

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 857**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2012 PCT/US2012/067632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2012 E 12852539 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021 EP 2785825**

54 Título: **Sistema microfluídico para cultivo celular**

30 Prioridad:

03.12.2011 US 201161566651 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2021

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**LEE, PHILIP, J.;
GAIGE, TERRY y
HO, WEI HSUAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 870 857 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema microfluídico para cultivo celular

Campo de la divulgación

5 La divulgación hace referencia ensayos, sistemas, y/o dispositivos para cultivar células u otro material biológico en entornos controlados, y que son aplicables a campos relacionados que utilizan generalmente sistemas microfluídicos. Las realizaciones particulares implican unas configuraciones que pueden utilizarse con diversos sistemas de gestión automatizados, con una carga y una perfusión del medio activa o pasiva, y para proporcionar sistemas automatizados de múltiples ensayos de alto rendimiento para cultivar, visualizar y analizar el crecimiento, la invasión, el movimiento, la quimiotaxis celular u otras propiedades celulares. Más específicamente, la divulgación
10 hace referencia, en realizaciones específicas, a sistemas de control térmico para placas de cultivo microfluídicas y otros sistemas automatizados para placas de cultivo.

Antecedentes de la invención

15 El cultivo celular microfluídico es una tecnología importante para aplicaciones en el cribado de fármacos, cultivo de tejidos, cribado de toxicidad y en la investigación biológica, y puede proporcionar una función biológica mejorada, datos basados en células de mayor calidad, un consumo reducido del reactivo y un coste inferior. Las preparaciones de muestras moleculares y celulares de alta calidad son importantes para diversas aplicaciones clínicas, de investigación y para otras aplicaciones. Las muestras *in vitro*, que representan una aproximación cercana a sus características *in vivo*, pueden suponer un beneficio potencial para una amplia gama de aplicaciones moleculares y celulares. El manejo, la caracterización, el cultivo y la visualización de células o de otros materiales biológicamente o
20 químicamente activos (tales como perlas recubiertas con diversas moléculas biológicas), se han ido valorando cada vez más en los campos del descubrimiento de fármacos, diagnóstico y análisis de enfermedades, y una variedad de otros tipos de trabajos terapéuticos y experimentales.

25 Numerosos aspectos relacionados con sistemas, dispositivos, métodos microfluídicos y su fabricación se tratan en las solicitudes de patente relacionadas y a las que se ha hecho referencia anteriormente. Aunque no debería interpretarse ninguna limitación en particular a partir de esas solicitudes hacia cualquiera de las reivindicaciones presentadas en el presente documento, estos documentos proporcionan un material antecedente de utilidad relacionado con realizaciones específicas.

30 Entre otras publicaciones y/o documentos de patente que tratan diversas estrategias relacionadas con cultivos celulares que utilizan sistemas microfluídicos y actividades relacionadas, se incluyen las siguientes solicitudes de patente de Estados Unidos y literatura no correspondiente a patentes. Una lista de estas referencias en el presente documento no indica que las referencias constituyen la técnica anterior.

Cytoplex, Inc. 6,653,124 "Array-based microenvironment for cell culturing, cell monitoring and drug-target validation."

Cellomics, Inc. 6,548,263 "Miniaturized cell array methods and apparatus for cell-based screening."

Fluidigm, Inc. Published Application 20040229349 (Nov 18, 2004) "Microfluidic particle-analysis systems."

35 Las solicitudes de patente y trabajos anteriores que se citan anteriormente, que implican al menos uno de los presentes inventores, tratan diversas configuraciones, métodos, y sistemas relacionados con el cultivo celular microfluídico y esos trabajos.

40 El documento WO 2009/089189 A2 describe un sistema microfluídico para el cultivo celular que comprende una unidad de cultivo, una cámara de cultivo microfluídica, una barrera de perfusión, canales de entrada, un depósito de salida, y un colector neumático.

Definición de la invención

45 La presente invención hace referencia a un sistema microfluídico para el cultivo celular y se define en la reivindicación 1. Versiones ventajosas de la invención se derivan de las reivindicaciones dependientes. Cuando se utilizan a continuación los términos "invención" o "realización", esto no significa necesariamente que la correspondiente divulgación se encuentra cubierta por las reivindicaciones, sino que tal divulgación resulta útil para la ilustración de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Sumario

La presente invención implica diversos componentes, sistemas y métodos relacionados con la mejora de dispositivos y sistemas microfluídicos para el cultivo celular, en particular sistemas para el cultivo y/o análisis y/o la visualización de células bajo parámetros controlados de temperatura y gas. En un aspecto, la invención implica nuevos dispositivos, sistemas y métodos microfluídicos para el cultivo celular que presentan ventajas sobre los sistemas propuestos previamente en algunas realizaciones, un control del calentamiento y el gas más conveniente y no intrusivo y que también proporcionan un manejo automático. En otro aspecto, la invención implica estructuras y métodos novedosos para integrar el control de calentamiento y de gas con múltiples unidades de cultivo celular microfluídico en diversos sistemas de múltiples unidades de cultivo celular, tales como una placa de pocillos de microtitulación incluyendo varios formatos estándar de placas de pocillos (p.ej., placa de cultivo de 96 pocillos según el estándar de la Sociedad de Ciencias Biomoleculares (SBS, por sus siglas en inglés), u otros formatos de placas, incluyendo placas con 6, 12, 24, 96, 384 o 1536 pocillos de muestras, además de placas de pocillos de fondo abierto estándares, además de placas con áreas específicas para el cultivo y/o la visualización de células.

Colector extraíble de placa con múltiples cámaras con control de gas y temperatura

En realizaciones y ejemplos en particular, las características de diseño incluyen proporcionar un dispositivo de cultivo celular en un formato conveniente que permita la eliminación de tubos y conectores con las propias placas y proporcione un control y monitorización de la temperatura mayoritariamente o totalmente contenido en un colector extraíble que se ajusta sobre las placas con una junta estanca al gas, proporcionando de este modo la capacidad de mantener un cultivo celular a largo plazo con control de temperatura y/o gas en una plataforma de cultivo que mantenga la capacidad de observar las células fácilmente, y que sea fácilmente extraíble de la placa de cultivo. Un sistema de la invención puede ser utilizado con una variedad de unidades de cultivo celular en placas de cultivo, tales como las descritas en las solicitudes de patente a las que se ha hecho referencia anteriormente, incluyendo unidades de cultivo celular para determinar invasión celular, unidades de cultivo con medios de cultivo de tipo gel, y una variedad de otras unidades de cultivo como las descritas en el presente documento o en solicitudes relacionadas.

Las células vivas requieren generalmente el control meticuloso de su entorno físico, incluyendo el intercambio de nutrientes y gas, la regulación de temperatura, y protección del estrés celular. Los métodos avanzados de cultivo celular a micro-escala, tal como se describe en las solicitudes de patente a las que se hace referencia anteriormente permiten el control estructural (microfabricación), y el control de la perfusión (microfluídica).

Micro-incubación, y cámara/pocillo de micro-incubadora en contacto con cámaras de cultivo celular microfluídicas

En el presente documento se describe un área adicional de este campo, denominada en ocasiones en el presente documento como *micro-incubación*, para proporcionar el control de temperatura y atmósfera de gas para su uso en sistemas de cultivo celular a micro-escalas, de una forma que no es intrusiva con respecto al equipo observacional, y que además se acopla y se retira fácilmente de una placa de cultivo en realizaciones específicas.

De acuerdo con realizaciones específicas, la invención proporciona una miniaturización del concepto de incubadora de cultivos celulares tradicionales para realizar una regulación de gas y temperatura dinámica y continua directamente en una cámara microfluídica. En ejemplos de implementaciones, esto es posible mediante la creación de una cámara micro-incubadora de aproximadamente 5ml de volumen en contacto con las cámaras de cultivo celular microfluídicas (1ul). La temperatura y el contenido de gas de la micro-incubadora se transfiere rápidamente a la cámara de cultivo celular (por conducción y difusión). La micro-incubadora descrita en el presente documento se mantiene mediante un diseño de colector novedoso, tal como se describe en el presente documento. Los colectores descritos en el presente documento pueden controlarse mediante diversos sistemas y software.

Sistema para microscopía con vídeo time-lapse (grabación en intervalos de tiempo) de células vivas

Muchos productos y métodos hacen posible la microscopía con video time-lapse de células vivas. Se pueden, en general, considerar tres aproximaciones que son comúnmente conocidas tales como: (1) sistema de carcasas completas (tipo caja) para microscopio, (2) incubadoras sobre platina, y (3) cámaras de perfusión.

Las carcasas completas para microscopio rodean la totalidad del microscopio excepto algunos componentes de generación de calor o sensibles al calor, tales como la cámara y las fuentes de iluminación. El aire dentro de la carcasa se hace circular y se mantiene a la temperatura deseada y con el ambiente gaseoso deseado de la muestra. Una ventaja de este método es que el control de temperatura de todo el microscopio reduce enormemente las derivas de enfoque debido a las fluctuaciones de la temperatura ambiente, pero entre sus diversas desventajas se incluyen una construcción costosa y diseñada a medida, la obstrucción del acceso al microscopio, y un elevado consumo de energía y gases. Además, la exposición a la humedad y los repetidos cambios de temperatura pueden dañar los microscopios.

5 Las incubadoras sobre platina rodean únicamente un pequeño volumen que está destinado a alojar una o más placas de Petri, portaobjetos u otras plataformas de cultivo. Estas proporcionan una regulación local de la temperatura y permiten el control limitado del ambiente gaseoso. Resultan convenientes, pero no proporcionan el mismo nivel de control que una caja cerrada para el microscopio, ya que la incubadora sobre platina debe imitar la mecánica de una caja cerrada, pero en un tamaño más reducido y adaptarse al microscopio. Por ejemplo, el control uniforme de temperatura en una incubadora sobre platina se encuentra limitado por el disipador de calor de la propia platina, y los cortes para proporcionar la trayectoria de la luz para la claridad óptica reducen aún más la uniformidad. Además, la complejidad del diseño de las incubadoras sobre platina las hace costosas.

10 Las cámaras de perfusión consisten generalmente en un conjunto que contiene un volumen de líquido fuente, con elementos de calentamiento ya sea directamente a través de las paredes de la cámara o inmediatamente aguas arriba de la vía de flujo de entrada. El diseño de los elementos de control necesita considerarse de forma cuidadosa, ya que cuestiones tales como la transferencia de calor/masa pueden dificultar el mantenimiento adecuado para alcanzar una condición de un estado estable. Actualmente, las cámaras de flujo se utilizan con poca frecuencia en la toma de imágenes de células vivas debido a las innumerables dificultades de adaptarlas para usos habituales.

15 La presente invención, por contraste, integra el control de temperatura, flujo y gas directamente en una placa de cultivo microfluídica a través del uso de un colector que se sella a la placa microfluídica. Aunque se tratan colectores similares en algunos aspectos en algunas de las solicitudes a las que se hace referencia anteriormente para controlar la perfusión en placas microfluídicas, los diseños previos no incorporaban todas las características descritas en el presente documento, ya que tal incorporación resultaba difícil debido a la naturaleza compacta del colector y la placa de cultivo. El presente diseño del colector incluye compartimentos de "micro-incubadora" para temperatura o gas novedosos creados mediante el colector. Estos compartimentos han demostrado proporcionar ventajas novedosas y fundamentales para la adecuada integración para las necesidades de las imágenes de células vivas.

25 La presente invención permite el cultivo celular directo en una platina de microscopio sin el uso de cámaras de entorno externas, tal como carcasas o calentadores sobre platina. El concepto de "micro-incubadora" de acuerdo con las realizaciones específicas de la presente invención proporciona un control preciso, un cultivo celular a largo plazo, y la facilidad de cambios de condiciones dinámicos que no se encuentran disponibles en este contexto en otros diseños.

30 Aunque muchos de los ejemplos tratados en detalle en el presente documento están diseñados para ser utilizados en conjunto con una placa de pocillos estándar o a medida, de acuerdo con realizaciones específicas también pueden implementarse estructuras y unidades de cultivo microfluídicas y sistemas y métodos microfluídicos de diversas configuraciones, según se describe en el presente documento, independientemente de cualquier placa de pocillos, tal como en diversos sistemas "lab-on-chip" (sistemas miniaturizados "laboratorio en un chip") integrados que no están configurados para ser utilizados en conjunto con placas de pocillos o diversos dispositivos o sistemas microfluídicos diferentes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra una vista lateral de un ejemplo de colector a modo de micro-incubadora de acuerdo con realizaciones específicas de la invención que se muestra colocado en un sistema micro-incubador con una placa de pocillos y un visualizador de microscopio.

40 La FIG. 2 ilustra un ejemplo de una vista en planta superior de un colector con un controlador térmico de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 3 ilustra un ejemplo de una vista superior de un colector con un controlador térmico sellado a una placa de pocillos y montado en un visualizador del microscopio.

45 La FIG. 4 ilustra un ejemplo de una placa de cultivo con cuatro unidades de cultivo situadas en una placa de 96 pocillos según el estándar SBS. Este ejemplo muestra cuatro unidades de cultivo (correspondientes a las filas indicadas A-D) con seis pocillos de entrada (indicados A1-D6), cuatro áreas de cultivo microfluídico situadas bajo el óvalo de visualización grande, y dos pocillos de salida (7-8). Esto es únicamente un ejemplo y la colocación y designación de los diversos pocillos y componentes podrá variar con diferentes implementaciones.

50 La FIG. 5A-D son dibujos esquemáticos de un ejemplo de implementación de un colector con un controlador térmico a partir de diversas vistas de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 6(A) ilustra la parte inferior de un módulo de intercambio de calor de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. La parte inferior se acopla a la parte neumático del colector. (B) ilustra la parte superior de un módulo de intercambio de calor de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 7 es una vista lateral esquemática de las partes neumáticas de un colector sellado a una placa de cultivo y que muestra el gas en líneas que se conectan con un volumen de control del ambiente según realizaciones específicas de la invención.

5 La FIG. 8 es un esquema que muestra cómo un colector se interconecta con una placa microfluídica de acuerdo con realizaciones específicas en donde se crea un sellado positivo aplicando un vacío a la cavidad que rodea todos los pocillos. La unidad de calentamiento no se muestra en esta figura.

La FIG. 9 ilustra un colector con una línea de gas adicional y una lente de objetivo calentada de acuerdo con un diseño de colector anterior.

10 La FIG. 10A-C muestra una vista superior, una vista lateral y una vista en planta de un esquema de un ejemplo de colector neumático de acuerdo con unos diseños anteriores. En este ejemplo, las líneas de ocho tubos a la derecha son para aire comprimido, y cada una está configurada para proporcionar presión a una columna de pocillos de entrada de células en una matriz microfluídica. La línea más a la izquierda en la figura es para el vacío y se conecta con un anillo de vacío exterior alrededor del colector. Este diseño básico del colector se modifica utilizando los contenidos del presente documento para producir el colector calentado.

15 La FIG.11 ilustra un ejemplo de sistema microfluídico de perfusión (ONIX™), controlador y colector de micro-incubadora (MIC) de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 12 ilustra un ejemplo de sistema microfluídico de perfusión (ONIX™), controlador y colector de micro-incubadora (MIC) y un sistema de control por ordenador.

20 La FIG. 13 muestra fibroblastos de ratones NIH-3T3 cultivados utilizando el sistema de micro-incubadora de acuerdo con realizaciones específicas de la invención en $t=0$ (izquierda) y después de 15 horas (derecha) mostrando la viabilidad y el crecimiento celular. Cuando no se controló la temperatura o el CO₂, las células murieron rápidamente en 2 horas.

