además, varios aspectos de dicho dispositivo sólo reproducen aproximadamente la membrana basal de los alveolos pulmonares y su deformación. En efecto, el estirado unidireccional generado por los canales conjuntos de dicho dispositivo no se corresponde con el estirado en tres direcciones que tiene lugar en el pulmón humano. *In vivo*, los movimientos respiratorios son el resultado de la contracción del diafragma, que tira de la

cavidad del pulmón, causando la entrada de aire en los pulmones. Además, la membrana integrada en el pulmón-sobre-chip descrito en el documento WO 2010/009307 A2 es comparablemente gruesa, es decir, de aproximadamente diez micrómetros, en comparación con el grosor de la base de la membrana alveolar pulmonar, que es de entre 200 y 500 nanómetros.

En el documento US 2010/0233799 A1, se muestra otro ejemplo de un pulmón-sobre-chip de microfluidos con una membrana estirable. De esta manera, un dispositivo comprende una membrana de PDMS sobre la que se cultivan células epiteliales. Con el fin de investigar las tensiones mecánicas que se producen típicamente en los pulmones ventilados, un pivote ejerce una fuerza mecánica sobre la membrana.

Sin embargo, para resultar adecuada para dicho esfuerzo del pivote, la membrana debe ser robusta y en el dispositivo del documento US 2010/0233799 A1 presenta un grosor de aproximadamente 100 micrómetros. El dispositivo mostrado no está provisto de una membrana porosa y, de esta manera, no permite simular la complejidad de la membrana alveolar mediante la reproducción de la barrera aire-sangre. Además, no permite el cultivo de células en la cara de la membrana en la que el pivote empuja deformándola, ya que el contacto directo del pivote con la membrana presionaría las células, dañándolas. Lo anterior implica que dicho sistema no permite simular el sistema de cocultivo típico de las barreras *in vitro*, aunque se integrase una membrana porosa.

Una limitación adicional del sistema descrito en el documento US 2010/0233799 A1, asimismo debido al contacto directo del pivote contra la membrana, es la evidente ausencia de espacio entre el pivote y la membrana. Lo anterior impide que se proporcione suficiente espacio para el medio fisiológico y, en consecuencia, las células no pueden ser perfundidas. Debido a que no puede proporcionarse solución fisiológica a las células desde la cara inferior de la membrana, el medio fisiológico necesita proporcionarse desde la cara superior de la membrana, en donde se cultivan las células, es decir, no se puede configurar ninguna condición de interfaz aire-líquido (IAL) en este sistema.

Otra desventaja del sistema del documento WO 2010/0233799 A1 es que la observación de las células desde la cara inferior del chip no resulta posible con un pivote no transparente. Y aunque el pivote sea transparente, las imágenes todavía resultarían distorsionadas debido a la curvatura del pivote y deberían corregirse, por ejemplo, con un software específico, a fin de resultar apropiadas.

Todavía adicionalmente, el sistema del documento US 2010/0233799 A1 únicamente permite que la membrana se estire en una dirección hacia afuera, mientras que en el pulmón dicha dirección sólo es cierta para las células endoteliales. Además, el perfil de estirado en el sistema del documento US 2010/0233799 A1 es muy heterogéneo. En particular, únicamente la membrana en la parte intermedia se adaptará a la estructura del pivote, mientras que en la membrana en la periferia no se adaptará. Lo anterior resulta en perfiles de estirado diferentes en la parte media de la membrana y en la periferia y, además, los alveolos en el pulmón se estiran de manera similar a una esfera en expansión. Lo anterior significa que el radio de la esfera cambia constantemente en el que, en este sistema, el radio viene definido por la forma del pivote.

Por lo tanto, existe una necesidad de un dispositivo para el modelado *in vitro* de tejidos de órganos que permita, por ejemplo, estirar cíclicamente las células en una medida y/o dirección predefinida y variable, permitiendo simular la deformación tridimensional del tejido, tal como en los alveolos pulmonares.

45 **Divulgación de la invención**

Según la invención, dicha necesidad se satisface con un dispositivo tal como se define mediante los elementos de la reivindicación independiente 1. Las formas de realización preferidas son el objeto de las reivindicaciones dependientes.

En particular, la invención es lo siguiente: un dispositivo para el modelado *in vitro* de tejidos de órganos comprende una primera parte de cuerpo con por lo menos una cámara de acceso, una segunda parte de cuerpo con por lo menos una cámara de cultivo y una membrana de cultivo que divide la cámara o cámaras de acceso respecto de la cámara de cultivo. El dispositivo comprende además una tercera parte de cuerpo con por lo menos una cámara de accionamiento que presenta por lo menos una cavidad de limitación, y una membrana de accionamiento que divide la cámara o cámaras de cultivo respecto de la cámara o cámaras de accionamiento, de manera que la membrana de cultivo es flexionable mediante el ajuste de la presión en la cámara de accionamiento.

La expresión "modelado de tejidos *in vivo*" en el contexto de la invención puede referirse a las condiciones *in vivo* de modelado de tejidos de los órganos, tales como, por ejemplo, el pulmón, y más particularmente a interfaces de tejidos, tales como interfaces de tejidos entre los alveolos y el endotelio vascular. Las primera, segunda y tercera partes de cuerpo pueden formarse como unidades físicas diferentes que pueden montarse entre sí, en forma de unidades físicas combinadas, de manera que las primera y segunda partes de cuerpo sean una unidad física y siendo la tercera parte de cuerpo una segunda unidad física, o en forma de una sola unidad física. Las primera, segunda y tercera partes de cuerpo pueden presentar, por ejemplo, forma de placa. En algunas formas de realización, la cámara o cámaras de acceso asimismo pueden utilizarse para el cultivo, de manera que es una

cámara combinada de acceso-cultivo. La membrana de cultivo puede ser porosa, es decir, completa o parcialmente porosa, o no porosa. Puede ser además comparablemente delgada y flexible, y puede ser recubrible con células en una cara o en ambas caras a fin de crear una barrera *in vitro*, similar a las barreras *in vivo*, tal como la barrera aire-sangre en los pulmones. La expresión "comparablemente delgada" en el presente contexto puede relacionarse con un grosor de entre aproximadamente 10 nanómetros (nm) y aproximadamente 20 micrómetros (μm), o de entre aproximadamente 20 nanómetros y aproximadamente 10 micrómetros, o de entre aproximadamente 200 nanómetros y aproximadamente 5 micrómetros. El tamaño de los poros de la membrana de cultivo puede ser de entre aproximadamente 0,4 micrómetros y aproximadamente 12 micrómetros y puede ser de aproximadamente 3 micrómetros. La densidad de los poros puede ser de entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 100.000.000 poros/cm² y puede ser de aproximadamente 800.000 poros/cm².

La membrana de cultivo puede presentar un grosor en el intervalo de entre aproximadamente 100 nm y 10 μm , o en el intervalo de entre aproximadamente 200 nm y 3 μm , en un intervalo de entre aproximadamente 500 nm y 1 μm . En algunas formas de realización, por ejemplo en que la cámara de acceso y la cámara de cultivo están dispuestas en el mismo nivel, la membrana de cultivo y la membrana de accionamiento puede ser la misma, es decir, pueden ser una única unidad física. La cámara de accionamiento puede presentar una única cavidad de limitación o una pluralidad de cavidades de limitación. Además, puede haber una pluralidad de cámaras de accionamiento, cada una con una única cavidad de limitación o una pluralidad de cavidades de limitación.

La membrana de cultivo que divide la cámara o cámaras de acceso respecto de la cámara de cultivo puede implementarse de manera que la cámara de acceso y la cámara de cultivo sean directamente contiguas y la membrana de cultivo se encuentre interpuesta entre ellas. Alternativamente, puede implementarse mediante conexión indirecta de la cámara de acceso y la cámara de cultivo mediante por lo menos una cámara adicional, tal como un canal o microcanal o similar, y disponiendo la membrana de cultivo en la cámara o cámaras adicionales, contiguas a por lo menos una cámara adicional y la cámara de cultivo, o contiguas a por lo menos una cámara adicional y la cámara de acceso. La membrana de cultivo puede utilizarse para el cultivo de células en una superficie o en sus dos superficies. Las células cultivadas sobre la membrana de cultivo pueden perfundirse continua o intermitentemente o pueden cultivarse de manera estacionaria.

Además, sobre una superficie o sobre ambas superficies de la membrana de cultivo pueden implantarse o cultivarse diversos tipos de células. Entre dichas células pueden incluirse cualquier tipo de célula procariótica y eucariótica procedente de una estructura multicelular, incluyendo nemátodos, amebas y bacterias, hasta mamíferos, tales como seres humanos. Los tipos celulares implantados o cultivos sobre la membrana de cultivo del dispositivo dependen del tipo de órgano o función del órgano que se desea simular y los tejidos que comprenden dichos órganos. Además, pueden cocultivarse en cualquiera de las caras, o en ambas caras, de la membrana de cultivo diversas células madre, tales como células de la médula ósea, células madre adultas inducidas, células madre embrionarias o células madre aisladas a partir de tejidos adultos. Utilizando diferentes medios de cultivo en las cámaras de cultivo y/o acceso que alimentan cada capa de células, puede permitirse que factores de diferenciación diferentes alcancen las capas de células madre, diferenciándose de esta manera las células en diferentes tipos celulares. Asimismo pueden mezclarse tipos celulares en la misma cara de la membrana de cultivo para crear cocultivos de diferentes células sin separación de una membrana.

La membrana de accionamiento que divide la cámara o cámaras de cultivo respecto de la cámara o cámaras de accionamiento puede implementarse disponiendo la cámara de accionamiento, o particularmente su cavidad de limitación, y la cámara de cultivo, de manera directamente contigua y la membrana de accionamiento interpuesta entre ellas. Alternativamente, puede implementarse mediante conexión indirecta de la cámara de accionamiento y la cámara de cultivo mediante por lo menos una cámara adicional, tal como un canal o microcanal o similar, y disponiendo la membrana de cultivo en la cámara o cámaras adicionales, contiguas a por lo menos una cámara adicional y la cámara de cultivo, o contiguas a por lo menos una cámara adicional y la cámara de accionamiento.

Durante la utilización del dispositivo según la invención, la membrana de cultivo puede flexionarse mediante el ajuste de la presión en la cámara de accionamiento. En particular, el ajuste de la presión dentro de la cámara de accionamiento puede causar la flexión de la membrana de accionamiento, dependiendo de la presión, hacia dentro (presión decreciente) o hacia afuera (presión creciente) de la cámara de accionamiento, es decir, negativa o positivamente. De esta manera, la presión dentro de la cámara de cultivo asimismo puede modificarse de manera que la membrana de cultivo se flexione correspondientemente hacia dentro o afuera de la cámara de cultivo. Dicho efecto puede encontrarse particularmente presente en el caso de que la cámara de cultivo se llene parcial o totalmente con un medio o líquido comparablemente incompresible. El ajuste de la presión dentro de la cámara de accionamiento permite aplicar una flexión tridimensional cíclica, predefinida y asimismo variable de la membrana de cultivo en correspondencia con la flexión de la membrana de accionamiento. De esta manera, puede utilizarse para el estirado de las células cultivadas sobre la membrana de cultivo. En formas de realización, la membrana de accionamiento asimismo puede flexionarse por otros medios diferentes de los cambios de presión. Por ejemplo, dicha flexión puede llevarse a cabo mediante una fuerza magnética, es decir, mediante la adición de materiales magnéticos en la membrana o fuera de la membrana.

Además, la provisión de una o más cavidades de limitación en la cámara de accionamiento permite limitar la flexión

de la membrana de accionamiento y, en correspondencia con ello, de asimismo la membrana de cultivo. Lo anterior puede facilitar comparablemente el funcionamiento y configuración del dispositivo, ya que la flexión puede limitarse con independencia del tipo y material de la membrana de cultivo. Es decir, la flexión de la membrana de accionamiento, que puede corresponderse a la flexión deseada de la membrana de cultivo o barrera *in vitro*, puede limitarse geoméricamente mediante el diseño de la cavidad de limitación. Como resultado, el nivel de estirado de las células cultivadas sobre la membrana de cultivo puede mantenerse constante con independencia de la confluencia del cultivo celular sobre la membrana de cultivo, de la presencia de una interfaz aire-líquido o líquido-líquido y en cierta medida, respecto de las propiedades mecánicas de la membrana de cultivo. Mediante la restricción de la flexión de la membrana de accionamiento, pueden evitarse en gran medida las variaciones entre lotes de las propiedades viscoelásticas del material de la membrana de cultivo y la variación de la geometría de la membrana de accionamiento. Como resultado, no necesita controlarse con precisión una presión de accionamiento requerida, lo que puede proporcionar un accionamiento sin calibración. Además, dicha configuración permite crear indirectamente presiones pequeñas y precisas que resultan necesarias para estirar las células cultivadas sobre la membrana de cultivo, mediante la flexión de, por ejemplo, una membrana de accionamiento más gruesa con una presión más alta.

Por lo tanto, con el dispositivo según la invención, puede proporcionarse un sistema de accionamiento robusto que no depende de las propiedades mecánicas del material de la membrana de accionamiento, ni de la presión, y que permite simular las deformaciones tridimensionales del tejido, en particular de los alveolos pulmonares.

Al utilizar el dispositivo según la invención para cultivar células sobre la membrana de cultivo, pueden monitorizarse las respuestas celulares a diversos impactos ambientales, utilizando diversos sistemas que pueden combinarse con el dispositivo. Por ejemplo, pueden monitorizarse los cambios de pH utilizando sensores bien conocidos. O puede muestrearse el sobrenadante celular continua o periódicamente para la medición de los cambios de concentración de los factores secretados celulares (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas) o pueden muestrearse células, continua o periódicamente para la medición de cambios en la transcripción génica o cambios en la bioquímica celular o en la organización estructural. Por ejemplo, pueden medirse las especies de oxígeno reactivo (EOR), que son un indicio de estrés celular. Asimismo puede medirse la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) para monitorizar la confluencia y/o la permeabilidad de la barrera *in vitro*. Asimismo puede someterse el "tejido" cultivo sobre la membrana de cultivo a análisis de microscopía, análisis inmunohistoquímico, análisis de hibridación *in situ* o análisis patológico típico utilizando la tinción, tal como la tinción de hematoxilina y eosina. Las muestras para dichos análisis pueden obtenerse en tiempo real, u obtenerse después de un experimento o extrayendo pequeñas biopsias en diferentes estadios durante un estudio o un experimento. Además, pueden someterse las células cultivadas sobre la membrana a otras células, tales como células del sistema inmunitaria o células bacterianas, a anticuerpos o células dirigidas por anticuerpos, por ejemplo, con diana en receptores celulares específicos. Pueden exponerse las células a virus o a otras partículas. Para ayudar en la detección del movimiento de sustancias suministradas externamente, tales como células, virus, partículas o proteínas, pueden marcarse naturalmente utilizando medios típicos, tales como marcajes radioactivos o fluorescentes. Por ejemplo, las células pueden hacerse crecer, cultivarse y analizarse utilizando el dispositivo según la invención durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, entre por lo menos 1 a 2 semanas e incluso más de 2 semanas.

En una forma de realización ejemplificativa no limitativa, el dispositivo según la invención se configura para simular el funcionamiento de un pulmón, de manera que las células de epitelio pulmonar se autoensamblan sobre una superficie de la membrana de cultivo y las células del endotelio capilar pulmonar se autoensamblan sobre la cara opuesta de la misma membrana de cultivo. De esta manera, el dispositivo permite la simulación de la estructura y funcionamiento de una unidad alveolar-capilar funcional que puede exponerse a una tensión mecánica fisiológica para simular la respiración o a estímulos químicos, moleculares, particulados y celulares tanto transportados por el aire como transportados en la sangre a fin de investigar el intercambio de compuestos químicos, moléculas y células a través de dicha interfaz tejido-tejido a través de los poros de la membrana. El dispositivo puede presentar un impacto sobre el desarrollo de los modelos pulmonares *in vitro* que simulan las respuestas a nivel de órgano, que pueden analizarse bajo condiciones fisiológicas y patológicas.

Las formas de realización del dispositivo según la invención pueden aplicarse en numerosos campos, incluyendo biología básica, investigación en ciencias de la vida, identificación y desarrollo de fármacos, ensayos de seguridad farmacológica, toxicología, ensayos químicos y biológicos, así como ingeniería de tejidos y órganos. En una forma de realización, el dispositivo es un dispositivo orgánico bioartificial que puede utilizarse en biología patológica específica de órgano. Además, el dispositivo puede encontrarse aplicación en dispositivos de asistencia orgánica para hígado, riñón, pulmón, intestino, médula ósea y otros órganos y tejidos, así como en estructuras de sustitución de órganos.

Entre las aplicaciones del dispositivo según la invención asimismo puede incluirse, aunque sin limitarse a ellas, la identificación de marcadores de enfermedad, la evaluación de la eficacia de los terapéuticos anticáncer, el ensayo de vectores de terapia génica, el desarrollo de fármacos, el cribado, estudios de células, especialmente células madre y células de médula ósea; estudios sobre biotransformación, absorción, lavado, metabolismo y activación de xenobióticos; estudios sobre la biodisponibilidad y transporte de agentes químicos o biológicos a través de capas epiteliales o endoteliales; estudios sobre el transporte de agentes biológicos o químicos a través de la

barrera hematoencefálica; estudios sobre el transporte de agentes biológicos o químicos a través de la barrera epitelial intestinal; estudios sobre la toxicidad basal aguda de agentes químicos; estudios sobre la toxicidad local aguda o específica de órgano aguda de agentes químicos; estudios sobre la toxicidad basal crónica de agentes químicos; estudios sobre la toxicidad local crónica o específica de órgano crónica de agentes químicos; estudios de toxicidad por inhalación; estudios de toxicidad de dosis repetidas; estudios de toxicidad a largo plazo; estudios de toxicidad crónica; estudios sobre la teratogenicidad de agentes químicos; estudios sobre genotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de agentes químicos; detección agentes biológicos infecciosos y armas biológicas; detección de agentes químicos perjudiciales y topes químicos; estudios sobre enfermedades infecciosas; estudios sobre la eficacia de agentes químicos o biológicos para tratar enfermedades; estudios sobre el intervalo de dosis óptimas de agentes en el tratamiento de enfermedades; predicción de la respuesta de órganos *in vivo* a agentes biológicos; predicción de la farmacocinética de agentes químicos o biológicos; predicción de la farmacodinámica de agentes químicos o biológicos referente al impacto del contenido genético sobre la respuesta a los agentes; estudios sobre la transcripción génica en respuesta a agentes químicos o biológicos; estudios sobre la expresión de proteínas en respuesta a agentes químicos o biológicos, y estudios sobre los cambios en el metabolismo en respuesta a agentes químicos o biológicos.

El dispositivo según la invención asimismo puede utilizarse para cribar las células para un efecto de las células sobre los materiales (por ejemplo, de una manera equivalente al metabolismo en los tejidos de un fármaco). Puede utilizarse para estimular el medio de carga mecánica de caminar, correr, respirar, peristalsis, flujo de sangre u orina, o el latido de un corazón, sobre células cultivadas a partir de tejidos mecánicamente activos, tales como corazón, pulmón, músculo esquelético, hueso, ligamento, tendón, cartílago, células musculares lisas, intestino, riñón, piel, células endoteliales y células de otros tejidos. En lugar de someter a ensayo las respuestas biológicas o bioquímicas de una célula en un medio estático, el investigador puede aplicar un abanico de frecuencias, amplitudes y duración de las tensiones mecánicas, incluyendo la tensión, la compresión y la cizalla sobre las células en cultivo.

El dispositivo según la invención puede utilizarse adicionalmente para estudiar la biotransformación, absorción, lavado, metabolismo y activación de xenobióticos, así como la administración de fármacos. Asimismo puede estudiarse la biodisponibilidad y transporte de agentes químicos y biológicos a través de las capas epiteliales, tal como en el intestino, capas endoteliales, tal como en vasos sanguíneos, y a través de la barrera hematoencefálica. Asimismo puede estudiarse la toxicidad basal aguda, la toxicidad local aguda o la toxicidad específica de órgano aguda, teratogenicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de los agentes químicos. Los efectos de agentes biológicos infecciosos, armas biológicas, agentes químicos nocivos y armas químicas asimismo pueden detectarse y estudiarse. Pueden estudiarse las enfermedades infecciosas y la eficacia de los agentes químicos y biológicos para tratar dichas enfermedades, así como los intervalos de dosis óptima para dichos estudios. La respuesta de los órganos *in vivo* a los agentes químicos y biológicos, y la farmacocinética y farmacodinámica de estos agentes puede detectarse y estudiarse utilizando el dispositivo según la invención. Puede estudiarse el impacto del contenido genético sobre la respuesta a los agentes. Puede determinarse la cantidad de proteína y la expresión génica en respuesta a agentes químicos o biológicos. Pueden estudiarse los cambios en el metabolismo en respuesta a los agentes químicos o biológicos, así como utilizando el presente dispositivo.

En aplicaciones específicas, el dispositivo según la invención puede resultar particularmente ventajoso. Por ejemplo, entre algunas de las ventajas del dispositivo, al contrario que los cultivos celulares o cultivos de tejidos convencionales, pueden incluirse, por ejemplo, al introducir las células en el dispositivo, puede producirse la diferenciación de fibroblastos, CML (células musculares lisas) y CE (células endoteliales), reestableciendo relaciones tejido-tejido arquitectónicas tridimensionales definidas que son similares a la situación *in vivo*, y pueden investigarse las funciones y respuestas celulares a los agentes farmacológicos o sustancias o productos activos al nivel de tejido y de órgano. Además, muchas actividades celulares o tisulares son susceptibles de detección en el dispositivo, incluyendo, aunque sin limitación, la tasa de difusión de los fármacos en y a través de los tejidos en capas en el canal de flujo transportado, la morfología celular, la diferenciación y los cambios en la secreción en diferentes capas, la locomoción celular, el crecimiento, la apoptosis y similares. Además, el efecto de diversos fármacos sobre diferentes tipos de células situados en diferentes capas del sistema puede evaluarse fácilmente.

El dispositivo según la invención puede utilizarse en ingeniería de una diversidad de tejidos, incluyendo, aunque sin limitación, el sistema cardiovascular, pulmón, intestino, riñón, cerebro, médula ósea, huesos, dientes y piel. En el caso de que el dispositivo se fabrique con un material biocompatible y/o biodegradable adecuado, tal como ácido poliláctido-co-glicólido (PLGA), puede utilizarse para el trasplante o implantación *in vivo*. Además, la capacidad de localizar espacialmente y controlar las interacciones de varios tipos celulares presenta una oportunidad de manipular jerárquicamente y de crear análogos de tejidos y órganos más fisiológicamente correctos. La organización de múltiples tipos celulares en una estructura definida presenta efectos beneficiosos sobre la diferenciación celular, el mantenimiento y la longevidad funcional.

Para la identificación de fármacos, por ejemplo, la utilización del dispositivo según la invención puede presentar dos ventajas: (1) el dispositivo puede simular mejor la arquitectura en capas *in vivo* de tejidos y, por lo tanto, permite estudiar el efecto farmacológico al nivel de órgano además de a los niveles celulares y tisular, y 2) el dispositivo puede reducir la utilización de modelos tisulares *in vivo* y la utilización de animales para la selección de fármacos y los estudios toxicológicos.

Además, de la identificación y desarrollo de fármacos, el dispositivo según la invención asimismo puede resultar útil en investigación básica y clínica. Por ejemplo, puede utilizarse para investigar el mecanismo de la tumorigénesis. Está bien establecido que la progresión del cáncer *in vivo* está modulada por el huésped y el microambiente tumoral, incluyendo las células estromales y la matriz extracelular (MEC). Por ejemplo, se ha encontrado que las células estromales son capaces de convertir células epiteliales benignas en células malignas, de esta manera que se ha encontrado que la MEC afecta a la formación del tumor. Existe evidencia creciente de que las células que crecen en una arquitectura definida son más resistentes a los agentes citotóxicos que las células en monocapas. Por lo tanto, el dispositivo podría ser un mejor medio de simular las características de crecimiento originales de las células de cáncer y, de esta manera, reflejar mejor la sensibilidad farmacológica real de los tumores *in vivo*.

