

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 067**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2021 E 23154016 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 4202029**

54 Título: **Método de fabricación de un biochip**

30 Prioridad:

25.06.2020 US 202063044223 P

06.11.2020 US 202063110673 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.02.2025

73 Titular/es:

**DLOC BIOSYSTEMS, INC. (100.00%)
Building 30, street D-4, Baissour main
road, Baissour,
Aley, Mount Lebanon, LB**

72 Inventor/es:

MALAEB, WADDAH ARKAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 000 067 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de fabricación de un biochip

5 Antecedentes

Desarrollar un medicamento farmacéutico exitoso es costoso y lleva mucho tiempo. Además, muchos fármacos fallan en las últimas etapas del procedimiento de desarrollo, lo que provoca una caída de los costes significativos. Un motivo que contribuye al fracaso de los fármacos en las últimas etapas de desarrollo es que las empresas farmacéuticas normalmente someten a prueba los medicamentos en células cultivadas en plataformas de cultivo celular ineficaces que no replican suficientemente el tejido humano. Por ejemplo, las plataformas de cultivo celular típicas suelen estar compuestas por placas planas 2D. Sin embargo, las placas planas 2D existentes no replican la estructura 3D de los órganos humanos, lo que produce resultados inexactos. Por ejemplo, una microestructura típica del tejido humano es la morfología de los conductos circulares, que es la microestructura de muchos órganos como la mama, el páncreas, el hígado, el riñón y la vasculatura. Las placas planas 2D típicas no se parecen a la microestructura 3D de la morfología de los conductos circulares.

Dos aspectos fundamentales para la creación de un modelo biomimético son preservar la polaridad celular a través del andamiaje estructural e inducir el intercambio de señales celulares mediante el cultivo conjunto del tejido epitelial con la membrana basal y el estroma circundante. La conservación de la polaridad celular es importante cuando se realizan pruebas en tejidos ductales epiteliales porque las células polarizadas alcanzan la senescencia cuando se forman en un conducto y, por lo tanto, dejan de crecer, en comparación con las contrapartes cancerosas que no tienen una polaridad demarcada. Por lo tanto, las células cancerosas nunca alcanzan la senescencia y siguen dividiéndose o creciendo, lo que lleva a un crecimiento incontrolable de células cancerosas. En consecuencia, las células cultivadas y enganchadas entre sí formando un conducto cerrado se asemejan al tejido epitelial normal, mientras que las células cultivadas en 2D funcionan de manera similar a las células en la fase de formación del conducto. Por lo tanto, el crecimiento de las células en un entorno anómalo puede hacer que funcionen más como tejido canceroso que como tejido normal.

El cultivo conjunto de células epiteliales con el estroma circundante es importante porque el tejido fibroso desempeña un papel vital en la progresión del cáncer ductal a través de las fluctuaciones de los niveles hormonales y del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Tales fluctuaciones provocan cambios en la expresión génica de las células estromales, lo que conduce a diferentes biomarcadores de la matriz extracelular y, por lo tanto, a interrumpir las cascadas de señalización desde y hacia los tejidos epiteliales. Normalmente, los sistemas que tienen uno de esos dos aspectos fundamentales muestran un mayor parecido con el tejido nativo en comparación con una plataforma de cultivo 2D típica o geles 3D, pero aún muestran muchas diferencias importantes en comparación con el tejido nativo.

Otro aspecto importante para la creación de un modelo biomimético es la capacidad de someter a prueba el efecto de un fármaco en el microambiente tisular. Esto significa que, para un tejido ensamblado, es importante someter a prueba el efecto de una modificación en un entorno tisular sobre el del tejido circundante. Esto es especialmente importante en las aplicaciones del cáncer, particularmente debido a los cambios drásticos en la matriz extracelular (ECM) que conducen a una alteración de las rutas de señalización en las células tisulares y las células de los tejidos circundantes. Se ha demostrado que estos cambios drásticos desempeñan un papel vital en la progresión y la metástasis del cáncer.

Las plataformas de cultivo celular típicas son incapaces de cultivar conjuntamente diferentes tipos de células en compartimentos separados espacialmente, lo que dificulta modelar el microentorno completo del tejido humano. Por ejemplo, el microentorno de un tumor de mama incluye células epiteliales normales que forman un conducto, así como células de cáncer de mama. Ambos tipos de células interactúan con las células de soporte en la matriz extracelular. Esto representa el microentorno tumoral que afecta la acción de los fármacos destinados a tratar el cáncer de mama. Sin embargo, las plataformas tradicionales de descubrimiento de fármacos y los sistemas de cultivo no recapitulan la estructura circular de las células de mama normales y no captan el efecto de otras células del microentorno del tumor sobre las células cancerosas.

El documento WO 2018/237132 describe un método de fabricación de un dispositivo microfluídico que comprende obtener un molde base con al menos una cámara saliente y al menos una varilla que se extiende desde un borde del molde a través de la cámara hasta el borde opuesto del molde; unir el molde de polímero solidificado a una superficie, insertar el hidrogel de matriz extracelular en la cámara y retirar la al menos una varilla una vez que el hidrogel de matriz se haya polimerizado.

El documento EP 3 007 882 describe un método para fabricar un dispositivo microfluídico usando un método de impresión 3D para canales microfluídicos que tienen una forma cilíndrica.

En consecuencia, existe la necesidad de plataformas de cultivo celular para someter a prueba fármacos y un método de fabricación de un biochip que resuelva los inconvenientes anteriores.

Resumen

La presente descripción proporciona un método nuevo e innovador para fabricar un biochip que actúa como plataforma de cultivo celular. Las células pueden insertarse en el biochip y crecer en tejidos tridimensionales que van a usarse en las pruebas de fármacos. Dentro del biochip hay un conducto de plástico poroso ultradelgado que se forma al curvar las membranas en forma cilíndrica. Puede accederse al conducto desde ambos lados a través de canales microfluídicos. Un objetivo del biochip proporcionado es replicar un microentorno organoide ductal haciendo crecer las células epiteliales o endoteliales ductales en las paredes internas del conducto y haciendo crecer el tejido circundante formado a partir de las células desde el exterior mediante la siembra de células y componentes de medio a través de un gel desde el otro lado. El biochip puede utilizarse para replicar tejido ductal que incluye, pero no se limita a: conductos pancreáticos, renales, hepáticos, mamarios, pulmonares, vasculares, prostáticos, testiculares y linfáticos. El biochip podría utilizarse por investigadores, empresas farmacéuticas y médicos clínicos para someter a prueba sus fármacos y componentes en los organoides que crecen dentro del chip a fin de predecir mejor sus efectos antes de someterlos a prueba en seres humanos.

La presente descripción proporciona un método para crear un sistema de andamiaje para que las células crezcan en tejidos ductales interconectados en 3D (tejido epitelial/endotelial cilíndrico rodeado por un estroma con tejido mioepitelial y/o revestimiento de estroma entre los mismos). La descripción permite una estabilidad estructural capaz de soportar tejidos 3D de baja rigidez.

La presente descripción abarca varias ventajas técnicas, tales como un andamiaje circular de sección transversal en donde las células, cuando se unen a la superficie interna del conducto y se hacen confluentes, pueden lograr una polaridad de membrana (diferenciación) parecida a la de los tejidos naturales y permitir el cultivo conjunto de células con el estroma circundante. Esto proporciona una mayor imitación, lo que resulta en una predicción más precisa del entorno *in vivo* y en la versatilidad del chip integrado en el órgano. Finalmente, la presente descripción proporciona la capacidad de lograr capacidades de alto rendimiento en donde podrían realizarse cientos e incluso miles de experimentos en los chips descritos.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, un biochip para el crecimiento de tejido ductal incluye al menos una estructura de membrana, en donde la al menos una estructura de membrana incluye al menos una membrana porosa configurada para proporcionar un entorno celular mimético, al menos un armazón, en donde el al menos un armazón incluye un canal configurado para soportar la al menos una estructura de membrana y al menos un canal microfluídico en comunicación de fluido con el canal que soporta al menos una estructura de membrana y al menos un cubreobjetos, en donde el al menos un armazón está configurado de tal manera que se proporciona un espacio interno dentro del al menos un armazón y es capaz de crear al menos un canal dentro del al menos un armazón, en donde el espacio interno creado entre el armazón proporciona un compartimento que es interno en relación con el cuerpo del armazón pero externo en relación con la estructura de la membrana y en donde se proporcionan una pluralidad de aberturas en el al menos un armazón para permitir que el fluido o el aire entre o salga del espacio interno creado entre el armazón que proporciona un compartimento externo en relación con la estructura de membrana creada entre el armazón.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana es uno o más andamiajes cilíndricos.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana es capaz de combinarse dentro del espacio interno dentro de los andamiajes cilíndricos de la al menos una estructura de membrana, proporcionando capas de andamiajes ductales de membrana porosa anidados unos dentro de otros.

La al menos una estructura de membrana se selecciona del grupo de polímeros sintéticos, polímeros orgánicos o material compuesto.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana es capaz de imitar las condiciones tisulares *in vivo* para un material biológico diferente o el mismo.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la estructura de membrana es capaz de proporcionar un entorno para una pluralidad de tipos de tejido estromal.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana es capaz de proporcionar un entorno para las pruebas de una pluralidad de modelos de enfermedad.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón contiene características que mantienen el andamiaje ductal cilíndrico en su posición, dando acceso a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal.

5 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los componentes biológicos pueden pipetearse o bombearse en el interior de los canales microfluídicos del biochip.

10 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los componentes biológicos son los mismos componentes biológicos.

15 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los componentes biológicos son componentes biológicos diferentes.

20 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón contiene características que forman uno o más canales microfluídicos que dan acceso a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal.

25 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón contiene características que forman los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal.

30 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón contiene canales microfluídicos que conducen a que los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal estén interconectados en una o más zonas de las ubicaciones del andamiaje ductal poroso.

35 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón contiene canales microfluídicos que conducen a que los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal estén interconectados, sólo están separados por las paredes del andamiaje ductal poroso después del ensamblaje.

40 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, al menos un armazón contiene canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal, están interconectados, sólo se conectan a través de los poros de las paredes del andamiaje ductal después de su ensamblaje.

45 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento externo del andamiaje ductal podrían grabarse en las capas internas del al menos un armazón.

50 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento externo del andamiaje ductal podrían grabarse en las superficies externas del al menos un armazón y encerrarse en al menos un cubreobjetos delgado que crea el canal completo.

55 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la sección transversal del conducto cilíndrico podría ser circular, elipsoidal o de cualquier otra forma cerrada.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el conducto podría ser poroso y los poros podrían ser de cualquier cantidad, forma y tamaño.

60 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, algunos poros permiten la difusión de componentes biológicos.

65 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, algunos poros permiten la migración de las células a través de la pared del conducto.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un almacén incluye al menos un orificio de entrada y al menos un orificio de salida.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un almacén, que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal, podrían extenderse entre los orificios de entrada y salida del canal.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un almacén, que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal, podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse después del ensamblaje de los subcomponentes del chip.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un almacén está configurado para usarse con un microscopio o dispositivo de obtención de imágenes.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los canales microfluídicos que permiten que los fluidos fluyan hacia el compartimento interno y externo que rodea el andamiaje ductal están encerrados entre el al menos un almacén.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los canales microfluídicos que permiten que los fluidos fluyan al compartimento externo que rodea el andamiaje ductal están encerrados entre el al menos un almacén y el al menos un vidrio cubreobjetos que cubre el lado adicional del biochip que no está encerrado por el al menos un almacén.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana unida al al menos un almacén podría rodearse con el hueco del canal microfluídico estromal desde todos los lados cuando la membrana se curva y se une antes del ensamblaje en una zona de la superficie de andamiaje ductal a lo largo de su longitud.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un almacén está hecho de un material que es quebradizo, transparente y de baja autofluorescencia, tal como vidrio o polímero.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un almacén está hecho de un material que es opaco.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un almacén está configurado para deformarse, en respuesta a un estímulo, y encapsular al menos una estructura de membrana.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el estímulo es uno de calor, presión, exposición química o exposición a la radiación.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un cubreobjetos y el al menos un almacén están integrados para formar un cuerpo unitario.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un cubreobjetos está hecho de un material que es transparente.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el biochip es capaz de conectarse e interactuar con una pluralidad de biochips adicionales.