La FIG. 14 ilustra una alternativa de un diseño de una placa y una unidad de cultivo con un ejemplo de unidad de cultivo llena con colorante azul con la imagen tomada desde la parte superior.

25 La FIG. 15 es una captura de pantalla que muestra la integración del sistema microfluídico de perfusión ONIX con una aplicación de microscopía de código abierto.

30 La FIG. 16 ilustra un sistema de micro-incubación integrado con un sistema de microscopio para el análisis de las células. Las dimensiones del colector en las realizaciones específicas, le permiten asentarse en una platina con placa de pocillos estándar, con una vía óptica transparente que no interfiere con la microscopía óptica. Esto permite una imagen con time-lapse de las células cultivadas en la micro-incubadora.

La FIG. 17 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo de dispositivo lógico representativo.

La FIG. 18 es un diagrama de bloques que muestra un sistema automático accionado por pistones.

La FIG. 19 (Tabla 1) ilustra un ejemplo de enfermedades, condiciones, o estados que pueden ser evaluados o para los que pueden someterse a ensayo fármacos u otras terapias.

35 La FIG. 20A-D son esquemas de un ejemplo de implementación de circuitos de control electrónico para un colector de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones específicas 1.

Resumen

Definiciones

40 Una "partícula" hace referencia a células biológicas, tales como células de mamíferos o bacterias, partículas virales, o partículas liposómicas u otras partículas que pueden someterse a ensayo de acuerdo con la invención. Tales partículas presentan unas dimensiones mínimas entre aproximadamente 50-100 nm, y pueden llegar a tener un tamaño de unas 20 micras o más. Cuando se utilizan para describir un ensayo celular, los términos "partículas" y "células" pueden utilizarse de manera intercambiable.

Un “micro-canal” o “canal” o “canal de flujo” hace referencia en general a un canal a escala de micras utilizado para la conexión fluido-comunicante de varios componentes de sistemas y dispositivos. Un micro-canal tiene habitualmente una sección transversal rectangular, p.ej. cuadrada, o redonda, con dimensiones laterales y de fondo en una realización preferida de entre 10 y 500 micras, y 10 y 500 micras, respectivamente. Los fluidos que fluyen en los micro-canales pueden mostrar un comportamiento microfluídico. Cuando se utilizan para hacer referencia a un micro-canal dentro del dispositivo con matriz de micro-pocillos, el término “micro-canal” y “canal” se utilizan de manera intercambiable. El término “canal de flujo” indica unos canales diseñados para el paso de medios, reactivos, u otros fluidos o geles, y en algunos ejemplos células. El término “canal de cultivo” o “canal de cultivo celular” indica en general una parte de una estructura para el cultivo celular a través del cual las células están diseñadas para fluir y también permanecer durante el cultivo celular (aunque las células pueden situarse en un área de cultivo en particular del canal de cultivo en algunas realizaciones). El término “canal de aire” indica en general un canal aproximadamente a escala de micras utilizado para permitir que gases tales como el aire, mezclas enriquecidas con oxígeno, etc., pasen en proximidad a los canales de flujo o las áreas de cultivo. El término “canal de perfusión” se utiliza en ocasiones para indicar un canal de flujo y cualquier pasaje o estructura de perfusión que permita que los medios se perfundan en el área de cultivo.

El término “barrera de perfusión” hace referencia a una combinación de estructuras sólidas y pasajes de perfusión que separan generalmente un canal de flujo de un área o cámara de cultivo celular. Los pasajes de perfusión son generalmente menores que la altura y/o el ancho del micro-canal (por ejemplo, en el orden de 5-50% o en el orden de aproximadamente 10%), y están diseñados para evitar que las células, otros objetos de cultivo, y en algunos ejemplos geles migren hacia el interior de los canales de flujo, a la vez que permiten cierto flujo de fluidos que es en general de una resistencia fluidica mucho más elevada que la del flujo del fluido en los canales de flujo. En un ejemplo, la barrera de perfusión tiene un pasaje de perfusión que tiene 4 micras de alto y que de otro modo recorre la mayor parte de la longitud del micro-canal. En otras realizaciones, una barrera de perfusión presenta muchos pasajes de perfusión que son aproximadamente tan altos como el canal microfluídico, pero de aproximadamente 4 micras de ancho.

Un “dispositivo microfluídico” hace referencia a un dispositivo que tiene diversas estaciones o pocillos conectados por micro-canales a escala de micras en los que los fluidos mostrarán un comportamiento microfluídico en su flujo a través de los canales.

El término “matriz de micro-pocillos” hace referencia a una matriz de dos o más micro-pocillos formadas sobre un sustrato.

Un “dispositivo” es un término ampliamente utilizado en la técnica y abarca una amplia gama de significados. Por ejemplo, en su nivel más básico y menos elaborado, “dispositivo” puede significar simplemente un sustrato con características tales como canales, cámaras y puertos. A niveles más complejos de elaboración, el “dispositivo” puede además comprender un sustrato que incluye dichas características, u otras capas que tienen características microfluídicas que operan en conjunto o independientemente. En su nivel más elaborado, el “dispositivo” puede comprender un sustrato completamente funcional ajustado con un objeto que facilita la interacción entre el mundo externo y las características microfluídicas del sustrato. Un objeto de este tipo puede denominarse de diversas formas tales como un elemento portador, carcasa, alojamiento, o un término similar, tal como se trata más adelante. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “dispositivo” hace referencia a cualquiera de estas realizaciones o niveles de elaboración que el contexto puede indicar.

Los sistemas microfluídicos proporcionan una herramienta potente para llevar a cabo experimentos biológicos. Recientemente, la microfluídica basada en elastómeros ha ganado popularidad especialmente debido a su transparencia óptica, su permeabilidad al gas y sus sencillos métodos de fabricación. La presente invención implica una microfluídica integrada utilizada para diversas aplicaciones y sistemas de cultivo y ensayos, para proporcionar un control del calentamiento y la automatización de diversas manipulaciones de las placas de cultivo. Entre las ventajas de las realizaciones específicas se incluyen el uso de un formato de placa de micro-titulación de tamaño estándar, placas libres de tubos, y un ajuste sencillo y efectivo de las placas con un colector para proporcionar control de la recirculación de gas y del calentamiento.

De acuerdo con realizaciones adicionales de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, un sistema de carga de células novedoso utiliza un colector neumático y presión neumática para situar las células en el área de micro-cultivo. Con la adición de este sistema de carga de células, puede automatizarse completamente el cultivo celular microfluídico y su análisis utilizando otros equipos automatizados que existen para la manipulación de placas de titulación estándar. En la presente invención, se incorporan elementos de calentamiento y circulación de gas en el colector para proporcionar un sistema de micro-incubadora.

En realizaciones adicionales, puede utilizarse una configuración de cultivo por flujo activado por gravedad utiliza la diferencia de nivel del medio entre el pocillo de entrada y el de salida, además de la producción de resistencias fluidicas para lograr la tasa de flujo deseada en un régimen de nl/min, para hacer fluir “pasivamente” el medio de cultivo durante largos periodos de tiempo (p.ej., hasta 4 días) sin el uso de voluminosas bombas externas o tubos en

un entorno tal como una incubadora para controlar la temperatura, y entonces el colector con control térmico, tal como se proporciona en el presente documento, puede ser utilizado para el control del cultivo celular durante su observación.

5 En algunas realizaciones, un controlador de flujo neumático personalizado puede acoplarse a los conectores eléctricos y de gas en el colector, y de este modo utilizarse para cargar las células en las zonas de cultivo, para cambiar entre diferentes soluciones de exposición, y para controlar la temperatura de la zona de cultivo. Una interfaz de software digital puede utilizarse para permitir que un usuario programe entradas específicas (pulsos, rampas, etc.) a lo largo del tiempo para exponer las células a funciones complejas durante la toma de imágenes con time-lapse, a la vez que se mantiene o se varía la temperatura y la exposición al gas según se desee.

10 2. Sistema y matriz de cultivo microfluídico

Las solicitudes a las que se hacía referencia anteriormente trataban una variedad de diferentes configuraciones y técnicas de fabricación de cultivos celulares. Las partes de la operación de las áreas y materiales para los cultivos celulares son de utilidad como antecedentes para la presente discusión. En algunos ejemplos en las mismas, una o más áreas de micro-cultivo se conectan a un canal para el medio o el reactivo a través de una red de pasajes 15 fluidicos (o entradas o conductos de difusión), en donde la red comprende una pluralidad de pasajes de perfusión de alta resistencia fluidica que se entrecruzan. En un ejemplo tratado, los pasajes en la red son de aproximadamente 1 a 4 μm de altura, de 25 a 50 μm de longitud y de 5 a 10 μm de ancho, permitiendo la red una difusión más uniforme entre los canales para el medio o el reactivo y el área de cultivo, y permitiendo una fabricación más sencilla y una difusión más uniforme. La solicitud anterior además discutía que la elevada relación de resistencia fluidica entre la 20 micro-cámara y los pasajes de perfusión/difusión o la red (p.ej., relaciones en el rango de aproximadamente 10:1, 20:1 a 30:1) ofrece muchas ventajas para el cultivo celular tales como: (1) exclusión por tamaños de las células; (2) localización de células en el interior de una micro-cámara; (3) proporcionar un entorno fluidico uniforme para el crecimiento celular; (4) capacidad para configurar matrices de micro-cámaras o áreas de cultivo; (4) facilidad de fabricación, y (5) gestión de reactivos sin una red extensa de válvulas. Se ilustraron ejemplos en los que una barrera de perfusión a modo de red puede ser más corta que el área de cultivo o puede estar cerca de o a la misma altura 25 que ésta, y además en donde se ilustraron diversas configuraciones para dispositivos de cultivo.

3. Colector neumático con control térmico

Tal como se ha tratado anteriormente, una dificultad en una serie de sistemas de cultivo es cómo controlar el calentamiento y la temperatura del área de cultivo, a la vez que se permite la observación de los procesos celulares. 30 Las soluciones previas se han basado en fuentes de calor aplicadas a la placa de pocillos, por ejemplo, desde el visualizador del microscopio, (por ejemplo, véase la FIG. 11), o bien en contener todo el sistema en un entorno controlado.

La presente invención proporciona un sistema de cultivo mejorado situando todos, o casi todos, los controles de calor y gas en o acoplados a un colector normalmente extraíble que en realizaciones preferidas está configurado para que sea operativo sin interferir con el equipo observacional. La invención se entenderá más fácilmente en referencia a los ejemplos específicos ilustrados, aunque estos ejemplos pretenden ser ilustrativos y no limitativos. La FIG. 1 muestra una vista lateral de un ejemplo de colector a modo de micro-incubadora de acuerdo con realizaciones específicas de la invención, que se muestran en su lugar en un sistema de micro-incubadora con una 35 placa de pocillos y un visualizador de microscopio. La FIG. 2 ilustra un ejemplo de una vista en planta superior de un colector con un controlador térmico de acuerdo con las realizaciones específicas de la invención. La FIG. 3 ilustra un ejemplo de una vista superior de un colector con un controlador térmico sellado a una placa de pocillos y montado en un visualizador de microscopio de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. La FIG. 4 ilustra un ejemplo de una placa de cultivo con cuatro unidades de cultivo situadas en una placa de 96 pocillos según el estándar de la SBS. Este ejemplo muestra cuatro unidades de cultivo (correspondientes a las filas indicadas A-D) 45 con seis pocillos de entrada (indicados A1-D6), cuatro áreas de cultivo microfluídico situadas bajo el óvalo de visualización grande, y dos pocillos de salida (7-8).

Por tanto, de acuerdo con realizaciones específicas, un colector a modo de micro-incubadora puede interconectarse con una variedad de placas microfluídicas y proporciona uno o más de entre el control de la carga de células, de la perfusión, de la temperatura y del ambiente gaseoso. Un intercambiador de calor de convección añade o retira calor a la mezcla de gas utilizando un dispositivo termoeléctrico de efecto Peltier. Las células se mantienen calientes a través del calor conducido desde la mezcla de gas caliente, y la concentración de gas deseada se difunde en los 50 medios que rodean las células a través de una membrana permeable al gas en la placa microfluídica.

Tal como puede verse en la FIG. 1, cuando el colector de acuerdo con realizaciones específicas se encuentra en su lugar sobre una placa de cultivo, se forma una cámara de gas sellada desde el intercambiador de calor, bajo el 55 colector y hacia el interior del área encima de la microfluídica del cultivo. El gas introducido en el área sobre la microfluídica se hace circular mediante un ventilador u otro medio de circulación del gas en el intercambiador de

calor, proporcionando de este modo el control tanto del ambiente gaseoso como de la temperatura sobre el área de cultivo utilizando el colector.

5 Este diseño, de acuerdo con realizaciones específicas de la invención, resuelve el problema de proporcionar un calentamiento efectivo en un pequeño espacio para administrar la temperatura controlada a las propias células a la vez que se controla también la composición del gas. De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, el colector a modo de micro-incubadora incluye tanto una entrada de gas como un ventilador de recirculación para controlar la composición del gas.

10 En el ejemplo de implementación que se muestra en la FIG. 1, los gases controlados y presurizados se introducen en el colector a través de las líneas 5 de gas. La sección neumática del colector se muestra, por razones de conveniencia, en este ejemplo en dos piezas, la pieza 10a superior y la pieza 10b inferior, que comprende una junta para ajustar herméticamente la placa 20, donde la placa contiene una cantidad de pocillos 22. La operación neumática del colector y su ajuste a la placa de pocillos es tal como se describe en las solicitudes de patente a las que se hace referencia en el presente documento. El colector además incluye un módulo 40 de intercambio de calor, con aletas 42 de intercambio de calor internas y una placa 44 a modo de cubierta transparente (p.ej., de vidrio o acrílica). Cuando el colector se encuentra situado sobre la placa 10, la zona abierta sobre las áreas de cultivo se conecta con el elemento de calentamiento para crear una zona 30 de circulación de gas. Para mostrar el dispositivo en contexto, se ilustran elementos 102 y 104 de microscopía e iluminación, ya que se utilizan generalmente durante la operación. La placa de pocillos puede ser cualquier placa de pocillos, estándar o personalizada, tal como se describe en el presente documento. Podrá entenderse a partir de las enseñanzas/contenidos proporcionados en el presente documento que se construyen diferentes configuraciones del colector 40 para adaptarse a diferentes diseños de placas de pocillos.

Recirculación en el colector

25 En este ejemplo de diseño, los controles y elementos de gas y de calentamiento se encuentran contenidos en su totalidad en el colector, y el colector puede ajustarse con cualquier cantidad de placas de micro-pocillos configuradas de forma diferente, incluyendo placas de micro-pocillos que no presentan ninguna modificación específica para permitir que reciban una fuente de calor.

De acuerdo con realizaciones específicas, se utilizan dos ventiladores en el elemento de intercambio de calor, uno para hacer circular el gas sellado en el área de gas y uno para interactuar con el intercambiador de calor.

30 Las FIG. 5A-D son dibujos esquemáticos de un ejemplo de implementación de un colector con un controlador térmico desde diversas vistas, de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. Las secciones neumáticas del colector funcionan de forma similar a los diseños divulgados anteriormente. El módulo de intercambio de calor se describe en mayor detalle a continuación.