El dispositivo según la invención asimismo puede permitir la adición de diferentes factores de crecimiento, compuestos químicos, gases y nutrientes a diferentes tipos celulares según las necesidades de las células y su existencia *in vivo*. El control de la localización de dichos factores o proteínas podría dirigir el proceso de remodelado y funcionamiento de células específicas y podría proporcionar además las claves moleculares al sistema global, resultando en desarrollos beneficiosos tales como neotejidos, remodelado celular, secreción potenciada y similares.

En todavía otro aspecto, el dispositivo según la invención puede utilizarse en forma de micromatrices celulares de multitypo celular, tales como dispositivos de microfluidos. Utilizando el dispositivo, puede mantenerse la integridad de patrón de las matrices celulares. Dichas micromatrices celulares pueden constituir el futuro "laboratorio-en-un-chip", particularmente al multiplexarse y automatizarse. Dichos cultivos multitypo celular miniaturizados facilitarán la observación de la dinámica celular con ensayos más rápidos y menos ruidosos, al presentar integrada la complejidad, que permitirá que las células muestren respuestas similares a las *in vivo* frente a la matriz.

En todavía otro aspecto, el dispositivo según la invención puede utilizarse como sensor biológico. Los biosensores basados en células pueden proporcionar más información que otros biosensores debido a que las células con frecuencia presentan respuestas fisiológicas multifacéticas a los estímulos, además de nuevos mecanismos para amplificar dichas respuestas. Todos los tipos celulares en el dispositivo pueden utilizarse para monitorizar diferentes aspectos de un analito simultáneamente; pueden utilizarse diferentes tipos celulares en el dispositivo para monitorizar diferentes analitos simultáneamente, o una mezcla de ambos tipos de monitorización. Se han utilizado células desde *E. coli* a células de líneas de mamífero como sensores para aplicaciones en la monitorización medioambiental, la detección de toxinas y la monitorización fisiológica.

En todavía otro aspecto, el dispositivo según la invención puede utilizarse en la comprensión de procesos fundamentales de la biología celular y de las interacciones células-MEC. El proceso de remodelado *in vivo* es un proceso recíproco, dinámico complejo entre las células y las MEC. El dispositivo podría ser capaz de capturar la complejidad de dichos sistemas biológicos, de manera que sean susceptibles de investigación y una manipulación beneficiosa. Además, acoplado con herramientas de obtención de imágenes, tales como la microscopía de fluorescencia, la microfluorimetría o la tomografía de coherencia óptica (TCO), la resistencia eléctrica transepitelial (RETE), se espera el análisis en tiempo real del comportamiento celular en los tejidos multicapa mediante la utilización del dispositivo. Entre los ejemplos de estudios celulares y tisulares susceptibles de análisis en tiempo real se incluyen la secreción y señalización celulares, las interacciones célula-célula, las interacciones tejido-tejido, la construcción y monitorización dinámicas de tejidos artificiales, las investigaciones de estructura-función en la ingeniería de tejidos y el proceso de matrices *in vitro* de remodelado celular.

Otro ejemplo es la utilización del dispositivo según la invención es inducir la formación de interfaces tejido-tejido y estructuras orgánicas complejas dentro del dispositivo mediante su implantación *in vivo* dentro del cuerpo de un animal vivo, permitiendo la impregnación de células y tejidos en el dispositivo y el establecimiento de interfaces tejido-tejido normales. A continuación, el dispositivo completo y células y tejidos contenidos se extrae quirúrgicamente mientras se perfunde a su a través uno o más de los canales de fluidos con el medio y los gases necesarios para la supervivencia celular. Dicha forma de realización compleja del dispositivo a continuación puede mantenerse estable *in vitro* mediante perfusión continua y utilizarse para el estudio de funciones celulares y tisulares altamente complejas en su contexto 3D normal con un nivel de complejidad no posible utilizando cualquiera de los sistemas modelo *in vitro* actuales.

En particular, una forma de realización de microcanal del dispositivo según la invención puede implantarse subcutáneamente *in vivo* en un animal en el que el dispositivo contiene materiales inductores de hueso, tales como hueso en polvo desmineralizado o proteínas morfogénicas óseas (PMO), en un canal que presenta una o más aberturas correspondientes abiertas al espacio tisular circundante. Puede cerrarse un segundo canal durante la implantación mediante el cierre de sus aberturas finales o su llenado con un material extraíble sólido, tal como un vástago sólido. Como resultado de la cicatrización de heridas, los tejidos conectivos que contienen microcapilares y células madre mesenquimales crecen hacia el interior de los canales abiertos del dispositivo y, debido a la presencia del material inductor óseo, forman hueso con espacios que atraen células precursoras hematopoyéticas circulantes para formar médula ósea totalmente funcional, tal como se ha mostrado en estudios anteriores. Una

vez se ha completado dicho proceso, el sitio quirúrgico se reabre y el segundo canal se reabre sacando el vástago o tapones y conectando después los catéteres conectados con un reservorio de líquidos de manera que el medio de cultivo que contiene nutrientes y gases necesarios para la supervivencia celular pueda bombearse por el segundo canal y pasarse por los poros de la membrana de cultivo hacia el interior del primer canal que contiene la médula ósea formada. El dispositivo de microcanales entero a continuación podría recortarse liberándolo del tejido circundante, y con el medio en flujo continuo hacia el interior del dispositivo, extraerlo del animal y pasarlo a un incubador de cultivo de tejidos y mantenerlo en cultivo con flujo de fluido continuo por el segundo canal, y puede añadirse un flujo adicional al primer canal, así como, si se desea, mediante la conexión con sus aberturas de entrada y salida. A continuación, puede utilizarse el dispositivo de microcanal para estudiar la función de la médula ósea intacta *in vitro* tal como en un ambiente controlado.

Pueden utilizarse materiales tanto biocompatibles como biodegradables en el dispositivo según la invención para facilitar la implantación *in vivo*. Asimismo pueden utilizarse recubrimientos biocompatibles y biodegradables. Por ejemplo, pueden utilizarse recubrimientos cerámicos sobre un sustrato metálico. Sin embargo, cualquier tipo de material de recubrimiento y el recubrimiento pueden realizarse en diferentes tipos de materiales: metales, cerámicas, polímeros, hidrogeles o una combinación de cualquiera de dichos materiales. Entre los materiales biocompatibles se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: un óxido, un fosfato, un carbonato, un nitruro o un carbonitruro. Entre los óxidos, los siguientes son posibles ejemplos: óxido de tantalio, óxido de aluminio, óxido de iridio, óxido de circonio u óxido de titanio. En algunos casos, el recubrimiento asimismo puede realizarse en un material biodegradable que se disolverá con el tiempo y será sustituido por el tejido vivo. Los sustratos están realizados en materiales tales como metales, cerámicas, polímeros o una combinación de cualquiera de ellos, metales tales como acero inoxidable, nitinol, titanio, aleaciones de titanio, o aluminio y cerámicas, tales como circonio, alúmina o fosfato de calcio resultan de particular interés.

El material biocompatible a partir del que puede realizarse el dispositivo asimismo puede ser biodegradable, en el aspecto de que se disolverá durante el tiempo y será sustituido por el tejido vivo. Entre dichos materiales biodegradables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, poli(ácido láctico-ácido glicólico), ácido poliláctico, ácido poliglicólico (PGA), colágeno u otras moléculas de la MEC, otras proteínas del tejido conectivo, aleaciones de magnesio, policaprolactona, ácido hialúrico, proteínas adhesivas, polímeros biodegradables, material biocompatible y biodegradable sintético, tal como biopolímeros, biovidrios, biocerámicas, sulfato de calcio, fosfato de calcio, tal como, por ejemplo, monohidrato de fosfato monocálcico, fosfato monocálcico anhidro, deshidrato de fosfato dicálcico, fosfato dicálcico anhidro, fosfato de tetracalcio, fosfato ortofosfato de calcio, pirofosfato de calcio, fosfato de alfa-tricalcio, fosfato de beta-tricalcio, apatito, tal como hidroxiapatito, o polímeros, tales como, por ejemplo, poli(alfa-hidroxi ésteres), poli(orto-éster), poli(ésteres de éter), polianhídridos, poli(fosfacenos), fumaratos de polipropileno, poli(amidas de éster), poli(fumaratos de etileno), poli(aminoácidos), polisacáridos, polipéptidos, poli(butiratos de hidroxilo), poli(valeratos de hidroxilo), poliuretanos, poli(ácido málico), poliláctidos, poliglicólidos, policaprolactonas, poli(carbonatos de glicólido-co-trimetileno), polidioxanonas o copolímeros, terpolímeros de los mismos o mezclas de dichos polímeros, o una combinación de materiales biocompatibles y biodegradables. Asimismo pueden utilizarse composites bioabsorbibles de resistencia ultraelevada y autoreforzados de vidrio biodegradable y de vidrio bioactivo ensamblados a partir de polímeros bioabsorbibles parcialmente cristalinos, tales como poliglicólidos, poliláctidos y/o copolímeros de glicólido/láctido.

Dichos materiales pueden presentar una resistencia inicial comparablemente elevada, un módulo apropiado y un tiempo de retención de la resistencia de 4 semanas hasta 1 año *in vivo*, según la geometría del implante. Asimismo pueden utilizarse elementos de refuerzo, tales como fibras de polímeros cristalinos, fibras de carbono en resinas poliméricas y rellenos particulados, por ejemplo, hidroxiapatito, para proporcionar la estabilidad dimensional y propiedades mecánicas de los dispositivos biodegradables. La utilización de redes interpenetrantes (IPN) en la construcción de materiales biodegradables se ha demostrado que es un medio para mejorar la resistencia mecánica. A fin de mejorar adicionalmente las propiedades mecánicas de los materiales biodegradables reforzados con IPN, el presente dispositivo puede prepararse en forma de redes semiinterpenetrantes (SIPN) de fumarato de polipropileno entrecruzado dentro de una matriz huésped de poli(láctido-co-glicólido) 85:15 (PLGA) o poli(l-láctido-co-d,l-láctido) 70:30 (PLA) utilizando diferentes agentes entrecruzantes. Asimismo pueden utilizarse membranas de copoliéster de poli(hidroxibutirato-co-9% hidroxivalerato) natural. El experto en la materia asimismo podrá seleccionar otros materiales biodegradables adecuados para cualesquiera propósitos específicos y tipos celulares y tisulares según las aplicaciones en que se utilice el dispositivo.

Preferentemente, se ajusta el volumen de por lo menos una cavidad de limitación de por lo menos una cámara de accionamiento para que se corresponda con una flexión predefinida de la membrana de cultivo hacia el interior o desde por lo menos una cámara de cultivo. De esta manera, el volumen puede disponerse particularmente de manera que la flexión predefinida corresponda a una flexión máxima de la membrana de cultivo. Por ejemplo, el volumen de la membrana de cultivo máximamente flexionada puede ser idéntico al volumen de la cavidad de accionamiento. De esta manera, la flexión de la membrana de cultivo puede ser convenientemente independiente de limitación por tipo y material de la membrana de cultivo.

Durante la utilización del dispositivo, la cámara de cultivo puede llenarse total o parcialmente con medio o fluido que es poco compresible en comparación con el medio o fluidos dispuestos en la cámara de acceso y/o en la

cámara de accionamiento. En particular, el medio dispuesto en la cámara de cultivo puede ser esencialmente incompresible en comparación con el medio dispuesto en la cámara de acceso y/o en la cámara de accionamiento. Por ejemplo, el medio dispuesto en la cámara de cultivo puede ser agua o una solución a base de agua o similar, y el medio dispuesto en la cámara de acceso y/o en la cámara de accionamiento puede ser aire o un gas similar al aire.

En otra forma de realización, la cámara de accionamiento puede proporcionarse con una mezcla de por lo menos dos medios, en el que un medio es poco o esencialmente nada compresible en comparación con el medio dispuesto en la cámara de acceso y/o en la cámara de accionamiento, y el otro medio es compresible en comparación con el medio dispuesto en la cámara de acceso y/o en la cámara de accionamiento. En dicha forma de realización, en la que el volumen de la cavidad de limitación es mayor que el volumen encerrado por la membrana de cultivo flexionada al máximo, puede reducirse la flexión de la membrana de cultivo en lugar de detenerse inmediatamente, lo que puede permitir una flexión comparativamente suave.

Preferentemente, la cavidad o cavidades de limitación de la cámara o cámaras de accionamiento se disponen contiguamente a la cámara o cámaras de cultivo. En el presente contexto, el término "contiguo" se refiere a la situación en la cara opuesta de la membrana de accionamiento. De esta manera, la cavidad de limitación puede ser congruente con la cámara de cultivo o puede cubrir parcialmente la cámara de cultivo. De manera similar, puede conseguirse una disposición eficiente compacta del dispositivo.

La cámara o cámaras de accionamiento preferentemente están conectadas con un canal de accionamiento de la flexión. Pueden conectarse adicionalmente con una abertura de accionamiento de la flexión que está conectada con un medio de aplicación de presión para el ajuste de la presión interior a la cavidad o cavidades de limitación de la cámara o cámaras de accionamiento. El medio de aplicación de presión puede ser una bomba o similar. En particular, el canal o canales de accionamiento pueden conectar la abertura de accionamiento de la flexión y la cámara de accionamiento. Dicha disposición del canal de accionamiento permite proporcionar eficientemente un medio regulador de la presión hacia el interior y exterior de la cámara de accionamiento. De esta manera, el canal de accionamiento puede ser particularmente un microcanal. De manera similar, la presión dentro de la cámara de accionamiento puede ajustarse, modificarse y controlarse eficientemente. Con una disposición de la abertura de accionamiento de la flexión con el medio de aplicación de presión, puede conseguirse una puesta en práctica comparativamente simple y eficiente del sistema de accionamiento. De esta manera, el dispositivo preferentemente comprende además un sensor de presión que detecta una presión dentro de la cámara o cámaras de accionamiento. Dicho sensor de presión permite una monitorización y control eficientes de la presión dentro de la cámara de accionamiento y, de esta manera, asimismo la flexión de la membrana de cultivo.

Preferentemente, el dispositivo comprende un canal de perfusión con una entrada, una salida y por lo menos una cámara de cultivo, en la que la entrada, la cámara o cámaras de cultivo y la salida se encuentran conectadas. De esta manera, el canal de perfusión puede ser particularmente un microcanal. Con dicho sistema de fluidos, pueden proporcionarse eficientemente células y nutrientes a la membrana de cultivo de manera que puede conseguirse y soportarse el crecimiento de células sobre la membrana de cultivo. De esta manera, el dispositivo preferentemente comprende además por lo menos dos válvulas para cerrar el canal de perfusión, en el que se disponen por lo menos dos válvulas entre la entrada del canal de perfusión y la cámara de cultivo del canal de perfusión y la otra de por lo menos dos válvulas o microválvulas se dispone entre la cámara de cultivo del canal de perfusión y la salida del canal de perfusión. Con dichas dos válvulas, puede aislarse la cámara de cultivo respecto de la entrada y la salida de manera que no puede escaparse fluido dispuesto en la cámara de cultivo. En otras formas de realización, al no disponer de una salida separada, puede resultar suficiente una única válvula para dicho aislamiento de la cámara de cultivo. En particular, dicho aislamiento de la cámara de cultivo permite una transferencia eficiente de la presión desde la membrana de accionamiento hasta la membrana de cultivo. O en otras palabras, puede evitarse que la flexión de la membrana de accionamiento cause que el medio en la cámara de cultivo fluya en lugar de cambiar su presión para flexionar la membrana de cultivo. Las dos o más válvulas pueden ser válvulas activas o válvulas pasivas.

De esta manera, cada una de las dos o más válvulas preferentemente comprende un canal de accionamiento de válvula, una abertura de válvula y una membrana de válvula que divide el canal de válvula respecto del canal de perfusión. Dicha puesta en práctica de las válvulas permite una puesta en práctica comparativamente simple del accionamiento de ajuste preciso de las válvulas. En particular, el control de las válvulas puede llevarse a cabo por medios iguales o similares a la flexión de la membrana de accionamiento. De esta manera, las membranas de válvula de por lo menos dos válvulas son secciones de la membrana de accionamiento que permiten una puesta en práctica comparativamente compacta del dispositivo en un número de piezas comparativamente bajo. Adicionalmente de esta manera las aberturas de válvula de las dos o más válvulas preferentemente están conectadas con un medio de aplicación de presión para el ajuste de la presión dentro de los canales de accionamiento de válvula de las dos o más válvulas. Además, el dispositivo preferentemente comprende además por lo menos dos sensores de presión de válvula que detectan las presiones dentro de los canales de accionamiento de válvula de las dos o más válvulas. Con dichos sensores de presión, la presión en las válvulas puede controlarse y ajustarse eficientemente.

Preferentemente, la membrana de cultivo se interpone entre la primera parte de cuerpo y la segunda parte de cuerpo y la membrana de accionamiento se interpone entre la segunda parte de cuerpo y la tercera parte de cuerpo. La expresión "interponer" en el presente contexto se refiere a pinzar entre diferentes partes del dispositivo. En particular, puede estar relacionado con el pinzado de las membranas directamente entre la primera, segunda y tercera partes de cuerpo similares a placas. De esta manera puede conseguirse una puesta en práctica comparativamente simple, compacta y eficiente del dispositivo. Alternativa o adicionalmente, la membrana de cultivo puede encolarse, unirse mediante plasma o fijarse de otro modo en el dispositivo.

Preferentemente, la membrana de cultivo por lo menos parcialmente se trata con plasma o se recubre con moléculas de adhesión celular. Dicho tratamiento de plasma puede ser una exposición a plasma de oxígeno o nitrógeno. Dichas moléculas de adhesión celular pueden ser fibronectina, colágeno, laminina o una mezcla de los mismos. La adhesión celular asimismo puede potenciarse mediante funcionalización de superficies de la membrana con moléculas funcionales. El recubrimiento con moléculas de adhesión celular o la funcionalización de la membrana por lo menos puede encontrarse presente en secciones de la membrana de cultivo que limitan la cámara de cultivo. Dicha membrana de cultivo permite un crecimiento eficiente de las células sobre la membrana de manera que puede modelarse el tejido.

Preferentemente, cada una de la primera parte de cuerpo, la segunda parte de cuerpo y la tercera parte de cuerpo es una microplaca realizada en un material biocompatible, tal como, por ejemplo, se indica posteriormente. De esta manera, la cámara o cámaras de acceso preferentemente se forma con un orificio pasante en la primera parte de cuerpo limitada por la membrana de cultivo. Lo anterior permite una puesta en práctica eficiente comparativamente simple de la cámara o cámaras de acceso. De esta manera asimismo, la cámara o cámaras de cultivo preferentemente se forman con un orificio pasante en la segunda parte de cuerpo. El orificio pasante que forma la cámara de cultivo preferentemente presenta forma cónica, en la que puede ensancharse en la dirección de la tercera parte de cuerpo. Lo anterior permite una puesta en práctica eficiente comparativamente simple de la cámara o cámaras de cultivo.

Preferentemente, el dispositivo comprende una fuente de medio conectada con por lo menos una cámara de cultivo, un colector de medio conectado con por lo menos una cámara de cultivo y una estructura de carga adaptada para proporcionar un medio procedente de la fuente de medio al colector de medio a través de por lo menos una cámara de cultivo. De esta manera, la fuente de medio puede ser idéntica al colector de medio, es decir, la fuente de medio y el colector de medio pueden ser una única entidad física. De esta manera, el sistema de perfusión asimismo podría disponerse de manera que la cámara de cultivo y la estructura de carga se implementen en un sistema de microfluidos de recirculación. La estructura de carga puede ser una bomba de medio o similar. Dicha disposición permite una puesta en práctica eficiente de un sistema de perfusión para el crecimiento de células sobre la membrana de cultivo. Con el mismo propósito, el dispositivo puede comprender, adicional o alternativamente, un inyector celular para proporcionar células al interior de por lo menos una cámara de cultivo. Las células pueden proporcionarse en, por ejemplo, por lo menos una cámara de acceso a través del orificio pasante y/o el canal de perfusión.

Preferentemente, el dispositivo comprende una unidad de control adaptada para ajustar y monitorizar las propiedades de funcionamiento del dispositivo. De esta manera, la unidad de control preferentemente se adapta a un flujo de medio a través de dicha por lo menos una cámara de cultivo. La unidad de control preferentemente se adapta adicionalmente para controlar la inyección celular en por lo menos una cámara de cultivo, por ejemplo, mediante el control de la concentración de las células cargadas sobre la membrana o la densidad de las células adherentes o confluyentes cultivadas sobre la membrana. Además, la unidad de control preferentemente se adapta para controlar la presión dentro de por lo menos una cámara de accionamiento. La unidad de control asimismo puede controlar la presión en la válvula o válvulas que aíslan la cámara de cultivo. Dicha unidad de control permite hacer funcionar eficientemente el dispositivo. Puede implementarse particularmente en forma de, o comprendiendo, un ordenador.

Dichos aspectos y otros de la invención resultarán evidentes y se elucidarán haciendo referencia a la forma o las formas de realización descritas a continuación en la presente memoria. El experto ordinario en la materia conocerá que la descripción anterior y posterior es únicamente ilustrativa y no limitativa en modo alguno.

Breve descripción de los dibujos

El dispositivo según la invención se describe con mayor detalle a continuación en la presente memoria mediante formas de realización ejemplificativas y haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: representa un diagrama de flujo de un sistema para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos, que comprende una primera forma de realización de un dispositivo según la invención.

Figura 2A: representa una vista en perspectiva de un dispositivo de órgano bioartificial de una segunda forma de realización de un dispositivo según la invención.

- Figura 2B: representa una vista en perspectiva de despiece del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 2A.
- 5
Figura 2C: representa una vista en planta del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 2A.
- Figura 2D: representa una vista en sección transversal a lo largo de la línea A-A de la vista en planta de la figura 2C.
- 10
Figura 2E: representa el detalle B de la vista de sección transversal de la figura 2D.
- Figura 2F: representa el detalle C de la vista de sección transversal de la figura 2D.
- 15
Figura 2G: representa el detalle B de la vista de sección transversal de la figura 2D en diferentes puntos temporales durante el accionamiento de una membrana de accionamiento o microválvula.
- Figura 2H: representa una vista en planta en detalle del detalle B de la vista de sección transversal de la figura 2D.
- 20
Figura 2J: representa una vista en perspectiva del detalle B de la vista de sección transversal de la figura 2D.
- Figura 2K: representa una vista en planta de una forma de realización modificada de la microválvula de la figura 2D.
- 25
Figura 2L: representa la microválvula de la figura 2K en diferentes puntos temporales durante el bombeo.
- Figura 2M: representa los caudales obtenidos con la microválvula de la figura 2K a diversas frecuencias y presiones de accionamiento.
- 30
Figura 3A: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una tercera forma de realización de un dispositivo según la invención.
- Figura 3B: representa una vista de una sección transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 3A en posición flexionada o accionada.
- 35
Figura 4: representa una vista en planta de un dispositivo de órgano bioartificial de una cuarta forma de realización de un dispositivo según la invención.
- Figura 5A: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una quinta forma de realización de un dispositivo según la invención.
- 40
Figura 5B: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una sexta forma de realización de un dispositivo según la invención que presenta tres cavidades de limitación por cada cámara de accionamiento.
- 45
Figura 6A: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una séptima forma de realización de un dispositivo según la invención con una pluralidad de cámaras de acceso paralelas asociadas a una única cámara de cultivo.
- 50
Figura 6B: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una octava forma de realización de un dispositivo según la invención que presenta una serie de cámaras de cultivo y cámaras de acceso asociadas a un único canal de perfusión.
- Figura 7A: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una novena forma de realización de un dispositivo según la invención que presenta cámaras de accionamiento dispuestas en un cuerpo intermedio.
- 55
Figura 7B: representa una vista de una sección transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 7A en una primera posición flexionada o accionada.
- 60
Figura 7C: representa una vista de una sección transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 7A en una segunda posición flexionada o accionada.
- Figura 8A: representa una vista en perspectiva de un dispositivo para fabricar una membrana de cultivo porosa delgada.
- 65
Figura 8B: representa una vista en perspectiva del dispositivo de la figura 8A durante la carga del mismo.