- 5 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, un método de fabricación de un biochip, el método incluye proporcionar al menos un armazón, en donde el al menos un armazón incluye, un canal configurado para soportar la al menos una estructura de membrana y al menos un canal microfluídico en comunicación de fluido con el canal, proporcionando al menos una membrana porosa, curvando al menos una membrana porosa en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica en donde es redonda, el conducto poroso cilíndrico se forma curvando una primera parte de una membrana porosa y una o más membranas porosas adicionales que forman una segunda parte del conducto, e insertando la al menos una membrana porosa entre el al menos un armazón.
- 10 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una membrana porosa se curva entre 0° y 180° desde un plano paralelo a la superficie superior entre al menos un armazón para formar una forma de conducto completo y las otras membranas se curvan para formar el resto del conducto completo.
- 15 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón está configurado para contener características que forman los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal.
- 20 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la al menos una estructura de membrana se combina dentro del espacio interno dentro de los andamiajes cilíndricos de la al menos una estructura de membrana, proporcionando capas de andamiajes ductales de membrana porosa anidados unos dentro de otros.
- 25 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón está configurado de modo que canales microfluídicos que conducen a que los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal estén interconectados en una o más zonas de las ubicaciones del andamiaje ductal poroso.
- 30 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón está configurado de modo que canales microfluídicos que conducen a que los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal estén interconectados, sólo están separados por las paredes del andamiaje ductal poroso después del ensamblaje.
- 35 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un armazón está configurado de modo que los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal, están interconectados, sólo se conectan a través de los poros de las paredes del andamiaje ductal después de su ensamblaje.
- 40 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento externo del andamiaje ductal podrían grabarse en las capas internas del al menos un armazón.
- 45 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento externo del andamiaje ductal podrían grabarse en las superficies externas del al menos un armazón y cubrirse con otra parte de armazón o al menos un cubreobjetos que crea el canal completo.
- 50 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón están configuradas para proporcionar al menos un orificio de entrada y al menos un orificio de salida que proporciona acceso al canal.
- 55 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón, que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal, podrían extenderse entre los orificios de entrada y salida del canal.
- 60 En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las características del al menos un armazón, que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal, podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse después del ensamblaje de los subcomponentes del chip.
- 65

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el conducto cilíndrico se forma uniendo las membranas y al menos un armazón mediante una o una combinación de unión química, unión por presión o unión térmica.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las membranas curvas que forman el andamiaje ductal cilíndrico pueden unirse antes o después del ensamblaje en al menos un armazón.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el método de unión se usa para fundir un grosor controlado de las superficies de los materiales, soldando las diferentes partes entre sí.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el enlace químico contiene una mezcla de etanol y cloroformo.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la unión térmica puede incluir la irradiación de la superficie.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, el al menos un vidrio cubreobjetos que forma las capas superior e inferior del biochip se une al menos a un armazón usando el mismo método que las otras partes o usando un pegamento polimérico de vidrio.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, los tapones que cierran los extremos de los canales microfluídicos que conducen al compartimento interior del andamiaje ductal se unen o utilizan un pegamento polimérico.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, las extensiones de la membrana del andamiaje ductal se mantienen en sus extremos y se tensan para impedir cualquier arrugamiento en las membranas.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, se forma un conducto poroso redondo curvando una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, se forma un conducto poroso redondo curvando una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona plana a lo largo de la superficie del andamiaje ductal que es una extensión de la superficie del conducto.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, se forma un conducto poroso redondo curvando más de una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona plana a lo largo de la superficie del andamiaje ductal que es una extensión de la superficie del conducto.

En otro aspecto de la presente descripción, que puede usarse en combinación con cualquier otro aspecto o combinación de aspectos enumerados en la presente memoria, la formación de las membranas incluye una varilla que sostiene la membrana en sus formas deseadas que está ubicada entre el al menos un armazón, con los extremos del andamiaje ductal unidos al armazón y rodeados por el al menos un armazón.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A ilustra una vista en perspectiva de un biochip.

La figura 1B ilustra una vista desde arriba de un biochip.

La figura 2A ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip, antes de la unión de las membranas.

La figura 2B ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip con membranas previamente unidas, antes de la formación del tubo, según un aspecto de la presente descripción.

La figura 2C ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip después de la formación del tubo.

La figura 2D ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip, que utiliza membranas adicionales.

- 5 La figura 2E ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip, que utiliza una estructura de membrana formada en una formación de tubos que se ensambla en un armazón.

La figura 2F ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip, que utiliza membranas adicionales formadas en una formación de tubos que es un conducto interno anidado dentro de otra estructura de membrana porosa.

- 10 La figura 3A ilustra una membrana porosa que forma el andamiaje ductal.

La figura 3B ilustra una membrana porosa que forma el andamiaje ductal y se une en los extremos de la membrana.

- 15 La figura 3C ilustra una membrana porosa que forma un andamiaje hemiductal.

La figura 4A ilustra una vista en sección transversal del andamiaje ductal con la membrana unida y sus extensiones cortadas.

- 20 La figura 4B ilustra una vista en sección transversal del andamiaje ductal y las extensiones de la membrana están tensadas.

- 25 La figura 4C ilustra una vista en sección transversal de dos membranas hemiductales con sus extensiones tensadas entre los dos armazones ensamblados entre sí para formar un conducto cilíndrico y unidas tras el ensamblaje al armazón.

- 30 La figura 4D ilustra una vista en sección transversal del conjunto de biochips en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal unido tras el ensamblaje al armazón único.

La figura 5A ilustra una vista desde arriba de un biochip ensamblado.

La figura 5B ilustra una vista en perspectiva de un conducto y una cámara microfluídica de un biochip.

- 35 La figura 5C ilustra una vista lateral de un conducto y una cámara microfluídica de un biochip.

La figura 6A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochip.

- 40 La figura 6B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal se une previamente en sus extremos antes de ensamblarlo al armazón.

La figura 7A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochip, donde se tira de la membrana después de curvarse cuando se ensambla para aplicar tensión.

- 45 La figura 7B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal se une en sus extremos después de ensamblarlo al armazón.

La figura 8A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochip en donde se tira de las dos membranas después de curvarse cada una en un hemiducto cuando se ensamblan para aplicar tensión.

- 50 La figura 8B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip donde el andamiaje ductal está hecho de dos membranas inclinadas junto con el armazón.

- 55 La figura 9A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochips en donde las membranas se curvan en conductos completamente redondos sin extensiones de membrana antes del ensamblaje al armazón, en donde las membranas se unen previamente en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud.

- La figura 9B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana.

- 60 La figura 10A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochip en donde se tira de las dos membranas después de curvarse cada una en un hemiducto cuando se ensamblan para aplicar tensión.

- 65 La figura 10B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal está formado por dos membranas alineadas a lo largo del armazón, pretensadas cuando están intercaladas y unidas después del ensamblaje al armazón.

La figura 11A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochip en donde las dos membranas están a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones se cortan cuando se ensamblan en un armazón único.

5 La figura 11B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde la membrana se curva en una rotación de 180 grados, se une en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud y las extensiones del andamiaje ductal se cortan antes del ensamblaje en un armazón único.

10 La figura 12A ilustra una vista desde arriba de un conjunto de biochips en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal, donde cada uno está previamente unido en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud.

15 La figura 12B ilustra el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal, donde cada uno está previamente unido en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud.

Las figuras 13A, 13B y 13C ilustran una realización adicional del biochip.

20 La figura 14 ilustra una microestructura tisular con morfología de conducto circular sobre la membrana porosa del conducto cilíndrico del biochip.

25 La figura 15A ilustra una vista en sección transversal del modelo de tejido ductal en donde se cultivan células epiteliales o endoteliales normales libres de enfermedad unidas a las paredes internas del compartimento interno del andamiaje ductal poroso.

La figura 15B ilustra un modelo de enfermedad tisular tumoral en donde las células epiteliales o endoteliales normales libres de enfermedad se mezclan con células cancerosas y se insertan al mismo tiempo en el compartimento del andamiaje ductal interno.

30 La figura 15C ilustra un modelo de enfermedad tisular tumoral en donde se cultivan células normales libres de enfermedad en el compartimento del andamiaje ductal interno antes de insertar grupos de tumores sólidos previamente cultivados.

35 La figura 15D ilustra un modelo de enfermedad basado en el estroma o el parénquima.

La figura 16 ilustra el formato de placa de 96 pocillos de alto rendimiento para el biochip.

Descripción detallada

40 La presente descripción proporciona un método para fabricar un biochip según la reivindicación 1. Además, el biochip permite realizar pruebas *in vitro* más predictivas de fármacos que las plataformas de cultivo típicas al replicar con mayor precisión el microentorno *in vivo* en comparación con las plataformas de cultivo típicas.

45 El biochip descrito en la presente memoria permite que las células crezcan y formen canales cilíndricos 3D que replican el tejido del cuerpo humano. Los conductos cilíndricos están incrustados en el biochip. Los conductos cilíndricos pueden construirse a partir de membranas porosas y flexibles, tales como las membranas que se usan normalmente para el cultivo celular 2D (por ejemplo, en membranas de transpocillos). Las membranas se remodelan para formar los conductos cilíndricos. Por ejemplo, una membrana puede laminarse sobre una varilla y luego unirse para formar el conducto cilíndrico. En algunos aspectos, la membrana puede unirse al poste de forma cilíndrica para ensamblarse con el chip. Por ejemplo, pueden unirse mediante una combinación de unión química (por ejemplo, mezcla de etanol y cloroformo) con unión por presión y calor.

50 Los conductos cilíndricos influyen en las células para que se adhieran, crezcan y se reorganicen para formar canales cilíndricos 3D que se asemejan a su forma en el cuerpo humano. Cuando las células se adhieren a la superficie interna del conducto y se fusionan, puede lograrse una polaridad o diferenciación de la membrana, que se asemeja a los tejidos naturales. Los conductos cilíndricos pueden tener una variedad de diámetros, por ejemplo, desde tan pequeños como 25 micrómetros hasta más de 2 milímetros. El intervalo de diámetros posibles permite un biochip que replica la microestructura ductal de una amplia gama de órganos.

60 Cada conducto cilíndrico está interconectado con al menos un compartimento externo (por ejemplo, un conducto poroso cilíndrico que tiene compartimentos internos y externos). Por ejemplo, un conducto puede estar interconectado con los compartimentos externos a través de microcanales. Esta configuración permite realizar un cultivo multicelular. Por ejemplo, las células ductales mamarias pueden cultivarse a lo largo de la pared interna del conducto cilíndrico, y las células del microentorno tumoral (como los fibroblastos y las células inmunitarias) pueden cultivarse dentro de un gel en los compartimentos externos para formar células 3D que están en contacto directo con la pared exterior del conducto cilíndrico. Las biomoléculas o células pueden atravesar los poros del conducto cilíndrico para lograr una

interferencia entre las células del interior del compartimento externo y las células del interior del conducto. En algunos casos, el flujo puede pasar al interior de los conductos cilíndricos para suministrar a las células medios de crecimiento y fármacos bioactivos. En otros casos, las células de muestra o las biomoléculas secretadas por ellas pueden pasar al interior de los conductos cilíndricos con fines de bioanálisis.

El biochip puede incluir múltiples conductos y múltiples canales circundantes. En al menos un aspecto de la presente descripción, el biochip puede configurarse en un diseño de placa de 96 pocillos con múltiples conductos paralelos para que pueda usarse con fines de detección de fármacos de alto rendimiento. En un aspecto de este tipo, el sistema tiene las dimensiones de una placa convencional de 96 pocillos y, en algunos casos, puede usarse con una bomba conectada al puerto de entrada y salida. En otros casos, el fluido puede pipetearse manualmente en el puerto de entrada y llenará todo el conducto con la ayuda de fuerzas capilares.

El biochip puede construirse con un material que esté optimizado para fines de cultivo celular. En algunos aspectos, el material del biochip es transparente, lo que es adecuado para el análisis por microscopía fluorescente. En algunos aspectos, el material del biochip es hidrófilo, lo que ayuda a evitar los problemas del polidimetilsiloxano (PDMS), un material hidrófobo ampliamente utilizado en muchas otras plataformas de cultivo celular. El biochip proporcionado puede fabricarse mediante los métodos de fabricación escalables existentes, como el moldeo y la unión.

Tal como se usa en la presente memoria, se entiende que “alrededor de”, “aproximadamente” y “sustancialmente” se refieren a números en un intervalo de números, por ejemplo, el intervalo del -10 % al +10 % del número de referencia, preferiblemente del -5 % al +5 % del número de referencia, más preferiblemente del -1 % al +1 % del número de referencia, lo más preferiblemente del -0,1 % al +0,1 % del número de referencia.

Además, debe entenderse que todos los intervalos numéricos de la presente memoria incluyen todos los números enteros, naturales o fracciones, dentro del intervalo. Además, estos intervalos numéricos deben interpretarse en el sentido de que respaldan una afirmación dirigida a cualquier número o subconjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, una descripción desde 1 hasta 10 debe interpretarse en el sentido de que admite un intervalo desde 1 hasta 8, desde 3 hasta 7, desde 1 hasta 9, desde 3,6 hasta 4,6, desde 3,5 hasta 9,9, etc.

Tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular de una palabra incluye el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, las referencias “un/uno”, “una” y “el/la” generalmente incluyen los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, la referencia a “un órgano” o “un conducto” incluye una pluralidad de tales “órganos” o “conductos”. El término “y/o” utilizado en el contexto de “X y/o Y” debe interpretarse como “X”, o “Y” o “X e Y”.