Módulo de intercambio de calor del colector

35 Un módulo de intercambio de calor en un ejemplo de realización, controla la temperatura dentro de la cámara mediante los ciclos de aire a una temperatura deseada. El control de temperatura se encuentra previsto mediante un módulo termoelectrico de efecto Peltier, que son dispositivos bien conocidos que convierten una corriente eléctrica en un gradiente de temperatura y pueden además ser utilizados como controlador de temperatura que o bien calienta o bien enfría. Aunque pueden utilizarse otras fuentes de calentamiento en un colector de la invención, un módulo Peltier es un mecanismo preferido actualmente, ya que puede incorporarse completamente en el módulo de intercambio de calor y en el colector.

Un módulo de intercambio de calor en un ejemplo de implementación tiene tres piezas principales: (1) una carcasa superior de metal; (2) una carcasa inferior de plástico y (3) un colector con un corte ovalado que permite que el aire fluya en el interior de la cámara de cultivo celular de la placa y realice el ciclo de vuelta al exterior.

Carcasa inferior de plástico

45 La FIG. 6(A) ilustra la parte inferior de un módulo de intercambio de calor de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. La parte inferior se acopla a la sección neumática del colector. (B) ilustra la parte superior de un módulo de intercambio de calor de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. La carcasa de plástico de la parte inferior puede acoplarse a la parte superior del colector (por ejemplo mediante tornillos o un adhesivo o mediante otros medios). La parte inferior de esta carcasa presenta un corte de dos vías de flujo de 2 mm de profundidad. Estas vías convergen en una sobre la cámara de toma de imágenes. Cuando convergen, la profundidad de la vía llega hasta los 3 mm. Alrededor de la periferia de la vía de flujo se encuentra una junta tórica que evita el intercambio de aire entre la vía de flujo y el entorno. El tamaño de las vías de flujo debe ser lo suficientemente ancho para permitir que una cantidad deseable de flujo circule en el interior de la cámara de cultivo

celular. Esto reduce la diferencia de temperatura en la zona de cultivo celular de la placa y el módulo de intercambio de calor (en la ubicación de la sonda de temperatura).

5 Un perfil extruido vertical se asienta sobre las vías. Contiene 3 cámaras. Sobre una vía de flujo se encuentra un disipador de calor y sobre la otra se asienta un ventilador. La tercera cámara se conecta con otra cámara en la carcasa superior de metal para crear un espacio para una placa PCB (placa de circuito impreso) que conecta los cables del módulo Peltier, una pequeña sonda de temperatura, un relé, conexiones con el controlador de la micro-incubadora y dos dispositivos de corte térmico (uno para cada disipador de calor). La sonda de temperatura sigue una trayectoria desde la cámara electrónica a través de un orificio roscado en el ventilador y hacia el interior de la parte superior de su vía de flujo para medir la temperatura del aire que circula en ciclos por ella.

10 La carcasa de plástico también presenta un corte desde la parte superior que forma un marco para una pieza de vidrio de 2 mm. Esta pieza de vidrio se asiente justo encima de la cámara de cultivo celular para crear una condición óptima para la toma de imágenes de microscopio sin interrumpir el calentamiento.

Carcasa superior de metal

15 La carcasa superior de metal (FIG. 6B) presenta características a modo de perfil extruido en forma de aletas que actúan como un disipador de calor para el otro lado del módulo Peltier. Además, contiene opcionalmente una cámara para un segundo ventilador para acelerar el proceso de enfriamiento además de un espacio para un dispositivo térmico de corte que se conecta con la cámara electrónica de la carcasa inferior de plástico.

20 Después de que se sitúe el ventilador en el interior de la carcasa y el dispositivo térmico de corte se acople a la cámara más pequeña, se aplica grasa térmica a la parte superior del módulo de Peltier para acoplarlo a la carcasa superior de metal. En un ejemplo específico, la parte inferior de la carcasa de plástico se sujeta de forma segura a la carcasa superior, por ejemplo utilizando tornillos o un adhesivo.

25 Cuando la temperatura en la zona de cultivo celular ha de elevarse, el módulo de Peltier calienta el disipador de calor inferior enfriando el disipador de calor superior. El ventilador inferior sopla aire caliente a través del disipador de calor inferior hacia el interior de la vía de flujo bajo el mismo. El aire caliente se introduce en la cámara de cultivo celular a medida que el aire más frío se hace circular de regreso hacia el ventilador. Cuando la temperatura en la zona de cultivo ha de reducirse, el módulo de Peltier enfría el disipador de calor inferior elevando la temperatura en el superior (hasta la temperatura ambiente).

30 La FIG. 7 es una vista lateral esquemática de las secciones neumáticas de un colector sellado a una placa de cultivo y que muestra el gas en unas líneas que se conectan a un volumen de control del entorno de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

La FIG. 8 es un esquema que muestra cómo un colector se interconecta con una placa microfluídica de acuerdo con realizaciones específicas en donde se crea un sellado positivo aplicando un vacío a la cavidad que rodea todos los pocillos. La unidad de calentamiento no se muestra en esta figura.

4. Colector neumático anterior

35 Aunque la gravedad o la carga pasiva es efectiva para algunos dispositivos microfluídicos de cultivo celular, y deseable en algunos ejemplos, un colector neumático con derecho de propiedad se ha descrito previamente en las solicitudes a las que se ha hecho referencia anteriormente. Este puede ajustarse a la placa y se aplica presión neumática al área de entrada de células para la carga de las células y para el cultivo durante los ensayos de invasión. La FIG. 10A-C muestra una vista superior, una vista lateral y una vista en planta de un esquema de un ejemplo de
40 colector neumático de acuerdo con diseños anteriores. En este ejemplo, las ocho líneas de tubos a la derecha son para aire comprimido, y cada una está configurada para proporcionar presión a una columna de pocillos de entrada de células en una matriz microfluídica. La línea más a la izquierda en la figura es para vacío y se conecta a un anillo de vacío exterior alrededor del colector. El colector se sitúa sobre una placa de pocillos estándar. Una junta de goma se coloca entre la placa y el colector, con orificios que coinciden con el colector (no se muestran). La línea de vacío crea un vacío en las cavidades entre los pocillos, sujetando la placa y el colector entre sí. La presión se aplica a los
45 pocillos para conducir el líquido hacia el interior de los canales microfluídicos (no se muestran). Se utiliza una presión habitual de 1 psi; por lo tanto la fuerza del vacío es suficiente para mantener un sellado estanco al aire. En un ejemplo, hay 9 líneas de tubos hacia el controlador de presión: 8 líneas son para aire comprimido y 1 línea es para el vacío (más a la izquierda). En ejemplos de realizaciones específicas, cada columna se conecta a una única
50 línea de presión. Las columnas sobre las zonas de imágenes de células se omiten.

Se ha observado que la carga de células presurizada es particularmente efectiva a la hora de preparar cultivos de células agregadas (p.ej., de tumores sólidos, hígado, musculares, etc.). La carga de células presurizadas también permite que estructuras con zonas de cultivo alargadas se carguen de manera efectiva. El uso de un colector

presurizado para la carga de células y el flujo pasivo para las operaciones de perfusión permite que la invención utilice un diseño muy simple de dos entradas, sin la necesidad de pocillos y/o válvulas de entrada tal como se utilizan en otros diseños.

5 Aunque este colector es efectivo para la carga de células y algunas tareas de perfusión, el colector no proporcionaba de forma efectiva una recirculación de gas por el área de cultivo, o cualquier control térmico. Tal como se ilustra en la figura, se suministró calentamiento cuando fue necesario desde el lado opuesto de la placa de cultivo, por ejemplo, de la zona cercana del visualizador del microscopio.

10 El colector de la placa opcionalmente también incluye una "línea de gas" adicional que se utiliza para bañar las células en el dispositivo microfluídico con un ambiente gaseoso específico (por ejemplo, CO₂ al 5%). Otros ejemplos incluyen el control de oxígeno y nitrógeno, pero puede enviarse cualquier mezcla gaseosa a las células. El gas fluye a través del colector hacia el interior de los pocillos sellados encima del área de cultivo y los orificios en el dispositivo microfluídico permiten que el gas fluya en los canales microfluídicos de aire específicos, tal como se ha descrito anteriormente. La capa del dispositivo permeable al gas (PDMS) permite que el gas se difunda en el medio de cultivo antes de la exposición de las células. Haciendo fluir el gas continuamente a través de la placa microfluídica se mantiene un ambiente gaseoso estable. Esto proporciona un medio opcional para controlar el ambiente gaseoso para colocar la placa microfluídica en una incubadora.

La FIG. 12 ilustra un ejemplo de un sistema microfluídico de perfusión (ONIX™), un controlador y colector de micro-incubadora (MIC) y un sistema de control por ordenador de acuerdo con realizaciones específicas de la invención.

20 Solo como un ejemplo, la FIG. 14 ilustra una alternativa de diseño de una placa y de unidad de cultivo, con un ejemplo de una unidad de cultivo llena con un colorante azul con la imagen tomada desde la parte superior. Sin embargo, cualquier unidad de cultivo en cualquier configuración de placas de cultivo puede utilizarse con un colector dimensionado de forma correcta. Esto incluye unidades con la parte superior abierta, unidades de invasión, unidades miméticas del hígado, unidades de gel, etc., tal como se describe en las solicitudes a las que se ha hecho referencia anteriormente.

25 Ensayo y/u observación celular

El ensayo celular puede ser realizado directamente en el cultivo celular microfluídico utilizando kits estándar de reactivos basados en óptica (p.ej., fluorescencia, absorbancia, luminiscencia, etc.). Por ejemplo, se ha demostrado un ensayo de viabilidad celular que utiliza la conversión de un sustrato a una molécula fluorescente mediante células vivas (reactivo CellTiter Blue de Promega Corporation). El reactivo es dispensado en el depósito de entrada de flujo y expuesto a las células mediante perfusión por gravedad durante un periodo de tiempo (p.ej., 21 horas). Para una introducción más rápida de un reactivo u otro fluido, puede añadirse el nuevo fluido al depósito de entrada de flujo, seguido de la aspiración del depósito de entrada de células.

30 Los datos pueden recopilarse directamente en las células/líquido en la placa microfluídica, tal como colocando la placa en un lector de placas de fluorescencia (p.ej., el modelo Synergy 2 de Biotek Instruments). En algunas reacciones, el sustrato puede difundirse en el medio de salida, y por lo tanto puede detectarse fácilmente en el depósito de entrada de células. Para ensayos con imágenes de células, la placa puede situarse en un microscopio de escaneo o en un sistema de análisis masivo de imágenes. Por ejemplo, puede utilizarse una estación automática de microscopio invertido Olympus IX71 para capturar la viabilidad de células de hígado cultivadas con una lente de objetivo 20X.

40 Llenando/aspirando repetidamente los pocillos, las células pueden mantenerse durante largos periodos de tiempo con un mínimo esfuerzo (p.ej., en comparación con "biorreactores" estándar que requieren una preparación estéril extensa de grandes depósitos de fluido que no pueden intercambiarse fácilmente durante la operación).

Ejemplo de cultivo celular

45 Se cultivaron células utilizando el sistema de micro-incubación para controlar la temperatura y la atmósfera de gas. En un ejemplo, se cultivaron células cancerígenas humanas (HT-1080, MCF-7, MDA-MB-231) a 37°C y CO₂ al 5% para monitorizar la división celular durante 24 horas. Tipos adicionales de células, incluyendo levadura, bacterias, células primarias, neuronas, etc., han sido cultivadas con éxito utilizando el sistema de micro-incubación. Como ejemplo, la FIG. 13 muestra fibroblastos de ratón NIH-3T3 cultivados utilizando el sistema de micro-incubación de acuerdo con realizaciones específicas de la invención en un tiempo t=0 (izquierda) y después de 15 horas (derecha), que muestran crecimiento y viabilidad celular. Cuando no se controló la temperatura o el CO₂, las células murieron rápidamente en 2 horas.

Sistemas integrados

Los sistemas integrados para la recopilación y el análisis de datos celulares y otros datos, además de para la compilación, almacenamiento y acceso de las bases de datos, incluyen habitualmente un ordenador digital con software que incluye un conjunto de instrucciones para la búsqueda y/o el análisis de secuencias, y, opcionalmente, uno o más de entre software de control de muestras de alto rendimiento, software de análisis de imágenes, software para la interpretación de datos recopilados, una armadura de control robótico para transferir soluciones desde una fuente hasta un destino (tal como un dispositivo de detección) ligado operativamente al ordenador digital, un dispositivo de entrada (p.ej., un teclado de ordenador) para introducir los datos objeto en el ordenador digital, o para controlar las operaciones de análisis o transferir muestras de alto rendimiento mediante la armadura de control robótico. Opcionalmente, el sistema integrado comprende además válvulas, gradientes de concentración, multiplexores fluidicos y/u otras estructuras para interconectarse con una micro-cámara, tal como se ha descrito.

Pueden emplearse recursos de hardware computacional con fácil disponibilidad que utilizan sistemas operativos estándar, y modificarse de acuerdo a los contenidos previstos en el presente documento, p.ej., un PC (sería suficiente con DOS™, OS2™, WINDOWS™, WINDOWS NT™, WINDOWS95™, WINDOWS98™, LINUX, o incluso un Macintosh, Sun o PCs, compatibles con chip Intel x86 o Pentium) para su uso en los sistemas integrados de la invención. La técnica actual en cuanto a la tecnología de software es adecuada para permitir la implementación de los métodos que se enseñan en el presente documento en un sistema de ordenador. Se describe un conjunto de instrucciones lógicas (instrucciones codificadas ya sea para software o hardware) para realizar uno o más de los métodos tal como se han enseñado en el presente documento. Por ejemplo, puede construirse software para proporcionar el análisis de datos y/o estadístico por parte de un experto en la técnica utilizando un lenguaje de programación tal como Visual Basic, Fortran, Basic, Java, o similar. Tal software puede también construirse utilizando una variedad de lenguajes de programación, juegos de herramientas o librerías estadísticas.

La FIG. 17 muestra un aparato de información (o dispositivo digital) 700 que puede entenderse como un aparato lógico que puede leer instrucciones desde unos medios 717 y/o un puerto 719 de red, que puede conectarse opcionalmente a un servidor 720 con medios 722 fijos. El aparato 700 puede utilizar a partir de ahí esas instrucciones para dirigir la lógica de servidor o de cliente, tal como se entiende en la técnica. Un tipo de aparato de lógica es un sistema de ordenador tal como se ilustra en la referencia 700, que contiene una CPU 707, dispositivos 709 y 711 de entrada opcionales, unidades 715 de disco y un monitor 705 opcional. Los medios 717 fijos, o los medios 722 fijos sobre el puerto 719, pueden utilizarse para programar dicho sistema y pueden representar un medio magnético u óptico de tipo disco, cinta magnética, una memoria dinámica o estática de estado sólido, etc. Puede también utilizarse un puerto 719 de comunicaciones para recibir instrucciones inicialmente que se utilizan para programar un sistema de este tipo y puede representar cualquier tipo de conexión de comunicaciones.

Pueden utilizarse diversos métodos y algoritmos de programación, incluyendo algoritmos genéticos y redes neuronales, para realizar aspectos de las funciones de recopilación, correlación y almacenamiento de datos, además de otras funciones deseables, tal como se ha descrito en el presente documento. Además, los sistemas digitales o analógicos tales como sistemas digitales o analógicos de ordenador, pueden controlar una variedad de otras funciones tales como la visualización y/o el control de archivos de entrada y salida.