Figura 8C: representa una vista de una sección transversal a lo largo de la línea A-A de la vista en perspectiva de la figura 8B.

5 Figura 8D: representa una vista en perspectiva de una membrana de cultivo fabricada con el dispositivo de la figura 8A.

Figura 9A: representa una vista en planta de un dispositivo de órgano bioartificial de una décima forma de realización de un dispositivo según la invención.

10 Figura 9B: representa una vista de una sección de transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 9A.

15 Figura 10: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una undécima forma de realización de un dispositivo según la invención con una pluralidad de cámaras de acceso espaciadas verticalmente asociadas a una única cámara de cultivo.

20 Figura 11A: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una duodécima forma de realización de un dispositivo según la invención dispuesta para el crecimiento de células sobre ambas caras de una membrana de cultivo.

Figura 11B: representa una sección de transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 11A, durante el crecimiento de células sobre una cara de la membrana de cultivo.

25 Figura 11C: representa una vista de una sección de transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 11A en reensamblaje.

Figura 11D: representa una sección de transversal del dispositivo de órgano bioartificial de la figura 11A, durante el crecimiento de células sobre una segunda cara de la membrana de cultivo.

30 Figura 11E: representa una vista de una sección transversal de un dispositivo de órgano bioartificial de una decimotercera forma de realización de un dispositivo según la invención dispuesta para el crecimiento de células sobre ambas caras de una membrana de cultivo.

35 Figura 12A: representa una vista en planta de un dispositivo de órgano bioartificial de una decimocuarta forma de realización de un dispositivo según la invención que presenta una cámara de cultivo cerrable.

Figura 12B: representa una vista de una sección transversal a lo largo de la línea A-A de la vista en planta de la figura 12A.

40 Figura 13A: representa una vista en planta de un dispositivo de órgano bioartificial de una decimoquinta forma de realización de un dispositivo según la invención con una microválvula que cierra la cámara de cultivo y equilibra la membrana de cultivo.

45 Figura 13B: representa una vista de una sección transversal a lo largo de la línea A-A de la vista en planta de la figura 13A.

Figura 14: representa los efectos de un esfuerzo mecánico cíclico (lineal 10%) sobre la permeabilidad de una barrera epitelial.

50 Figura 15: representa los efectos de un esfuerzo mecánico cíclico (lineal 10%) sobre la actividad metabólica de células epiteliales alveolares primarias humanas.

Descripción de formas de realización

55 En la descripción a continuación se utilizan determinados términos por conveniencia y no deben interpretarse como limitativos. Los términos “derecha”, “izquierda”, “arriba”, “abajo” y “sobre” se refieren a orientaciones en las figuras. La terminología comprende los términos explícitamente mencionados, así como sus derivados y términos con un significado similar.

60 La figura 1 muestra un diagrama de flujo de un sistema 100 para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos como primera forma de realización del dispositivo según la invención. El sistema 100 presenta un dispositivo de órgano bioartificial 101 con una membrana de cultivo como barrera *in vitro* 102. Comprende además una configuración 106 con una o más CPU 107 de una unidad de control conectada con una o más fuentes de presión 65 108, un inyector de células 109 y una o más bombas 103. La fuente o fuentes de presión 108 y el inyector de células 109 están controlados por una o más CPU 107 y están conectadas con el dispositivo de órgano bioartificial

101. La bomba o bombas 103 están dispuestas entre un reservorio fuente 104 como fuente de medio y el dispositivo de órgano bioartificial 101 que asimismo está conectado con un reservorio de recolección 105 como colector de medio. Mediante la bomba o bombas 103 y la CPU o las CPU 107, puede controlarse el flujo de líquido desde el reservorio fuente 104 hasta el reservorio de recolección 105 mediante el dispositivo de órgano bioartificial 101. Aunque en el sistema se describe únicamente un dispositivo de órgano bioartificial 101, se encuentra contemplado que pueda someterse a ensayo y analizarse en el sistema una pluralidad de barreras *in vitro* 102.

Tal como se exponen con mayor detalle a continuación, el dispositivo de órgano bioartificial 101 incluye dos o más aberturas, que establecen comunicación de los microcanales del dispositivo de órgano bioartificial 101 con componentes externos del sistema 100, tales como los reservorios de líquido 104, 105 y las fuentes de presión 108. En particular, el dispositivo de órgano bioartificial 101 está acoplado con el reservorio fuente 104, que puede contener aire, sangre, agua, células, compuestos, partículas y/o cualquier otro medio que debe administrarse en el dispositivo de órgano bioartificial 101. El reservorio fuente 104 proporciona un líquido a uno o más microcanales del dispositivo de órgano bioartificial 101 y el reservorio de recolección 105 recibe líquido que sale del dispositivo de órgano bioartificial 101. En una forma de realización alternativa, el reservorio fuente 104 como fuente y colector de medio proporciona el líquido al dispositivo de órgano bioartificial 101 y además recibe el líquido que sale del dispositivo de órgano bioartificial 101. De esta manera, resulta posible que fuentes de líquido separadas proporcionen líquidos al dispositivo de órgano bioartificial 101 y/o recolectores separados de líquido acumulen líquidos que salen del dispositivo de órgano bioartificial 101.

En una forma de realización, el líquido que sale del dispositivo de órgano bioartificial 101 puede reutilizarse y reintroducirse en la misma abertura de entrada o en uno diferente al que ha utilizado para entrar anteriormente. Por ejemplo, el dispositivo de órgano bioartificial 101 puede configurarse de manera que el líquido que pasa por un microcanal central particular se recircule de vuelta al dispositivo de órgano bioartificial 101 y nuevamente se hace circular por el mismo microcanal central. Lo anterior podría utilizarse, por ejemplo, para incrementar la concentración de un analito en el líquido a medida que se hace recircular en el dispositivo de órgano bioartificial 101. En otro ejemplo, el dispositivo de órgano bioartificial 101 puede configurarse de manera que el líquido que pasa por el dispositivo de órgano bioartificial 101 y se recircula de vuelta al dispositivo de órgano bioartificial 101 y después se hace circular por el mismo microcanal central. Lo anterior podría utilizarse para modificar la concentración o constitución del líquido a medida que se hace circular por otro microcanal.

La bomba o bombas 103 se utilizan preferentemente para bombear el líquido hacia el interior del dispositivo de órgano bioartificial 101, aunque las bombas en general son opcionales en el sistema 100. Las bombas de fluido son bien conocidas en la técnica y no se exponen en detalle en la presente memoria. Tal como se expone con mayor detalle a continuación, cada parte de microcanal preferentemente se encuentra en comunicación con su abertura respecto de entrada y/o salida, de manera que cada parte de microcanal permitirá el flujo de fluido por la misma.

Cada microcanal en el dispositivo de órgano bioartificial 101 preferentemente presenta aberturas dedicadas de entrada y salida que están conectadas con fuentes de fluido dedicadas respectivas y/o colectores de fluido para permitir el control independiente de caudales, contenido de flujos, presiones, temperaturas y otras características de los medios mediante cada microcanal central. De esta manera, pueden monitorizarse los efectos de diversos estímulos sobre cada una de las capas celulares o de tejidos por separado mediante muestreo de los canales de fluido separados para el marcador celular deseado, tal como cambios en la expresión génica al nivel del ARN o de proteínas.

El inyector celular 109 se encuentra en comunicación con el dispositivo de órgano bioartificial 101, en el que el inyector celular 109 está configurado para inyectar, extraer y/o manipular células, tales como, aunque sin limitarse a ellas, células epiteliales y endoteliales, sobre una o más superficies de la membrana interfacial o barrera *in vitro* 101 dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101 con independencia de las células introducidas en el dispositivo de órgano bioartificial 101 a través de las aberturas de entrada o directamente a través de las aberturas de acceso de la barrera *in vitro*. Por ejemplo, puede cultivarse en un dispositivo separado sangre que contiene partículas magnéticas que tiran de las células patógenas, de manera que la mezcla puede introducirse después en el sistema 100 mediante el inyector celular 109 en un tiempo deseado por el reservorio fuente 104 o directamente sobre la barrera *in vitro* 102. En una forma de realización, el inyector celular 109 está controlado independientemente, aunque puede estar controlado por las CPU 107. El inyector celular 109 es un componente opcional.

Aunque no requerido en todas las formas de realización, puede aplicarse presión a partir de una o más fuentes de presión 108 para crear un diferencial de presión a fin de causar movimientos mecánicos dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101. En una forma de realización en la que se utilizan presiones dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101, la fuente de presión 108 está controlada por las CPU 107 para aplicar un diferencial de presión dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101 para causar eficazmente que una o más membranas o barreras *in vitro* 102 (ver a continuación) dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101 se expandan y/o se contraigan en respuesta al diferencial de presión aplicado. En una forma de realización, la presión aplicada en el dispositivo de órgano bioartificial 101 por la fuente de presión 108 es una presión positiva, dependiendo de la configuración o aplicación del dispositivo de órgano bioartificial 101. Adicional o alternativamente, la presión aplicada en la fuente

de presión 108 es una presión negativa, tal como vacío o fuerza de succión, dependiendo de la configuración o aplicación del dispositivo 101. La fuente de presión 108 está preferentemente controlada por las CPU 107 para aplicar presión en intervalos temporizados o frecuencias prefijadas en el dispositivo de órgano bioartificial 101, de manera que los intervalos de tiempo se fijan para ser uniformes o no uniformes. La fuente de presión 108 puede controlarse para aplicar una presión uniforme en los intervalos de tiempo o puede aplicar presiones diferentes en diferentes intervalos. Por ejemplo, la presión aplicada por la fuente de presión 108 puede presentar una gran magnitud y/o fijarse en una frecuencia deseada para simular que la persona está corriendo o realizando un esfuerzo. La fuente de presión 108 asimismo puede aplicar patrones irregulares lentos, tal como simulando que la persona está durmiendo. En una forma de realización, las CPU 107 operan la fuente de presión 108 para variar aleatoriamente los intervalos de aplicación de presión para causar patrones de estirado cíclicos que simulan la irregularidad de la tasa respiratoria y de los volúmenes tidales durante la respiración natural.

Uno o más sensores pueden acoplarse con el dispositivo de órgano bioartificial 101 para monitorizar una o más zonas dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101, de manera que los sensores proporcionan datos de monitorización a las CPU 107. Un tipo de sensor es preferentemente un sensor de presión que proporciona datos respecto a la cantidad de presión en uno o más microcanales operativos o centrales del dispositivo de órgano bioartificial 101. Los datos de presión de caras opuestas de las paredes del microcanal pueden utilizarse para calcular la información en tiempo real de diferencial de presión entre los microcanales operativos y centrales. Los datos de monitorización son utilizados por las CPU 107 para proporcionar información sobre las condiciones operativas del dispositivo, así como sobre cómo se comportan las células dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101 en ambientes particulares en tiempo real. El sensor puede ser un electrodo, presentar capacidades de infrarrojos, ópticas, tales como, por ejemplo, una cámara o LED, o magnéticas o utilizar cualquier otro tipo apropiado de tecnología para proporcionar los datos de monitorización. Por ejemplo, el sensor puede ser uno o más microelectrodos que analizan características eléctricas a través de la membrana de cultivo o barrera *in vitro* 102, tal como, por ejemplo, la diferencia potencial, la resistencia y la corriente de cortocircuito, para confirmar la formación de una barrera organizada, así como su función de transporte de fluidos/iones a través de la membrana de cultivo o barrera *in vitro* 102. Debe indicarse que el sensor puede ser externo al dispositivo de órgano bioartificial 101 o puede estar integrado dentro del dispositivo de órgano bioartificial 101. Se encuentra contemplado que las CPU 107 controlen el funcionamiento del sensor, aunque ello no resulta necesario.

Lo siguiente se aplica al resto de la presente descripción. En el caso de, en aras de clarificar los dibujos, una figura contenga signos de referencia que no se expliquen en la parte directamente asociada de la descripción, la referencia se encuentra en secciones anteriores de la descripción.

Las figuras 2A y 2B ilustran una vista en perspectiva de un dispositivo de órgano bioartificial 201 de una segunda forma de realización de un dispositivo según la invención en una vista ensamblada y en una vista de despiece. El dispositivo de órgano bioartificial 201 está provisto de cuatro barreras *in vitro* 202 e incluye una pluralidad de aberturas 212 que se describirán con mayor detalle a continuación. El dispositivo de órgano bioartificial 201 está compuesto de diferentes partes de cuerpo, incluyendo un cuerpo inferior 203 como tercera parte de cuerpo, una membrana de accionamiento 204, un cuerpo intermedio 205 como segunda parte de cuerpo, una membrana de cultivo porosa delgada 206 y un cuerpo superior 207 como primera parte de cuerpo. Cada uno del cuerpo inferior 203, cuerpo intermedio 205 y cuerpo superior 207 presenta una forma similar a una placa esencialmente rectangular. Cada una de la membrana de accionamiento 204 y la membrana de cultivo 206 presenta una forma esencialmente rectangular.

El cuerpo inferior 203 incluye dos canales de accionamiento de flexión 210 y cuatro canales de accionamiento de válvula 209 en los que un fluido, preferentemente aire, se dispone para controlar el accionamiento de la flexión de la membrana de accionamiento 204 y de las microválvulas, respectivamente. Cada uno de los canales de accionamiento de flexión 210 conecta con una entrada de flexión 211 con dos cámaras de accionamiento 220, presentando cada una, una cavidad de limitación y conectando cada uno de los canales de accionamiento de válvula 209 con una entrada de válvula 208 con dos cámaras de microválvula 217.

La membrana de accionamiento 204 está configurada para estar montada o interpuesta entre el cuerpo inferior 203 y el cuerpo intermedio 205. Contiene una pluralidad de orificios pasantes 214, es decir dos grupos de tres orificios pasantes, estando dispuesto cada grupo en un extremo longitudinal de la membrana de accionamiento 204. Cada grupo de la pluralidad de orificios pasantes 214 presenta dos orificios de entrada de válvula 274 en posiciones correspondientes a las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203 y un orificio de entrada de accionamiento 284 en posiciones correspondientes a las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203. Los orificios pasantes 214 permite el acceso del fluido a los canales de accionamiento de flexión 210 y los canales de accionamiento de válvula 209 situados en el cuerpo inferior 203.

El cuerpo intermedio 205 incluye cuatro canales de perfusión 215 que se extienden longitudinalmente a lo largo del cuerpo intermedio 205. Además, el cuerpo intermedio 205 está provisto de orificios pasantes de entrada de válvula 265 en posiciones correspondientes a las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203 y con los orificios pasantes de accionamiento 265 en posiciones correspondientes a las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203. Cada uno de los canales de perfusión 215 conecta una entrada de perfusión 275 con una cámara de cultivo

221 y una salida de perfusión 285. Cada una de las cuatro cámaras de cultivo 221 se proporciona en forma de un orificio pasante cónico en el cuerpo intermedio 205 que se ensancha en la dirección de la membrana de accionamiento 204.

5 La membrana de cultivo 206 está configurada para estar montada o interpuesta entre el cuerpo intermedio 205 y el cuerpo superior 207. Contiene una pluralidad de orificios pasantes 264 en posiciones correspondientes a las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203 en posiciones correspondientes a las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203, en posiciones correspondientes a las entradas de perfusión 275 del cuerpo intermedio 205 y en posiciones correspondientes a las salidas de perfusión 285 del cuerpo intermedio 205.

10 El cuerpo superior 207 comprende cuatro cámaras de acceso 213, formada cada una por un orificio pasante. Las cámaras de acceso 213 están situadas en correspondencia con la localización de las cámaras de cultivo 221 del cuerpo intermedio 205. El cuerpo superior incluye además una pluralidad de orificios pasantes 216 que comprenden orificios de entrada de perfusión 266 en posiciones correspondientes a las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203, orificios de salida de perfusión 276 en posiciones correspondientes a las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203, orificios de entrada de válvula 286 en posiciones correspondientes a las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203 y orificios de entrada de accionamiento 296 en posiciones correspondientes a las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203. Además, el cuerpo superior está provisto de cuatro orificios pasantes de acceso de barrera *in vitro* 213 como cámaras de acceso para acceder a las barreras o membrana de cultivo *in vitro* 206.

25 El cuerpo inferior 203 puede estar realizado en un material no flexible, aunque se encuentra contemplado que esté realizado alternativamente en un material flexible. El cuerpo inferior 203, el cuerpo intermedio 205 y el cuerpo superior 207 están preferentemente realizados en un polímero biocompatible esencialmente no flexible, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, un copolímero de olefina cíclica, poliestireno o cualquier otro material elastomérico o termoplástico, u otros materiales, tales como vidrio, silicio, plástico blando o duro, y similares. Sin embargo, asimismo pueden estar realizados en material blando, y pueden ser diferentes entre sí. Se encuentra contemplado que la membrana de cultivo porosa delgada 206 esté realizada en un material que sea diferente del material de los cuerpos 203, 205, 207. La membrana de cultivo 206 está preferentemente realizada en un material esencialmente flexible, tal como polidimetilsiloxano o cualquier otro material flexible o no flexible, tal como poliimida, parileno o similar. La membrana de accionamiento 204 preferentemente está realizada en un material esencialmente flexible, tal como goma de silicona, preferentemente polidimetilsiloxano o poliimida, parileno o cualquier otro material flexible.

35 Durante el funcionamiento, los canales de accionamiento de válvula 209 y los canales de accionamiento de flexión 210 del cuerpo inferior 203 se llenan con un fluido, preferentemente aire, para controlar la flexión de la membrana de accionamiento 204 y de las microválvulas de cierre. De esta manera, el fluido se proporciona a los canales de accionamiento de válvula 209 a través de unas aberturas de válvula formadas por los orificios de entrada de válvula 286 del cuerpo superior 207, los orificios pasantes correspondientes 264 de la membrana de cultivo 206, los orificios de entrada de válvula 265 del cuerpo intermedio 205, los orificios de entrada de válvula 274 de la membrana de accionamiento 204 y las entradas de válvula 208 del cuerpo inferior 203. Además, el fluido se proporciona a los canales de accionamiento de flexión 210 a través de unas aberturas de flexión formadas por los orificios de entrada de accionamiento 296 del cuerpo superior 207, los orificios pasantes correspondientes 264 de la membrana de cultivo 206, los orificios de entrada de accionamiento 295 del cuerpo intermedio 205, los orificios de entrada de accionamiento 284 de la membrana de accionamiento 204 y las entradas de flexión 211 del cuerpo inferior 203.

50 Además, los canales de perfusión 215 del cuerpo intermedio 205 se llenan con un fluido comparativamente incompresible, tal como agua o una solución a base de agua. De esta manera, el líquido comparativamente incompresible se proporciona a los canales de perfusión 215 a través de unas aberturas de entrada de perfusión formadas por los orificios de entrada de perfusión 266 del cuerpo superior 207, los orificios pasantes correspondientes 264 de la membrana de cultivo 206 y las entrada de perfusión 275 del cuerpo intermedio 205 y saliendo de los canales de perfusión 215 a través de unas aberturas de salida de perfusión formadas por los orificios de salida de perfusión 276 del cuerpo superior 207, los orificios pasantes correspondientes 264 de la membrana de cultivo 206 y las salidas de perfusión 285 del cuerpo intermedio 205.

60 La figura 2C muestra una vista superior del dispositivo de órgano bioartificial 201, en el que algunos elementos del dispositivo de órgano bioartificial 201 que no son visibles sobre la superficie se indican con líneas de puntos. De esta manera, se ilustra que las secciones de la membrana de cultivo 206 que son accesibles a través de las cámaras de acceso 213 forman las cuatro barreras *in vitro* 202. Tal como puede observarse en la vista de una sección transversal de la figura 2D, en cada una de las barreras *in vitro* 202, la membrana de cultivo 206 separa la cámara de cultivo cónica 221 del cuerpo intermedio 205 respecto de la cámara de acceso 213 del cuerpo superior 207. La cámara de cultivo 221 está conectada con la entrada de perfusión izquierda 275 y con la salida de perfusión derecha 285 mediante el canal de perfusión 215. Además, en proximidad a cada una de las barreras *in vitro* 202, se dispone una válvula de accionamiento 219 que comprende una de las cámaras de accionamiento 220 del cuerpo inferior 203 y su sección contigua de la membrana de accionamiento 204.

En particular, considerando las vistas detalladas de las figuras 2E, figura 2H y figura 2J, puede observarse que, en el cuerpo intermediario 205, el canal de perfusión 215 pasa al interior de la entrada de perfusión 275 y de la salida de perfusión 285 a través de las cámaras de microválvula 217. De esta manera, cada una de las cámaras de microválvula 217 del cuerpo intermedio 205 está separada de uno de los canales de accionamiento de válvula 209 del cuerpo inferior 203 por la membrana de accionamiento 204. De manera similar, cada una de las cámaras de microválvula 217, junto con su sección contigua de la membrana de accionamiento 204 y canal de accionamiento de válvula 209 forma una microválvula.

En la figura 2G, la microválvula descrita anteriormente en la presente memoria se muestra en diferentes puntos temporales durante el accionamiento. De esta manera, en el punto temporal t_1 , la membrana de accionamiento 204 no ha sido accionada y el canal de perfusión 215 se encuentra en una posición completamente abierta. En el punto temporal t_2 , la membrana de accionamiento 204 ha sido parcialmente accionada y el canal de perfusión 215 se encuentra parcialmente cerrado a la cámara de microválvula 217. En el punto temporal t_3 , la membrana de accionamiento 204 se acciona crecientemente y el canal de perfusión 215 se cierra crecientemente a la cámara de microválvula 217 análogamente al accionamiento de la membrana de accionamiento 204. En el punto temporal t_4 , la membrana de accionamiento 204 ha sido completamente accionada y el canal de perfusión 215 se encuentra en una posición completamente cerrada.

En particular, considerando la vista detallada de la figura 2F, puede observarse que la cámara de cultivo 221 del cuerpo intermedio 205 está separada o dividida hacia arriba respecto de la cámara de acceso 213 del cuerpo superior 207 por la membrana de cultivo 206. Además, la cámara de cultivo 221 está separada hacia abajo respecto de la cámara de accionamiento 220 del cuerpo inferior 203 por la membrana de accionamiento 204, en la que la cámara de accionamiento 220 o su cavidad de limitación está situada en contigüidad, aunque descentrada respecto a la cámara de cultivo 221.

Al aplicar una fuerza de succión o vacío en el canal de accionamiento 210 a través de una de las aberturas de flexión, incluyendo una de las entradas de flexión 211, la membrana de accionamiento 204 se encuentra flexionada negativamente o hacia abajo en la cámara de accionamiento 220 como resultado de la reducción de la presión en la cámara de accionamiento 220. En el caso de que las válvulas de accionamiento 219 se encuentren flexionadas, la presión del fluido, preferentemente medio fisiológico, sangre, suero sanguíneo, aceite o aire, contenido en las cámaras de cultivo 221 y en los canales de perfusión 215, se reduce e induce una flexión de la barrera *in vitro* 202 o de la membrana de cultivo 206, respectivamente. Para evitar fugas del fluido contenido en las cámaras de cultivo 221 y en los canales de perfusión 215, las microválvulas se accionan neumáticamente siempre que las válvulas de accionamiento se encuentren en uso. Como resultado, las microválvulas bloquean los canales de perfusión 215 en ambas caras.