Ensamblaje del biochip

Las figuras 1A y 1B ilustran una vista en perspectiva y una vista desde arriba, respectivamente, de un biochip ensamblado, según un aspecto de la presente descripción.

En un ejemplo, el biochip 100 puede estar soportado por y usarse junto con un microscopio. Por ejemplo, el biochip puede colocarse o sujetarse sobre un microscopio para permitir que el microscopio vea el contenido del biochip. En un ejemplo adicional, el biochip 100 puede ser compatible con un dispositivo de obtención de imágenes para ver los procesos que ocurren dentro del biochip 100.

En un ejemplo, el biochip 100 puede estar compuesto de materiales o componentes que son aplicables para su uso con un microscopio. Por ejemplo, los materiales o componentes pueden ser transparentes, delgados, que proporcionen un emborronamiento mínimo o que tengan una baja autofluorescencia.

Las figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F ilustran el biochip 100 a lo largo de la progresión de las etapas de ensamblaje del biochip 100. El biochip 100 se denomina biochip 200a-200d cuando se produce el ensamblaje.

Haciendo referencia a la figura 2A, una vista en despiece ordenado de un biochip 200a ilustra un ejemplo de configuración del biochip 200a, según un aspecto de la presente descripción. En un ejemplo, el biochip 200a incluye un vidrio cubreobjetos superior 210 en la parte más alta del biochip 200a para cubrir al menos parte de la superficie superior del armazón superior 220 del biochip 200a. El vidrio cubreobjetos superior 210 puede ser un vidrio cubreobjetos delgado hecho de un material que sea quebradizo, transparente y que tenga una baja autofluorescencia, tal como vidrio o polímero. El armazón superior 220 y el armazón inferior 250 contienen características tales que, cuando se colocan en contacto directo entre sí, se forma un espacio interno para alojar membranas porosas. Estas características pueden ser el resultado del grabado en las capas internas del armazón. En otro ejemplo, el armazón superior 220 y el armazón inferior 250 contienen características que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento externo del andamiaje ductal y podrían grabarse en las superficies externas del armazón 250 y cubrirse con otra parte del armazón 220 o un cubreobjetos delgado que crea el canal completo en el armazón inferior para alojar la estructura de membrana porosa 240.

El almacén superior 220 y el almacén inferior 250 contienen características que mantienen el andamiaje ductal cilíndrico en posición dando acceso a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal. En otro ejemplo, el almacén superior 220 y el almacén inferior 250 contienen características que forman uno o más canales microfluídicos que dan acceso a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal. En otro ejemplo, el almacén superior 220 y el almacén inferior 250 contienen características de modo que los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal están interconectados en una o más zonas de las ubicaciones de la estructura de membrana porosa 240. En otro ejemplo, el almacén superior 220 y el almacén inferior 250 contienen características que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal formado por la estructura de membrana porosa 240 que podría extenderse entre los orificios de entrada y salida del canal. Los almacenes 220 y 250 que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse mediante los tapones 230a y 230b después del ensamblaje del biochip 200a. Puede proporcionarse un vidrio cubreobjetos inferior 260, similar al vidrio cubreobjetos superior 210, para cubrir la parte más inferior del almacén inferior 250. En un ejemplo, el vidrio cubreobjetos 210 y 260 que forma las capas superior e inferior del chip se une a los almacenes 220 y 250 usando un pegamento polimérico de vidrio.

Aún haciendo referencia a la figura 2A, la estructura de membrana porosa 240 aún no se ha unido. En un ejemplo, la estructura de membrana porosa 240 incluye dos elementos porosos ultradelgados hidrófobos para filtrar, se usa una membrana porosa ultradelgada hidrófila para formar un conducto cilíndrico y se utiliza una membrana porosa ultradelgada hidrófoba plana como filtro estromal.

Haciendo referencia a la figura 2B, se ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip 200b, que incluye los mismos componentes que el biochip 200a. Sin embargo, en este caso, las membranas porosas que forman la estructura de membrana porosa 240 se unen y forman un andamiaje ductal. En un ejemplo, la estructura de membrana porosa 240 se forma curvando las membranas porosas en una rotación de 180°, formando una estructura cilíndrica y uniendo el material de acceso de las membranas que no estaban curvadas en la estructura cilíndrica. Por ejemplo, para filtrar se utilizan dos membranas porosas ultradelgadas hidrófobas cilíndricas previamente unidas. La membrana porosa ultradelgada hidrófila cilíndrica previamente unida se curva en un conducto cilíndrico. Además, la membrana porosa ultradelgada hidrófoba plana puede usarse como filtro estromal. Estos componentes pueden combinarse para formar la estructura de membrana porosa 240.

En un ejemplo, un conducto poroso redondo se forma curvando una única membrana plana o una pluralidad de membranas planas sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona plana a lo largo de la superficie del andamiaje ductal que es una extensión de la superficie del conducto.

Haciendo referencia a la figura 2C, se ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip 200c, que incluye los mismos componentes que el biochip 200a. Sin embargo, en este caso, las membranas porosas que forman la estructura de membrana porosa 240 se han formado en una formación de tubos, según un aspecto de la presente descripción. En un ejemplo, para filtrar se utilizan dos membranas porosas ultradelgadas hidrófobas cilíndricas previamente unidas. Se utilizan membranas porosas ultradelgadas hidrófilas cilíndricas previamente unidas para formar el andamiaje del conducto. Además, se utilizan membranas porosas ultradelgadas hidrófobas planas como filtro estromal. Las membranas porosas se unen en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones cortadas antes de su ensamblaje en el almacén 250.

Haciendo referencia a la figura 2D, se ilustra una vista en despiece ordenado de un biochip 200d, que incluye los mismos componentes que el biochip 200a. Sin embargo, en este caso, se utilizan tipos adicionales de membranas porosas según un aspecto adicional de la presente descripción. Por ejemplo, pueden usarse dos membranas porosas ultradelgadas hidrófilas para formar la estructura de membrana porosa 240 que permite que se forme la zona de crecimiento del tejido del conducto. Además, se utilizan membranas porosas ultradelgadas hidrófobas planas, ya que un filtro de aire estromal también puede incluirse en la estructura de membrana porosa 240. Además, también pueden incluirse cuatro membranas porosas ultradelgadas hidrófobas en la estructura de membrana porosa 240 como filtro de aire. En un ejemplo, dos membranas que forman el andamiaje ductal se curvan en una rotación semiductal y las extensiones de las membranas se tensan a través de diferentes orificios en los almacenes 220 y 250 y se unen después del ensamblaje a los almacenes 220 y 250.

Haciendo referencia a la figura 2E, en un ejemplo, el biochip 200e incluye la estructura de membrana porosa 240 que se ha formado en una formación de tubos que se ensambla en un almacén único 220 que incluye las características tanto del almacén (220 y 250) como de los cubreobjetos (210 y 260). En un ejemplo, todos los componentes individuales que se encuentran en los biochips 200a-200d están integrados en un almacén único 220 unitario. En un ejemplo, para filtrar se utilizan dos membranas porosas ultradelgadas hidrófobas cilíndricas previamente unidas. Se utilizan membranas porosas ultradelgadas hidrófilas cilíndricas previamente unidas para formar los andamiajes de los conductos uno dentro del otro. Las membranas porosas se unen en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones cortadas antes de su ensamblaje en el almacén 220. El almacén 220 que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse mediante los tapones 230a y 230b después del ensamblaje del biochip 200e.

Haciendo referencia a la figura 2F, en un ejemplo, el biochip 200f incluye los armazones 220 y 250 que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal. Los orificios de entrada y salida del canal se taponarán posteriormente con los tapones 230a y 230b después del ensamblaje del biochip 200f. En un ejemplo, puede proporcionarse un vidrio cubreobjetos inferior 260, similar al vidrio cubreobjetos superior 210, para cubrir la parte más inferior del armazón inferior 250. En un ejemplo, el vidrio cubreobjetos 210 y 260 que forma las capas superior e inferior del chip se une a los armazones 220 y 250 usando un pegamento polimérico de vidrio. En un ejemplo, las membranas porosas que forman la estructura de membrana porosa 240 se han formado en una formación de tubos que es un conducto interno anidado dentro de otra estructura de membrana porosa que se ha formado en una formación de tubos que es el conducto intermedio. Para filtrar se utilizan dos membranas porosas ultradelgadas hidrófobas cilíndricas previamente unidas. Se utilizan membranas porosas ultradelgadas hidrófilas cilíndricas previamente unidas para formar los andamiajes de los conductos uno dentro del otro. Dos estructuras de plástico en forma de anillo 242 están ubicadas en uno de los conductos porosos hidrófilos donde el canal del armazón circundante tiene un diámetro mayor. Además, se utilizan dos membranas porosas ultradelgadas hidrófobas planas como filtro estromal. Las membranas porosas se unen en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones cortadas antes de su ensamblaje en el armazón 250. Los armazones 220 y 250 que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal intermedio podrían extenderse a través de los anillos que rodean uno de los conductos hidrófobos y, posteriormente, obstruirse utilizando tapones en forma de rompecabezas 270a y 270b desde arriba y desde abajo que entren en contacto y rodeen los anillos de plástico después del ensamblaje del biochip 200a. Los armazones 220 y 250 que forman los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse mediante los tapones 230a y 230b después del ensamblaje del biochip 200f.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa 240 puede unirse a los armazones 220 y 250 mediante una unión química, una unión por presión y una unión por calor. En un ejemplo se usa un método de unión para fundir un grosor controlado de las superficies de los materiales, soldando las diferentes partes entre sí. Por ejemplo, la unión química puede contener una mezcla de etanol y cloroformo. En otro ejemplo, la unión térmica puede incluir la irradiación de la superficie. En un ejemplo, el andamiaje ductal que tiene una extensión de la superficie del conducto, cuando se une después del ensamblaje al armazón, se mantiene en sus extremos y se tensa para evitar que se arruguen las membranas.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede ser un andamiaje cilíndrico de manera que se proporcione una geometría que está diseñada para conservar la polaridad celular a través de los marcadores de diferenciación y las proteínas de unión en las membranas de las células.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede tener las propiedades superficiales que podrían ser hidrófilas en algunas regiones para permitir el acceso de fluidos, células y materiales biológicos a través de los poros.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede tener las propiedades superficiales que podrían ser hidrófobas en algunas regiones, para permitir el acceso del aire a través de los poros, funcionando como una región de acceso de gas a los tejidos del interior del conducto.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede tener las propiedades superficiales que podrían ser hidrófobas en algunas regiones, para permitir el acceso del aire a través de los poros, funcionando como una trampa de burbujas de aire, eliminando el aire encapsulante del conducto.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede tener las propiedades superficiales que podrían ser estructurales, mecánicas y superficiales del material que constituye el andamiaje ductal que permiten soportar materiales biológicos con diversas viscosidades y rigideces.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede soportar el flujo de fluidos a altas velocidades de flujo y presiones fisiológicas.

En un ejemplo, la estructura de membrana porosa puede soportar biopsias de tejido, geles y materiales biológicos insertados.

En un ejemplo, los tejidos epiteliales y endoteliales ductales crecen dentro del conducto y el tejido adoptan la forma del andamiaje cilíndrico, conservando la polaridad celular a través de los marcadores de diferenciación y las proteínas de unión en las membranas de las células.

Las figuras 3A, 3B y 3C ilustran diversas configuraciones de membranas porosas según un aspecto de la presente descripción. La figura 3A ilustra una membrana porosa 310 que forma el andamiaje ductal del biochip 200d, donde la membrana se curva en una rotación de 180 grados, se une en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones cortadas antes de su ensamblaje en el armazón, según un aspecto de la presente descripción. La figura 3B ilustra una membrana porosa 320 que forma el andamiaje ductal

del biochip 100, donde la membrana está curvada 180 grados y unida en los extremos de la membrana, según un aspecto de la presente descripción. La figura 3C ilustra una membrana 330 porosa que forma un andamiaje hemiductal del biochip 100, que cuando se une a otro en los extremos de la membrana, forma un conducto cilíndrico, según un aspecto de la presente descripción.

Las figuras 4A, 4B, 4C y 4D ilustran vistas en sección transversal de diversas configuraciones de biochips ensamblados según un aspecto de la presente descripción. La figura 4A ilustra una vista en sección transversal del andamiaje ductal 410 en donde la membrana está curvada en una rotación de 180 grados, unida en una zona de la superficie del andamiaje ductal 410 a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones cortadas antes de su ensamblaje en el armazón, según un aspecto de la presente descripción. La figura 4B ilustra una vista en sección transversal del andamiaje ductal 420 en donde la membrana está curvada en una rotación de 180 grados, y las extensiones de la membrana se tensan desde un lado entre los dos armazones y se unen entre sí después del ensamblaje al armazón, según un aspecto de la presente descripción. La figura 4C ilustra una vista en sección transversal de dos membranas hemiductales 430 con sus extensiones tensadas entre los dos armazones ensamblados entre sí para formar un conducto cilíndrico y unidos después del ensamblaje al armazón según un aspecto de la presente descripción. La figura 4D ilustra una vista en sección transversal del conjunto del biochip 440 en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal unido después del ensamblaje al armazón único según un aspecto de la presente descripción.