Sistema automatizado de auto-sellado

La FIG. 18 es un diagrama de bloques que muestra un sistema accionado por pistón automático de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. Se utiliza un dispositivo de auto-sellado similar a un lector de placas utilizado en biotecnología, donde la principal diferencia es el diseño del componente del sistema para permitir una manipulación automatizada de las placas microfluídicas. En esta implementación, el sellado positivo entre el colector y la placa microfluídica se logra aún mediante la aplicación de vacío a las áreas intersticiales, pero la fuerza descendente inicial necesaria se aplica mecánicamente. El área sobre el colector se encuentra despejada para permitir el acceso por parte de un elemento gestor de líquidos automatizado tal como Tecan EVO. Los sensores de vacío y presión, además de los sensores de presencia de la placa y posición del elemento portador permiten una gestión de errores basada en software inteligente. La FIG. 18B es una secuencia de imágenes que muestra cómo el dispositivo de sellado automático acepta y sella el colector a la placa microfluídica. Un único actuador lineal neumático (p.ej., un pistón) proporciona movimiento horizontal y vertical. Se ha observado que esa única operación permite un control más preciso del colector y la placa y mantiene la placa en su lugar durante la operación del colector neumático.

REIVINDICACIONES

1. Sistema microfluídico de cultivo celular que comprende:

al menos una unidad de cultivo configurada en una placa de cultivo que comprende:

una cámara de cultivo microfluídica;

5 una barrera de perfusión que separa dicha cámara de cultivo microfluídica de uno o más canales de flujo del medio;

una pluralidad de canales de entrada independientes;

un pocillo de perfusión;

un depósito de salida en relación fluido-comunicante con dicha cámara de cultivo microfluídica; y

10 un colector neumático;

en donde la placa de cultivo se sella positivamente a dicho colector neumático, permitiendo el control accionado por presión de la pluralidad de canales de entrada independientes, de manera que las soluciones pueden cambiarse rápidamente sobre las células o pueden ser multiplexadas o combinadas en la cámara de cultivo microfluídica;

15 en donde dicho colector neumático además comprende un módulo de intercambio de calor para proporcionar un gas en circulación controlado térmicamente en un volumen de gas contenido en dicha cámara de cultivo microfluídica.

2. El sistema según la reivindicación 1 en donde dicha barrera de perfusión se utiliza para reducir la presión del flujo desde dichos canales de entrada a dicha cámara de cultivo microfluídica.

3. El sistema según la reivindicación 1 o 2 en donde dicha barrera de perfusión se utiliza para contener un medio de gel en dicha cámara de cultivo microfluídica.

20 4. El sistema según la reivindicación 1 y opcionalmente también cualquier combinación según la reivindicación 2 a la reivindicación precedente, en donde dicha barrera de perfusión rodea mayoritariamente la cámara de cultivo microfluídica desde uno o más canales de flujo del medio.

5. El sistema según la reivindicación 1, que además comprende un sistema de gestión automática para sellar el colector neumático a la placa de cultivo microfluídico que comprende:

25 un cilindro actuador lineal neumático (p.ej., un pistón);

uno o más sensores de posición;

dos brazos para sujetar el colector desde los lados, sin bloquear una vista a través de la parte superior del colector;

un elemento portador para placas y elementos de agarre de las placas para sostener la placa de cultivo;

30 dicho sistema configurado de manera que el movimiento del cilindro causa que el elemento portador de la placa se desplace horizontalmente hasta una posición bajo dicho colector;

dicho sistema configurado de manera que el movimiento del cilindro cause que el colector descienda sobre la placa.

6. El sistema según la reivindicación 5 en donde además:

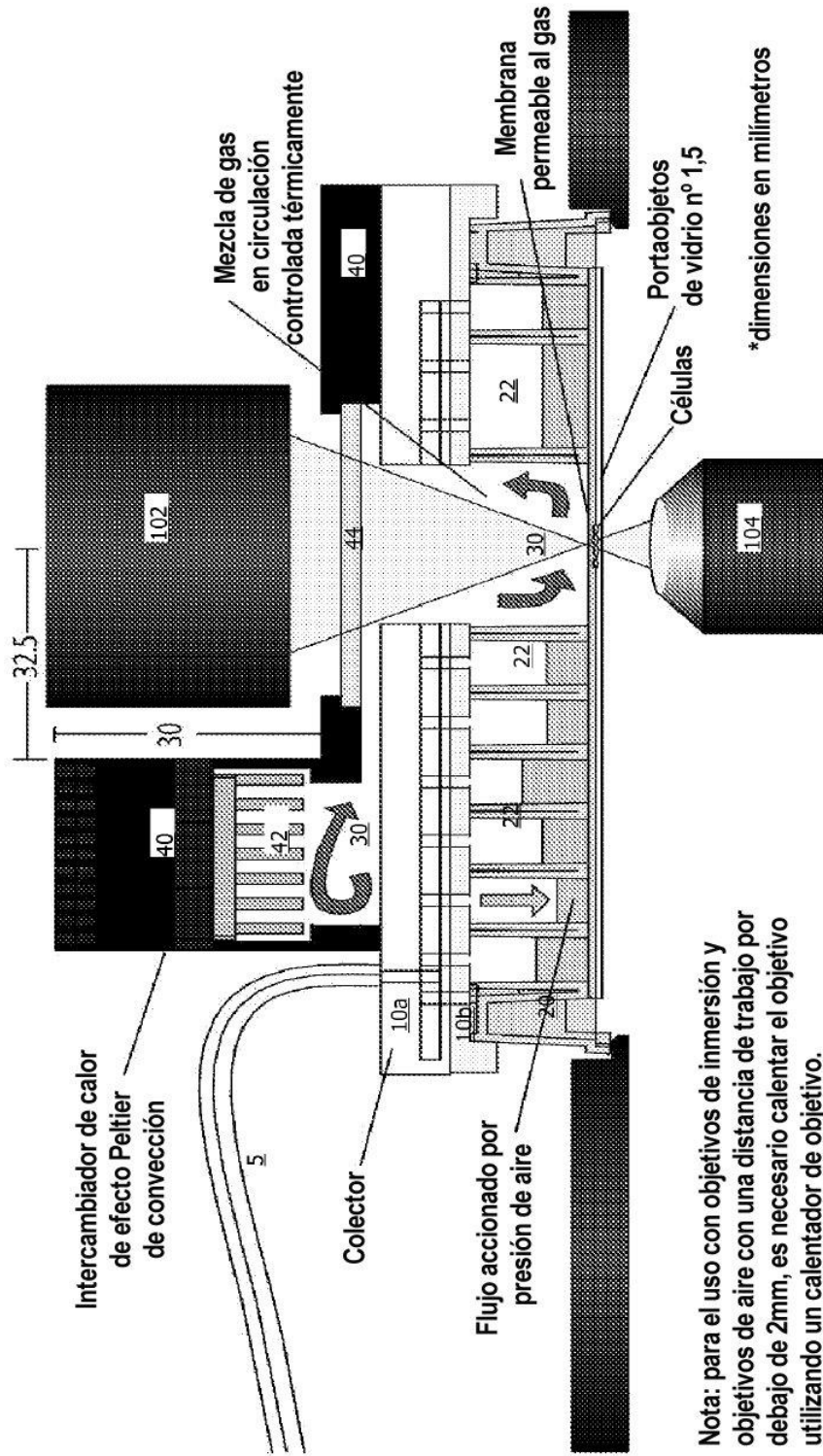
35 el cilindro se acopla a los brazos de manera que el cilindro proporciona un movimiento tanto horizontal como vertical.

7. El sistema según la reivindicación 5 o reivindicación 6 en donde además:

dicho sellado positivo entre el colector y la placa de cultivo microfluídico se logra aplicando vacío a través del colector a las áreas intersticiales de la placa de cultivo microfluídico, mientras que la fuerza descendente inicial necesaria se aplica de forma mecánica.

8. El sistema según la reivindicación 1, en donde se utiliza presión por gravedad para conducir la perfusión.
- 5 9. El sistema según la reivindicación 1, que además comprende una entrada de células en relación fluido-comunicante con dicha cámara de cultivo.
10. El sistema según la reivindicación 1, que además comprende una zona de circulación formada por el sellado positivo de dicho colector neumático a dicha placa de cultivo microfluídico.
- 10 11. El sistema según la reivindicación 10, en donde dicho módulo de intercambio de calor además comprende un ventilador para hacer circular gas dentro de dicha zona de circulación de gas.
12. El sistema según la reivindicación 1, en donde dicho módulo de intercambio de calor comprende un intercambiador de calor por convección.
13. El sistema según la reivindicación 12, en donde dicho intercambiador de calor por convección comprende aletas de intercambio de calor.
- 15 14. El sistema según la reivindicación 1, en donde dicho colector neumático además comprende una entrada de gas.