En una forma de realización, la membrana de cultivo porosa delgada 206 se trata con un plasma de oxígeno, un plasma rico en nitrógeno o un plasma similar que favorece la adhesión de las células, o se recubre con una solución que contiene moléculas de adhesión, tales como fibronectina, colágeno, laminina o cualesquiera otras moléculas, o una mezcla de dichas moléculas, que favorecen la adhesión de las células a la membrana de cultivo 206. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la aplicación de dichas moléculas a través de la cámara de acceso de barrera *in vitro* 213 y/o a través de una de las aberturas de perfusión y los canales de perfusión 215. A continuación, se introducen células, por ejemplo células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, células madre mesenquimales o cualesquiera otras células, en el canal de perfusión 215 a través de una de las aberturas de perfusión hasta alcanzar la cámara de cultivo 221. El dispositivo de órgano bioartificial 201 a continuación se incuba y se gira 180° para dejar que las células se adhieran a la membrana de cultivo 206. Una vez las células son adherentes, el dispositivo de órgano bioartificial 201 se gira nuevamente a su posición original y las células, por ejemplo nuevamente células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, células madre mesenquimales, o cualesquiera otras células, se introducen sobre las barreras *in vitro* 202 a través de las cámaras de acceso 213. Una vez se han adherido las células, la membrana de cultivo celular 206 o la barrera *in vitro* 202, respectivamente, pueden estirarse mecánicamente mediante la aplicación de una presión cíclica en la entrada de flexión 211 a través de la abertura de flexión.

El diseño tridimensional de la microválvula mostrada en detalle anteriormente permite limitar el volumen de medio que se empuja por el canal de perfusión 215 en la dirección de la membrana de cultivo 206. De esta manera, la membrana de cultivo 206 puede flexionarse con precisión en un grado predefinido y de una manera predefinida. Es uno de los objetivos de la microválvula, nivelar la membrana de cultivo 206 en cualquier condición de esfuerzo y en cualquier punto temporal deseado. Lo anterior permite predefinir la flexión de la membrana de cultivo 206 y controlar con precisión el esfuerzo predefinido deseado de la membrana de cultivo 206. El nivelado de la membrana de cultivo 206 puede llevarse a cabo a intervalos de tiempo regulares o irregulares, para reconfigurar el nivel predefinido de esfuerzo o para definir un nuevo nivel de esfuerzo. El nivelado de la membrana de cultivo 206 puede resultar necesario, por ejemplo, en el caso de pequeñas fugas o evaporación a través de la membrana de cultivo 206 y/o a través de una barrera *in vitro*. Lo anterior puede tener lugar, por ejemplo, en el caso de que los poros de la membrana de cultivo 206 sean comparativamente grandes y/o en el caso de que la integridad de la barrera *in vitro* resulte dañada tras una tensión mecánica, química o biofísica o una combinación de las mismas. La necesidad de un nivelado de la membrana de cultivo asimismo puede ocurrir en el caso de que una parte o la totalidad del

medio de cultivo se muestree parcial o totalmente para análisis posteriores.

Puede utilizarse una o varias microválvulas pasivas o una o varias microválvulas activas, o una combinación de las mismas, para nivelar la membrana de cultivo 206 en cualquier condición predefinida de esfuerzo. Las microválvulas activas pueden ser válvulas normalmente cerradas o normalmente abiertas.

El nivelado de la membrana de cultivo 206 en un nivel de esfuerzo predefinido puede llevarse a cabo fácilmente mediante la creación de una diferencia de presión hidrostática entre la entrada de perfusión 275 y/o la salida de perfusión 285 y/o la cámara de acceso 213 mediante la adición o extracción de medio de cultivo celular o solución similar para el cultivo celular. El esfuerzo predefinido asimismo puede crearse mediante la aplicación de una presión positiva o negativa en la entrada de perfusión 275 y/o salida de perfusión 285 y/o en la cámara de acceso 213 o una combinación de las mismas. El esfuerzo predefinido asimismo puede definirse mediante modificación de la presión en una o varias cámaras de accionamiento. Además, el nivelado puede conseguirse mediante bombeo del medio de cultivo celular o cualquier fluido de entrada o salida de la cámara de cultivo 221, por ejemplo, utilizando un sistema integrado de bombeo, tal como se muestra posteriormente.

En una forma de realización preferida, el nivel predefinido de esfuerzo de la membrana de cultivo 206 es próximo a cero y se consigue mediante una combinación de diferencia de presión hidrostática entre la entrada de perfusión 275, la salida de perfusión 285 y la cámara de acceso 213, las tensiones residuales de la membrana de accionamiento 204 y de la membrana de cultivo 206, y el cierre de la microválvula normalmente cerrada, o una combinación de los mismos. En lugar de una microválvula normalmente cerrada, asimismo podría utilizarse una microválvula normalmente abierta.

En la figura 2K, se muestra una variación de una microválvula como alternativa a la microválvula anteriormente en la presente memoria, que puede realizarse en el mismo dispositivo de órgano bioartificial 201 mostrado anteriormente en la presente memoria. En comparación con la microválvula descrita en detalle anteriormente en la presente memoria, la microválvula de la figura 2K presenta una cámara de microválvula asimétrica 217i. En particular, la cámara de microválvula 217i presenta en la vista superior de la figura 2K la forma de una gota, en la que el extremo delgado de la gota pasa por encima al interior del canal de perfusión 215 y al extremo ancho de la gota al que está conectado la entrada de perfusión 275.

La figura 2L muestra la microválvula con la cámara de microválvula asimétrica 217i durante el bombeo de un medio. De esta manera, en el punto temporal t_1 , la membrana de accionamiento 204 no ha sido accionada y el canal de perfusión 215 se encuentra en una posición completamente abierta. En el punto temporal t_2 , la membrana de accionamiento 204 se ha accionado parcialmente y el medio se dirige hacia el interior del canal de perfusión 215, así como en la dirección de la entrada de perfusión 275. En el punto temporal t_3 , la membrana de accionamiento 204 se acciona adicionalmente y se cierra la conexión con la entrada de perfusión 275. En el punto temporal t_4 , la membrana de accionamiento 204 se acciona crecientemente y el medio se dirige hacia el interior del canal de perfusión 215 únicamente. No se lleva a cabo ningún bombeo en la dirección de la entrada de perfusión. En el punto temporal t_5 , la membrana de accionamiento 204 ha sido totalmente accionada y se lleva a cabo el bombeo final de medio hacia el interior del canal de perfusión 215.

Tal como se muestra en la figura 2M, en cada accionamiento (cierre y/o apertura) de la microválvula, se fuerza la entrada o salida de un flujo de la solución o medio contenido en la cámara de microválvula 217i respecto de la cámara de cultivo 221 por el canal de perfusión 215 y hacia el interior o exterior de la entrada de perfusión 275. El flujo que se fuerza hacia el interior o exterior de la cámara de cultivo 221 debería minimizarse a fin de no afectar al esfuerzo predefinido de la membrana de cultivo 206. Un posible diseño de la microválvula para conseguir dicho objetivo es la minimización del tamaño de la cavidad de la microválvula, a fin de minimizar el volumen desplazado al cerrar o abrir la microválvula. Una desventaja de dicha solución puede ser la presión comparativamente elevada necesaria para accionar la membrana comparativamente pequeña 204 y los problemas asociados, tales como la adhesión de la membrana de accionamiento 204 a la cámara de microválvula 217i debido a la presión elevada que puede requerir recubrimientos antiadhesión especiales. Para evitar dicho problema, puede reducirse la sección transversal del canal de perfusión 215 a fin de incrementar la resistencia hidráulica del canal de perfusión 215 y reducir de esta manera el caudal según la ley de Poiseuille.

Otra posibilidad es diseñar la cámara de microválvula 217i de manera que el flujo bidireccional generado por el cierre de la microválvula 3002 sea asimétrico y preferentemente fluya en la dirección de la entrada de perfusión 275 y no del canal de perfusión 215 y la cámara de cultivo 221. Lo anterior puede conseguir cerrando en primer lugar la entrada de perfusión respecto de la cámara de microválvula 217, manteniendo simultáneamente abierta la salida al canal de perfusión 215. Lo anterior se lleva a cabo, por ejemplo, utilizando una geometría tridimensional de la cámara de microválvula 217i tal como se explica. La válvula tridimensional presenta un diámetro del orden milimétrico que permite una rápida flexión de la membrana de accionamiento 204. En el punto temporal t_2 , la membrana de accionamiento 204 contacta con el cuerpo intermedio 205, que presenta una protuberancia inferior, correspondiente a la entrada del canal de perfusión 215. Lo anterior bloquea inmediatamente el flujo en dirección a la membrana de cultivo 206. Aunque la presión en el canal de accionamiento 209 continúa elevándose, la membrana de accionamiento 204 se flexiona adicionalmente. La ventaja de dicho sistema es que no requiere una

gran presión, ya que las dimensiones de la microválvula pueden ser de tamaño milimétrico. Además, puede garantizarse un cierre hermético del canal de perfusión. Dichas microválvulas tridimensionales pueden producirse fácilmente mediante la utilización de tecnologías de impresión 3D, así como estereolitografía, fotolitografía, molienda estándar, laminado, moldeo por inyección, estampación en caliente o una combinación de los mismos.

5 En una forma de realización, se encuentra contemplada la utilización de una válvula asimétrica para llevar a cabo el nivelado de la membrana de cultivo 206 a fin de limitar el flujo empujado hacia el interior del canal de perfusión en la dirección de la membrana de cultivo.

10 En otra forma de realización, se encuentra contemplada la utilización de la válvula asimétrica a modo de bomba. En marcado contraste con las bombas peristálticas actuales, la mayoría de las cuales utiliza cavidades de válvula para bombear fluido, la microválvula asimétrica sólo requiere una cavidad para bombear fluido. Lo anterior representa una gran simplificación y ventaja, ya que la configuración se simplifica con un canal de accionamiento por bomba. El caudal de fluido bombeado puede regularse a partir de la geometría, respectivamente el tamaño de la cavidad de la bomba, la frecuencia de accionamiento aplicada, así como la magnitud de la fuerza aplicada para flexionar la membrana. La membrana puede flexionarse utilizando diferentes principios de accionamiento, por ejemplo, magnéticos, neumáticos (preferentes), eléctricos o utilizando una aleación con memoria de forma. La bomba podría utilizarse para transportar medio de cultivo celular, factores de crecimiento, fármacos, xenobióticos u otras sustancias en la cámara de cultivo. Asimismo se encuentra contemplada la creación de un sistema de perfusión recirculante.

20 En una forma de realización preferida, la válvula asimétrica está constituida por una cavidad de microválvula que contiene una pared inclinada, sobre la que se flexiona la membrana de accionamiento. Se crea una pequeña entrada del canal de perfusión en la pared inclinada para limitar el flujo inducido por el accionamiento de la microválvula de empuje o extracción de entrada o salida de la cámara de cultivo 221.

25 Las figuras 3A y 3B muestran vistas de un dispositivo de órgano bioartificial 2010 de una tercera forma de realización de un dispositivo según la invención. En general, el dispositivo de órgano bioartificial 2010 se realiza de manera esencialmente idéntica como el dispositivo de órgano bioartificial 201 indicado anteriormente. El dispositivo de órgano bioartificial 2010 comprende un cuerpo inferior 2030 como tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión 2100, canales de accionamiento de válvula, cámaras de microválvula 2170 y cámaras de accionamiento 220 con cavidades de limitación. En la parte superior del cuerpo inferior 2030 un cuerpo intermedio 2050 con canales de perfusión 2150 y cámaras de cultivo 2210 se dispone como segunda parte de cuerpo, en la que, entre el cuerpo inferior 2030 y el cuerpo intermedio 2050 se interpone una membrana de accionamiento 2040. En la parte superior del cuerpo intermedio 2050, se dispone un cuerpo superior 2070 con cámaras de acceso 2130 como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2050 y el cuerpo superior 2070, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2060. Las secciones de la membrana de cultivo 2060 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2130 del cuerpo superior 2070 forman barreras *in vitro* 2020.

30 La figura 3A ilustra esquemáticamente el mecanismo responsable del estirado mecánico de la barrera *in vitro* 2020. Una vez el fluido, preferentemente el medio de cultivo celular, llena la cámara de cultivo 2210 y un fluido, preferentemente aire, llena los canales de accionamiento 2100, se induce una presión positiva en las cámaras de microválvula 2170 a través de los canales de accionamiento de válvula, causando que las membranas de accionamiento 2040 se flexionen positivamente o hacia arriba. De esta manera, los canales de perfusión 2150 se cierran en ambas caras de las cámaras de cultivo 2210.

35 Tal como se muestra en la figura 3B, una presión negativa en las cámaras de accionamiento 2200 a continuación flexiona negativamente o hacia abajo las membranas de accionamiento 2040 hacia el interior de la cavidad de limitación de la cámara de accionamiento 2200, induciendo la flexión positiva de la barrera *in vitro* 2020 en una dirección z- o hacia abajo. En una forma de realización preferida, el volumen de la cavidad de limitación es idéntico al volumen desplazado de la barrera *in vitro* 2020, de manera que la flexión máxima w_{max} de la barrera *in vitro* 2020 está limitada por la cavidad de limitación. La tensión en la barrera *in vitro* 2020, de esta manera, resulta muy bien controlada y se mantiene constante, con independencia de las propiedades mecánicas de la membrana de accionamiento 2040 y de la membrana de cultivo 2060.

40 En referencia a las figuras 3A y 3B, asimismo se encuentra contemplada la utilización de microválvulas pasivas, microválvulas accionadas por fuerzas magnéticas o microválvulas accionadas magnéticamente o una combinación de las mismas, para cerrar los canales de perfusión 2150. Las microválvulas accionadas pueden diseñarse en un modo normalmente cerrado o normalmente abierto. Asimismo se encuentra contemplada la utilización del dispositivo de órgano bioartificial 2010 sin microválvulas, mediante un ligero incremento del volumen de la cámara de accionamiento 220 con el fin de compensar el volumen de fluido transportado en los canales de perfusión 2150 en cada ciclo de accionamiento.

65 La figura 4 muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2019 de una cuarta forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2019 está dispuesto principalmente de manera similar al

dispositivo de órgano bioartificial 201 y el dispositivo de órgano bioartificial 2010 descrito anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2039 como una tercera parte de cuerpo con cinco pares de canales de accionamiento de flexión 2109 conectados con cinco entradas de flexión 2189 en una cara y con diez cámaras de accionamiento 229 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2039 un cuerpo intermedio 2059 con doce canales de perfusión 2159 conectadas con doce entradas de perfusión 2189, se disponen doce cámaras de cultivo y doce salidas de perfusión 2179 como segunda parte de cuerpo, en la que, entre el cuerpo inferior 2039 y el cuerpo intermedio 2059 se interpone una membrana de accionamiento 2049. En la parte superior del cuerpo intermedio 2059, se dispone un cuerpo superior 2079 con doce cámaras de acceso 2139 como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2050 y el cuerpo superior 2070, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2069. Las secciones de la membrana de cultivo 2069 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2139 del cuerpo superior 2079 forman doce barreras *in vitro* 2029.

Cada una de las diez cámaras de accionamiento 229 está asociada a una de las doce cámaras de cultivo. Las cámaras de accionamiento 229 presentan cavidades de limitación con volúmenes variables. De esta manera, los volúmenes de las diferentes cavidades de limitación 2219, 2229, 2239, 2249, 2259 de las cámaras de accionamiento 229 corresponden a un valor de esfuerzo lineal específico proporcionado en porcentaje del esfuerzo que tiene lugar en la barrera *in vitro* 2029. Se muestra en una vista de una sección transversal en la línea A-A cavidades de limitación que son cero y que no inducen ningún esfuerzo (esfuerzo 0%). Las dos cámaras de accionamiento 229 mostradas en una vista de una sección transversal a lo largo de las líneas B-B presentan cavidades de limitación 2219 que generan 5% de esfuerzo. Las dos cámaras de accionamiento 229 mostradas en una vista de una sección transversal a lo largo de las líneas C-C presentan cavidades de limitación 2229 que generan 10% de esfuerzo. Las dos cámaras de accionamiento 229 mostradas en una vista de una sección transversal a lo largo de las líneas D-D presentan cavidades de limitación 2239 que generan 15% de esfuerzo. Las dos cámaras de accionamiento 229 mostradas en una vista de una sección transversal a lo largo de las líneas E-E presentan cavidades de limitación 2249 que generan 20% de esfuerzo. Las dos cámaras de accionamiento 229 mostradas en una vista de una sección transversal a lo largo de las líneas F-F presentan cavidades de limitación 2259 que generan 25% de esfuerzo.

De esta manera, dicha posible forma de realización del dispositivo de órgano bioartificial 2019 permite diferentes esfuerzos lineales de las barreras *in vitro* 2029 en un único dispositivo de órgano bioartificial 2019. Debe indicarse que pueden darse cualesquiera valores contenidos dentro de los esfuerzos proporcionados anteriormente. El esfuerzo preferido es de 10%, aunque puede encontrarse comprendido entre 0% y 30%. Los esfuerzos positivos asimismo resultan posibles tal como se indica con mayor detalle a continuación.

La figura 5A muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2018 de una quinta forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2018 está dispuesto principalmente de manera similar al dispositivo de órgano bioartificial 201, el dispositivo de órgano bioartificial 2010 y el dispositivo de órgano bioartificial 2019 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2038 como una tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2208 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2038, un cuerpo intermedio 2058 con canales de perfusión 2158 conectados con entradas de perfusión 21518, se disponen cámaras de cultivo 2218 y salidas de perfusión 21528 como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2038 y el cuerpo intermedio 2058 se interpone una membrana de accionamiento 2048. En la parte superior del cuerpo intermedio 2058, se dispone un cuerpo superior 2078 con orificios de entrada de perfusión 21618, cámaras de acceso 2138 y orificios de salida de perfusión 21628, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2058 y el cuerpo superior 2078, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2068. Las secciones de la membrana de cultivo 2068 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2138 del cuerpo superior 2078 forman barreras *in vitro* 2028. Cada una de las cámaras de accionamiento del cuerpo inferior 2038 del dispositivo de órgano bioartificial está provisto de dos cavidades de limitación 2208 con una superficie inferior redondeada. El diámetro de las cavidades de limitación 2208 puede encontrarse, por ejemplo, entre 300 micrómetros y 10 milímetros, y preferentemente es de 3.5 milímetros. Las cavidades de limitación 2208 pueden, por ejemplo, despresurizarse individualmente, para crear 0% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2028 mediante la no despresurización de las cavidades de limitación 2208, o por ejemplo, 5% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2028 mediante la despresurización de una de las cavidades de limitación 2208 de manera que la membrana de accionamiento 2048 resulta completamente flexionada en una de las cavidades de limitación 2208, mientras que la otra cavidad de limitación 2208 se mantiene a presión atmosférica, o 10% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2028 mediante despresurización de ambas cavidades de limitación 2208.

La figura 5B muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2017 de una sexta forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2017 es generalmente idéntico al dispositivo de órgano bioartificial 2018 descrito anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2037 como una tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2207 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2037, un cuerpo intermedio 2057 con canales de perfusión 2157 conectados con entradas de perfusión 21517, se disponen cámaras de cultivo 2217 y salidas de perfusión 21527 como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2037 y el cuerpo intermedio 2057 se interpone una membrana de accionamiento 2047. En la parte superior del cuerpo intermedio

2057, se dispone un cuerpo superior 2077 con orificios de entrada de perfusión 21617, cámaras de acceso 2137 y orificios de salida de perfusión 21627, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2057 y el cuerpo superior 2077, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2067. Las secciones de la membrana de cultivo 2067 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2137 del cuerpo superior 2077 forman barreras *in vitro* 2027. Cada una de las cámaras de accionamiento del cuerpo inferior 2037 del dispositivo de órgano bioartificial está provista de tres cavidades de limitación 2207 con una superficie inferior redondeada. El diámetro de las cavidades de limitación 2207 puede encontrarse, por ejemplo, entre 300 micrómetros y 10 milímetros, y preferentemente es de 3.5 milímetros. Las cavidades de limitación 2207 pueden, por ejemplo, despresurizarse individualmente, para crear 0% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2027 mediante la no despresurización de las cavidades de limitación 2207, o por ejemplo, 5% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2027 mediante la despresurización de una de las cavidades de limitación 2207, de manera que la membrana de accionamiento 2047 resulta completamente flexionada en una de las cavidades de limitación 2207, mientras que las otras cavidades de limitación 2207 se mantienen a presión atmosférica, o 10% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2027 mediante despresurización de dos cavidades de limitación 2207, de manera que la membrana de accionamiento 2047 resulta completamente flexionada en dos de las cavidades de limitación 2207, mientras que la otra cavidad de limitación 2207 se mantiene a presión atmosférica, o 15% de esfuerzo en la barrera *in vitro* 2027 mediante despresurización de la totalidad de las tres cavidades de limitación 2207.

Tal como resultará evidente para el experto en la materia, puede incrementarse el número de cavidades de limitación de manera que el volumen de las cavidades de accionamiento pueda diseñarse y fabricarse para que puedan inducirse valores específicos de esfuerzo en la barrera *in vitro* respectiva. La forma de las cavidades de limitación puede ser semiesférica con un semirradio vertical preferentemente de entre 100 micrómetros y 5 milímetros, con una profundidad preferente de aproximadamente 549 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 5%; de aproximadamente 668 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 10%; de aproximadamente 753 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 15%; de aproximadamente 823 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 20%; de aproximadamente 884 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 25% y de aproximadamente 939 micrómetros para un esfuerzo de aproximadamente 30%. Alternativamente, las cavidades de limitación pueden ser rectangulares. Se encuentra contemplado que la cavidad de accionamiento asimismo pueda adoptar otras formas, tales como formas semicirculares, forma elipsoidal, forma cuadrática o forma triangular.

El diámetro de las barreras *in vitro* de todas las formas de realización de dispositivos de órgano bioartificial descritos en la presente memoria puede encontrarse comprendido en un intervalo de entre aproximadamente 100 micrómetros y aproximadamente 10 milímetros, y preferentemente se encuentra comprendido entre 1 y 5 milímetros. En las formas de realización mostradas, las barreras *in vitro* presentan diámetros circulares, aunque se encuentra contemplado que presenten superficies elípticas, cuadráticas o rectangulares, o similares.

En la figura 6A se muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2016 de una séptima forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2016 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 2010, 2019, 2018, 2019 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2036 como una tercera parte de cuerpo con cámaras de microválvula 2176, así como canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2206 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2036, un cuerpo intermedio 2056 con canales de perfusión 2156 conectados con entradas de perfusión, se disponen cámaras de cultivo 2216 y salidas de perfusión como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2036 y el cuerpo intermedio 2056 se interpone una membrana de accionamiento 2046. En la parte superior del cuerpo intermedio 2056, se dispone un cuerpo superior 2076 con orificios de entrada de perfusión, cámaras de acceso 2136 y orificios de salida de perfusión, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2056 y el cuerpo superior 2076, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2066. Las secciones de la membrana de cultivo 2066 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2136 del cuerpo superior 2076 forman barreras *in vitro* 2026. Cada cámara de cultivo 2216 está asociada a tres cámaras de acceso 2136 y, de esta manera, a tres barreras *in vitro* 2026. Además, cada cámara de accionamiento 2206 está asociada a una cámara de cultivo 2216.