La figura 5A ilustra una vista desde arriba de un biochip 500a según un aspecto de la presente descripción. En un ejemplo, el biochip 500a puede incluir una zona de filtrado de aire 510 que puede permitir que se liberen burbujas de aire del biochip 500a. En algunos ejemplos, el área de filtrado de aire 510 también puede permitir que el aire entre en el biochip 500, lo que permite que las células que se están cultivando tengan acceso al aire. El biochip 500a también puede incluir un conducto rodeado por un estroma 520. En algunos ejemplos, el biochip 500a puede incluir una entrada 530a y una salida 530b del conducto y una entrada 540a y una salida 540b del canal estromal.

La figura 5B ilustra una vista en perspectiva de un conducto y una cámara microfluídica de un biochip 500b, según un aspecto de la presente descripción. En un ejemplo, el biochip 500b puede incluir un orificio de entrada 530a y un orificio de salida 530b. Además, el biochip 500b puede incluir al menos una zona de acceso de aire 550, al menos una trampa de burbujas de aire 560, una cámara microfluídica estromal 570 y una superficie de contacto de conducto poroso 580. El biochip 500b también puede incluir múltiples segmentos de conducto rodeados de plástico 590. La figura 5C ilustra una vista lateral de un conducto y una cámara microfluídica de un biochip 500b.

Las figuras 6A, 7A, 8A, 9A y 10A ilustran una vista desde arriba del biochip 100 a lo largo de múltiples métodos de unión según un aspecto de la presente descripción. Las figuras 6B, 7B, 8B, 9B y 10B ilustran las etapas y los procedimientos para ejecutar los múltiples métodos de unión según un aspecto de la presente descripción.

MÉTODO 1: Membranas de con unión previa con extensiones:

La figura 6A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en donde, antes de la unión, las membranas porosas se curvan de manera cilíndrica, aproximadamente en una orientación de 180°. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 610, un conducto rodeado por el estroma 620, una entrada del conducto 630a, una salida del conducto 630b, una entrada del canal del estroma 640a y una salida del canal del estroma 640b.

La figura 6B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 650, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal se une previamente en sus extremos antes de ensamblarlo al armazón. Por ejemplo, el método incluye un procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e hidrófilas sobre una varilla y unirlos en sus extremos mediante unión térmica. El método también puede incluir el procedimiento de ensamblaje de las membranas en el armazón. Esto puede requerir coger la varilla que tiene las membranas unidas a la misma, colocarla en el armazón, colocar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, intercalar todo entre los dos armazones y, a continuación, unirlos mediante una unión por prensado térmico con ayuda química. Finalmente, el método puede implicar el procedimiento de extracción de la varilla, taponar los extremos del canal ductal más allá de los orificios de entrada y salida y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del biochip 100.

MÉTODO 2: Membranas con unión posterior con extensiones y tensión perpendicular:

La figura 7A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en donde se tira de una membrana después de curvarse una rotación completa de 180° cuando se ensambla para aplicar tensión. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 710, un conducto rodeado por el estroma 720, una entrada del conducto 730a, una salida del conducto 730b, una entrada del canal del estroma 740a y una salida del canal del estroma 740b.

La figura 7B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 750, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip 100 en donde el andamiaje ductal se une en sus extremos después de ensamblarlo al armazón. En un ejemplo, el método puede incluir el procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e

hidrófilas sobre una varilla colocada en uno de los armazones y tirar de sus extremos desde orificios paralelos al andamiaje ductal. Este método puede ubicar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, compilar las capas de membrana entre los dos armazones y, a continuación, unir las mediante unión por prensado térmico con ayuda química. Finalmente, el método puede incluir el procedimiento de extracción de la varilla, cortar los extremos de la membrana, taponar los extremos del canal ductal más allá de los orificios de entrada y salida y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del biochip 100.

Método 3: Membranas con unión posterior con extensiones y tensión inclinada:

La figura 8A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en el que se extraen dos membranas después de curvarse en un hemiducto cuando se ensamblan para aplicar tensión. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 810, un conducto rodeado por el estroma 820, una entrada del conducto 830a, una salida del conducto 830b, una entrada del canal del estroma 840a y una salida del canal del estroma 840b.

La figura 8B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 850, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip 100 en donde el andamiaje ductal está hecho de dos membranas inclinadas junto con el armazón, pretensadas cuando están intercaladas y unidas después del ensamblaje al armazón. En un ejemplo, los métodos incluyen un procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e hidrófilas sobre una varilla colocada en uno de los armazones y tirando de sus extremos desde los orificios inclinados a lo largo del andamiaje ductal. El método también puede incluir ubicar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, intercalar todo entre los dos armazones y, a continuación, unirlos mediante unión por prensado térmico con ayuda química. Finalmente, el método puede incluir un procedimiento de extracción de la varilla, cortar los extremos de la membrana, taponar los extremos del canal ductal más allá de los orificios de entrada y salida y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del chip, según un aspecto de la presente descripción.

Método 4: Membranas con unión previa totalmente redondeadas sin extensiones:

La figura 9A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana, que se une previamente en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud antes de ensamblarlo en el armazón. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 910, un conducto rodeado por el estroma 920, una entrada del conducto 930a, una salida del conducto 930b, una entrada del canal del estroma 940a y una salida del canal del estroma 940b.

La figura 9B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 950, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip 100 en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana, que se une previamente en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud antes de ensamblarlo en el armazón. En un ejemplo, el método puede incluir el procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e hidrófilas sobre una varilla y unirla a la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud mediante unión térmica. A continuación, muestra el procedimiento de ensamblaje de las membranas en el armazón. El método también puede requerir coger la varilla que tiene las membranas unidas a la misma, colocarla en el armazón, colocar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, intercalar todo entre los dos armazones y, a continuación, unirlos mediante una unión por prensado térmico con ayuda química. En este diseño, el hueco del canal microfluidico estromal rodea los andamiajes ductales del armazón desde todos los lados. Finalmente, este método puede implicar el procedimiento de extracción de la varilla, taponar los extremos del canal ductal más allá de los orificios de entrada y salida y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del biochip 100.

Método 5: Membranas con unión posterior con extensión y tensión axial:

La figura 10A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en donde se extraen dos membranas después de curvarse cada una en un hemiducto cuando se ensamblan para aplicar tensión axial. En un ejemplo, el biochip 1000 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 1010, un conducto rodeado por el estroma 1020, una entrada del conducto 1030a, una salida del conducto 1030b, una entrada del canal del estroma 1040a y una salida del canal del estroma 1040b.

La figura 10B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 1050, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip en donde el andamiaje ductal está hecho de dos membranas alineadas junto con el armazón, pretensadas cuando están intercaladas y unidas después del ensamblaje al armazón. En un ejemplo, el método puede incluir el procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e hidrófilas sobre una varilla colocada en uno de los armazones y tirar de sus extremos desde orificios alineados con el andamiaje ductal. Además, el método puede incluir colocar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, compilar todos los elementos entre los dos armazones y, a continuación, unir las membranas mediante unión por presión térmica con ayuda química. Finalmente, el método puede incluir el procedimiento de extracción de la varilla, cortar los extremos de la membrana, taponar los extremos del canal ductal más allá de los orificios de entrada y salida y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del biochip 100.

Método 6: Un chip de almacén con membranas completamente redondas sin extensiones

La figura 11A ilustra una vista desde arriba de un biochip 1100 configurado según un método en donde las dos membranas están a lo largo de su longitud con la membrana unida y sus extensiones se cortan cuando se ensamblan en un almacén único según un aspecto de la presente descripción. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 1110, un conducto rodeado por el estroma 1120, una entrada del conducto 1130a, una salida del conducto 1130b, una entrada del canal del estroma 1140a y una salida del canal del estroma 1140b. En un ejemplo, el biochip 1100 incluye un material retirable de manera selectiva 1160 que se retira en respuesta a la exposición a la radiación UV, al grabado químico u otro estímulo.

La figura 11B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 1150, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip 100 en donde la membrana se curva en una rotación de 180 grados, se une en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud y las extensiones del andamiaje ductal se cortan antes del ensamblaje en un almacén único. En un ejemplo, un almacén contiene las características de ambos almacenes. En un ejemplo, el hueco cilíndrico en la realización de almacén único tiene un diámetro mayor que el hueco cilíndrico en una realización de dos almacenes. El almacén se forma moldeando sobre un material retirable de manera selectiva que luego se retira en respuesta a la exposición a la radiación UV, al grabado químico u otro estímulo. Las membranas cilíndricas curvadas se colocan en una varilla y se insertan en su posición en el hueco del almacén. Tras la inserción en el hueco del almacén, todo el chip (conjunto almacén-membrana con la varilla en su interior) se une químicamente y se prensa térmicamente para deformar el almacén y unir las características internas. En un ejemplo, la última etapa del método descrito es taponar los extremos del conducto. En un ejemplo, no se utilizan cubreobjetos y en el almacén se incluyen características capaces de cubrir la pluralidad de aberturas en un almacén único. En un ejemplo, el método de almacén único utiliza un almacén hecho de un material de vidrio.

Método 7: Un chip de almacén con membranas anidadas completamente redondas

La figura 12A ilustra una vista desde arriba del biochip 100 configurado según un método en donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal, donde cada uno está previamente unido en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud antes de ensamblarlo en el almacén y puede accederse al mismo de manera independiente. En un ejemplo, el biochip 100 configurado según este método puede incluir una zona de filtrado de aire 1210, un conducto rodeado por un conducto y luego por un estroma 1220, una entrada de conducto interno 1230a, una salida de conducto interno 1230b, una entrada de conducto intermedio 1250a, una salida de conducto intermedio 1250b, una entrada de canal de estroma 1240a y una salida de canal de estroma 1240b.

La figura 12B ilustra las etapas y los procedimientos, según el método 1260, para ejecutar el procedimiento de unión de los componentes del biochip 100 donde el andamiaje ductal es redondo sin extensiones de membrana y está anidado dentro de otro andamiaje ductal, donde cada uno está previamente unido en una zona de la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud antes de ensamblarlo en el almacén. En un ejemplo, el método puede incluir el procedimiento de curvatura de las membranas hidrófobas e hidrófilas sobre un pasador pequeño igual al diámetro del conducto interno y unirlo a la superficie del andamiaje ductal a lo largo de su longitud mediante unión térmica. Además, el método puede incluir el ensamblaje de dos anillos de plástico en los bordes de una de las membranas hidrófobas y en un extremo de la membrana hidrófila. En un ejemplo, el método también incluye el ensamblaje de otra membrana hidrófila más grande en un pasador más grande de un diámetro interior mayor que los diámetros exteriores de los anillos y un diámetro exterior igual al diámetro del andamiaje ductal exterior. El método también puede incluir el ensamblaje del pasador pequeño con sus membranas dentro del pasador más grande. A continuación, muestra el procedimiento de ensamblaje de los pasadores con las membranas del almacén, incluidas las membranas planas a lo largo de los canales que conducen al canal del estroma y al conducto intermedio. El método también puede requerir coger la varilla que tiene las membranas unidas a la misma, colocarla en el almacén, colocar la membrana estromal plana hidrófoba en su posición, intercalar todo entre los dos almacenes y, a continuación, unirlos mediante una unión por prensado térmico con ayuda química. En este diseño, el hueco del canal microfluídico estromal rodea los andamiajes ductales internos e intermedios del almacén desde todos los lados. Finalmente, este método puede incluir el procedimiento de extracción de la varilla, taponar los extremos del canal ductal interno más allá de los orificios de entrada y salida, y taponar los extremos del conducto intermedio mediante dos partes en forma de rompecabezas desde arriba y desde abajo que entran en contacto y rodean los anillos de plástico, y ensamblar los vidrios cubreobjetos en ambas superficies del biochip 100.

En otra realización, se describe un método para ensamblar el biochip 100. Según el método descrito, primero limpiar y realizar controles de calidad en el almacén fabricado. Esto se logra separando el almacén en la combinación más precisa (almacén superior e inferior). Utilizar varillas de calibración ultraprecisas para hacerlo. A continuación, cortar las membranas porosas de 7 μ m de grosor en láminas de 40x3 mm (error de anchura $\pm$ 0,1 mm). Limpiar a fondo el almacén sumergiéndolo en una disolución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % en agua destilada; sonicar durante 5 minutos, sumergir el almacén en agua destilada; sonicar durante 5 minutos. Por último, limpiar las membranas de 2 x 4 cm con el mismo método que en la etapa anterior.