FIG. 1



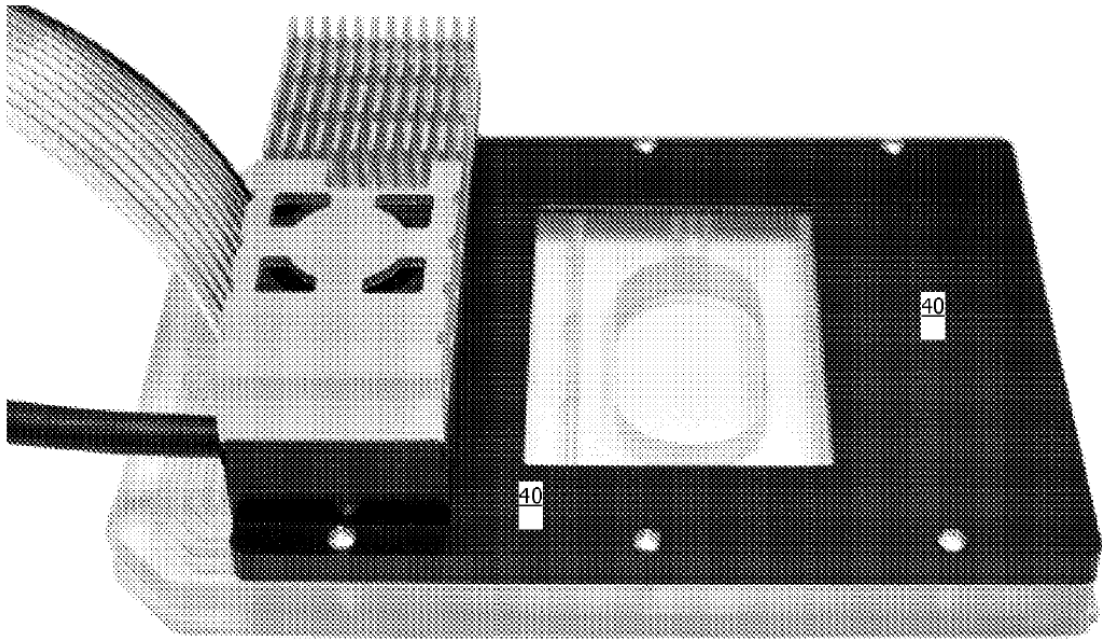


FIG. 2

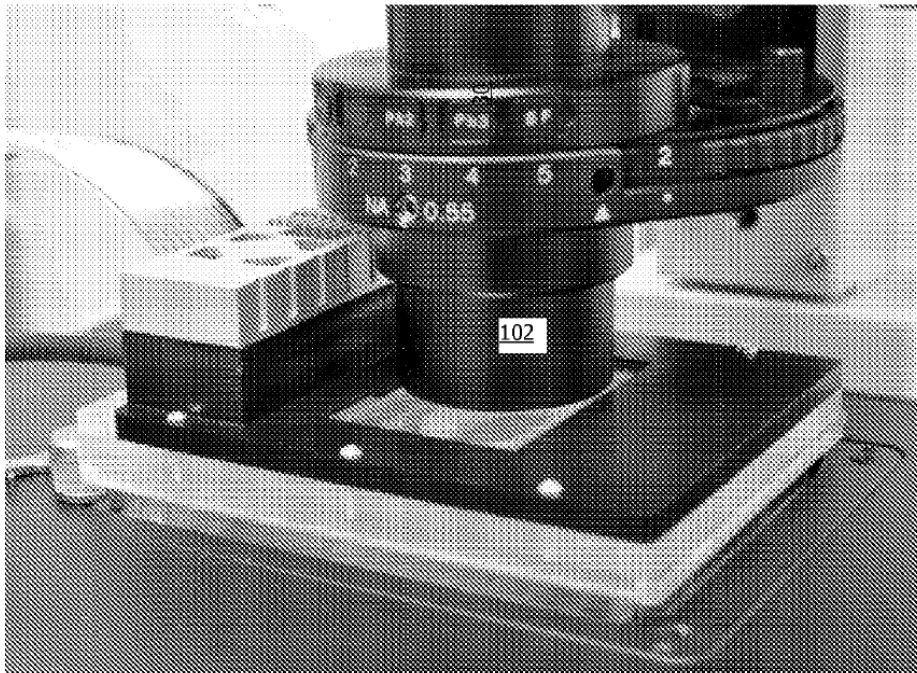


FIG. 3

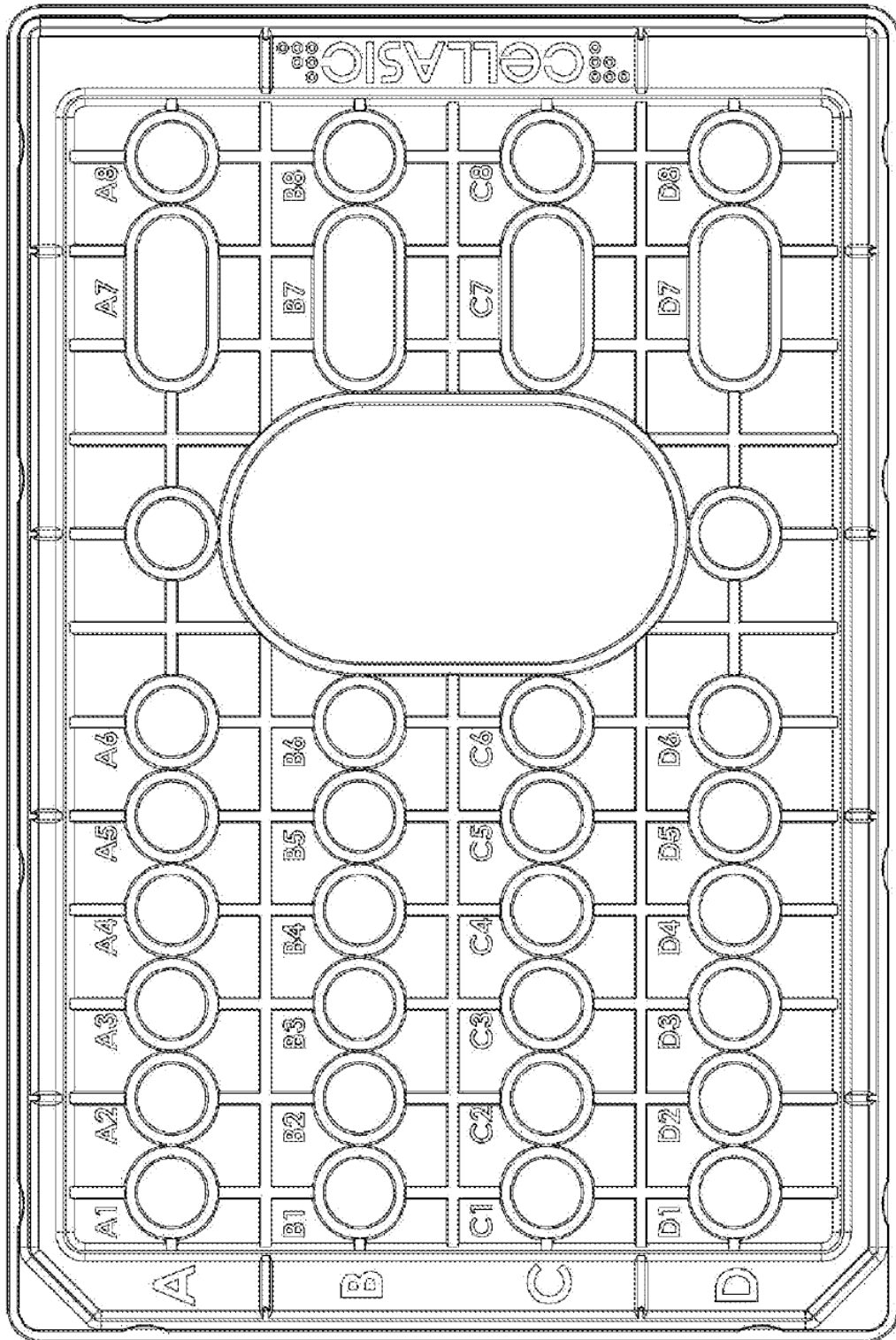


FIG. 4

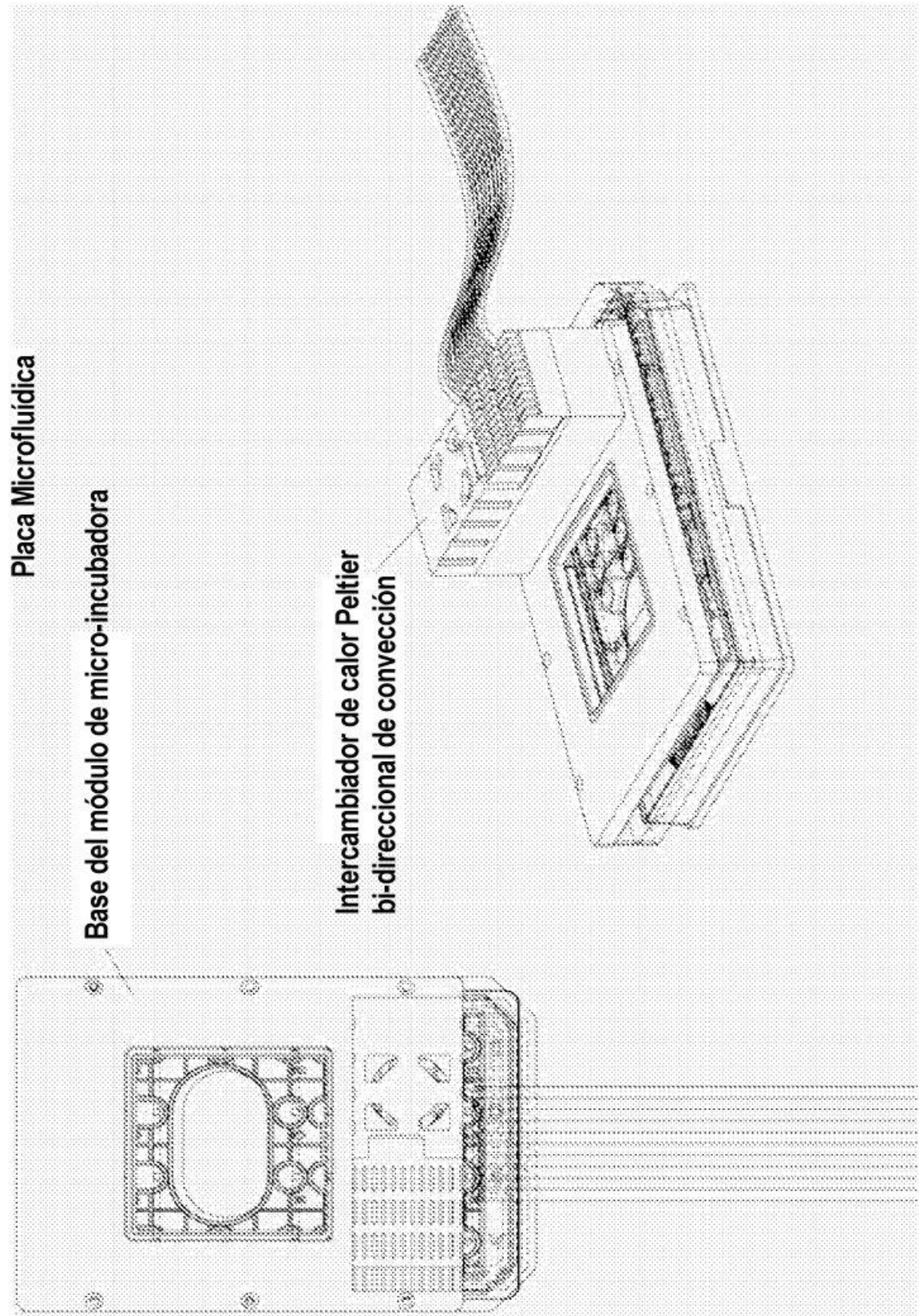


FIG. 5A

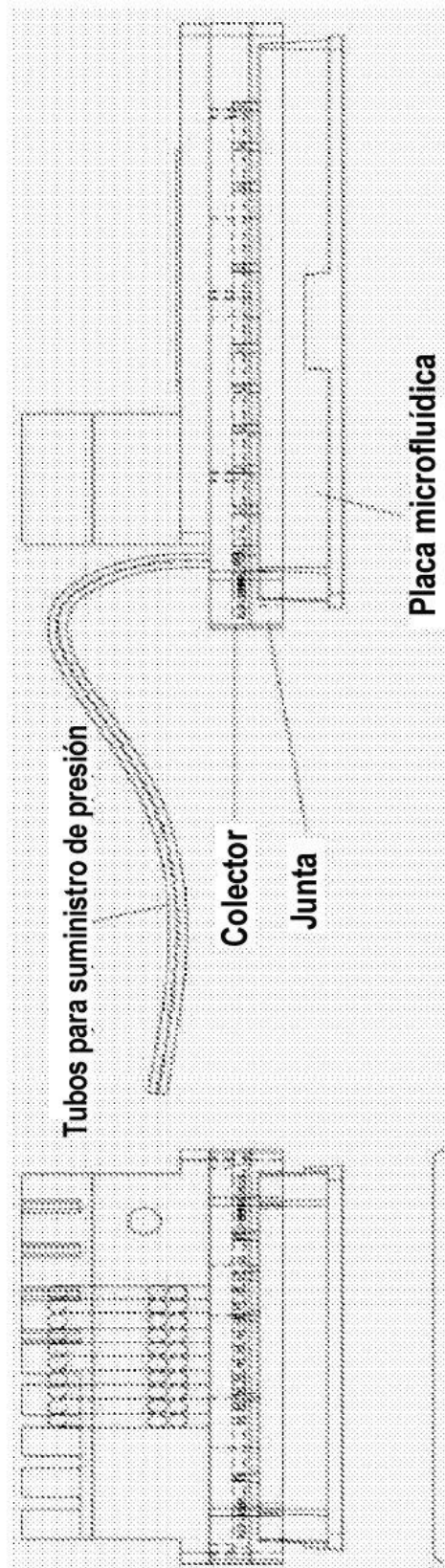


FIG. 5B

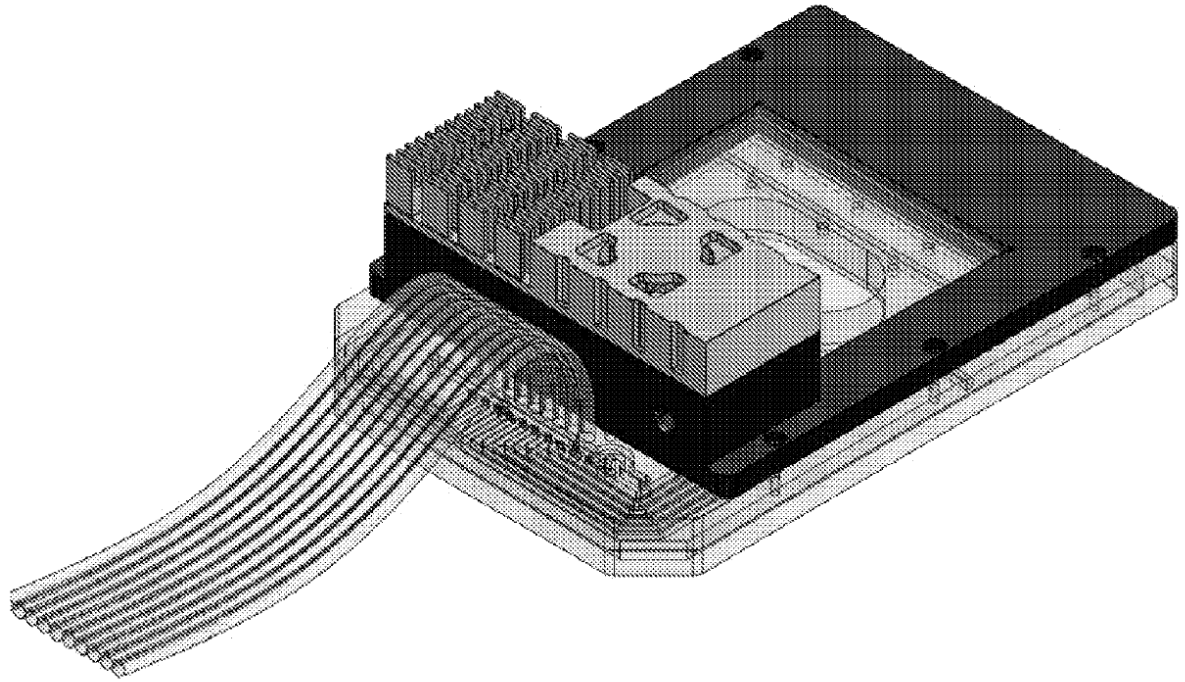


FIG. 5C

Nº OBJETO	NÚMERO DE PIEZA	CANTIDAD
1	PARTE INFERIOR CARCASA	1
2	DISIPADOR DE CALOR INFERIOR	1
3	VENTILADOR	2
4	MÓDULO PELTIER	1
5	PARTE SUPERIOR CARCASA	1
6	PIEZA DE VIDRIO	1
7	COLECTOR F84	1
8	JUNTA DE 5mm	1