El objetivo de disponer de una pluralidad de barreras *in vitro* 2026 en cada cámara de cultivo 2216 en el dispositivo de órgano bioartificial 2016 es incrementar la superficie global de la barrera *in vitro* 2026. En la presente forma de realización, un grupo de barreras *in vitro* 2026 se estira simultáneamente utilizando una única válvula de accionamiento con una cámara de accionamiento 2206. En dicha configuración, la presión se distribuye homogéneamente en la cámara de cultivo celular 2216, permitiendo que las barreras *in vitro* 2026 se flexionen simultáneamente, presentando las microválvulas las cámaras de válvula 217, manteniendo la cámara de cultivo 2216 cerrada.

La figura 6B muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2015 de una octava forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2015 está dispuesto principalmente como los dispositivos de órgano bioartificial 201, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2035 como una tercera parte de cuerpo con cámaras de microválvula 2175, así como canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2205 en la cara

opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2035, un cuerpo intermedio 2055 con canales de perfusión 2155, cada uno de los cuales está conectado con entradas de perfusión, se disponen tres cámaras de cultivo 2215 y salidas de perfusión como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2035 y el cuerpo intermedio 2055 se interpone una membrana de accionamiento 2045. En la parte superior del cuerpo intermedio 2055, se dispone un cuerpo superior 2075 con orificios de entrada de perfusión, cámaras de acceso 2135 y orificios de salida de perfusión, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2055 y el cuerpo superior 2075, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2065. Las secciones de la membrana de cultivo 2065 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2135 del cuerpo superior 2075 forman barreras *in vitro* 2025. Cada cámara de cultivo de perfusión 2215 está asociada a una cámara de accionamiento 2045 y a una cámara de válvula 2175.

De esta manera, el dispositivo de órgano bioartificial 2015 está provisto de grupos de tres barreras *in vitro* 2025 que se accionan individualmente, cada una de las cuales presenta una válvula de accionamiento o cámara de accionamiento 2205 dedicada, respectivamente. En la presente forma de realización, las cámaras de microválvula 217 están situadas entre las barreras *in vitro* 2025 de un grupo de manera que cada cámara de cultivo celular 2215 pueda cerrarse individualmente.

Las figuras 7A, 7B y 7C muestran un dispositivo de órgano bioartificial 2014 de una novena forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2014 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016 y 2015 descritos anteriormente. El dispositivo de órgano bioartificial 2014 comprende un cuerpo inferior 304 como cuarta parte de cuerpo sobre el que se dispone un cuerpo intermedio 2054. El cuerpo intermedio 2054 presenta una segunda parte de cuerpo del dispositivo de órgano bioartificial 2014 con canales de perfusión 2154, cada uno de los cuales conecta una entrada de perfusión 2184 con una cámara de cultivo 2214 y una salida de perfusión 2194. El cuerpo intermedio 2054 además presenta una tercera parte de cuerpo del dispositivo de órgano bioartificial 2014 que comprende partes terminales de canales de flexión 2104 cada uno de los cuales pasa por encima hacia el interior de una cámara de accionamiento 2204 con una cavidad de limitación. La cámara de accionamiento 2204 de la tercera parte de cuerpo está situada contiguamente al canal de perfusión 2154 de la segunda parte de cuerpo entre la entrada de perfusión 2184 y la cámara de cultivo 2214. La cámara de accionamiento 2204 se separa del canal de perfusión 2154 mediante una membrana de accionamiento 2044. En la parte superior del cuerpo intermedio 2054, se dispone un cuerpo superior 2074 con orificios de entrada de perfusión 2084, cámaras de acceso 2134, secciones de los canales de flexión 2104 y orificios de salida de perfusión, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2054 y el cuerpo superior 2074, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2064. Las secciones de la membrana de cultivo 2064 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2134 del cuerpo superior 2074 forman barreras *in vitro* 2024.

De esta manera, en el dispositivo de órgano bioartificial 2014, la cámara de accionamiento 2204 se dispone en la tercera parte de cuerpo situada en el cuerpo intermedio 2054. La membrana de accionamiento 2044 se flexiona mediante el canal de flexión 2104. Tal como se ilustra en la figura 7B, la membrana de accionamiento 2044 puede flexionarse hacia arriba o negativamente mediante una presión negativa en el canal de flexión 2104. Lo anterior causa que la barrera *in vitro* respectiva 2024 se flexione hacia abajo o hacia el interior de la cámara de cultivo 2214. Además, tal como se ilustra en la figura 7C, mediante la aplicación de una presión positiva en el canal de flexión 2104, la membrana de accionamiento 2044 puede flexionarse hacia abajo o positivamente. Lo anterior causa que la barrera *in vitro* respectiva 2024 se flexione hacia arriba o hacia el interior de la cámara de acceso 2134. De esta manera, la barrera *in vitro* 2024 puede tensarse eficientemente, positivamente, negativamente o tanto positiva como negativamente.

En las figuras 8A, 8B, 8C y 8D, se muestra una fabricación de una membrana de cultivo porosa delgada 206x tal como puede implementarse en cualquiera de las formas de realización de los dispositivos de órgano bioartificial descritos anteriormente. La membrana de cultivo 206x puede realizarse en un material con una pluralidad de poros 801, en el que las moléculas, células, fluido o cualquier otro medio puede pasar a través de la membrana de cultivo porosa delgada 206x a través de uno o más poros 801. Tal como se expone posteriormente con mayor detalle, la membrana de cultivo porosa delgada 206x está realizada en un material que permite someterla a tensión y/o esfuerzo en respuesta a diferenciales de presión presentes entre la cámara de cultivo celular y la presión circundante al dispositivo de órgano bioartificial. El grosor de la membrana de cultivo porosa delgada 206x es de entre aproximadamente 20 nanómetros y aproximadamente 20 micrómetros, preferentemente de entre aproximadamente 200 nanómetros y aproximadamente 5 micrómetros. El tamaño de los poros 801 es de entre aproximadamente 0,4 micrómetros y aproximadamente 12 micrómetros y preferentemente es de aproximadamente 3 micrómetros. La densidad de los poros es de entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 100.000.000 poros/cm² y preferentemente es de aproximadamente 800.000 poros/cm². Asimismo se encuentra contemplado que la barrera *in vitro* esté provista de una membrana no porosa.

Las figuras 8A, 8B y 8C muestran el procedimiento esquemático de fabricación de la membrana de cultivo porosa delgada 206x con posibles geometrías de los orificios de membrana 801. Un molde 802 con una matriz de micropilares 803 se cubre con un sustrato de cobertura 804. Se introduce pasivamente un fluido no polimerizado 805 mediante fuerzas capilares o se presiona forzosamente hacia el interior del espacio vacío creado entre el

molde 802, el sustrato de cobertura 804 y la matriz de micropilares 803 (ver la figura 8B). La figura 8C ilustra la sección transversal del ensamblaje de molde 802 y sustrato de cobertura 804 con los espacios llenos con el fluido no polimerizado 805. La altura de los micropilares 803 define la densidad del fluido no polimerizado 805. Mediante el curado del fluido no polimerizado 805 para una temperatura y tiempo prefijados se produce la membrana de cultivo delgada 206x que presenta una matriz de poros 801 (figura 8D). En una forma de realización, el molde 802 puede fabricarse mediante el grabado en húmedo o en seco de silicio, dióxido de silicio, nitruro de silicio o similar.

Las figuras 9A y 9B muestran un dispositivo de órgano bioartificial 901 de una décima forma de realización de un dispositivo según la invención en una vista en planta y en una vista de una sección transversal. En el dispositivo de órgano bioartificial 901, la barrera *in vitro* 9202 puede perfundirse en ambas caras. Se conecta un canal de perfusión 904 con la cara superior de la barrera *in vitro* 9202 mediante las aberturas de acceso de barrera *in vitro* y un canal de perfusión 902 a su cara inferior. La figura 9B ilustra una vista detallada de la sección transversal del dispositivo de órgano bioartificial 901 en la presente posible forma de realización. Se encuentra contemplado que se conecten varios canales de perfusión 904 con la barrera *in vitro* 9202.

En la figura 10 se muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2013 de una undécima forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2013 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016, 2015 y 2014 descritos anteriormente. El dispositivo de órgano bioartificial 2013 comprende un cuerpo inferior 2033 como tercera parte de cuerpo con cámaras de accionamiento 2203. En la parte superior del cuerpo inferior 2033, un cuerpo intermedio 2053 con canales de perfusión 2153, cada uno de los cuales está conectado con una entrada de perfusión, se dispone una cámara de cultivo 2213 y una salida de perfusión, en la que, entre el cuerpo inferior 2033 y el cuerpo intermedio 2053 se interpone una membrana de accionamiento 2043. En la parte superior del cuerpo intermedio 2053, se disponen tres cuerpos superiores 2073, cada uno de ellos con una cámara de acceso 2133, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2053 y los cuerpos superiores 2073, así como entre los cuerpos superiores 2073, se interponen membranas de cultivo delgadas porosa o no porosas 2063. Las secciones de las membranas de cultivo 2063 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2133 del cuerpo superior 2073 formando barreras *in vitro* 2023. Cada uno del cuerpo superior 2073 entre el cuerpo intermedio 205 y el siguiente cuerpo superior 2073, así como el cuerpo superior 2073 entre los dos otros cuerpos superiores 2073 está provisto de un canal de entrada 20713 de cámara de acceso y un canal de salida 20723 de cámara de acceso para proporcionar un medio a y desde la cámara de acceso respectiva 2133.

Las figuras 11A, 11B, 11C y 11D muestran un dispositivo de órgano bioartificial 2012 de una duodécima forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2012 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 901, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016, 2015, 2014 y 2013 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2032 como una tercera parte de cuerpo con microválvulas que presenta cámaras de microválvula 2172, así como canales de accionamiento de flexión 2102 conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2202 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2032, se monta una membrana de accionamiento 2042 que cubre el cuerpo inferior 2032. El dispositivo de órgano bioartificial 2012 comprende además un cuerpo intermedio 2052 con canales de perfusión 2152 conectados con entradas de perfusión 21512, cámaras de cultivo 2212 y salidas de perfusión 21522 como segunda parte de cuerpo. En la parte superior del cuerpo intermedio 2052, se dispone un cuerpo superior 2072 con orificios de entrada de perfusión, cámaras de acceso 2132 y orificios de salida de perfusión, como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2052 y el cuerpo superior 2072, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2062. Las secciones de la membrana de cultivo 2062 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2132 del cuerpo superior 2072 forman barreras *in vitro* 2022. El dispositivo de órgano bioartificial 2012 se adapta de manera que el cuerpo inferior 2032 y la membrana de accionamiento 2042 puedan extraerse como parte inferior a partir del cuerpo intermedio 2052, la membrana de cultivo 2062 y el cuerpo superior 2072 como parte superior.

Durante la utilización, tal como se muestra en la figura 11B, el cuerpo intermedio 2052, la membrana de cultivo 2062 y el cuerpo superior 2072 se voltean en 180° y se vierte un medio de cultivo 7022 en la cámara de cultivo 2212. De esta manera, el medio de cultivo 7022 que contiene células y/o otros agregados celulares en suspensión, se carga en la parte trasera de la membrana de cultivo 2062 y crecen células 7012 y forman una barrera *in vitro* 2022. De esta manera, se cargan las células 7012 sobre la cara trasera de la membrana de cultivo 2062 con el dispositivo de órgano bioartificial 2012 con la cara superior orientada hacia abajo. Tal como se muestra en la figura 11C, una vez las células se han adherido a la membrana de cultivo 2062, el cuerpo intermedio 2052, la membrana de cultivo 2062 y el cuerpo superior 2072 se voltean hacia abajo y se ensambla con el cuerpo inferior 2032 y la membrana de accionamiento 2042. Ambas partes pueden ensamblarse utilizando una sujeción utilizando fuerzas mecánicas, eléctricas o magnéticas, o una combinación de las mismas. El medio de cultivo 7022 a continuación se exprime entre los dos cuerpos y es guiado por los canales de perfusión 2152. Tal como se muestra en la figura 11D, una vez ensamblado, pueden cargarse células adicionales 7042 proporcionadas en un medio de cultivo 7032 y cultivarse sobre la cara superior de la membrana de cultivo 2062 dentro de la cámara de acceso 2132. Tal como se ha indicado anteriormente, las microválvulas se cierran antes de activar el accionamiento de la membrana de cultivo 2062. El fluido resulta atrapado entre las partes de cuerpo y la cámara de cultivo 2132 que presenta un volumen que es suficientemente grande para que la célula sobreviva durante por lo menos el periodo del ensayo.

Típicamente, el volumen de la cámara de cultivo 2212 es aproximadamente 50 microlitros, aunque puede comprimirse a un volumen de entre aproximadamente 0,5 microlitros y aproximadamente 500 microlitros. El exceso de fluido se dirige hacia una cámara de exceso de fluido en la que rebosa. Se encuentra contemplado que el dispositivo de órgano bioartificial 2012 pueda abrirse y cerrarse nuevamente para repetir el procedimiento indicado anteriormente, a fin de cargar tipos celulares, moléculas y nanopartículas adicionales.

En la figura 11E se muestra un dispositivo de órgano bioartificial 4000 de una decimotercera forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 4000 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 901, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016, 2015, 2014, 2013, 2012 y 2011 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2031i como una tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2201i en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2031i, un cuerpo intermedio 2051i con canales de perfusión 2151i conectados con las cámaras de cultivo 2211i se dispone como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2031i y el cuerpo intermedio 2051i se interpone una membrana de accionamiento 2041i. En la parte superior del cuerpo intermedio 2050, se dispone un cuerpo superior 2070 con cámaras de acceso 2130 como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2050 y el cuerpo superior 2070, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2060. Las secciones de la membrana de cultivo 2061i situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2131i del cuerpo superior 2071i forman barreras *in vitro* 2021i. En la presente forma de realización, los canales de perfusión 2151i son cavidades en el cuerpo intermedio 2051i que están cerradas una vez se ha ensamblado el cuerpo superior 2071i con el cuerpo intermedio 2051i. El ensamblaje entre el cuerpo superior 2071i al que se ha unido la membrana de cultivo 2061i es reversible. Puede utilizarse para cargar una o varias gotas de medio de cultivo celular con células suspendidas, antes del ensamblaje.

La unión reversible se utiliza para cargar células en el dispositivo de órgano bioartificial o para muestrear sobrenadante celular para análisis posteriores o para observar las células sobre la membrana de cultivo o para añadir medio de cultivo celular u otras sustancias. Para la puesta en práctica de la unión reversible, una o dos partes de cuerpo del dispositivo de órgano bioartificial necesitan dotarse de una o varias cavidades que una vez ensambladas con la segunda parte de cuerpo permiten la creación de una cámara de cultivo celular.

Otras partes de cuerpo del dispositivo de órgano bioartificial pueden unirse reversiblemente con el mismo propósito u otros propósitos. Se contempla que la parte de cuerpo superior pueda ensamblarse reversiblemente con la parte de cuerpo intermedio.

El sistema de unión reversible permite además crear microválvulas utilizando partes de cuerpo que pueden ensamblarse reversiblemente, limpiarse y tratarse sus superficies para convertirlas en hidrófilas e hidrófobas.

En una forma de realización, se aplica una gota de medio de cultivo con células en suspensión sobre el cuerpo inferior 2032i. A continuación, el cuerpo superior se une inmediatamente al cuerpo inferior mediante unos métodos explicados anteriormente y se voltea en 180° para permitir que las células se adhieran a la membrana de cultivo 2062i. Una vez las células son adherentes, el dispositivo de órgano bioartificial se voltea nuevamente y las células se cultivan en la parte superior de la membrana de cultivo.

En una forma de realización, se aplica una gota de medio de cultivo sin células en suspensión sobre la parte superior del cuerpo inferior 2032i. A continuación, el cuerpo superior se une inmediatamente al cuerpo inferior mediante métodos explicados anteriormente y se añaden células en la parte superior de la membrana de cultivo. Dicha forma de realización resultaría suficiente para estudiar células únicamente sobre la parte superior de la membrana de cultivo 2062i.

En la figura 12A y en la figura 12B, se muestra un dispositivo de órgano bioartificial 2011 de una decimocuarta forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 2011 está dispuesto principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 901, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016, 2015, 2014, 2013 y 2012 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2031 como una tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2201 en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2031 un cuerpo intermedio 2051 con canales de perfusión 2151 conectados con cámaras de cultivo 2211 se dispone como segunda parte de cuerpo, en la que, entre el cuerpo inferior 2031 y el cuerpo intermedio 2051 se interpone una membrana de accionamiento 2041. En la parte superior del cuerpo intermedio 2051, se dispone un cuerpo superior 2071 con cámaras de acceso 2131 como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2051 y el cuerpo superior 2070, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2061. Las secciones de la membrana de cultivo 2061 situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2131 del cuerpo superior 2071 forman barreras *in vitro* 2021. El dispositivo de órgano bioartificial 2011 está provisto de medios para cerrar la cámara de cultivo 2211. Tal como se muestra en la figura 12, la cámara de cultivo 2211 se cierra una vez las células se han sembrado en la cara inferior de la membrana de cultivo 2061.

En la figura 13A y en la figura 13B, se muestra un dispositivo de órgano bioartificial 4001 de una decimoquinta forma de realización de un dispositivo según la invención. El dispositivo de órgano bioartificial 4001 está dispuesto

principalmente de manera similar a los dispositivos de órgano bioartificial 201, 901, 2010, 2019, 2018, 2017, 2016, 2015, 2014, 2013, 2012 y 2011 descritos anteriormente. Comprende un cuerpo inferior 2031ii como una tercera parte de cuerpo con canales de accionamiento de flexión conectados con entradas de flexión en una cara y con cámaras de accionamiento 2201ii en la cara opuesta. En la parte superior del cuerpo inferior 2031ii, un cuerpo intermedio 2051ii con canales de perfusión 2151ii conectados con las cámaras de cultivo 2211ii se dispone como segunda parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo inferior 2031ii y el cuerpo intermedio 2051ii se interpone una membrana de accionamiento 2041ii. En la parte superior del cuerpo intermedio 2051ii, se dispone un cuerpo superior 2071ii con cámaras de acceso 2131ii como primera parte de cuerpo, en el que, entre el cuerpo intermedio 2051ii y el cuerpo superior 2071ii, se interpone una membrana de cultivo porosa delgada 2061ii. Las secciones de la membrana de cultivo 2061ii situadas dentro o bajo las cámaras de acceso 2131ii del cuerpo superior 2071ii forman barreras *in vitro* 2021ii. En la presente forma de realización, el dispositivo de órgano bioartificial 4001 está provisto de una microválvula normalmente cerrada 3002ii para cerrar la cámara de cultivo 2211ii. Dicha microválvula 3002ii permite calibrar la membrana porosa delgada 2021ii, mediante el equilibrado de las presiones en ambas caras de la membrana porosa delgada 2021ii. En efecto, tras cerrar la cámara de cultivo 2211ii, la membrana porosa delgada 2021ii puede hincharse ligeramente debido al exceso de medio de cultivo contenido en la gota colgante. Antes de cerrar la cámara de cultivo 2211ii, la membrana de accionamiento 2041ii se flexiona mediante la aplicación de una presión negativa en el canal de accionamiento 3001ii. Una vez la parte intermedia 2051ii que incluye la membrana porosa delgada 2021ii se ha alineado y unido a la parte inferior 2031ii, se corta la presión negativa en el canal de accionamiento 3001ii, liberando la membrana de accionamiento 2041ii y cerrando la microválvula 3002ii. El diseño de la microválvula 3002ii se concibe para que un mínimo de medio de cultivo entre en el canal de perfusión 2151ii y la cámara de cultivo al cerrarse la microválvula 3002ii.

La figura 14 ilustra los efectos de un esfuerzo mecánico cíclico fisiológico (10% lineal) sobre la permeabilidad de la barrera epitelial. Las células epiteliales bronquiales pulmonares (16HBEo-) se sembraron a una densidad de 250.000 células/cm² sobre la membrana de cultivo recubierta con fibronectina. Se dejó que las células se adhiriesen y creciesen durante 72 h. Las células se expusieron a un esfuerzo cíclico (lineal 10%, 0.2 Hz) durante 19 h, mientras que el control se mantuvo bajo condiciones estáticas. Se midió la permeabilidad celular utilizando dos moléculas: FITC-sodio y RITC-dextrano. Tras 2 h de incubación, se midió la permeabilidad de cada molécula con un lector de multiplacas de fluorescencia (Tecan Infinite M1000; Exc.:460/Em.:515 & Exc.:553/Em.:627). Los resultados muestran que las células que habían sido estiradas durante 19 h presentaban una permeabilidad transmembranaria significativamente incrementada para la molécula pequeña (FITC-sodio) en comparación con las células de control bajo condiciones estáticas. En contraste, no se observaron diferencias significativas de permeabilidad para la molécula grande (RITC-dextrano) entre una capa de células epiteliales que habían sido estiradas y unas que no. La importancia del esfuerzo mecánico cíclico sobre la permeabilidad de la barrera de aire-sangre resulta claramente demostrada en dicho experimento clínicamente relevante que puede predecir el tipo de moléculas que entran en el torrente sanguíneo por la vía de inhalación.

La figura 15 ilustra los efectos de un esfuerzo mecánico cíclico fisiológico sobre la actividad metabólica de una capa confluyente de células epiteliales alveolares humanas primarias. En el presente experimento, se sembraron células epiteliales alveolares humanas primarias a una densidad de 400.000 células/cm² sobre la membrana de accionamiento recubierta con gelatina/colágeno-1. Se dejó que las células se adhiriesen y creciesen durante 48 h. Las células se expusieron a un esfuerzo cíclico (lineal 10%, 0.2 Hz) durante 48 h, mientras que el control se mantuvo bajo condiciones estáticas durante el mismo periodo de tiempo. Se midió la vitalidad y proliferación celulares utilizando el ensayo de AlamarBlue no tóxico (Invitrogen) 1 h antes de aplicar el estirado cíclico y 23 h y 47 h después de iniciar el estirado de las células. Durante la incubación de 1 h, todas las células se mantuvieron bajo condiciones estáticas. Tras la incubación, se midió la forma reducida de AlamarBlue con un lector multiplaca de fluorescencia (Tecan Infinite M1000; Exc.: 570/Em.: 585). Los resultados muestran que las células que habían sido estiradas durante 48 h presentaban una actividad metabólica significativamente incrementada en comparación con las células de control que no habían sido sometidas a estimulación mecánica.

Con las formas de realización de dispositivos mostrados en la presente exposición, se pretende describir y producir un sistema de pulmón-sobre-chip de alto rendimiento compatible con estaciones estándares de pipeteado robótico utilizadas en la industria farmacéutica (procedimiento de identificación de fármacos). Los sistemas de microfluidos son en general muy adecuados para dicha puesta en práctica. Sin embargo, uno de los retos de los sistemas de barrera *in vitro* como el descrito es el cultivo de las células en el fondo de la membrana de cultivo. Lo anterior requiere voltear la plataforma a fin de permitir que las células se adhieran a la membrana (de lo contrario, sedimentarían en el fondo del sistema). En lugar de utilizar un canal de microfluidos para cargar las células en el sistema y voltearlo una vez se han introducido las células, resulta preferente voltear la placa en primer lugar y añadir una gota medio con células en suspensión sobre la membrana de cultivo y dejar que se adhieran. En contraste con la siembra de células mediante un canal, en el que se adhieren células, dicha solución presenta la importante ventaja de que el número de células sembrado sobre la membrana es bien conocido. A continuación, se cierra el sistema (sin burbujas de aire) y se utiliza en un modo perfundido o en un modo no perfundido.