A continuación, las membranas se cortan, se colocan y se fijan. Colocar las membranas perfectamente simétricas por encima del armazón hemiductal. Estirar la membrana (fuerza de tracción, dirección axial del conducto) y fijar los extremos de cada uno de los armazones en la superficie superior del armazón con una gota de cloroformo de 1 ul. Colocar el armazón superior con la membrana ensamblada contra una superficie de sacrificio con la membrana entre el armazón y la superficie, fijar y perforar la membrana a través de los orificios de entrada/salida del armazón. A continuación, colocar el armazón inferior en el soporte del chip diseñado para colocarse dentro del dispositivo de prensa térmica. Colocar el hilo de 0,5 mm de diámetro o la varilla de acero ultraprecisa de 0,5 mm de diámetro en posición por encima del hemiconducto del armazón inferior. Colocar un pasador de acero de 1 mm de diámetro y 2,5 mm de largo en el orificio de entrada del canal de estroma inferior del armazón (esto ayudará a ensamblar los dos subconjuntos con precisión uno encima del otro, independientemente de los errores relativamente grandes de corte por láser en los bordes, debidos a la precisión de la máquina de CNC (misma herramienta y soporte de chip) es inferior a 5 um. Colocar un pasador de nailon de 0,5 mm de diámetro y 2,5 mm de largo en el orificio de conexión inferior del armazón (esto, además de colocar el hilo y el otro pasador, ayudará a ensamblar los dos subconjuntos con precisión uno encima del otro, independientemente de los errores relativamente grandes de corte por láser en los bordes, debidos a la precisión de la máquina de CNC (misma herramienta y soporte chip) es inferior a 5 um.

Continuar el método descrito para ensamblar el biochip 10, pipetear 10 ul de cloroformo al 20 % en etanol de manera homogénea en cada una de las superficies de interconexión del armazón. Presionar directamente los artículos para juntarlos y cerrar el soporte de chip. Colocar instantáneamente bajo la prensa térmica y aplicar una tensión de 53 Mpa a 82 °C durante 7 minutos. Enfriar el chip en agua destilada y mantenerlo durante 30 s (para impedir la cristalización de la membrana). A continuación, una vez que se complete el procedimiento de sujeción, conectar el collarín variable a la región visible y accesible de la varilla de acero de 0,5 mm o al hilo que está atrapado dentro del chip. Debe tenerse en cuenta que esta varilla se utiliza para deformar con precisión la membrana en las características correctas. Retirar la varilla/el hilo del conducto sujetando el collarín y tirando en la dirección opuesta a la abrazadera o utilizando una varilla para empujar el collarín contra la abrazadera. A continuación, deben taponarse los extremos del conducto. Cortar hilos de nailon de 1,5 mm de largo que tienen un diámetro = 0,5 mm y utilizarlos como tapones, colocándolos dentro del canal del conducto en los extremos del conducto más allá de los orificios de entrada/salida. Dejar caer 1 mm de cloroformo puro en el tapón después de insertarlo en los extremos del conducto, lo que es suficiente para derretir el PMMA que rodea el tapón de nylon y sellarlos juntos.

Además de las etapas mencionadas anteriormente del método descrito, realizar una prueba de fugas desde el conducto pipeteando 10 ul de agua coloreada en el conducto. Si se produce una fuga debajo de la membrana, entonces las ranuras del conducto se cortan superficialmente en el armazón. Si la fuga se produce directamente desde el canal del conducto al canal del estroma, entonces la fuga se produce porque las ranuras del conducto están cortadas profundamente en el armazón. Si se producen ambas fugas, entonces la fuga se debe a que el canal estromal está cortado profundamente por debajo de la superficie plana y allí se produce una baja presión de unión. Realizar una prueba de difusión de poros insertando agua coloreada en el conducto y utilizando una toallita de papel para superficies delicadas, por ejemplo, una Kimwipe®. Insertar la toallita de papel de la región estromal y dejar que toque la superficie exterior del conducto poroso. Si la difusión se produce desde el conducto hasta la toallita de papel y la toallita de papel absorbe el agua coloreada, entonces los poros no están bloqueados.

A continuación, debe ensamblarse el conjunto del cubreobjetos. En primer lugar, usar 2 cubreobjetos (1×1 cm) y colocar cada uno a cada lado del chip ensamblado. A continuación, pipetear 2 ul de pegamento de ácido acrílico dispensado homogéneamente en la región límite, para unir los cubreobjetos a la superficie de PMMA. Por último, esperar 3 horas para que se cure el pegamento. Deben realizarse pruebas de doble flujo. Para ello, hacer fluir agua coloreada a través de ambos canales del chip (en cada canal pasa un color diferente). Debería producirse una mezcla entre los dos colores debido a la difusión a través de los poros. Por último, no debe producirse ninguna fuga en ambos canales.

Las etapas finales del método de ensamblaje descrito son limpiar el LOC dejándolo caer en una solución de SDS al 2 % en agua destilada y luego soncarlo durante 5 minutos. Luego sumergirlo en agua destilada y soncarlo durante 5 minutos. Empaquetar cada chip en un blíster y cerrar el blíster con una lámina de esterilización Tyvek y sellarlo con la máquina de prensado en caliente. Llevar el chip a la instalación de esterilización con H₂O₂ para esterilizarlo. Por último, empaquetar cada 12 blísteres en una caja con el logotipo.

En otra realización, se describe un método para ensamblar el biochip 10 que utiliza la automatización. En primer lugar, la máquina que se utiliza sostiene el armazón inferior sobre una placa móvil en una posición relativa fija a través de 2 pasadores salientes de 2,5 mm de largo (1 mm y 0,5 mm de diámetro) que entran en los dos orificios del armazón inferior. A continuación, directamente por encima de la placa de soporte del armazón inferior, la máquina sostiene el armazón sobre una placa móvil en una posición relativa fija a través de 3 pasadores salientes de 1 mm de largo (1 mm de diámetro) que se introducen en los dos orificios de entrada y salida del armazón superior (excepto el orificio de entrada del canal del estroma). A continuación, la placa móvil pasa a una cámara donde se corta una alimentación de 2 membranas porosas (7 um de grosor) de 3 mm de anchura para darles forma pero extendidas en longitud. Ambas se empujan contra los hemiductos del armazón. Una se empuja hacia arriba contra el armazón superior y la otra hacia abajo contra el hemiducto del armazón inferior. A continuación, después de colocar la membrana en su posición, se

dejará caer una gota de 1 ul de cloroformo puro en los extremos de la membrana mientras se empuja y se tensa y, a continuación, se corta la membrana.

Continuando con el método de ensamblaje automático descrito, los dos subconjuntos (armazón superior e inferior con membranas) llegan a una posición en la que sus superficies deben pulverizarse con 10 ul de cloroformo al 20 % diluido en etanol. A continuación, los dos subconjuntos pulverizados se introducen en una posición en la que se intercala una varilla de acero ultraprecisa y, a continuación, se sujeta con una prensa térmica durante 7 minutos. Después de los 7 minutos, la varilla se retirará automáticamente y también se quitará la placa superior que estaba conectada al armazón superior, lo que le da al chip un grado de libertad de movimiento. Mientras el chip aún está en su posición, se introducen dos tapones de nailon para cerrar los extremos del conducto más allá de los orificios de entrada/salida, y se deja caer 1 ul de cloroformo en los mismos. En este caso se realiza una etapa de control de calidad, en donde el agua coloreada pasa por el conducto de los chips y un programa de visión artificial comprobará si hay fallos. Los chips defectuosos irán a un recipiente de recogida de chips defectuosos, mientras que los que tengan éxito pasarán a una etapa de sonicación y limpieza. Después de la etapa de limpieza, se dispensan 2 ul de pegamento de ácido acrílico de manera homogénea sobre los cubreobjetos de vidrio y, a continuación, los dos cubreobjetos se empujan contra la superficie de los chips durante 3 horas para unirlos. El primer cubreobjetos que se coloca es el superior, donde una placa que contiene tres pasadores también sujetará el chip hacia arriba contra el cubreobjetos de vidrio superior mientras se quitan los conectores de los pasadores inferiores. Luego, el chip se moverá a otra placa que contenga 2 pasadores y el cubreobjetos de vidrio con pegamento.

Finalmente, en este caso se realiza otra prueba de calidad haciendo pasar fluidos bicolores en los dos canales del chip y separándolos mediante un programa de visión artificial. Si se produce un fallo, los chips también irán a otro recipiente de recogida de chips defectuosos. Los que tengan éxito pasarán a una etapa final de limpieza en un baño de sonicación. A continuación, luego se secan los chips con un flujo de aire a 50 °C y se introducen automáticamente en los blísteres. Luego se cubren los blísteres con la lámina de Tyvek y se unen entre sí mediante una etapa de prensado en caliente. Los blísteres que contienen los chips ya están listos para enviarlos a una instalación de esterilización. Finalmente, después de regresar del autoclave con H₂O₂, los blísteres se empaquetan con el soporte en una caja de 12.

Las figuras 13A, 13B y 13C ilustran posibles realizaciones del biochip según aspectos de la presente descripción. La figura 13A ilustra posibles usos adicionales del biochip según los aspectos de la presente descripción. En un ejemplo, 1310a muestra el biochip vacío porque no se han cultivado células dentro del biochip. Además, 1310b muestra el biochip cultivado con tejido vascular rodeado de tejido estromal cultivado dentro del biochip. Además, 1310c ilustró un biochip cultivado con tejido epitelial ductal rodeado de tejido estromal cultivado dentro del biochip, según un aspecto de la presente descripción. La figura 13B ilustra una realización de ejemplo del biochip, en donde un compartimento externo 1340 rodea dos andamiajes ductales 1320 y 1330. Por ejemplo, el tejido estromal crece en el compartimento externo 1340 que rodea ambos conductos 1320 y 1330. Dentro de uno de los andamiajes ductales 1330, el tejido vascular crece y se adhiere a las paredes porosas del conducto. Dentro del otro andamiaje ductal 1320, el tejido epitelial ductal crece y se adhiere a las paredes porosas del conducto, según un aspecto de la presente descripción. La figura 13C ilustra una realización de ejemplo del biochip, en donde dos compartimentos externos separados 1340 y 1350 rodean un andamiaje ductal 1330. Por ejemplo, dos tejidos estromales diferentes que crecen en cada uno de los dos compartimentos externos 1340 y 1350 rodean un conducto en el que crece un vaso sanguíneo.

Siembra del biochip

La figura 14 ilustra una microestructura tisular con morfología de conducto circular de células epiteliales cultivadas en la membrana porosa del conducto cilíndrico del biochip 1400, según un aspecto de la presente descripción. La membrana porosa del conducto cilíndrico del biochip 1400 incluye un canal de conducto 1410, un elemento poroso 1420, células epiteliales 1430, un canal estromal 1440, tejido estromal 1450 y células mioepiteliales 1460. En un ejemplo, las células epiteliales pueden ser una de las células epiteliales ductales renales, hepáticas, pulmonares o mamarias. En un ejemplo, el tejido estromal 1450 puede ser uno de células grasas, fibroblastos, que pueden incorporarse en un hidrogel. En un ejemplo, las células mioepiteliales 1460 pueden incorporarse en un hidrogel de membrana basal. En una sección posterior de esta descripción se analizan ejemplos adicionales de células epiteliales y tejido estromal que pueden utilizarse.

En otra realización, se describe un método para sembrar células en el canal del conducto 1410 contra el gel de matriz extracelular (ECM) para la formación de conductos completos en el biochip 1400. Las estructuras tubulares, tales como los tejidos de barrera endoteliales o epiteliales, se establecen en el chip 1400 mediante el crecimiento de células en el canal del conducto 1410 contra un gel de ECM en el canal del estroma. La morfología y la función del túbulo pueden evaluarse mediante microscopía, un ensayo de integridad de barrera u otros ensayos funcionales. Además, las células, los medios y la ECM de cada canal 1310 podrían extraerse por separado para la evaluación de los componentes, como la qPCR, una propiedad exclusiva del chip. En una realización, los siguientes materiales son necesarios realizar el método de siembra descrito: chip 1200; soporte (formato de placa de 12 pocillos - pocillos cuadrados); colágeno-I 5 mg/ml (AMSBio Cultrex®, cultivo 3D, colágeno-I, cola de rata, 5 mg/ml, n.º 3447 -020-01); HEPES 1 M (Life Technologies 15630-122, pH 7,2-7,5); 37 g/l de NaHCO₃ (Sigma S5761-500G, disolver en agua estéril, ajustar el pH a 9,5 usando NaOH); medio (12,5 ml por soporte (12 chips)); células: la densidad de siembra

depende del tipo de células; pipetas de 10 µl o 20 µl (por ejemplo: Eppendorf Research® plus (canal único, volumen variable)); pipeta de 1 ml (de cualquier tipo) (opcional); puntas de pipeta de 10 o 20 µl (por ejemplo, epT.I.P.S.® Standard, Eppendorf Quality™ de 0,1-10 µl o 0,1-20 µl); depósito de medio; puntas de pipeta de 1 ml (de cualquier tipo) (opcional); pinzas estériles (tamaño pequeño); y hielo picado.