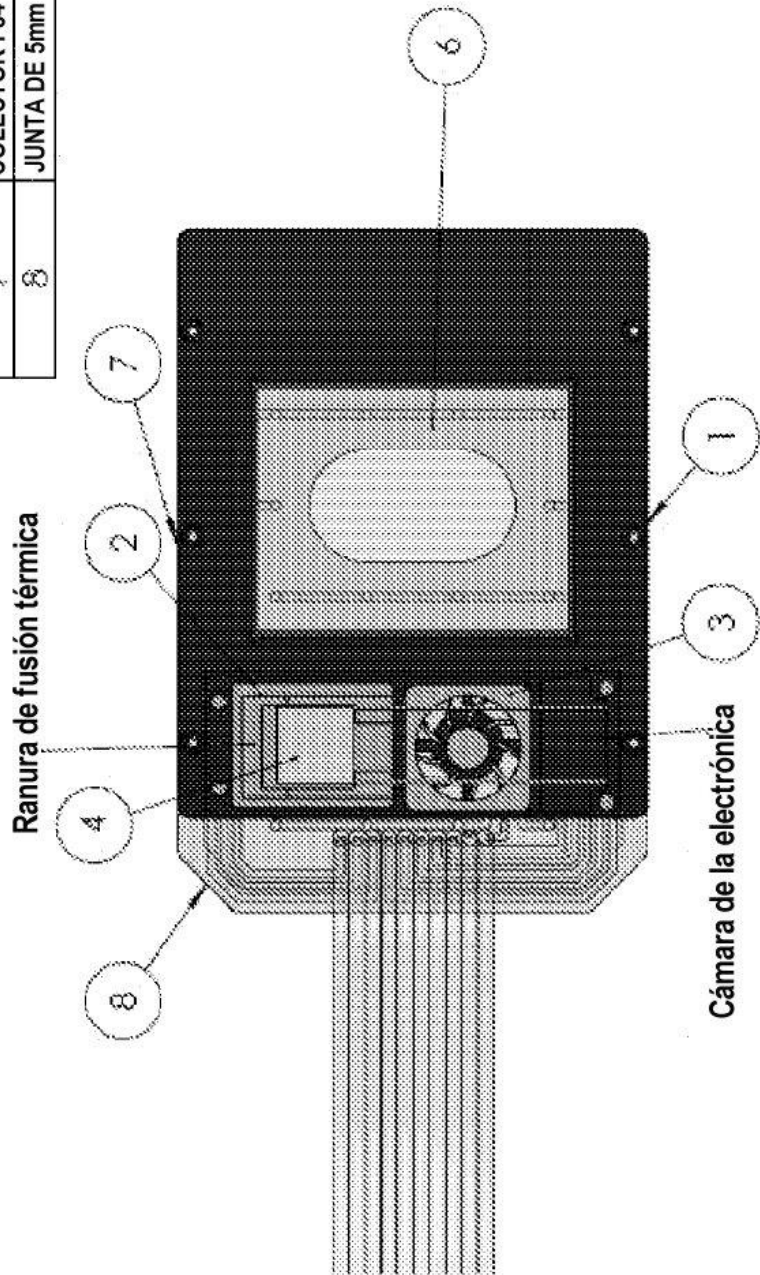


FIG. 5D

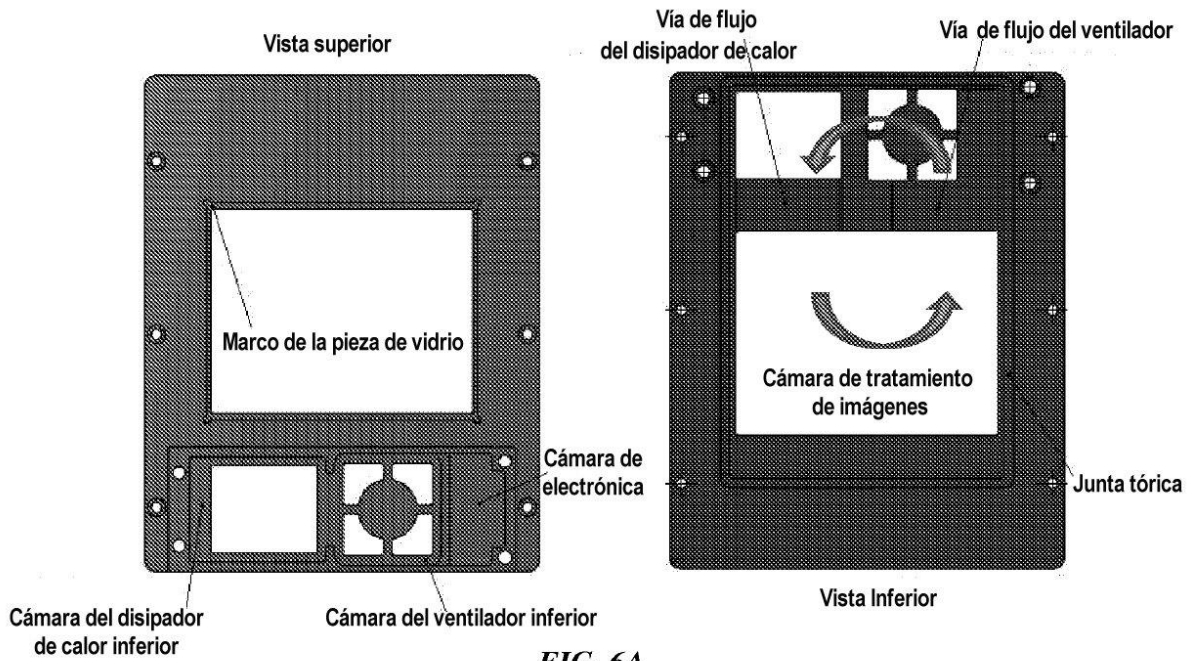


FIG. 6A

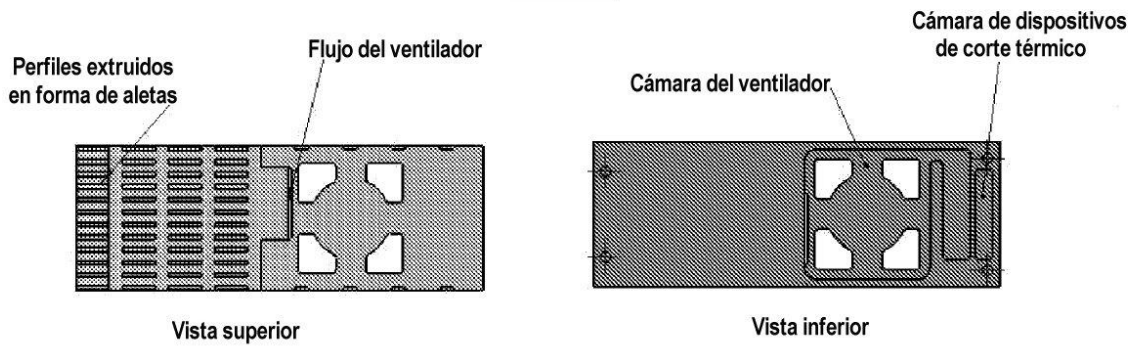
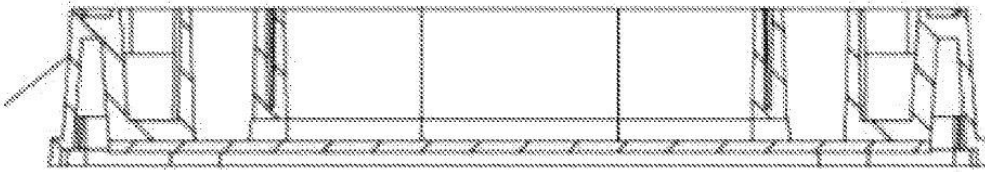
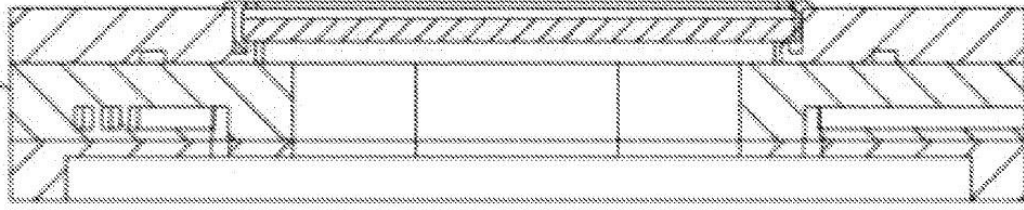


FIG. 6B

Sección A-A (Estado Abierto)



Sección A-A (Estado sellado)



Entrada mezcla de gas

Salida mezcla de gas

Volumen de entorno controlado

FIG. 7

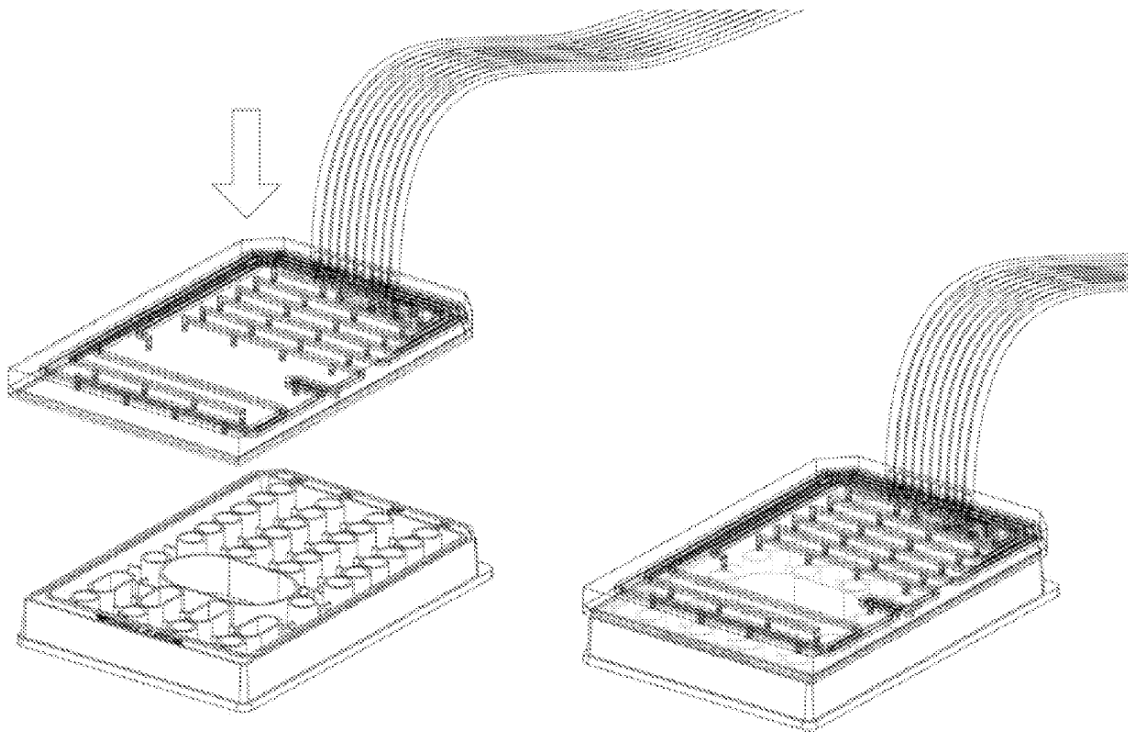


FIG. 8

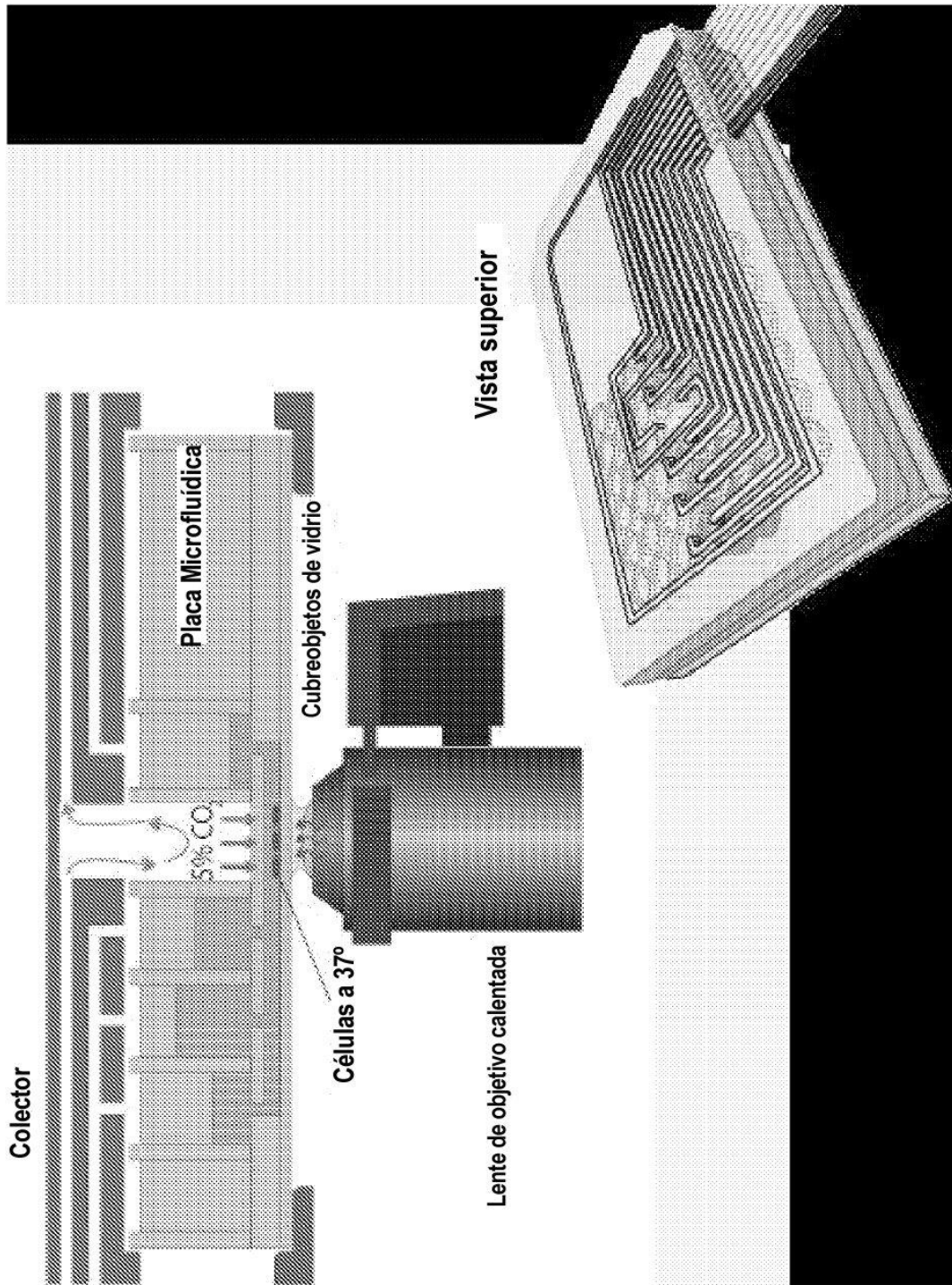


FIG. 9(DISEÑO ANTERIOR)

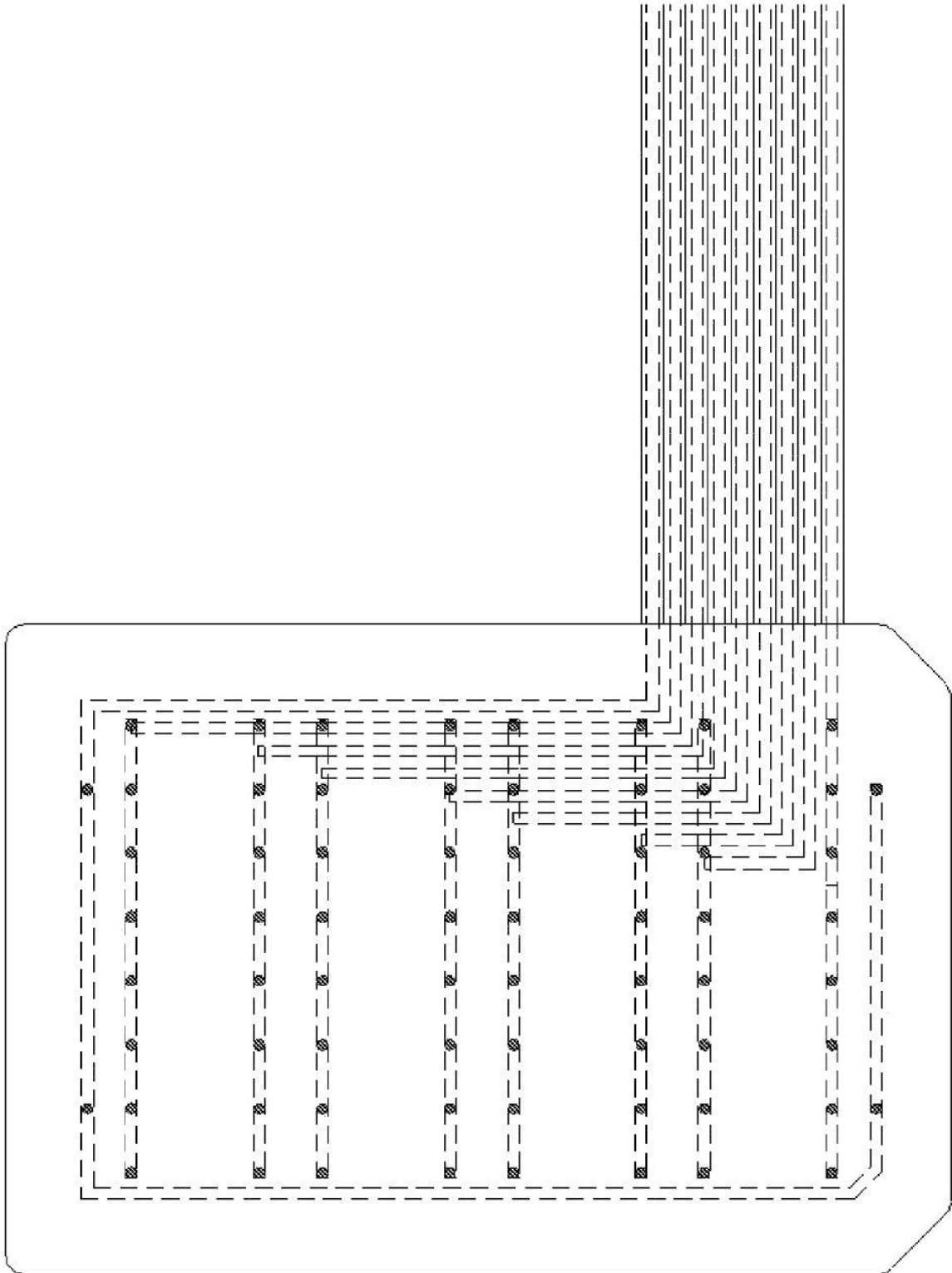


FIG. 10A (DISEÑO ANTERIOR)

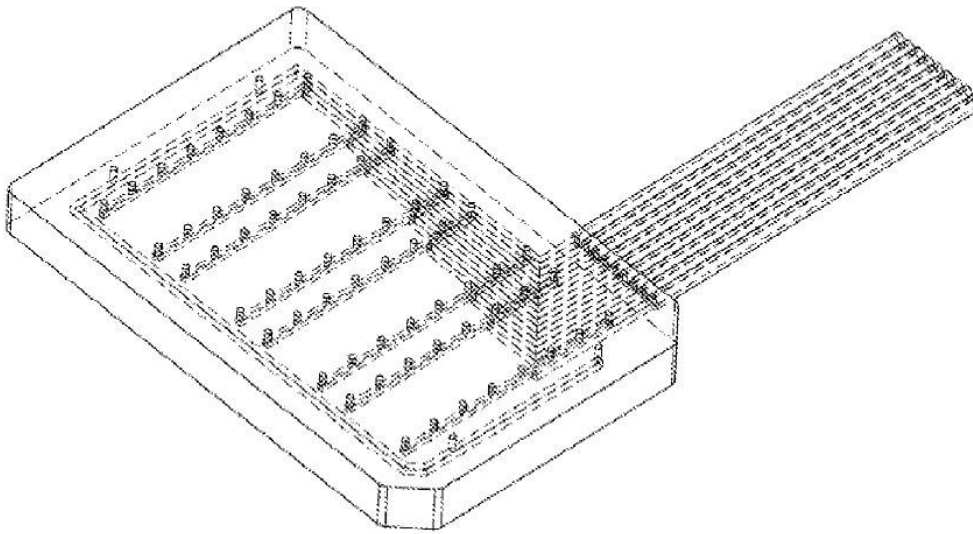


FIG. 10B (DISEÑO ANTERIOR)