Con las formas de realización de dispositivos mostrados en la presente exposición se pretende describir y producir un sistema de pulmón-sobre-chip de alto rendimiento compatible con sistemas de exposición para estudios *in vitro* de gases, mezclas complejas, fibras y nanopartículas para estudiar los efectos de las sustancias transportadas por

el aire. Dichos sistemas permiten reproducir la exposición de las vías respiratorias pulmonares a todos los tipos de partículas que se inhalan. Por lo tanto, se contempla exponer las células (primarias y/o líneas celulares, por ejemplo, del tracto respiratorio) cultivadas sobre dicho dispositivo para dirigir el contacto entre células y componentes de la atmósfera de ensayo en la interfaz aire-líquido o a la solución en la que se cultivan las células. Las aplicaciones de dichos sistemas son la investigación de la toxicidad y funcionalidad de los fármacos (por ejemplo, fármacos respiratorios) o la toxicidad de diversas sustancias procedentes de procesos de combustión (escape), cosméticos, productos químicos domésticos, productos químicos industriales, pesticidas, insecticidas, otros farmacéuticos, humo de tabaco y asimismo podría utilizarse para llevar a cabo análisis de aire interior y exterior.

En un sistema no perfundido, al ser cerrado (solución fisiológica estática) debe haber suficientes nutrientes para las células para sobrevivir durante el tiempo del ensayo. La parte inferior puede estar constituida por una cavidad situada en torno a la membrana de cultivo que contendrá el medio una vez ensamblado. Además, se implementa un sistema para permitir que el exceso de solución fluya hacia el exterior de la cámara de cultivo de manera que no pueda haber burbujas de aire contenidas en el sistema. Se contemplan dos soluciones; la primera está realizada de una válvula; la segunda, sin válvula. En ambos casos, necesita garantizarse que la membrana de cultivo no se flexione al cerrar el sistema. La cámara de cultivo constituida por la cavidad cerrada por la parte de cuerpo puede presentar un volumen de aproximadamente 50 μl y puede presentar en el intervalo de aproximadamente 10 μl a aproximadamente 200 μl . En un sistema perfundido, el volumen de la cavidad no necesita ser tan grande y puede reducirse a unos pocos microlitros.

Para cerrar el sistema, permanentemente o no permanentemente, pueden contemplarse varias soluciones. La posibilidad de desensamblar el sistema puede permitir el análisis adicional de las células (lisis, RP-PCR o similar). En una forma de realización, una sujeción mantiene juntas las dos partes de cuerpo con una fuerza mecánica generada por un muelle, o un medio de unión, tal como tornillos o similares. Asimismo podría contemplarse que las dos partes se ensamblen utilizando pernos específicos en las partes superior o inferior que se engancharían en la otra parte.

Además, en las reivindicaciones, la expresión “que comprende” no excluye otros elementos o etapas, y el artículo indefinido “un” o “una no excluye una pluralidad. Una única unidad o etapa puede satisfacer las funciones de varias características recitadas en las reivindicaciones. El mero hecho de que determinadas medidas se enumeren en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que una combinación de dichas medidas no pueda utilizarse ventajosamente. Los términos “esencialmente” y “aproximadamente” y similares en relación a un atributo o un valor particularmente asimismo definen exactamente el atributo o exactamente el valor, respectivamente. El término “aproximadamente” en el contexto de un valor o intervalo numérico dado se refiere a un valor o intervalo que se encuentra, por ejemplo, dentro de 20%, dentro de 10%, dentro de 5% o dentro de 2% del valor o intervalo dado. Cualesquiera signos de referencia en las reivindicaciones no deberían interpretarse como limitativos del alcance.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) para el modelado *in vitro* de tejidos *in vivo* de órganos, que comprende:

una primera parte de cuerpo (207; 2070; 2071; 2072; 2073; 2074; 2075 2076; 2077; 2078; 2079) con por lo menos una cámara de acceso (213; 2130; 2131; 2132; 2133; 2134; 2135; 2136; 2137; 2138; 2139),

una segunda parte de cuerpo (205; 2050; 2051; 2052; 2053; 2054; 2055; 2056; 2057; 2058; 2059) con por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219), y

una membrana de cultivo (206; 2060; 2061; 2062; 2063; 2064; 2065; 2066; 2067; 2068; 2069) que divide la por lo menos una cámara de acceso (213; 2130; 2131; 2132; 2133; 2134; 2135; 2136; 2137; 2138; 2139) de la cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219),

caracterizado por que comprende además

una tercera parte de cuerpo (203; 2030; 2031; 2032; 2033; 2054; 2035; 2036; 2037; 2038; 2039) con por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209) que presenta por lo menos una cavidad de limitación, y

una membrana de accionamiento (204; 2040; 2041; 2042; 2043; 2044; 2045; 2046; 2047; 2048; 2049) que divide la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219) de la por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209), de manera que

la membrana de cultivo (206; 2060; 2061; 2062; 2063; 2064; 2065; 2066; 2067; 2068; 2069) es flexionable ajustando una presión en la cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209).

2. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según la reivindicación 1, en el que un volumen de la por lo menos una cavidad de limitación de la por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209) se ajusta para corresponder a una flexión predefinida de la membrana de cultivo (206; 2060; 2061; 2062; 2063; 2064; 2065; 2066; 2067; 2068; 2069) en o desde la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219).

3. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según la reivindicación 1 o 2, en el que la por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209) está conectada a un canal de accionamiento de flexión (210; 903; 2100; 2101; 2102; 2109).

4. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209) está conectada a una abertura de accionamiento de flexión que está conectada a unos medios de aplicación de presión (108) para ajustar la presión dentro de la por lo menos una cavidad de limitación de la por lo menos una cámara de accionamiento (220; 2200; 2201; 2202; 2203; 2204; 2205; 2206; 2207; 2208; 2209).

5. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159) que presenta una entrada (275; 2184; 21512; 21517; 21518; 21519), una salida (285; 2194; 21522; 21527; 21528; 21529) y la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219), en el que la entrada (275; 2184; 21512; 21517; 21518; 21519), la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219) y la salida (285; 2194; 21522; 21527; 21528; 21529) están conectadas.

6. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según la reivindicación 5, que comprende por lo menos dos válvulas para cerrar el canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159), en el que una de las por lo menos dos válvulas está dispuesta entre la entrada (275; 2184; 21512; 21517; 21518; 21519) del canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159) y la cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219) del canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159) y la otra de las por lo menos dos válvulas está dispuesta entre la cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219) del canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159).

2159) y la salida (285; 2194; 21522; 21527; 21528; 21529) del canal de perfusión (215; 2150; 2151; 2152; 2153; 2154; 2155; 2156; 2157; 2158; 2159).

5 7. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la membrana de cultivo (206; 2060; 2061; 2062; 2063; 2064; 2065; 2066; 2067; 2068; 2069) se interpone entre la primera parte de cuerpo (207; 2070; 2071; 2072; 2073; 2074; 2075 2076; 2077; 2078; 2079) y la segunda parte de cuerpo (205; 2050; 2051; 2052; 2053; 2054; 2055; 2056; 2057; 2058; 2059) y la membrana de accionamiento (204; 2040; 2041; 2042; 2043; 2044; 2045; 2046; 2047; 2048; 2049) se interpone entre la segunda parte de cuerpo (205; 2050; 2051; 2052; 2053; 2054; 2055; 2056; 2057; 2058; 2059) y la tercera parte de cuerpo (203; 2030; 2031; 2032; 2033; 2054; 2035; 2036; 2037; 2038; 2039).

15 8. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la membrana de cultivo (206; 2060; 2061; 2062; 2063; 2064; 2065; 2066; 2067; 2068; 2069) se trata por lo menos parcialmente con plasma o se recubre con moléculas de adhesión celular.

20 9. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada una de la primera parte de cuerpo (207; 2070; 2071; 2072; 2073; 2074; 2075 2076; 2077; 2078; 2079), la segunda parte de cuerpo (205; 2050; 2051; 2052; 2053; 2054; 2055; 2056; 2057; 2058; 2059) y la tercera parte de cuerpo (203; 2030; 2031; 2032; 2033; 2054; 2035; 2036; 2037; 2038; 2039) es una microplaca realizada en un material biocompatible.

25 10. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la por lo menos una cámara de acceso (213; 2130; 2131; 2132; 2133; 2134; 2135; 2136; 2137; 2138; 2139) está formada por un orificio pasante en la primera parte de cuerpo (207; 2070; 2071; 2072; 2073; 2074; 2075 2076; 2077; 2078; 2079) limitada por la membrana de cultivo.

30 11. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una fuente de medio (104) conectada a la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219), un colector de medio (104; 105) conectado a la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219) y una estructura de carga adaptada para proporcionar un medio a partir de la fuente de medio (104) al colector de medio (104; 105) a través de dicha por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219).

35 12. Dispositivo según la reivindicación 11, en el que la fuente de medio (104) y el colector de medio (104; 105) es una entidad física única.

40 13. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un inyector de células para proporcionar células en la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219).

45 14. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una unidad de control adaptada para ajustar y monitorizar las propiedades de funcionamiento del dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019).

50 15. Dispositivo (100; 201; 901; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019) según la reivindicación 14, en el que la unidad de control está adaptada para controlar la inyección de células en la por lo menos una cámara de cultivo (221; 2210; 2211; 2212; 2213; 2214; 2215; 2216; 2217; 2218; 2219).

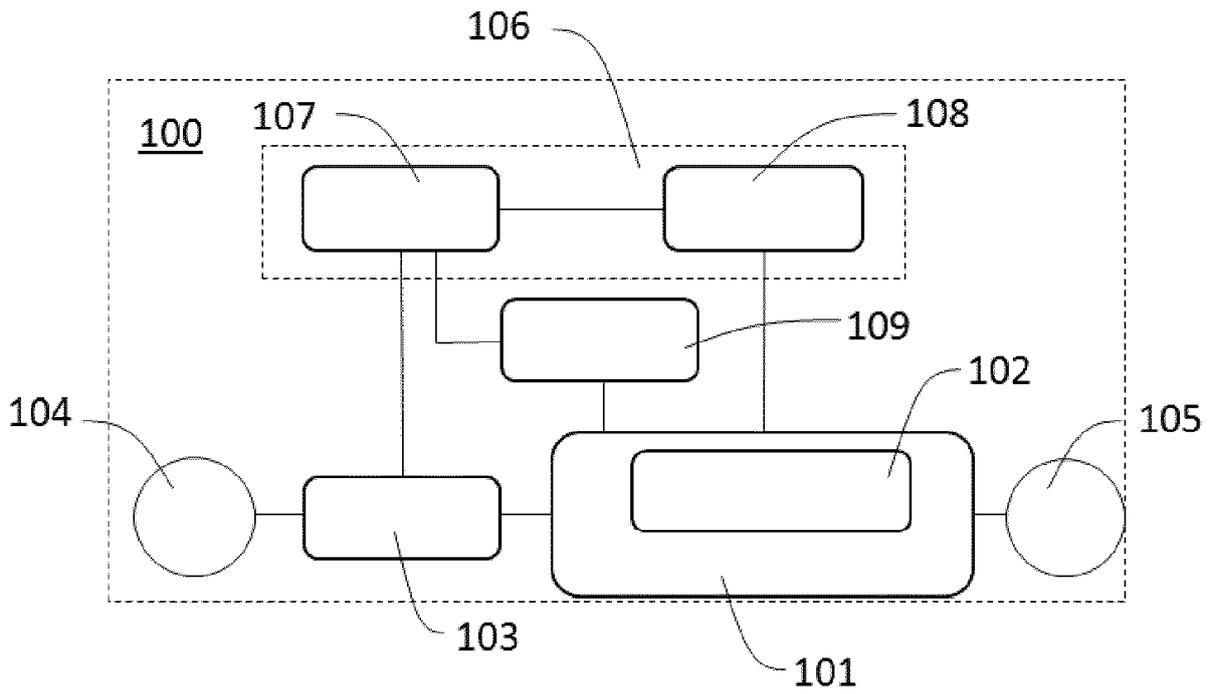


Fig. 1

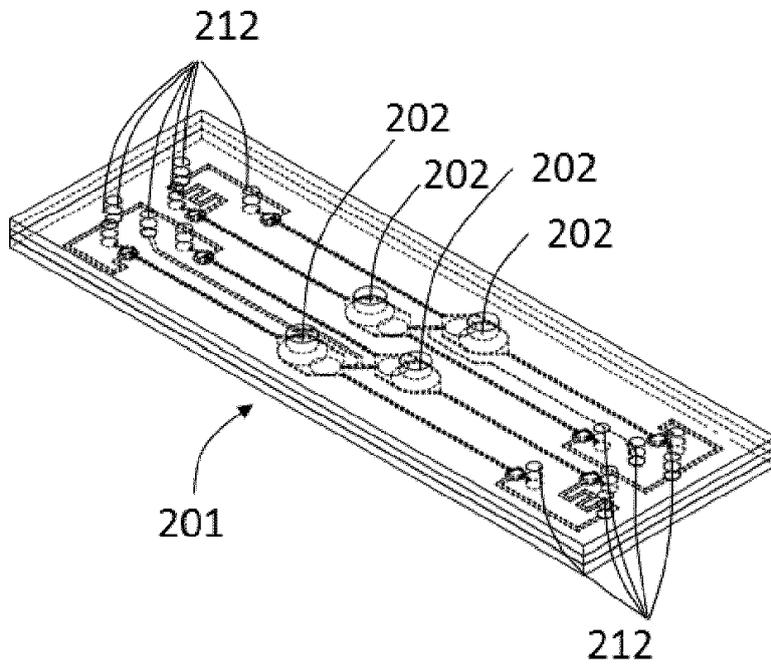
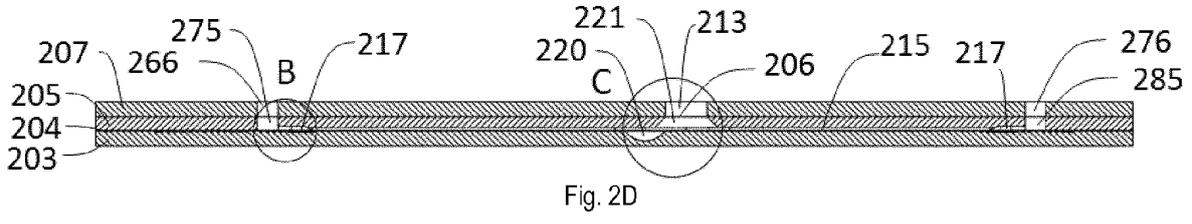
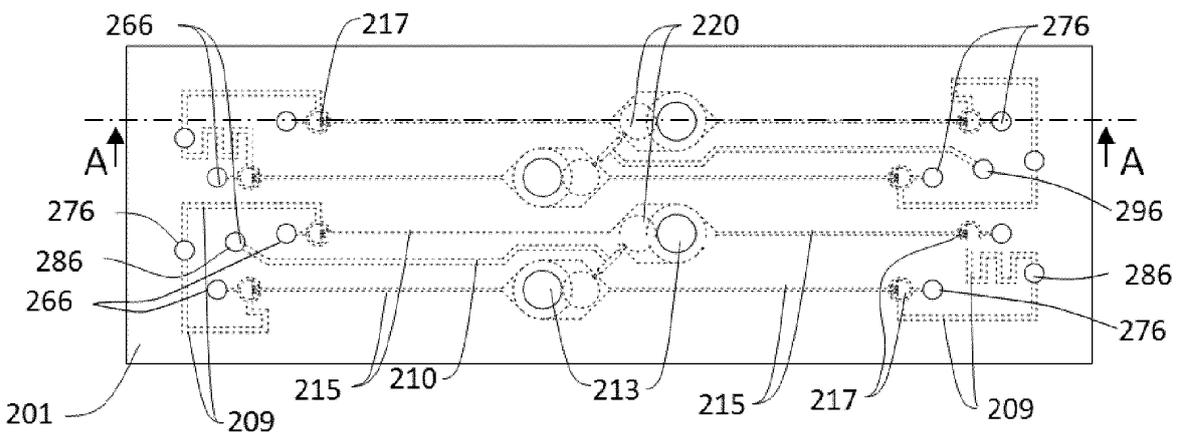
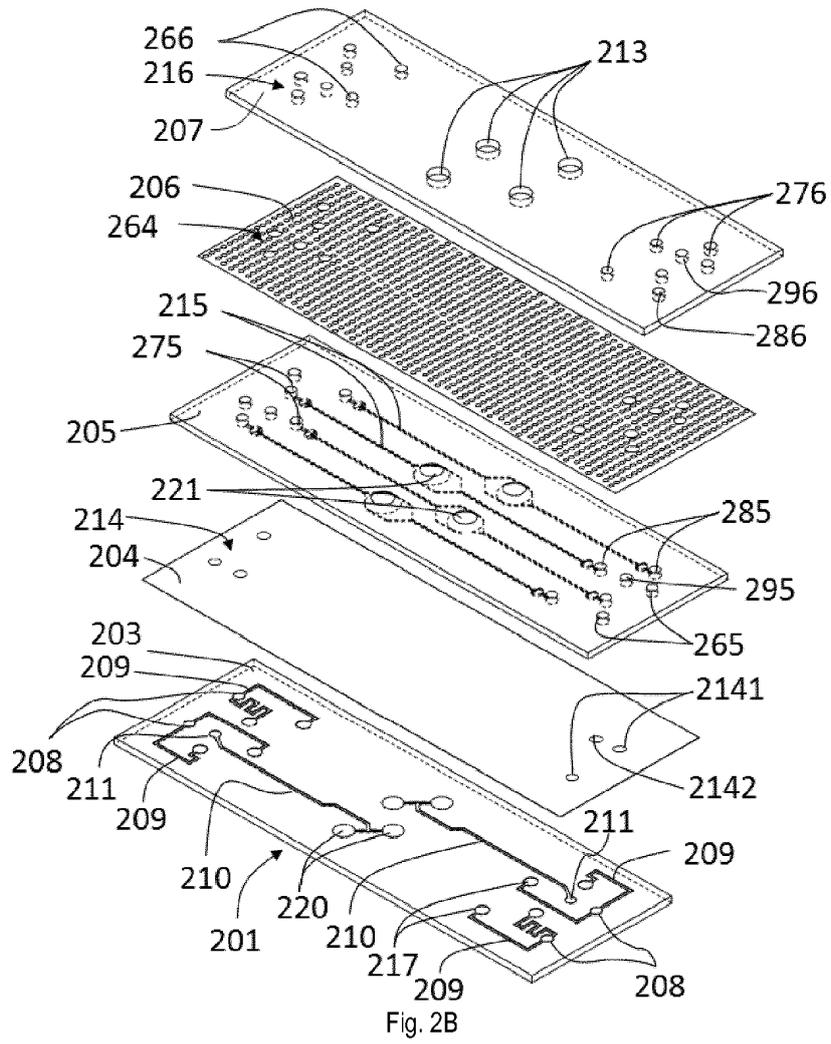


Fig. 2A



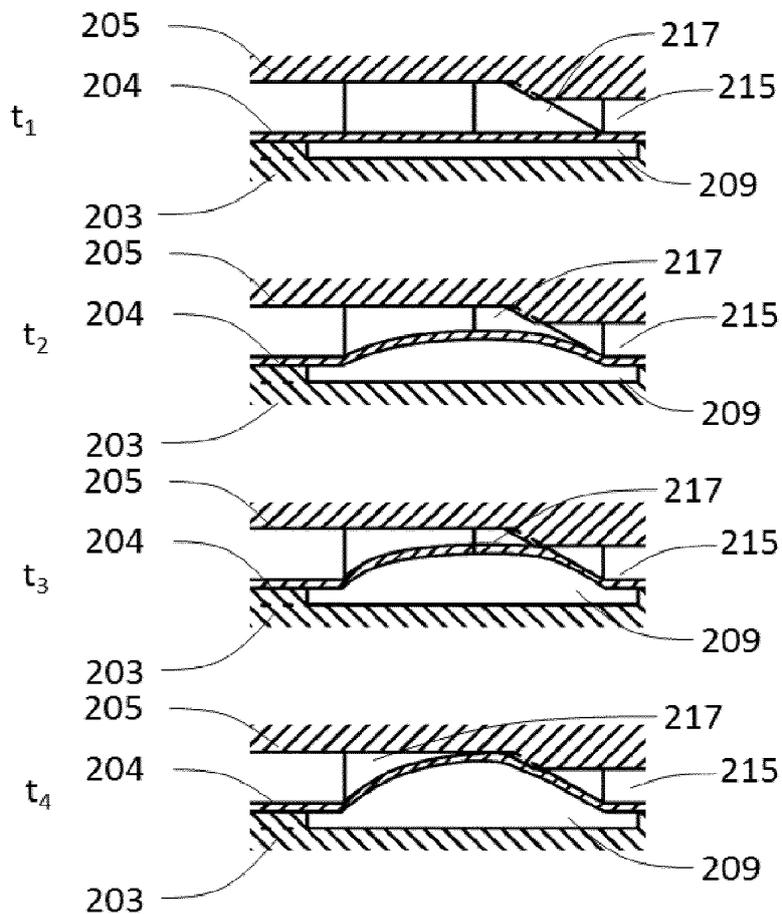
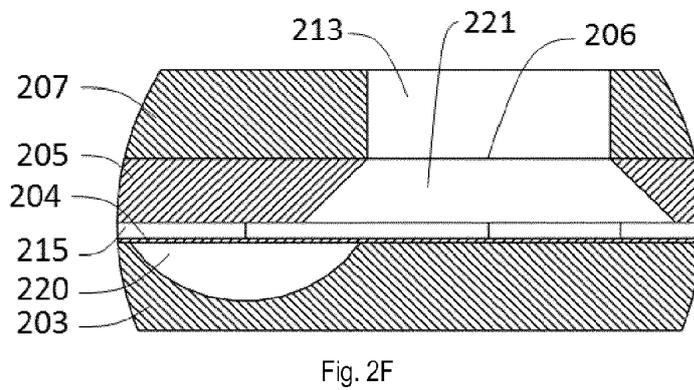
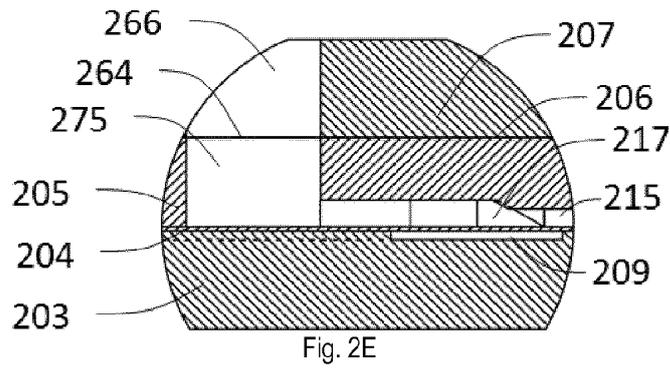