Haciendo referencia a la figura 13, según el método descrito, el método de siembra comienza con la apertura de los blísteres estériles que contienen el soporte y los chips 1300 debajo de la cámara de bioseguridad y la colocación de los chips en el soporte (hasta 12 chips por soporte). A continuación, añadir 14 µl de HBSS al canal del estroma de cada chip usando una pipeta de 10 µl o 20 µl. A continuación, preparar la cantidad requerida de gel de ECM (por ejemplo, 14 µl de gel por chip) según el siguiente método de preparación de 4 mg/ml de colágeno-I: colocar un tubo Eppendorf sobre hielo; el gel de colágeno-I de 4 mg/ml se prepara mezclando HEPES 1 M, 37 g/l de NaHCO₃ y 5 mg/ml de colágeno-I en una razón de 1:1:8; preparar al menos 100 µl del volumen total de gel para garantizar que los componentes se mezclen; mezclar bien pipeteando la mezcla hacia arriba y hacia abajo >20 veces, mientras está en hielo; si se forman burbujas, girar rápidamente el tubo hacia abajo (~5 segundos); y usar el gel inmediatamente después de la preparación (en el plazo de 10 minutos). A continuación, utilizando la pipeta de 10 o 20 µl, colocar la punta de la pipeta dentro del orificio de entrada del conducto 26. Asegurarse de que la punta encaje bien (debe quedar pegada en el orificio) y, a continuación, dispensar con cuidado 14 µl. Utilizar las pinzas para sujetar el chip en su lugar antes de retirar la pipeta. Dispensar 14 µl de gel en la entrada del canal del estroma de cada chip con la pipeta de 20 µl.

A continuación, colocar el soporte que contiene los chips en una incubadora humidificada (es decir, a 37 °C, el 5 % de CO₂) durante 15 minutos para permitir la polimerización del gel de colágeno-I. Añadir una gota de 2 µl de HBSS por encima de la entrada y la salida de los canales de la ECM para impedir que el gel se seque. En este caso es libre de sembrar las células epiteliales en cualquier momento, no es necesario que lo haga directamente. Recoger células según su protocolo de disociación. Contar el número de células vivas en la suspensión celular. Calcular el número requerido de células para sembrar en los chips y granularlos. En una realización, la densidad celular óptima depende del tipo de célula (generalmente entre 1.000 y 10.000 células/µl). Volver a suspender el sedimento en [900.000/10.000 =] 90 µl de medio para obtener una suspensión celular de 10.000 células/µl. Sembrar 6 µl de suspensión celular en la entrada del conducto utilizando el mismo procedimiento de pipeteo que se utilizó anteriormente para cargar el gel. Volver a suspender la suspensión celular durante la siembra para garantizar una densidad celular homogénea. Para garantizar que las células se adhieran a ambos lados del conducto (formación de conductos completamente circulares), también es necesario un procedimiento de siembra o siembra posterior (que se describe en la siguiente sección).

En una realización, el biochip 1400 puede girarse para permitir que el crecimiento celular forme un conducto completo con la superficie de contacto del conducto 1410. El biochip 1400 puede colocarse en un soporte de una incubadora en su superficie superior (con la superficie superior hacia abajo) hasta que una capa de células se adhiera a la superficie superior. Luego se gira suavemente el biochip 1400. A continuación, se añade 1 ml de medio al biochip 1400. Luego se cubre el biochip 1400 y se coloca de nuevo en la incubadora. El tiempo que necesitan las células para unirse depende del tipo de célula y, por lo general, varía entre 30 minutos y 6 horas. Las células contenidas en el conducto 1410 son suficientes para cubrir ambas superficies. Por lo tanto, colocar el soporte boca abajo es suficiente para que las células se sedimenten y se adhieran a la superficie superior. Después de girar el biochip 1400, las células en exceso que no estén adheridas a la superficie superior se sedimentarán en la superficie inferior y se unirán. Finalmente, se añade 1 ml de medio a cada pocillo del soporte que contiene un chip 1400 para impedir el secado del medio y el gel dentro de los canales.

En otra realización, puede utilizarse un método adicional antes de sembrar las células recubriendo la superficie interna del conducto dispensando colágeno IV diluido (5 µg/ml de medio) en el conducto para ayudar a la unión de las células, luego hacer fluir las células suspendidas en el medio a una velocidad de flujo muy baja en el conducto y trasladarlas delicadamente a la incubadora. A continuación, pipetear 6 µl de la mezcla de colágeno 5 µg/ml en el medio y colocar las placas con los chips en una incubadora a 37 °C. Tras el recubrimiento con colágeno de tipo IV, los chips están listos para sembrarse con células o pueden almacenarse hasta una semana a 4 °C. Usar una aguja de jeringa Hamilton de 5 µl para dispensar suavemente las células en el conducto. Con extrema precaución, moverla delicadamente a la incubadora. Según este procedimiento, las células que fluyen hacia el conducto se unirán homogéneamente a las paredes del conducto y la tensión superficial del colágeno será suficiente para mantener las células en posición si no se produce agitación.

En otra realización, la siembra de las células en el conducto puede lograrse mediante el uso de una bomba de microjeringa a velocidades de flujo decrecientes, para garantizar una unión homogénea. En primer lugar, limpiar el tubo Tigon de aguja de mariposa lavándolo con etanol al 70 %, manteniéndolo seco y, a continuación, lavarlo con medio. A continuación, conectar una bomba de microjeringa con múltiples cabezales a las entradas de los chips utilizando el tubo Tigon limpio y una punta de pipeta de 10 µl colocada en la entrada del chip. De manera similar a otro procedimiento descrito, se ejecuta un flujo en el primer conducto a una velocidad de flujo de 10 µl/min (según se encuentra en la simulación por CFD) durante 5 minutos, para garantizar la presión de flujo adecuada necesaria para empujar las celdas contra las paredes del conducto. Reducir la velocidad de flujo a 1 µl/min después de 5 minutos y mantenerla durante 50 minutos. Por último, retirar las conexiones de la bomba y colocar en la incubadora.

En otra realización, después de pipetear las células, conectar el soporte a un balancín giratorio diseñado para garantizar una monocapa ductal homogénea. El balancín giratorio está diseñado para hacer girar el chip alrededor del eje del conducto a una velocidad controlada.

En otra realización, se describe un método para cambiar el medio de los cultivos cultivados en el biochip 1400. La mayoría de los cultivos del chip 1400 requieren una renovación de medio cada 2-3 días. El medio viejo puede pipetearse fuera de los canales o aspirarse mediante un sistema aspirador. Después de vaciar los canales, puede añadirse medio recién preparado con una pipeta. El método descrito permite cambios de medio en el chip 1400 y también puede usarse para otros ensayos, como la fijación. En una realización, los materiales necesarios para utilizar el método descrito son los siguientes: chip 1400; soporte (formato de placa de 12 pocillos - pocillos cuadrados); medio celular específico; sistema aspirador y puntas (opcional); pipetas de 10 ul o 20 ul (por ejemplo: Eppendorf Research® plus (canal único, volumen variable)); pipeta de 1 ml (de cualquier tipo) (opcional); puntas de pipeta de 10 o 20 ul (por ejemplo, epT.I.P.S.® Standard, Eppendorf Quality™ de 0,1-10 ul o 0,1-20 ul); depósito de medio; puntas de pipeta de 1 ml (de cualquier tipo) (opcional); y pinzas estériles (tamaño pequeño).

En una realización de la presente descripción, el cambio de medio puede lograrse sacando de la incubadora un soporte que contiene los chips, colocando el soporte debajo de la cámara de bioseguridad y quitando la tapa del soporte. A continuación, aspirar el medio del pocillo que contiene el chip usando una pipeta de 1 ml o usando un aspirador. A continuación, aspirar el medio desde el interior de los canales a. Utilizar la pipeta de 10 o 20 ul y colocar la punta de la pipeta dentro del orificio de entrada del conducto. Asegurarse de que la punta encaje bien (debe quedar pegada en el orificio). Aspirar 10 ul del medio, que es un exceso de volumen. Utilizar las pinzas para sujetar el chip en su lugar antes de retirar la pipeta. A continuación, dispensar 6 ul del nuevo medio en el interior de los canales (igual que en la etapa 3). Repetir las etapas descritas anteriormente con todos los chips 1400 utilizados en el soporte (hasta 12 chips). A continuación, dispensar 1 ml de medio por encima de cada chip 1400. Por último, cerrar la tapa del soporte y volver a colocarlo en la incubadora.

Ejemplos de tejido cultivado

Las figuras 15A, 15B, 15C y 15D ilustran diferentes realizaciones que utilizan el biochip 100 para cultivar diversos tipos de células.

La figura 15A ilustra una vista en sección transversal del modelo de tejido ductal que utiliza un biochip 1500 según la presente descripción. El modelo de tejido ductal incluye un canal ductal 1510, células endoteliales 1520, hepatocitos humanos primarios 1530 y gel estromal 1540. Las células endoteliales 1520 pueden ser una de las células endoteliales derivadas de hígado humano (HLEC). En algunos ejemplos, los hepatocitos humanos primarios 1530 pueden ser células endoteliales microvasculares glomerulares humanas primarias.

En otro ejemplo, el tejido ductal puede ser uno de los tipos de tejido hepático, renal, pulmonar, mamario, pancreático, prostático, vascular, linfático, glandular u otros tipos de tejido.

En algunos ejemplos, el gel estromal 1540 puede ser un gel estromal asociado con las células endoteliales específicas cultivadas. Por ejemplo, si se utilizan células del túbulo proximal renal (RPTEC), puede usarse un gel estromal renal. El modelo de tejido ductal puede usarse cuando se cultivan células epiteliales o endoteliales normales libres de enfermedad adheridas a las paredes internas del compartimento interno del andamiaje ductal poroso. También muestra un tejido estromal que crece en el compartimento externo del andamiaje ductal, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el usuario puede personalizar el estroma para que esté hecho de biopsias, geles o materiales biológicos con diversos componentes y viscosidades. En un ejemplo, las células madre podrían cultivarse en los conductos formando un conducto hueco o una estructura similar a una salchicha donde las células podrían nutrirse desde el canal estromal. En otro ejemplo, las células y los materiales biológicos podrían extraerse de biopsias, líneas celulares y otros materiales biológicamente relevantes.

La figura 15B ilustra el biochip 1500 usado para cultivar células cancerosas. El biochip 1500 puede usarse para cultivar células cancerosas 1550 cerca de las células epiteliales o endoteliales normales 1520 libres de enfermedad para estudiar un modelo de enfermedad tisular tumoral. En un ejemplo, las células cancerosas 1550 o los grupos de tumores sólidos previamente cultivados se insertan al mismo tiempo en el compartimento del andamiaje ductal interno.

La figura 15C ilustra el biochip 1500 usado para cultivar grupos de tumores sólidos. El biochip 1500 puede usarse para cultivar grupos de tumores sólidos 1560 cerca de las células epiteliales o endoteliales normales libres de enfermedad 1520 para estudiar un modelo de enfermedad tisular tumoral. En un ejemplo, los grupos de tumores sólidos 1560 se insertan al mismo tiempo en el compartimento interno del andamiaje ductal. Esto permite crear un modelo de enfermedad para tumores con metástasis.