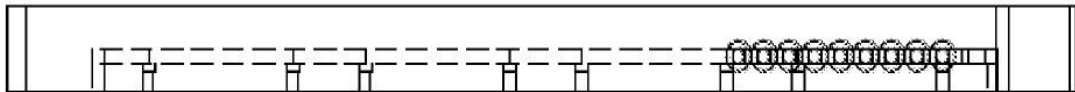


FIG. 10C (DISEÑO ANTERIOR)



FIG. 11

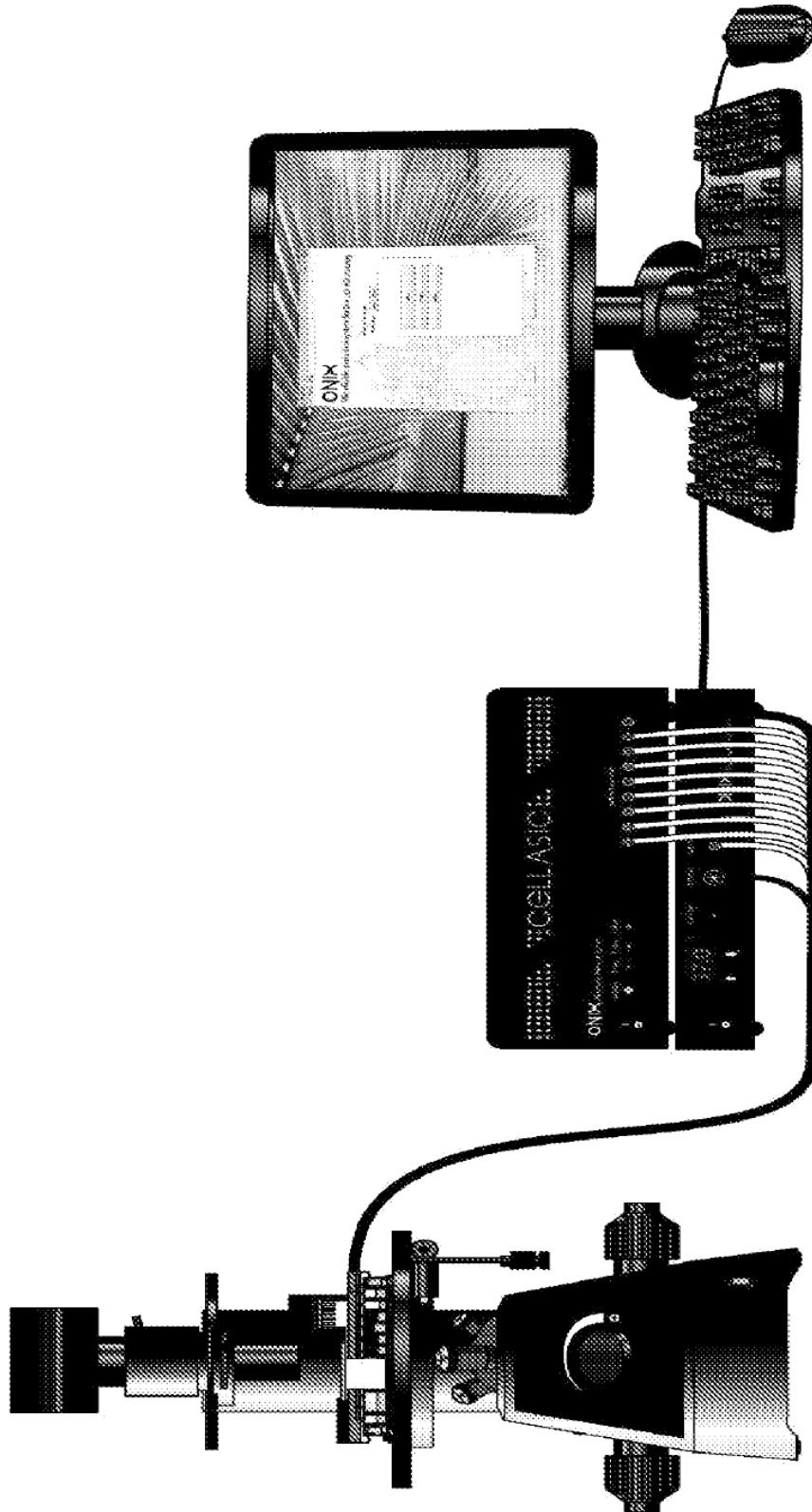


FIG. 12

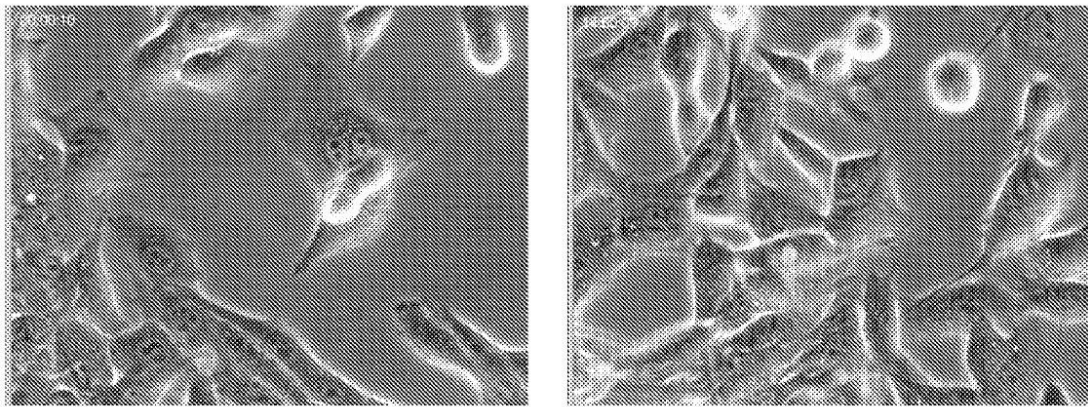
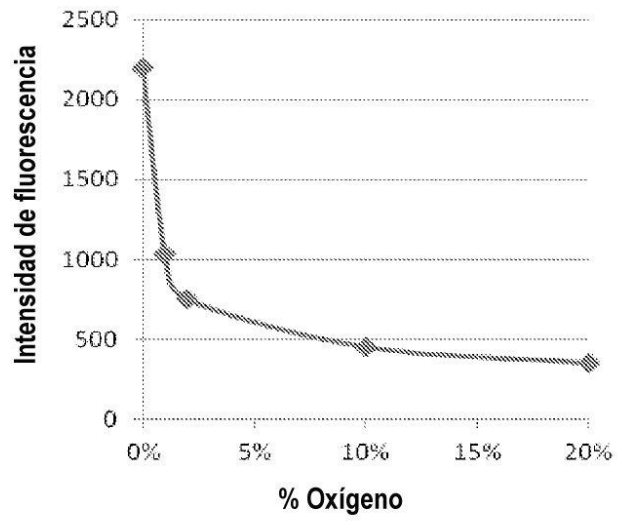


FIG. 13

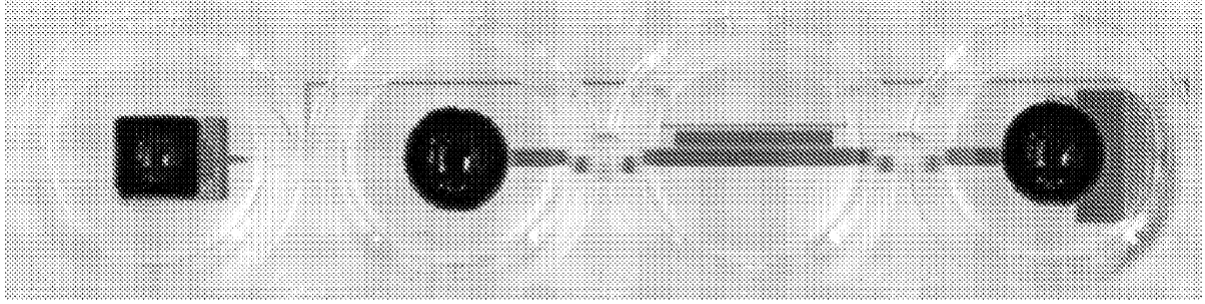
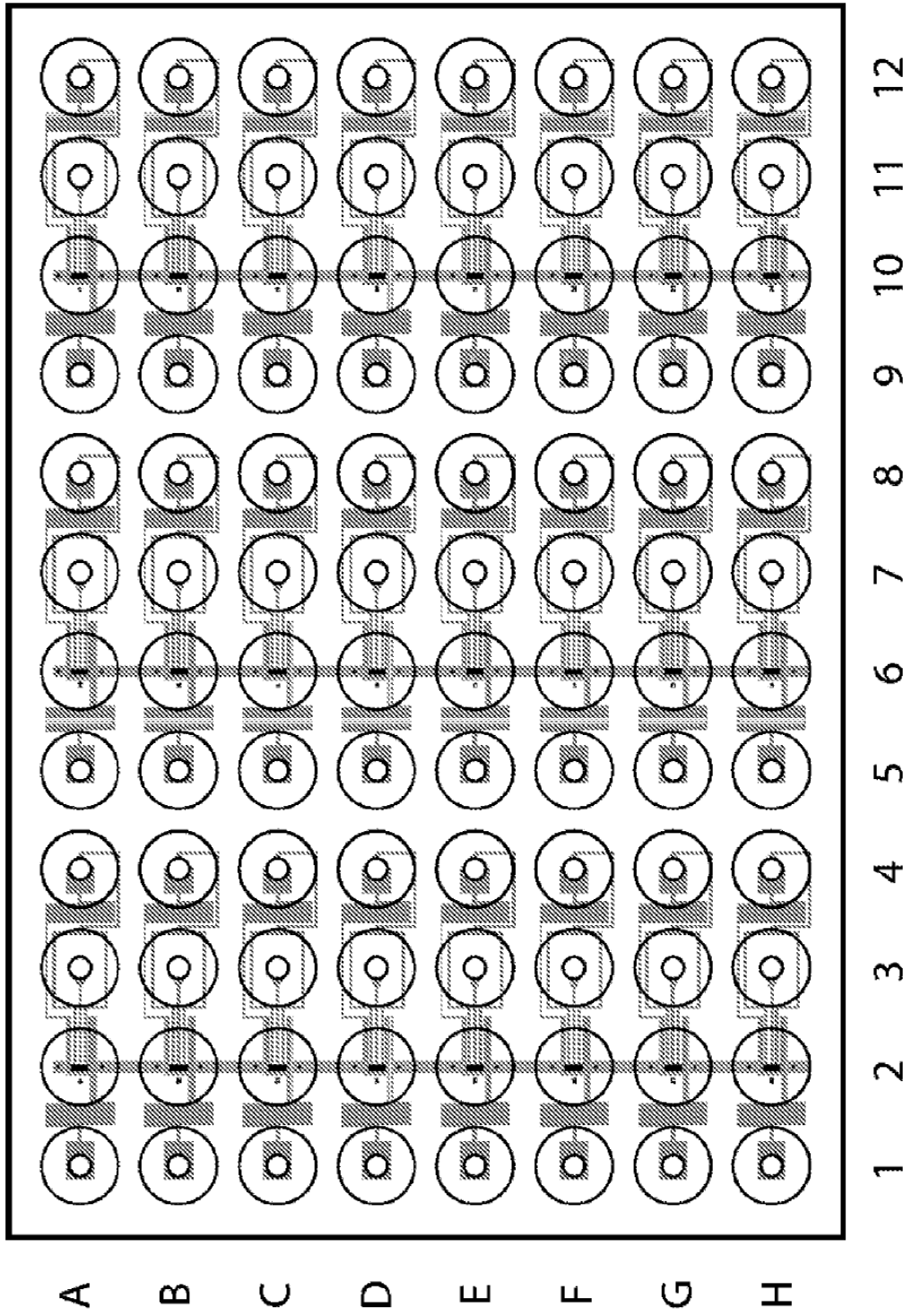