Fig. 2G

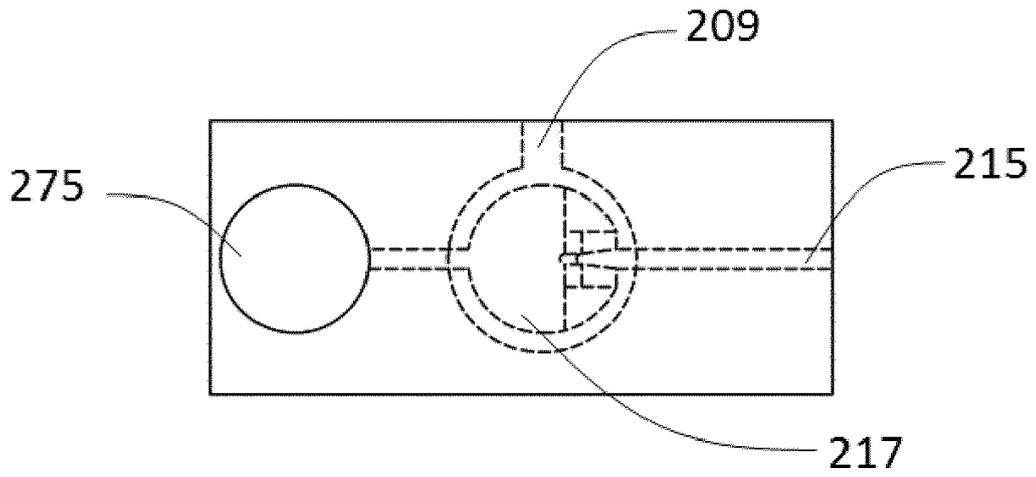


Fig. 2H

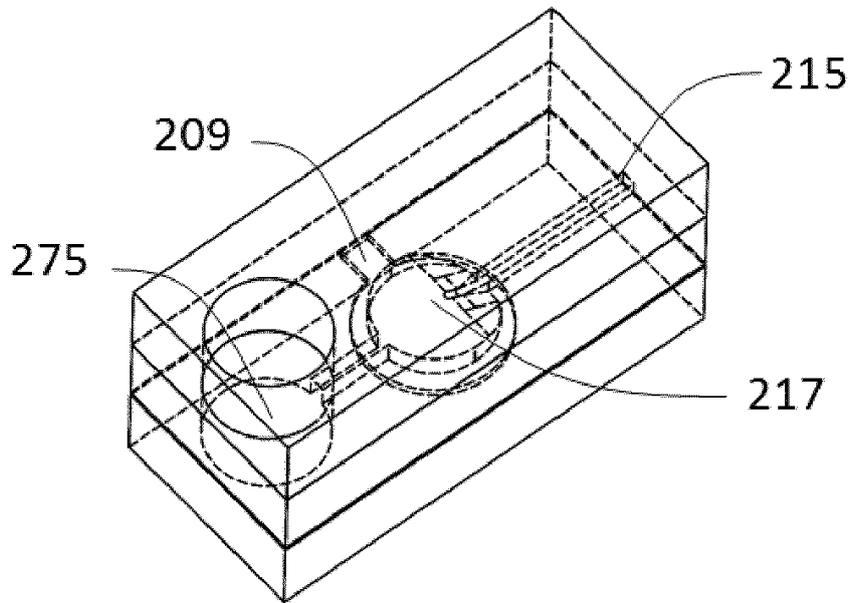


Fig. 2J

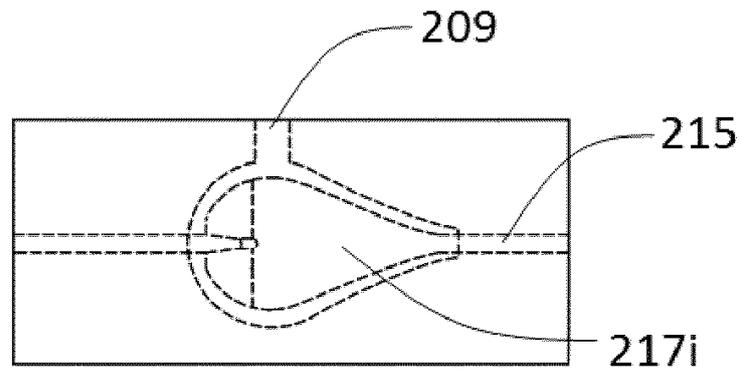


Fig. 2K

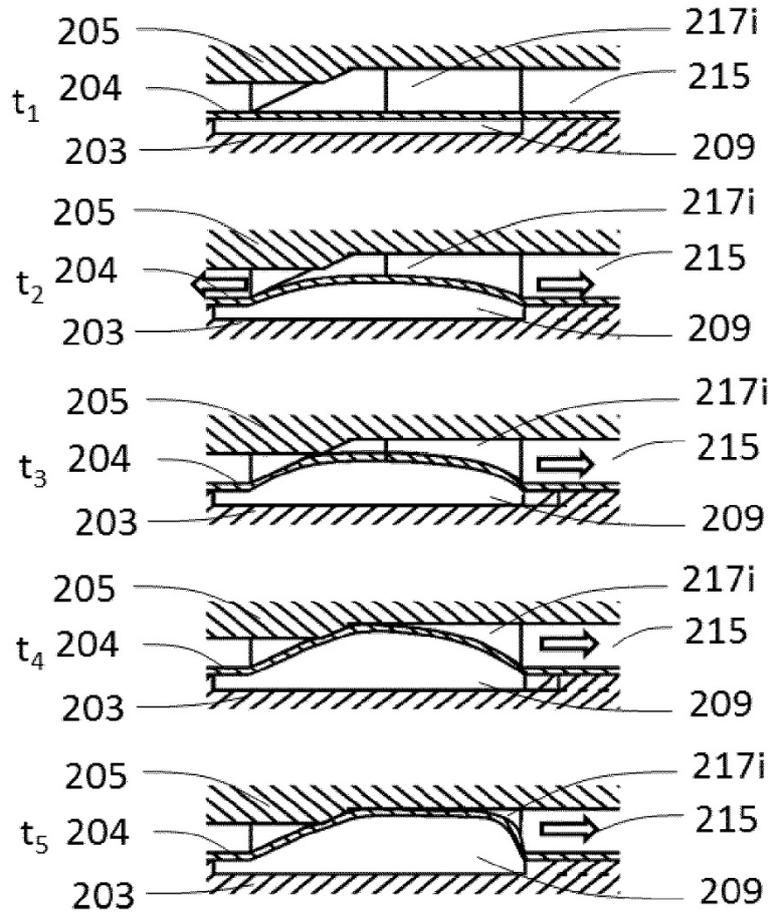


Fig. 2L

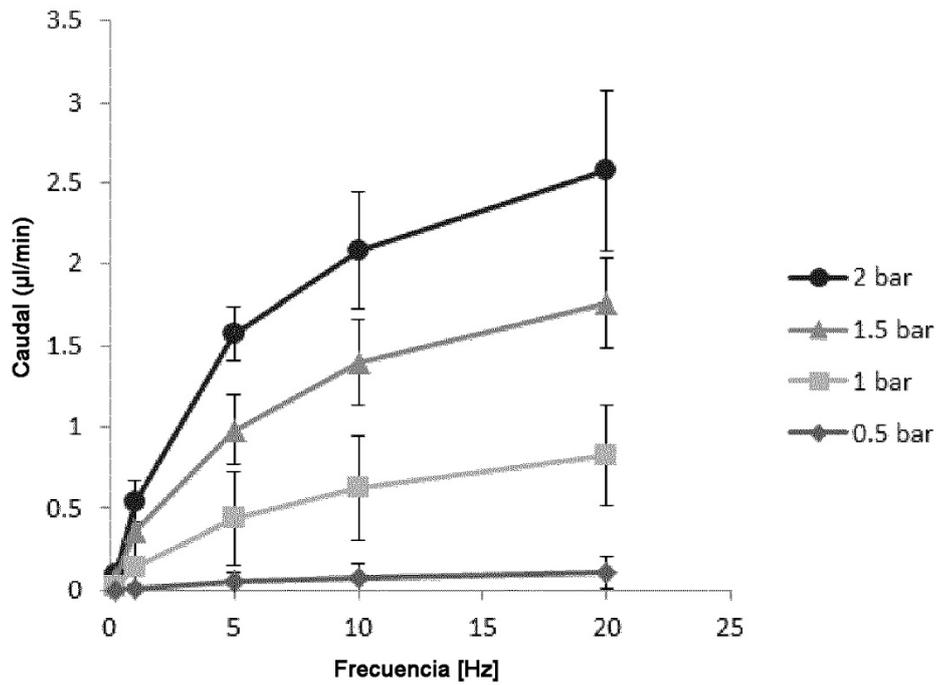


Fig. 2M

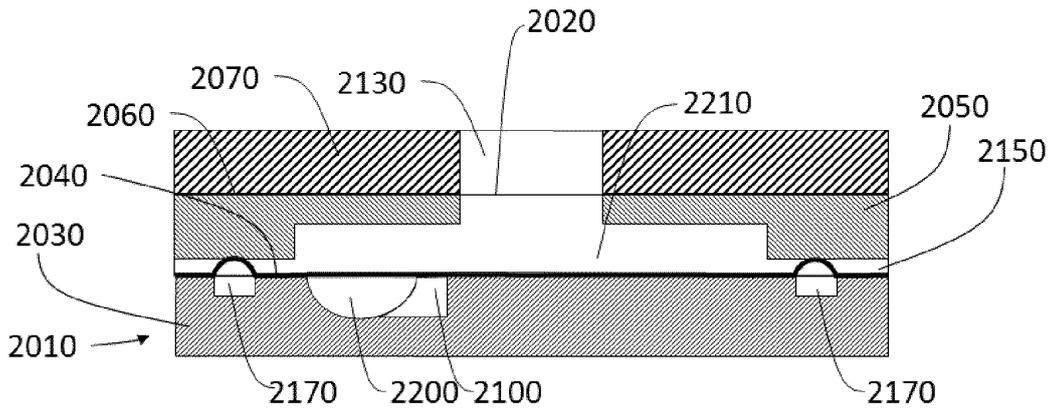


Fig. 3A

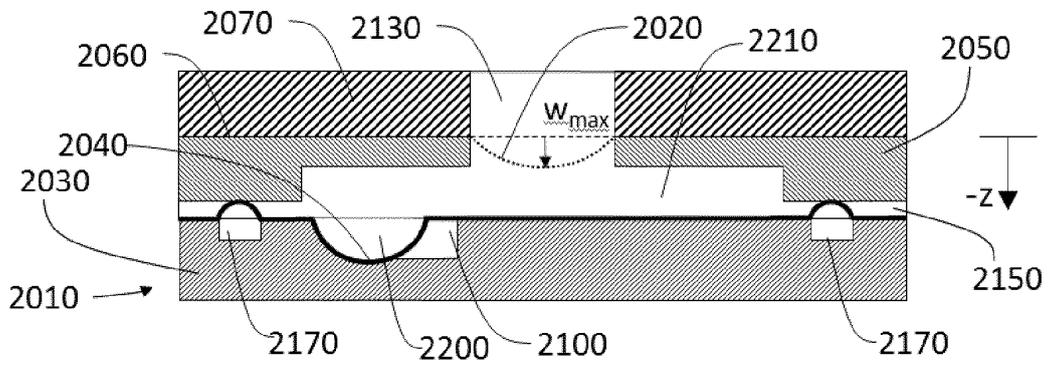


Fig. 3B

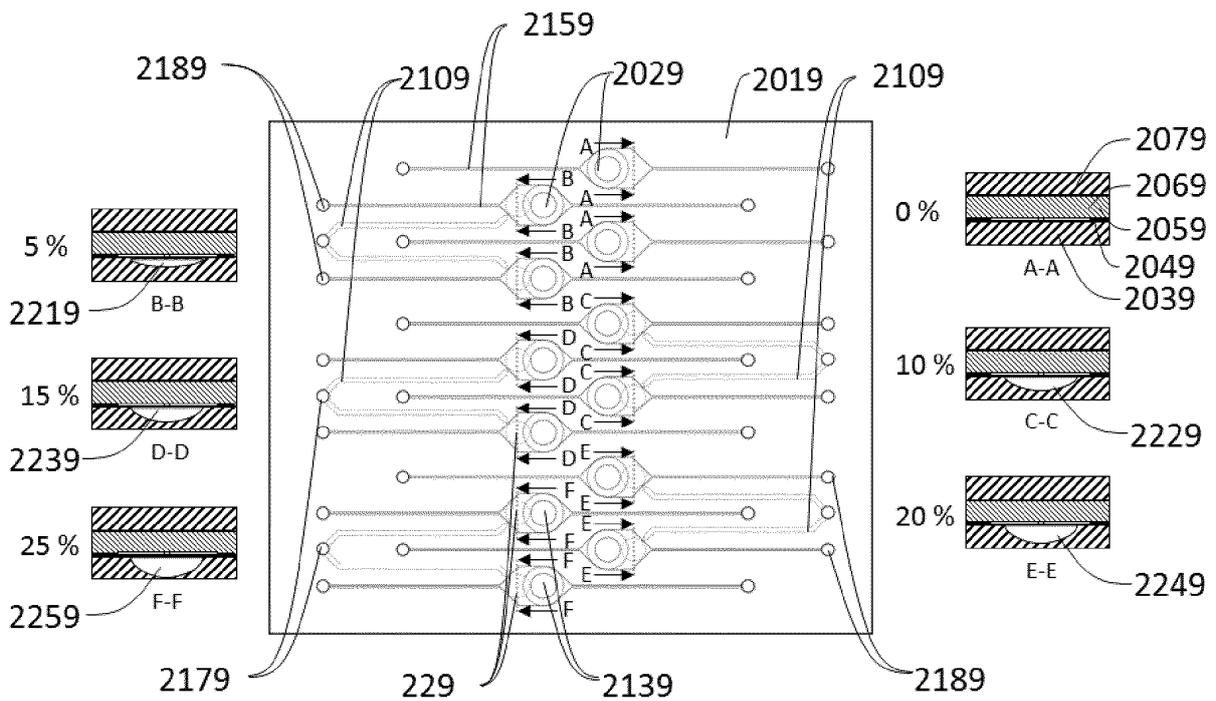


Fig. 4

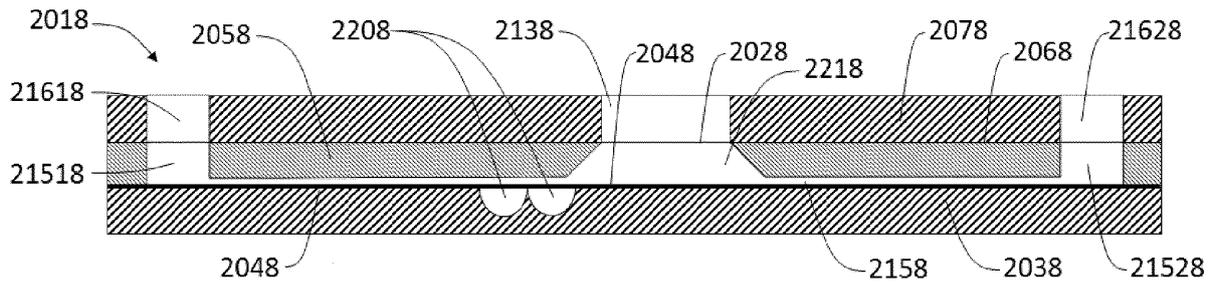


Fig. 5A

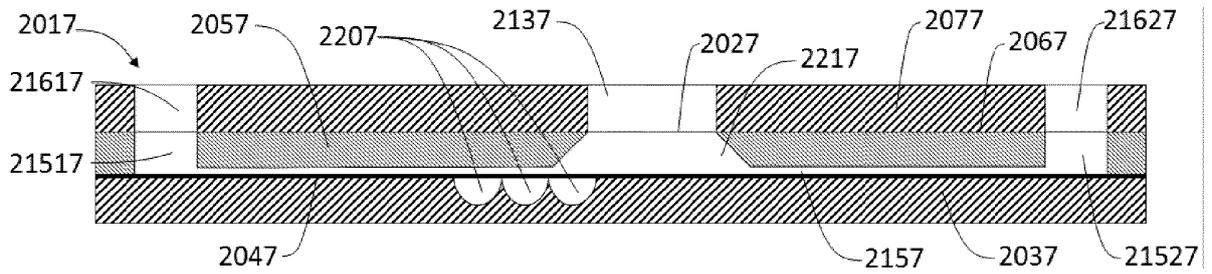


Fig. 5B

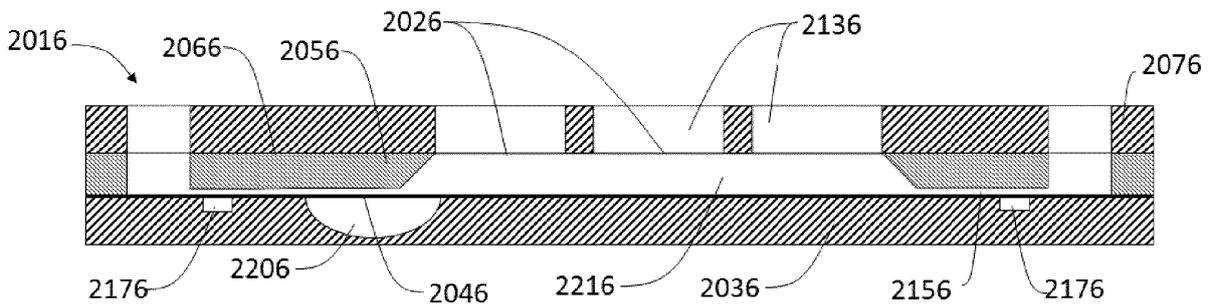


Fig. 6A

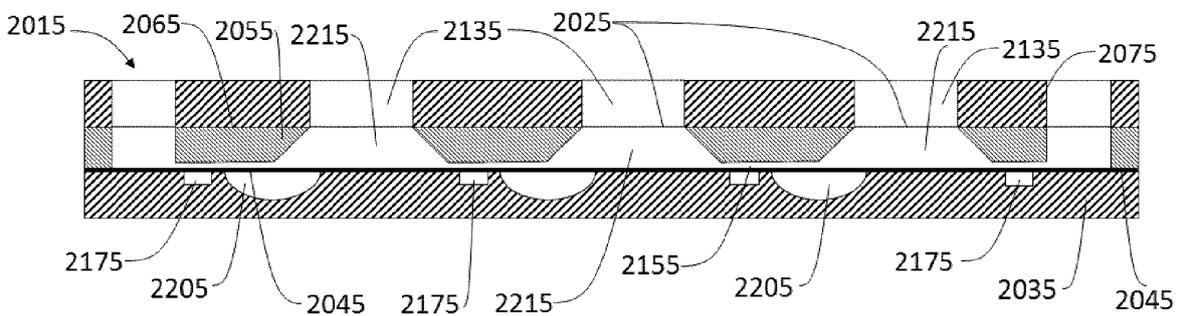


Fig. 6B

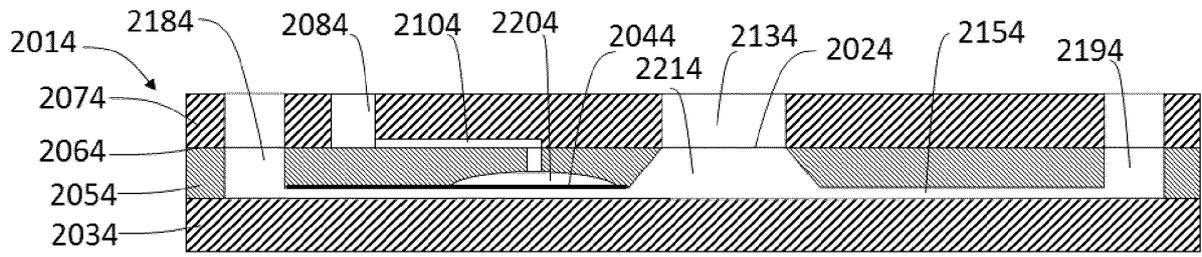


Fig. 7A

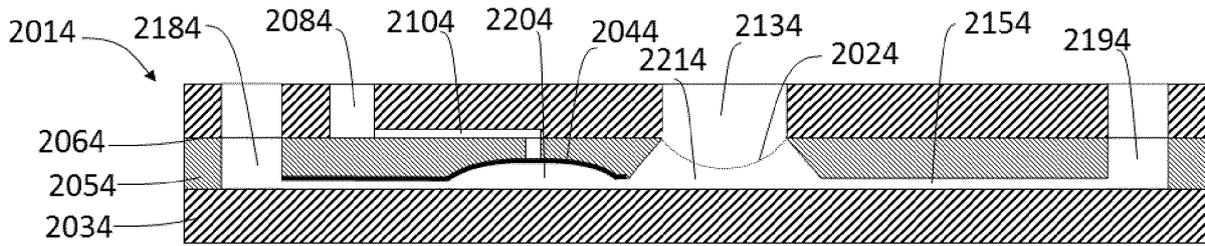


Fig. 7B

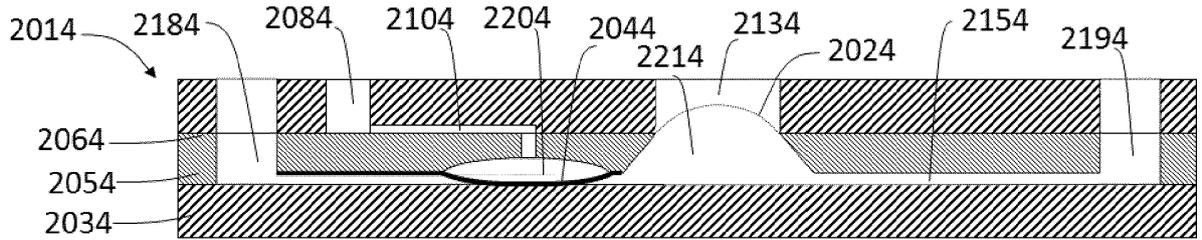


Fig. 7C

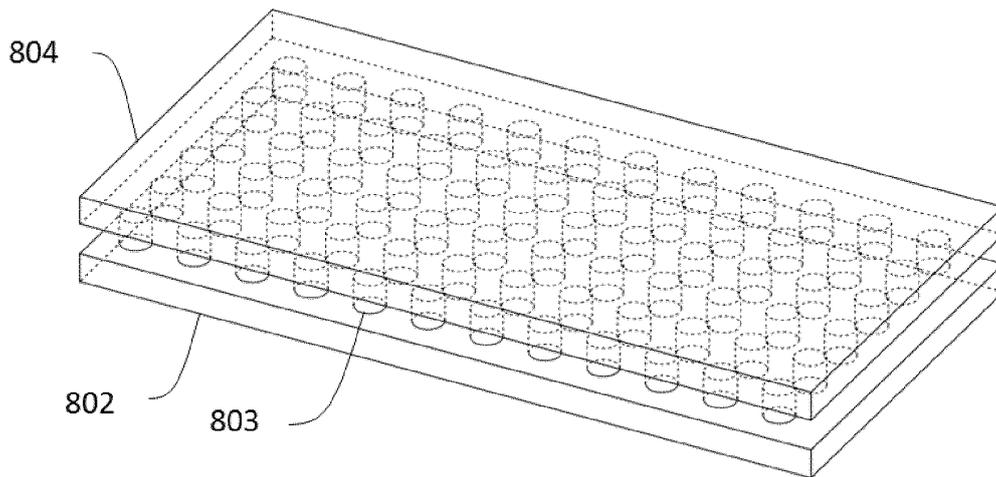


Fig. 8A