La figura 15D ilustra una realización del biochip 1500 que utiliza un modelo de enfermedad tisular tumoral en donde el tejido estromal normal libre de enfermedad 1530 se mezcla con células cancerosas 1570 o grupos de tumores sólidos previamente cultivados, y se inserta al mismo tiempo en el compartimento del andamiaje ductal externo, que rodea el conducto 1510, y crea un modelo de enfermedad basado en el estroma o el parénquima, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo de prueba de fármacos de hepatotoxicidad, en donde hepatocitos humanos primarios se cultivan dentro del gel estromal hepático y se cultivan en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto, las células endoteliales derivadas de hígado humano, que incluyen células microvasculares hepáticas, crecen y se unen a la pared interna del andamiaje ductal, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo de prueba de fármacos de nefrotoxicidad, en donde células glomerulares humanas primarias y células endoteliales microvasculares glomerulares humanas primarias 1520 se cultivan dentro del gel estromal renal 1540 y se cultivan en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto 1510, las células del túbulo proximal renal humano crecen y se unen a la pared interna del andamiaje ductal.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo de ensayo de fármacos de toxicidad en donde el modelo de hepatotoxicidad del hígado (que también metaboliza el fármaco) está conectado de manera microfluídica al modelo de nefrotoxicidad renal, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse en un modelo para someter a prueba la eficacia de los fármacos contra el cáncer de pulmón. Los fibroblastos pulmonares humanos se cultivan dentro del gel estromal fibroblástico pulmonar 1440 en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto, las pequeñas células epiteliales de las vías respiratorias humanas para la interfase aire-líquido crecen adheridas a las paredes internas del andamiaje ductal. En la superficie luminal de las células epiteliales, se unen y crecen tumores sólidos de células de adenocarcinoma de pulmón humano positivas para KRAS o células de adenocarcinoma de células no pequeñas, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo para someter a prueba la eficacia de los fármacos contra el cáncer de próstata. Las células estromales de próstata humana se cultivan dentro del gel estromal prostático en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto, las células epiteliales de próstata humana crecen adheridas a las paredes internas del andamiaje ductal. En la superficie luminal de las células epiteliales, se unen y cultivan tumores sólidos del clon LNCaP, células de carcinoma de próstata FGC o células de carcinoma de células pequeñas del cáncer de próstata en estadio E NCI-H660, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo para someter a prueba la eficacia de los fármacos contra el cáncer de mama. Los fibroblastos mamarios primarios humanos se cultivan dentro del gel estromal mamario en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto, las células epiteliales de mama humana crecen adheridas a las paredes internas del andamiaje ductal. En la superficie luminal de las células epiteliales, se unen y crecen tumores sólidos de las células HCC1500 (estrógeno +ve y progesterona +ve) o HCC70 (estrógeno +ve) o HCC2157 (estrógeno -ve y progesterona +ve), según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo para someter a prueba la eficacia de los fármacos contra el cáncer cerebral a través de la barrera hematoencefálica. Los astrocitos humanos se cultivan dentro del gel estromal astrocítico cerebral 1540 en el compartimento externo del conducto. Dentro del conducto, las células endoteliales microvasculares cerebrales de cerebro humano crecen adheridas a las paredes internas del andamiaje ductal. En la superficie luminal de las células vasculares, los tumores sólidos del glioblastoma cerebral y células tumorales de grado IV de astroblastoma U-118 MG se unen y crecen, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, el biochip 1500 puede usarse como modelo de prueba de fármacos para la dosificación del fármaco según el equilibrio de toxicidad y eficacia. El modelo de dosificación del fármaco consiste en la conexión microfluídica del modelo hepático, el modelo renal y, a continuación, el modelo de enfermedad. En este modelo, el fármaco pasa primero a través del chip hepático, donde el fármaco se metaboliza y se somete a prueba su hepatotoxicidad. Luego, el fármaco pasa a través del chip renal para someter a prueba la toxicidad en el túbulo proximal renal. Luego, el fármaco pasa por el modelo de enfermedad para someter a prueba la eficacia del fármaco en los tumores crecidos. Esta ilustración muestra el modelo de dosificación para los medicamentos contra el cáncer de pulmón, próstata, mama y cerebro. El fármaco normalmente supera al ensayo si se descubre un equilibrio farmacológico óptimo en cuanto a eficacia y toxicidad, según un aspecto de la presente descripción.

En una realización, los investigadores podrían utilizar el biochip 1500 para estudiar la fisiología y la patología de los tejidos ductales, los efectos de la mecanotransducción en los tejidos ductales, las rutas de señalización en los tejidos ductales, la metástasis preferencial del cáncer a través de los tejidos ductales, la difusión y el efecto de fármacos, estimulantes tóxicos y biológicos en los tejidos ductales y para la generación en masa de células madre.

En una realización, las empresas farmacéuticas podrían utilizar el biochip 1500 para cultivar organoides ductales y modelos humanos en chip para someter a prueba fármacos en él y estudiar su seguridad, eficacia y dosificación para predecir mejor la reacción del fármaco en los ensayos clínicos.

5 En una realización, los investigadores clínicos podrían utilizar el biochip 1500 para la medicina personalizada y de precisión, cultivando organoides ductales a partir de biopsias de pacientes, creando un chip personalizado para el paciente, para someter a prueba diferentes tratamientos y fármacos en él y pronosticar un tratamiento preciso y personalizado.

10 En una realización, el biochip 1500 puede incluir un andamiaje ductal que restringe el ensamblaje y el crecimiento de los tejidos epiteliales y endoteliales ductales hasta convertirse en solo una monocapa unida a las paredes interiores del andamiaje ductal, tomando su forma. La estructura cilíndrica de los tejidos epiteliales ductales está vinculada a la conservación de la polaridad celular a través de los marcadores de diferenciación y las proteínas de unión en las membranas de las células. El crecimiento de los tejidos ductales epiteliales o endoteliales en estructuras cilíndricas dentro del biochip permite que el modelo tisular sea mimético con los tejidos *in vivo*.

15 En una realización del biochip 1500, el compartimento externo y los poros del andamiaje ductal permiten que el cultivo y el crecimiento de cualquier tejido 3D en suspensión o en gel se interconecte con el tejido ductal en el interior del conducto. El cultivo conjunto de células epiteliales con el estroma circundante es importante porque el tejido fibroso desempeña un papel vital en la progresión del cáncer ductal a través de las fluctuaciones de los niveles hormonales y del factor de crecimiento. Tales fluctuaciones provocan cambios en la expresión génica de las células estromales, lo que conduce a diferentes biomarcadores de la matriz extracelular y, por lo tanto, a interrumpir las cascadas de señalización desde y hacia los tejidos epiteliales. El cultivo conjunto de los tejidos ductales epiteliales o endoteliales con sus tejidos estromales correspondientes hace que el modelo tisular sea mimético con los tejidos *in vivo*.

20 En una realización del biochip 1500, el andamiaje ductal cilíndrico de paredes porosas, que tiene un compartimento externo y externo, permite el acceso preciso a las células, los tejidos y las matrices extracelulares desde cualquier ubicación específica sin alterar los demás tejidos. Esto permite la colocación controlada de células tumorales o grupos de tumores sólidos en cualquier ubicación del modelo para un modelo de enfermedad tumoral específico. Los efectos resultantes de los fármacos sometidos a prueba en los tejidos cultivados dentro del biochip dependen de la precisión en la modelización del tamaño, la densidad y la ubicación de los tumores. Tener un andamiaje ductal hace que el modelo de enfermedad tumoral sea mimético con respecto a los tejidos *in vivo*.

25 En una realización del biochip 1500, el tamaño, la forma y la densidad de los poros, además del grosor de la pared del andamiaje ductal cilíndrico, permiten que las células se compriman y atraviesen la pared si se someten a alguna ruta de señalización. Esto imita el procedimiento de migración celular a través de los tejidos.

30 Haciendo referencia a la figura 16, en otra realización, el biochip 100 descrito puede incluir múltiples conductos y múltiples canales circundantes. En al menos un aspecto de la presente descripción, el biochip puede configurarse en un diseño de placa de 96 pocillos con múltiples conductos paralelos para que pueda usarse con fines de detección de fármacos de alto rendimiento. En un aspecto de este tipo, el sistema tiene las dimensiones de una placa convencional de 96 pocillos y, en algunos casos, puede usarse con una bomba conectada al puerto de entrada y salida. En otros casos, el fluido puede pipetearse manualmente en el puerto de entrada y llenará todo el conducto con la ayuda de fuerzas capilares.

35 En un ejemplo, el biochip 100 puede tener múltiples configuraciones de diseño en donde podrían diseñarse múltiples conductos para interconectarse con uno o más canales circundantes para usarse en aplicaciones de pruebas de difusión de fármacos.

40 En un ejemplo, el biochip 100 puede tener múltiples canales que podrían diseñarse para interconectarse con uno o más conductos, para usarse en aplicaciones de migración celular y metástasis.

45 En un ejemplo, el biochip 100 puede configurarse para interactuar con múltiples chips que contienen diferentes tipos de sistemas tisulares y organoides, procedentes del mismo o de un tipo diferente de individuo o línea celular. Por ejemplo, puede conectarse una pluralidad de biochips 100 para formar un modo de chip en ser humano.

Método para fabricar biochips

50 En otra realización, se describe un método para fabricar el biochip 100. Según el método descrito, el poli(metacrilato de metilo) (PMMA) se corta en la forma y el grosor deseados usando una máquina de corte por láser. En primer lugar, se recoge una lámina de PMMA de 1,5 mm de grosor y se inspecciona el grosor de la lámina en diferentes regiones utilizando un calibrador de grosor. Para una lámina de 300x300 mm, no debe variar entre los dos lados más de +/- 0,1 mm. A continuación, se realiza una etapa de sacrificio en el material sobrante para optimizar el procedimiento de corte por láser. Debe tenerse en cuenta el grosor del haz de láser. Por ejemplo, para que una máquina específica corte un cuadrado de 2 cm x 2 cm, las dimensiones de entrada pueden ser de 2,1 x 2,15 cm (teniendo en cuenta la diferencia de error del eje de la máquina). La capa protectora que recubre la lámina de PMMA debe permanecer puesta

en todo momento durante el procedimiento de fabricación. A continuación, toda la lámina de PMMA se corta en cuadrados iguales de 2 x 2 cm (nota: el resultado final debe ser de 2 x 2 cm). Según este método, una lámina de 30x30 cm debe dar al menos 196 cuadrados de PMMA. Mientras aún esté ensamblado en su posición en la máquina de corte por láser y usando un marcador, marcar el armazón cortado con los lados horizontales o verticales como referencia para las siguientes operaciones (para tener en cuenta los errores de corte por láser en la siguiente etapa). Además, marcar cada cuadrado usando un marcador en su borde (el mismo lado marcado anteriormente) y retirar la capa protectora que recubre el PMMA.

Según el método descrito, la siguiente etapa de fabricación del biochip 100 es ensamblar una abrazadera de pistón ascendente hecha a medida en una máquina fresadora automática, tal como una máquina fresadora de control numérico por ordenador (CNC). En primer lugar, colocar la abrazadera ascendente en la máquina de CNC y sujetarla. Antes de sujetar el mango de la abrazadera de CNC para fijar la abrazadera ascendente, conectar la sonda táctil a la máquina de CNC y optimizar la calibración de la superficie superior de la abrazadera según la sonda táctil utilizada. A continuación, iterar la posición de la abrazadera hasta asegurarse de que la superficie superior de la abrazadera esté perfectamente nivelada, luego fijar la abrazadera y sujetarla bien. A continuación, colocar un PMMA cuadrado de la etapa anterior en el pistón de la abrazadera y empujar hacia arriba hasta lograr un agarre y la superficie superior de PMMA de 2 cm x 2 cm quede coplanar con la superficie interna superior de la abrazadera. La posición de esta superficie en el eje z será la misma independientemente de la diferencia de error de grosor de los cuadrados de PMMA. A continuación, conectar el molino de bolas de 0,5 mm de diámetro a la máquina de CNC y tomar la referencia cero del eje z cuando el molino de bolas toque la superficie del armazón ensamblado. Calibrar adicionalmente la posición de la abrazadera, intentando cortar la primera operación de fresado del corte en hemiducto de 0,5 mm de diámetro y 0,25 mm de profundidad en el centro del armazón en toda su longitud.

Según el método descrito para fabricar el biochip 100, la etapa de garantía de calidad requiere desatornillar el pistón del armazón y retirar el armazón con este corte de una sola operación. Repetir este procedimiento para 20 armazones diferentes. A continuación, realizar pruebas de calidad sobre la profundidad de corte, en una realización, utilizando las varillas de precisión ultraprecisas de los dos conjuntos (eje de alta resolución de 0,5 mm de diámetro (Plug Gauge Set No-Go y Plug Gauge Set Go)). A continuación, colocar la varilla de 0,5 mm entre los dos hemiductos del armazón y presionar este conjunto intercalado con la mano. Intentar quitar la varilla, si la varilla se quitó fácilmente, entonces se cortan los hemiductos a una profundidad superior a 0,5 mm, repetir la calibración. Si la varilla No-Go no se quitó fácilmente, entonces comprobar si las dos superficies del armazón están bien alineadas entre sí, si no lo están y si hay un espacio entre ellas, entonces las profundidades de los hemiductos son poco profundas, repetir la calibración. Si la varilla No-Go no se quitó fácilmente y no hay espacio entre los dos armazones intercalados manualmente, entonces no hay ningún error significativo en la profundidad de corte, por lo tanto, proceder a la prueba de la varilla Go para garantizar una mayor calidad. A continuación, colocar la varilla de 0,5 mm entre los dos hemiductos del armazón y presionar este conjunto intercalado con la mano. Si la varilla no se quitó fácilmente, entonces el conducto es un ligeramente poco profundo. Finalmente, si la varilla GO se quitó fácilmente, entonces la ranura del hemiducto se cortó con un error de +/-0,5 µm.