FIG. 14A

FIG. 14B



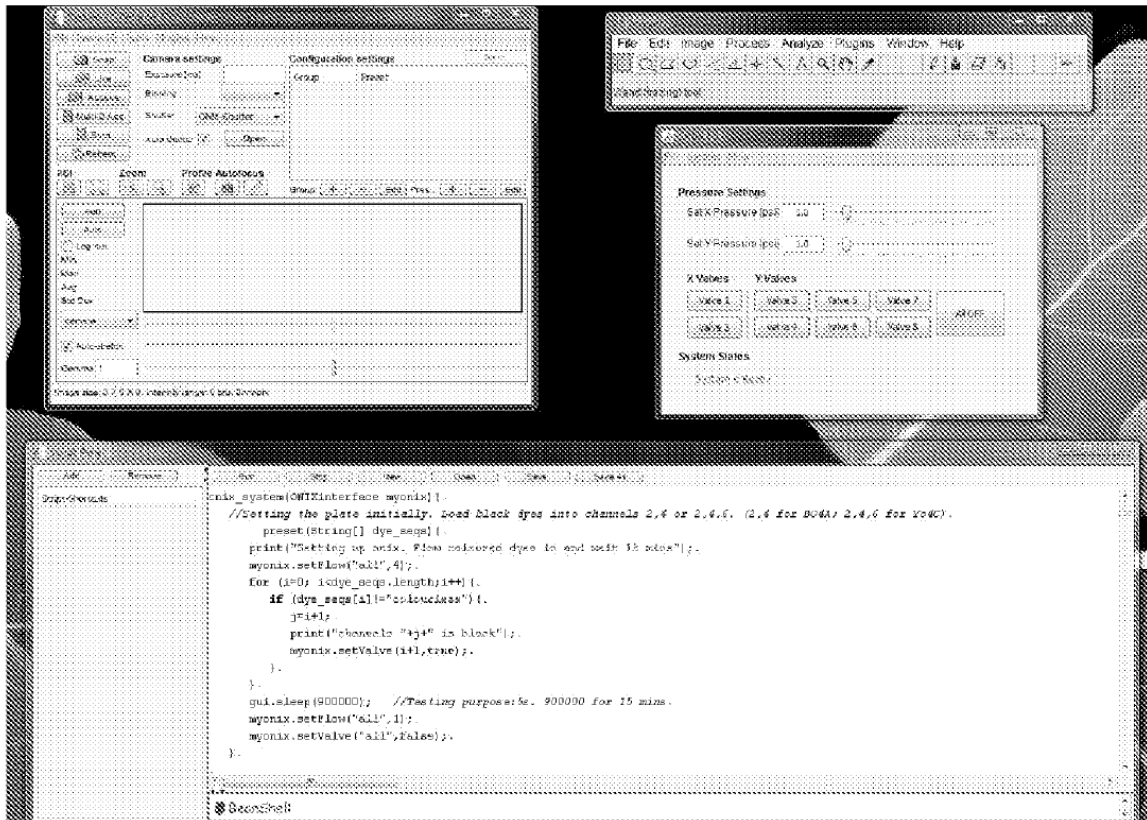


FIG. 15



FIG. 16

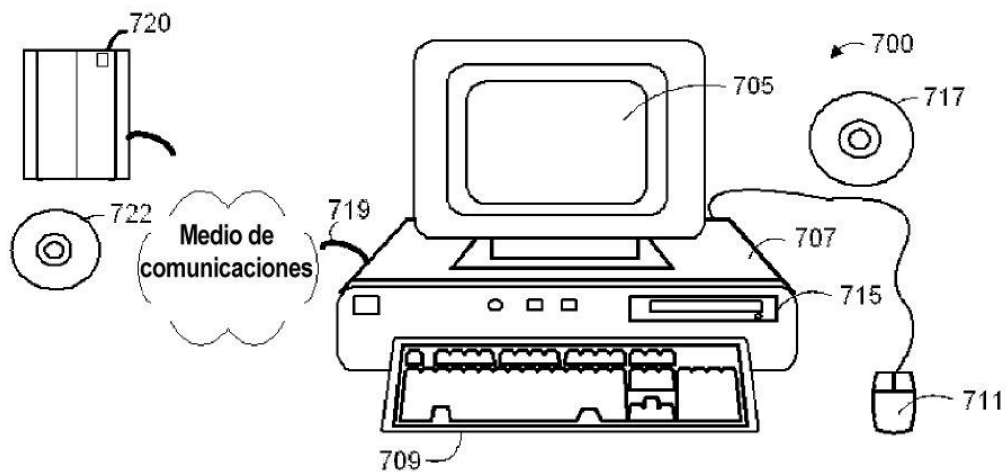


FIG. 17

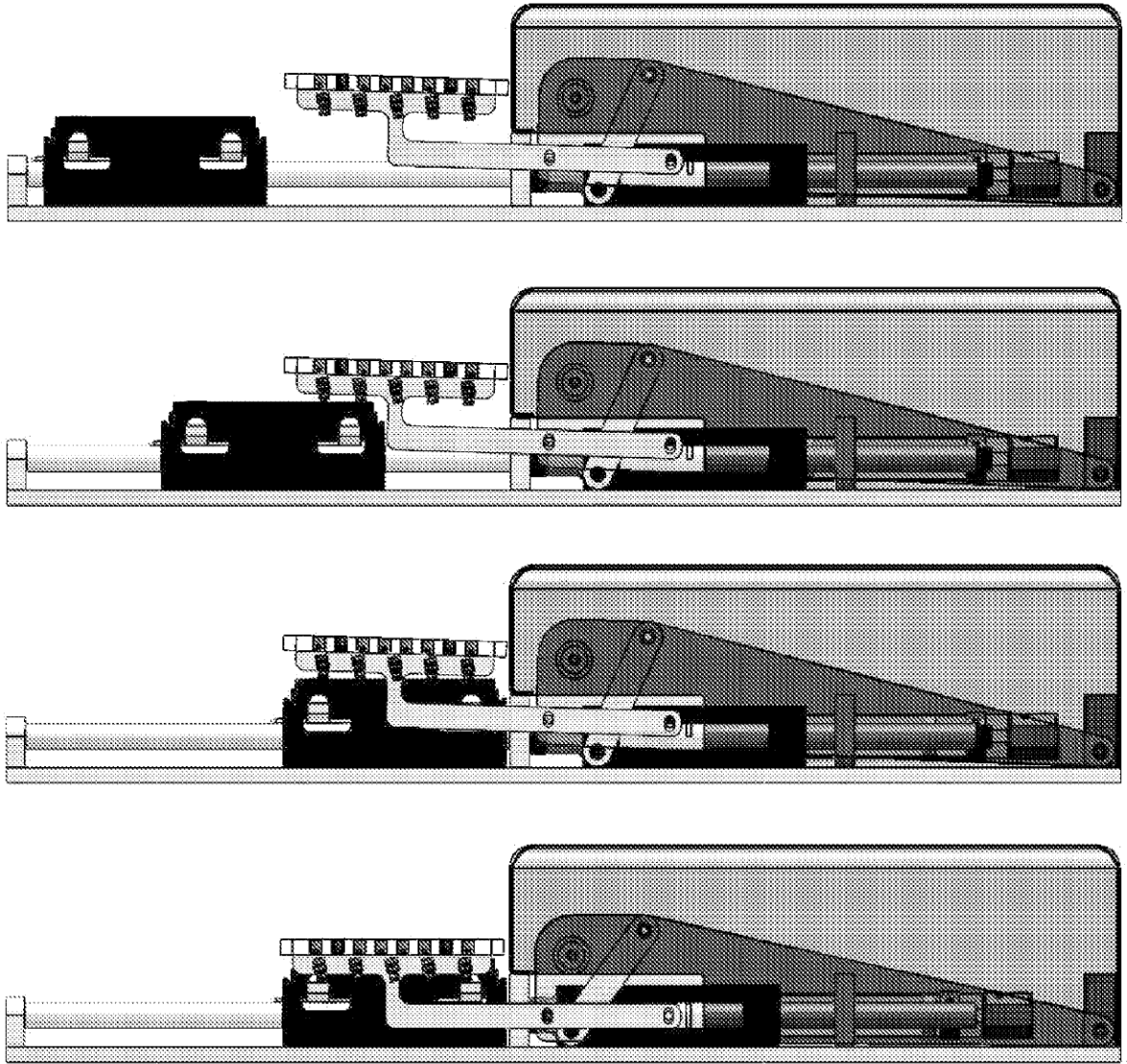


FIG. 18A

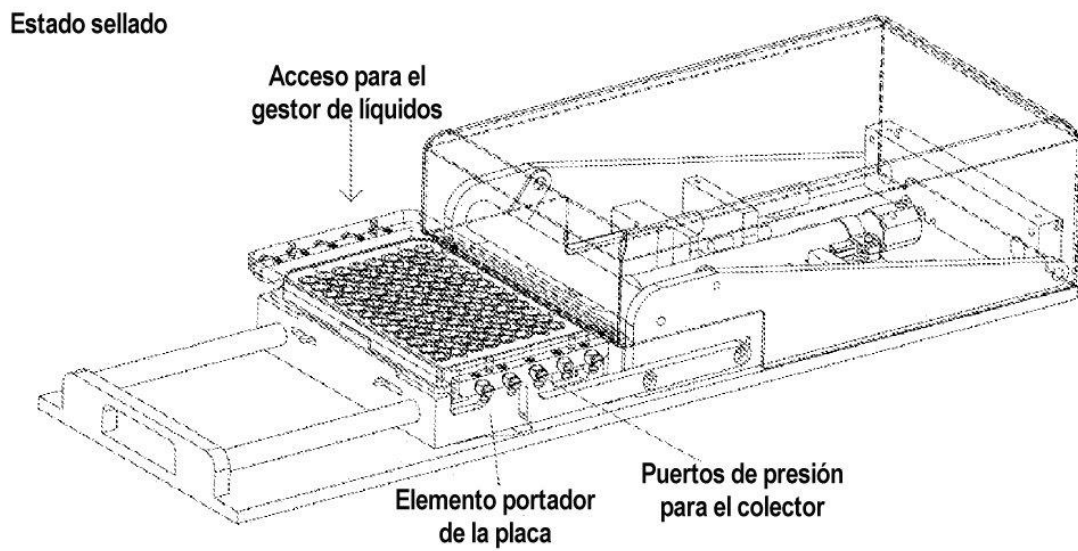
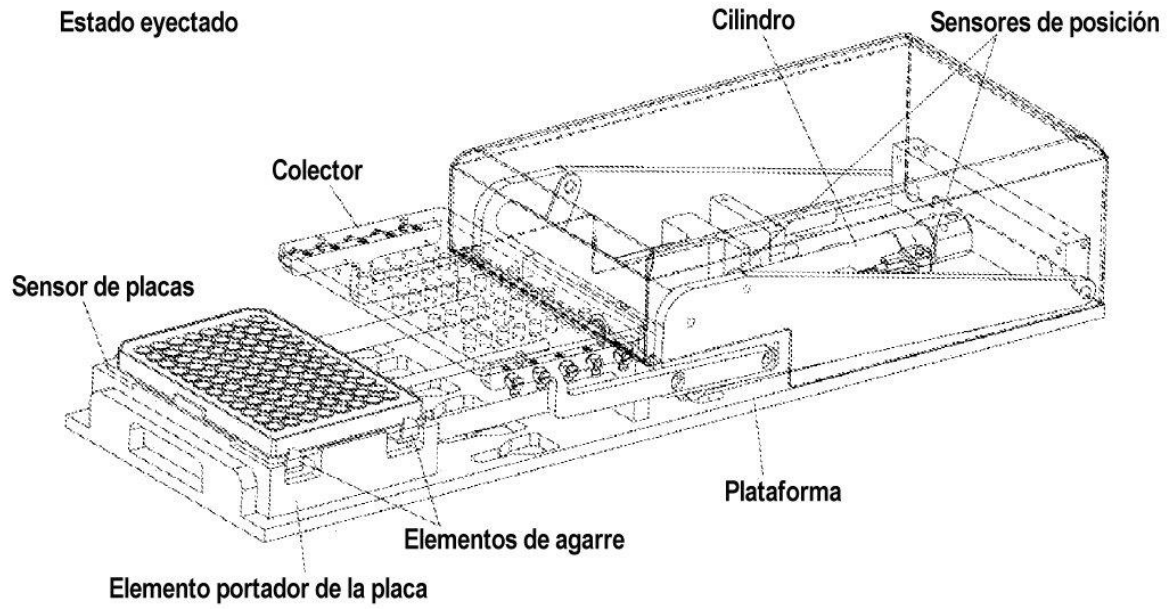


FIG. 18B

<u>Clasificación de la enfermedad</u>	<u>Enfermedad</u>
<u>Enfermedad Cardiovascular</u>	Aterosclerosis; Angina inestable; Infarto de miocardio; Reestenosis después de angioplastia u otra intervención percutánea; Insuficiencia cardíaca congestiva; Miocarditis; Endocarditis; Disfunción endotelial; Cardiomiopatía
<u>Enfermedad Endocrina</u>	Diabetes mellitus I y II; Tiroiditis; Enfermedad de Addison
<u>Enfermedad Infecciosa</u>	Hepatitis A, B, C, D, E; Malaria; Tuberculosis; VIH; Pneumocystis carinii; Giardia; Toxoplasmosis; Enfermedad de Lyme; Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas; Citomegalovirus; Virus de Epstein-Barr; Virus del herpes simple; Colitis por Clostridium difficile; Meningitis (todos los organismos); Neumonía (todos los organismos); Infección de las vías urinarias (todos los organismos); Diarrea infecciosa (todos los organismos)
<u>Angiogénesis</u>	Angiogénesis patológica; Angiogénesis fisiológica; Angiogénesis inducida por el tratamiento
<u>Enfermedad Inflamatoria/Reumática</u>	Artritis reumatoide; Lupus eritematoso sistémico; Enfermedad de Sjögren; síndrome de CREST; Esclerodermia; Espondilitis anquilosante; Crohn; Colitis ulcerosa; Colangitis esclerosante primaria; Apendicitis; Diverticulitis; Esclerosis biliar primaria; Granulomatosis de Wegener; Poliarteritis nodosa; Enfermedad de Whipple; Psoriasis; Poliangeítis microscópica; Enfermedad de Takayasu; Enfermedad de Kawasaki; Hepatitis autoinmune; Asma; Enfermedad de Churg-Strauss; Enfermedad de Beurger; Enfermedad de Raynaud; Colecistitis; Sarcoidosis; Asbestosis; Neumoconiosis
<u>Rechazo de trasplante</u>	Corazón; Pulmón; Hígado; Páncreas; Intestino; Médula ósea; Célula madre; Enfermedad de injerto contra huésped; Vasculopatía del trasplante
<u>Leucemia y Linfoma</u>	

FIG. 19. (TABLA 1)

Apéndice: diagramas eléctricos del sistema ONIX-MIC

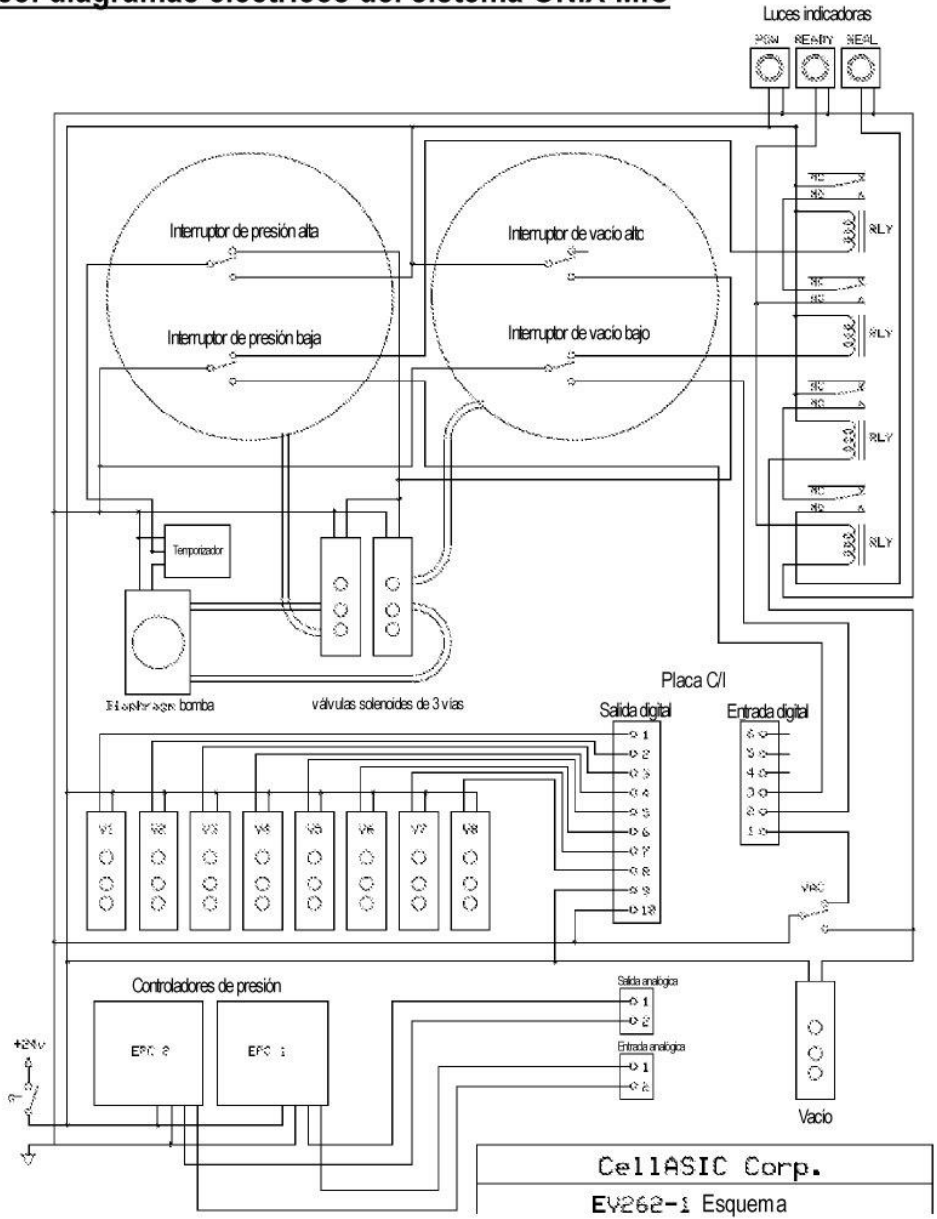


FIG. 20A