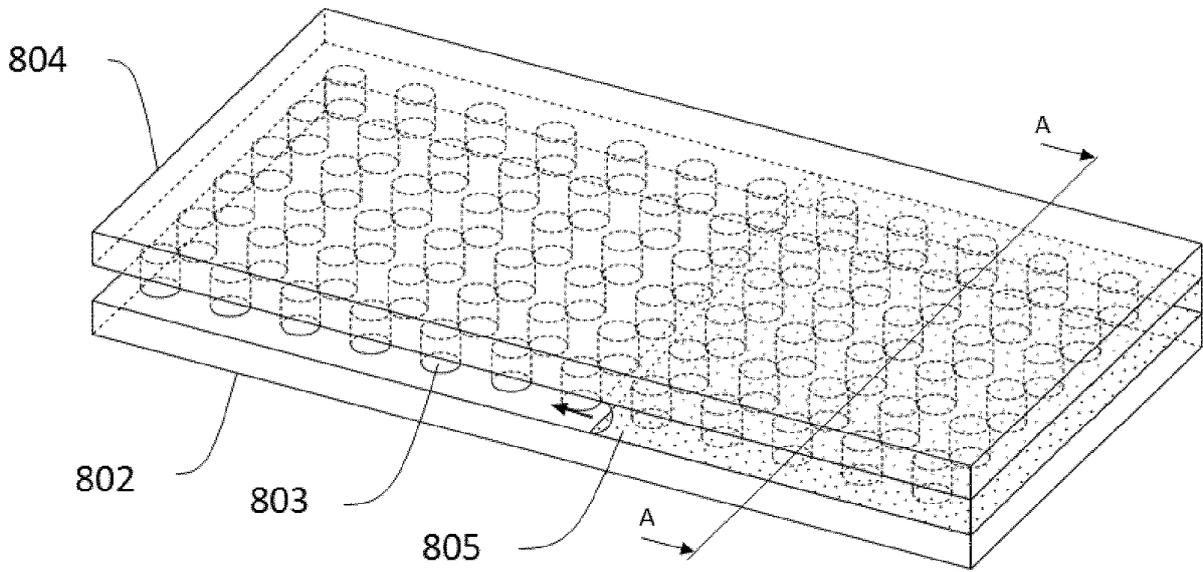


Fig. 8B

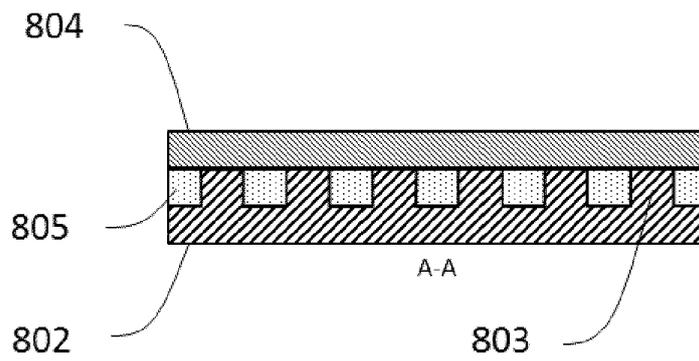


Fig. 8C

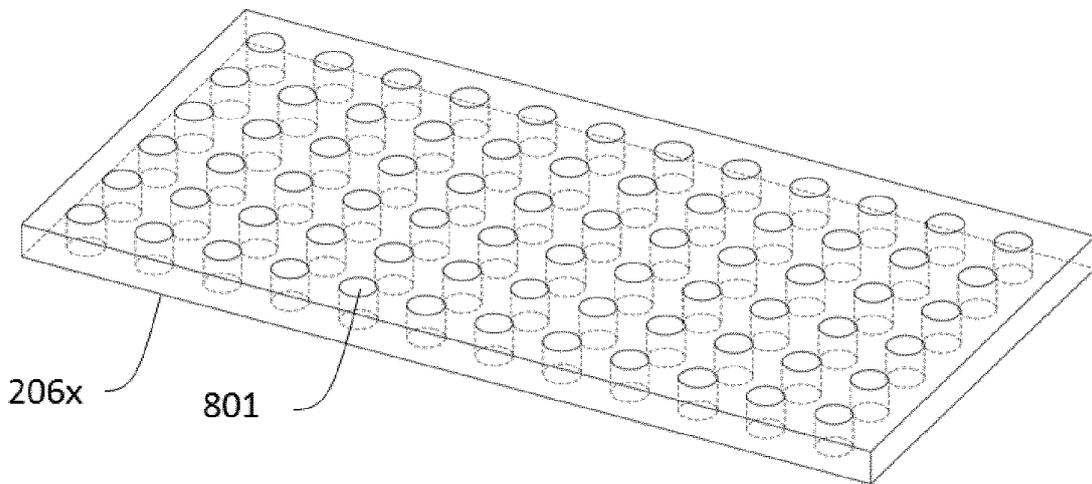


Fig. 8D

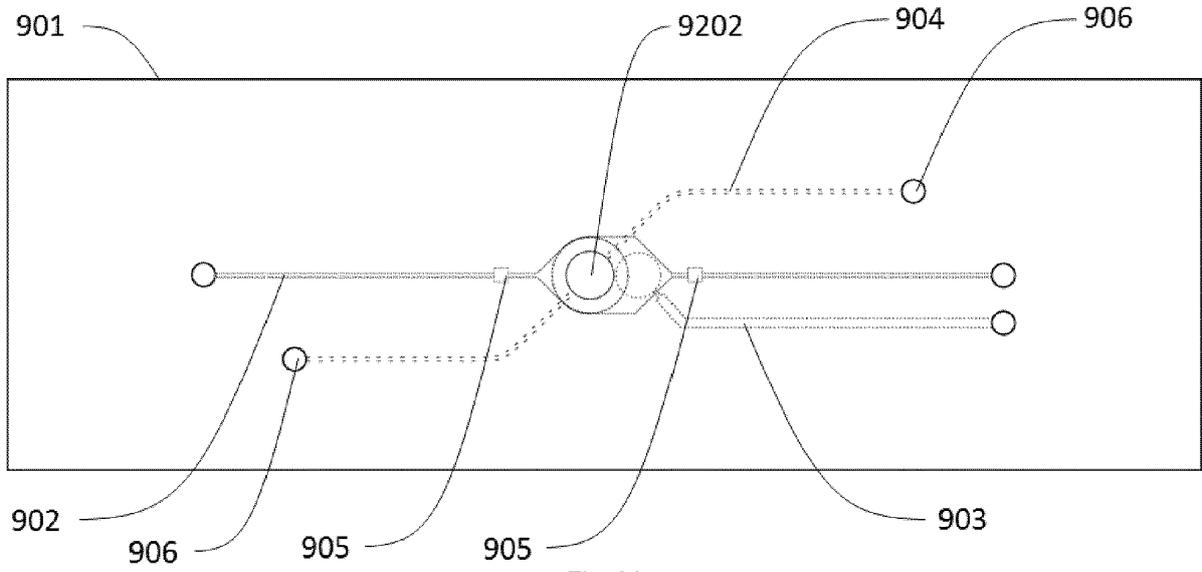


Fig. 9A

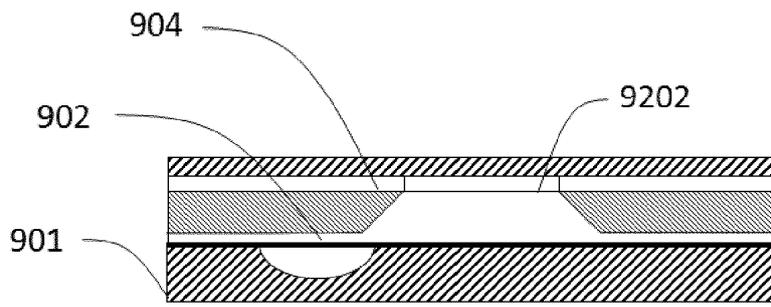


Fig. 9B

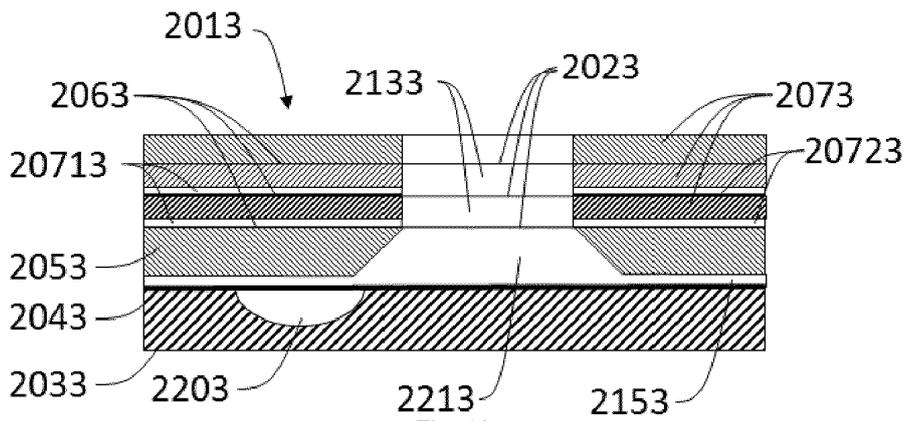
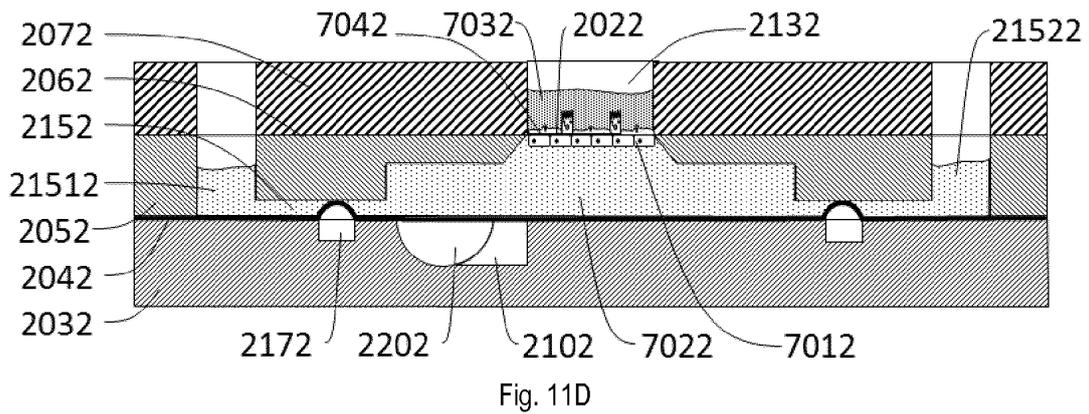
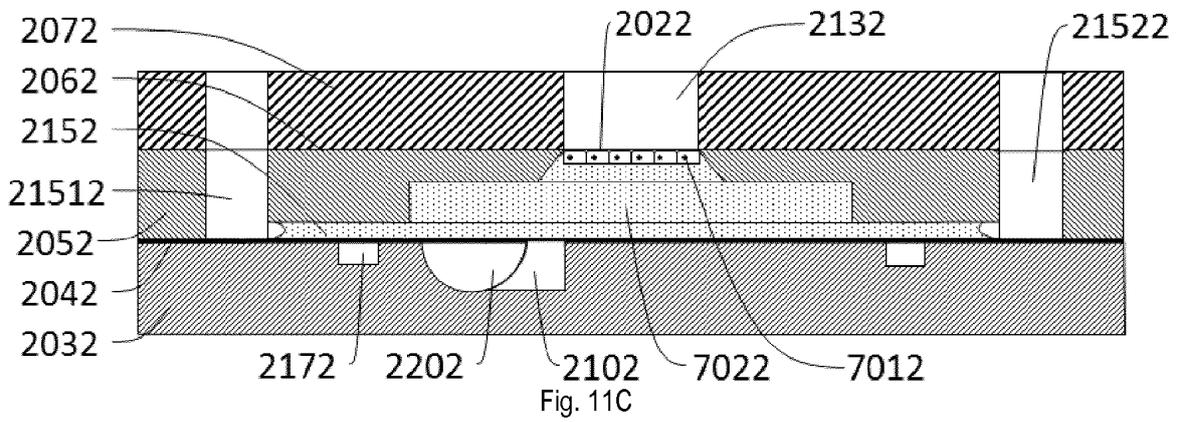
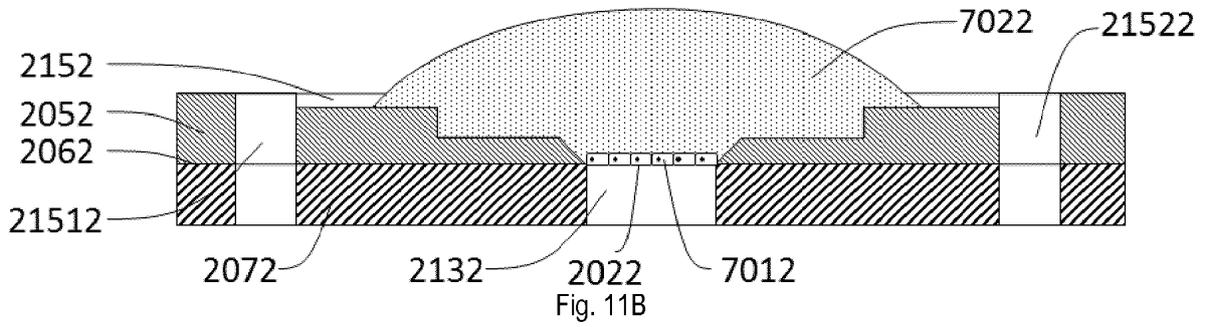
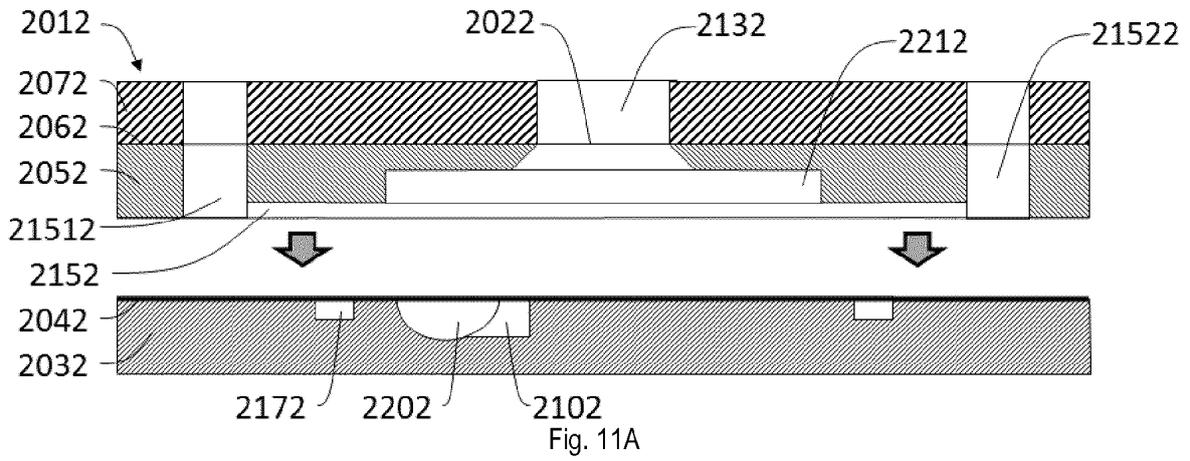


Fig. 10



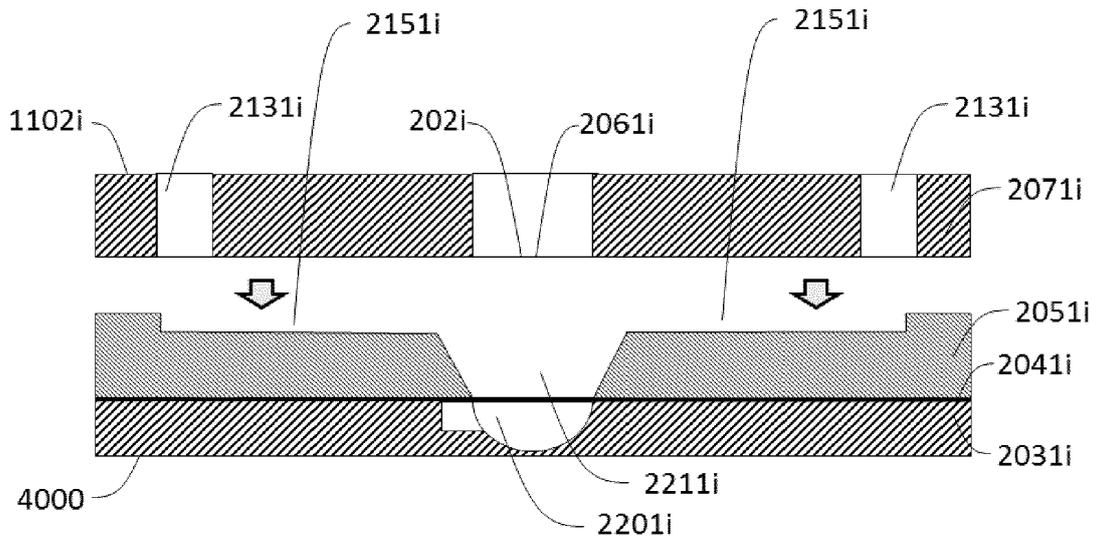


Fig. 11E

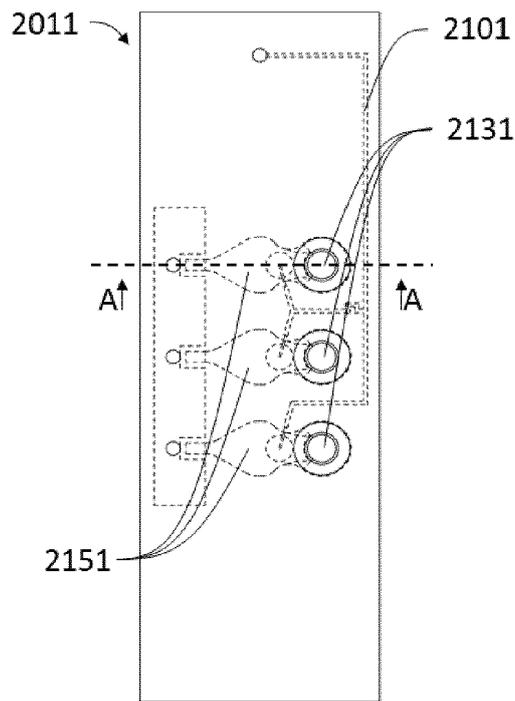


Fig. 12A

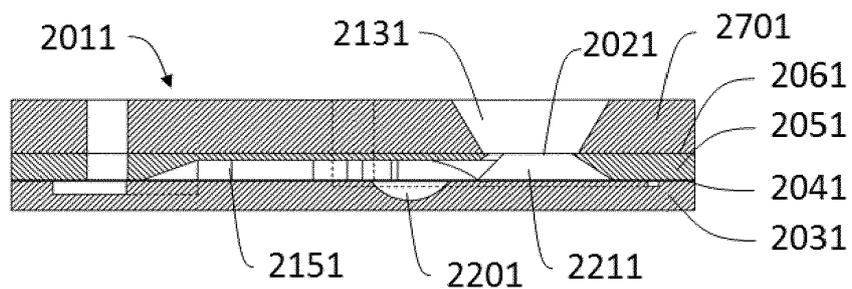


Fig. 12B

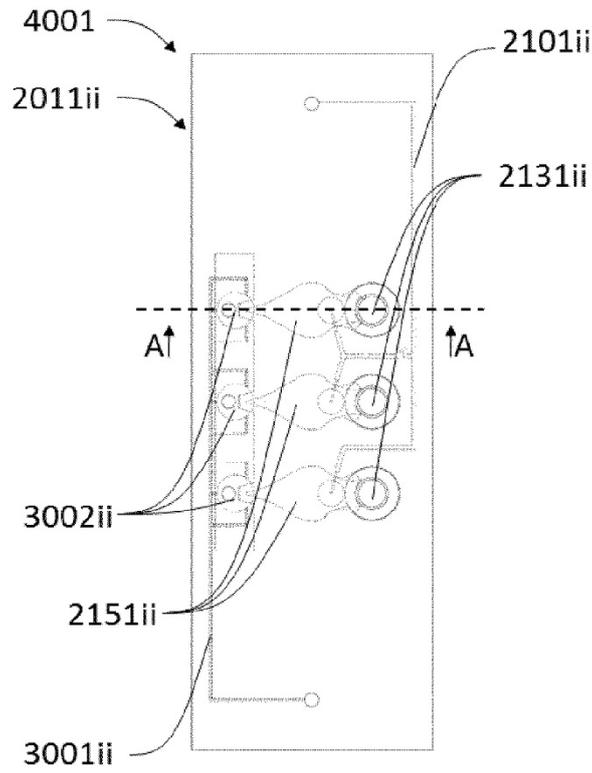


Fig. 13A

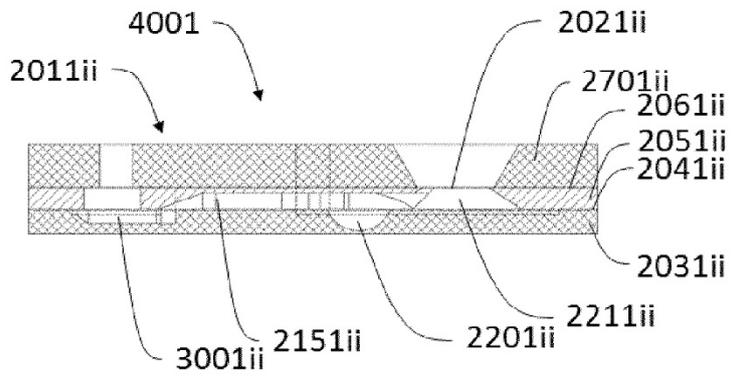


Fig. 13B

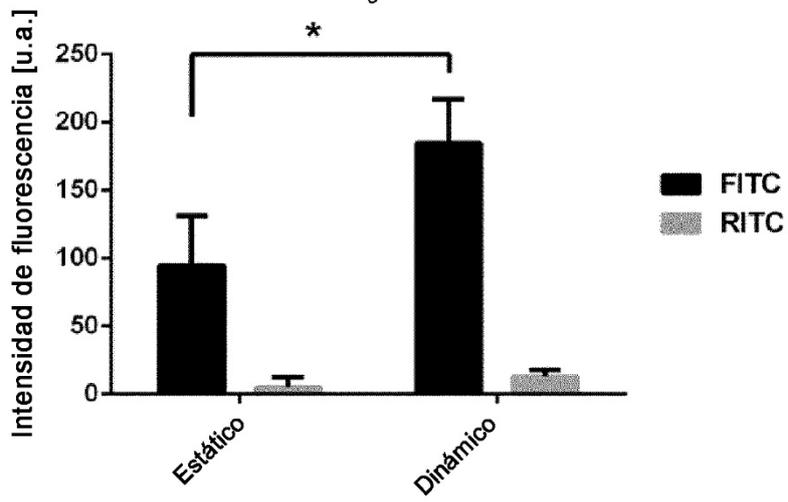


Fig. 14

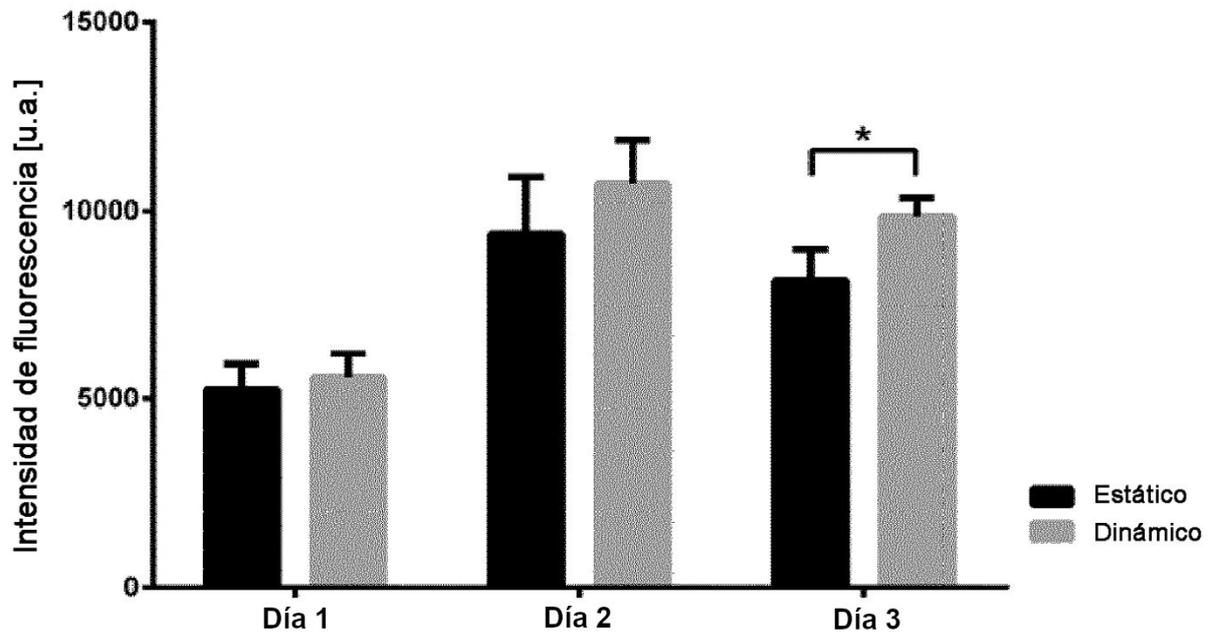


Fig. 15