Según el método descrito para fabricar el biochip 100, las operaciones de CNC son las siguientes con velocidades de alimentación de aproximadamente 100 mm/min y velocidades de husillo de 7000 revoluciones por minuto (RPM). La operación 1, utilizando el mismo molino de bolas de 0,5 mm del procedimiento de calibración, corta una ranura de 0,25 mm de profundidad que pasa por el centro del armazón de un lado a otro. La operación 2, se inicia automáticamente después de la operación 1, cortando una ranura de 5 mm de largo (a lo largo de la ranura del hemiducto cortada en la operación 1 en su centro) y 0,5 mm de anchura en toda la profundidad del armazón mediante 6 etapas de corte (0,25 mm de profundidad cada una). Operación 3, taladrar automáticamente el orificio de conexión de 0,5 mm a 4 mm del centro del eje del conducto. Operación 4, para la mitad de los chips y con el mismo conjunto de herramientas y chips que en las tres primeras operaciones, cortar el canal de 1,5 mm de largo, 0,5 mm de anchura y 0,5 mm de profundidad (armazón superior). Operación 5, para la mitad de los chips y con el mismo conjunto de herramientas y chips que en las cuatro primeras operaciones, perforar el otro orificio de conexión de 0,5 mm (armazón superior). A continuación, retirar el chip del pistón de la abrazadera, montar otro y hacer lo mismo con todas las láminas cuadradas de PMMA cortadas en la operación de corte por láser.

Según el método descrito para fabricar el biochip 100, las operaciones adicionales de CNC son las siguientes con velocidades de alimentación de aproximadamente 100 mm/min y velocidades de husillo de 7000 revoluciones por minuto (RPM). En primer lugar, girar el chip hacia el otro lado y, con la misma herramienta, continuar con las siguientes operaciones. Operación 6, cortar la ranura oblicua de 4 mm de longitud horizontal y 2,5 mm de longitud vertical, 0,5 mm de anchura y 0,4 mm de profundidad para todos los chips. Operación 7, para la mitad del armazón (armazón inferior), y con la misma herramienta, cortar la ranura horizontal de 4 mm de largo, 0,5 mm de anchura y 0,4 mm de profundidad desde el orificio de entrada del estroma hasta el borde de la superficie de contacto del conducto. Operación 8, para la otra mitad del armazón (armazón superior), y con la misma herramienta, cortar la ranura horizontal de 2,5 mm de largo, 0,5 mm de anchura y 0,4 mm de profundidad desde el orificio de entrada del estroma hasta el orificio de conexión junto a la salida del canal del estroma. Operación 9: para la otra mitad del armazón (armazón superior), y con la misma herramienta, cortar la ranura horizontal de 2,5 mm de largo, 0,5 mm de anchura y 0,4 mm de profundidad desde el orificio de entrada del estroma hasta el orificio de conexión situado junto a la salida del canal del estroma. Luego, retirar el chip del pistón de la abrazadera y ensamblar otra repetición para todos los chips. Operaciones 9-12:

ensamblar la broca de 1 mm, ubicar el armazón superior en el pistón y taladrar los cuatro orificios de entrada y salida restantes para el conducto y el canal del estroma. Por último, repetir todas las operaciones para todos los demás armazones superiores.

- 5 En otra realización, se describe un método adicional para fabricar el biochip 100. El biochip 100 puede fabricarse utilizando procedimientos de micromoldeo por inyección. Para ello, primero fabricar el molde mediante mecanizado CNC. Deben realizarse varias iteraciones y controles de calidad para garantizar la precisión de las características de corte en el molde de moldeo. Después de optimizar la fabricación del molde, se iniciará el procedimiento de moldeo por inyección, en donde se optimizarán los parámetros de moldeo para obtener características y dimensiones precisas del armazón, donde se realizan controles de calidad. Deben realizarse iteraciones en el procedimiento de moldeo para garantizar que obtenemos un armazón repetible con resoluciones aceptables.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de un biochip, comprendiendo el método:
 - 5 proporcionar al menos un armazón, en donde el al menos un armazón incluye, un canal configurado para soportar la al menos una estructura de membrana y al menos un canal microfluídico en comunicación de fluido con el canal; proporcionar al menos una membrana porosa; curvar al menos una membrana porosa en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica.
 - 10 en donde un conducto poroso cilíndrico redondo se forma curvando una primera parte de una membrana porosa y una o más membranas porosas adicionales forman una segunda parte del conducto, e insertar la al menos una membrana porosa entre el al menos un armazón.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos un armazón está configurado para contener características que forman los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde al menos una estructura de membrana se combina dentro del espacio interno dentro de los andamiajes cilíndricos de la al menos una estructura de membrana, proporcionando capas de andamiajes ductales de membrana porosa anidados unos dentro de otros.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un armazón está configurado de modo que los canales microfluídicos que conducen a los compartimentos interno y externo del andamiaje ductal estén interconectados en una o más zonas de las ubicaciones del andamiaje ductal poroso.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en donde las características del al menos un armazón que forma los canales microfluídicos que conducen al compartimento interno del andamiaje ductal podrían extenderse más allá de los orificios de entrada y salida del canal y, posteriormente, obstruirse después del ensamblaje de los subcomponentes del chip.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde el conducto cilíndrico se forma uniendo las membranas y al menos un armazón mediante una unión química, unión por presión o unión térmica o una combinación de estas.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en donde las membranas curvas que forman el andamiaje ductal cilíndrico pueden unirse antes o después del ensamblaje en el al menos un armazón.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el método de unión se usa para fundir un grosor controlado de las superficies de los materiales, soldando las diferentes partes entre sí.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, en donde el enlace químico contiene una mezcla de etanol y cloroformo.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un vidrio cubreobjetos que forma las capas superior e inferior del biochip se une al menos a un armazón utilizando el mismo método que las otras partes o utilizando un pegamento polimérico de vidrio.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en donde los tapones que cierran los extremos de los canales microfluídicos que conducen al compartimento interior del andamiaje ductal, se unen o utilizan un pegamento polimérico.
- 55 12. El método de la reivindicación 1, en donde las extensiones de la membrana de andamiaje ductal se mantienen en sus extremos y se tensan para impedir que se arruguen las membranas.
13. El método de la reivindicación 1, en donde se forma un conducto poroso redondo curvando una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona de la superficie de andamiaje ductal a lo largo de su longitud.
- 60 14. El método de la reivindicación 1, en donde se forma un conducto poroso redondo curvando una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona plana a lo largo de la superficie del andamiaje ductal que es una extensión de la superficie del conducto.
15. El método de la reivindicación 1, en donde un conducto poroso redondo se forma curvando más de una membrana plana sobre una varilla en un bucle cerrado de sección transversal cilíndrica y uniéndola en una zona plana a lo largo de la superficie del andamiaje ductal que es una extensión de la superficie del conducto.

16. El método de la reivindicación 1, en donde la formación de las membranas incluye una varilla que sostiene la membrana en sus formas deseadas, se encuentra entre al menos un armazón, con los extremos del andamiaje ductal unidos al armazón y rodeados por al menos un armazón.

Figura 1A

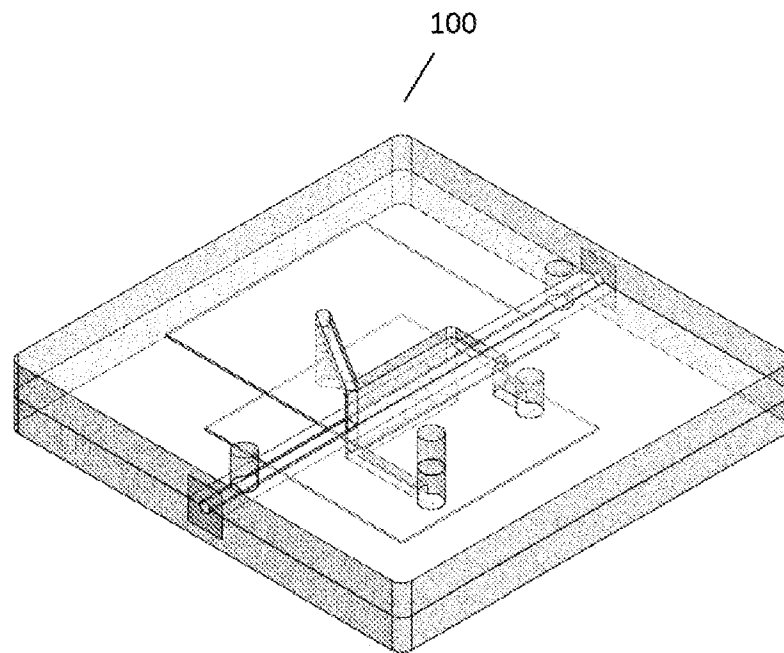


Figura 1B

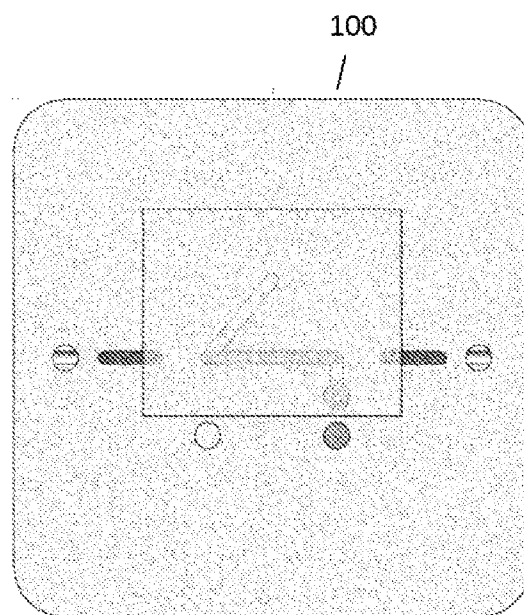


Figura 2A

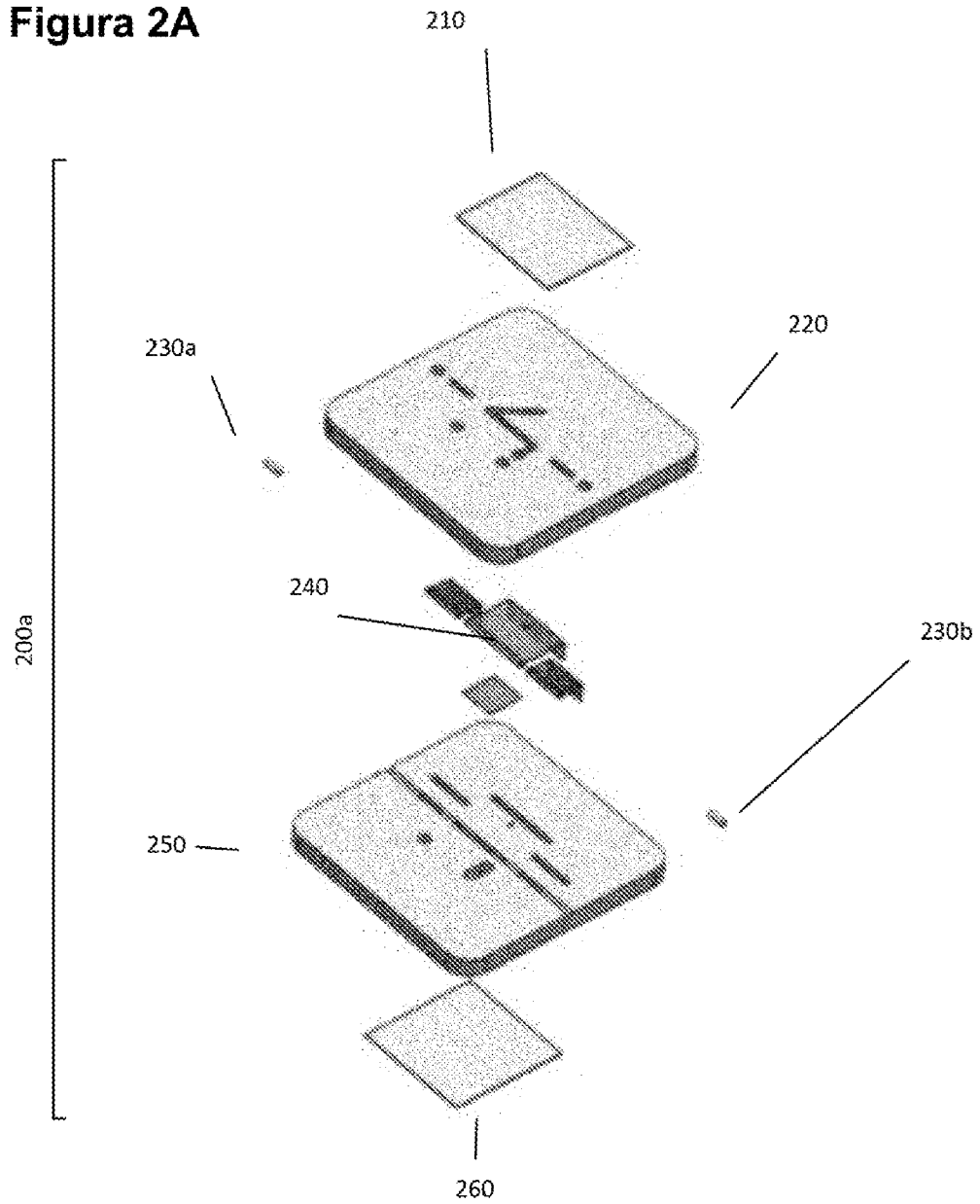


Figura 2B

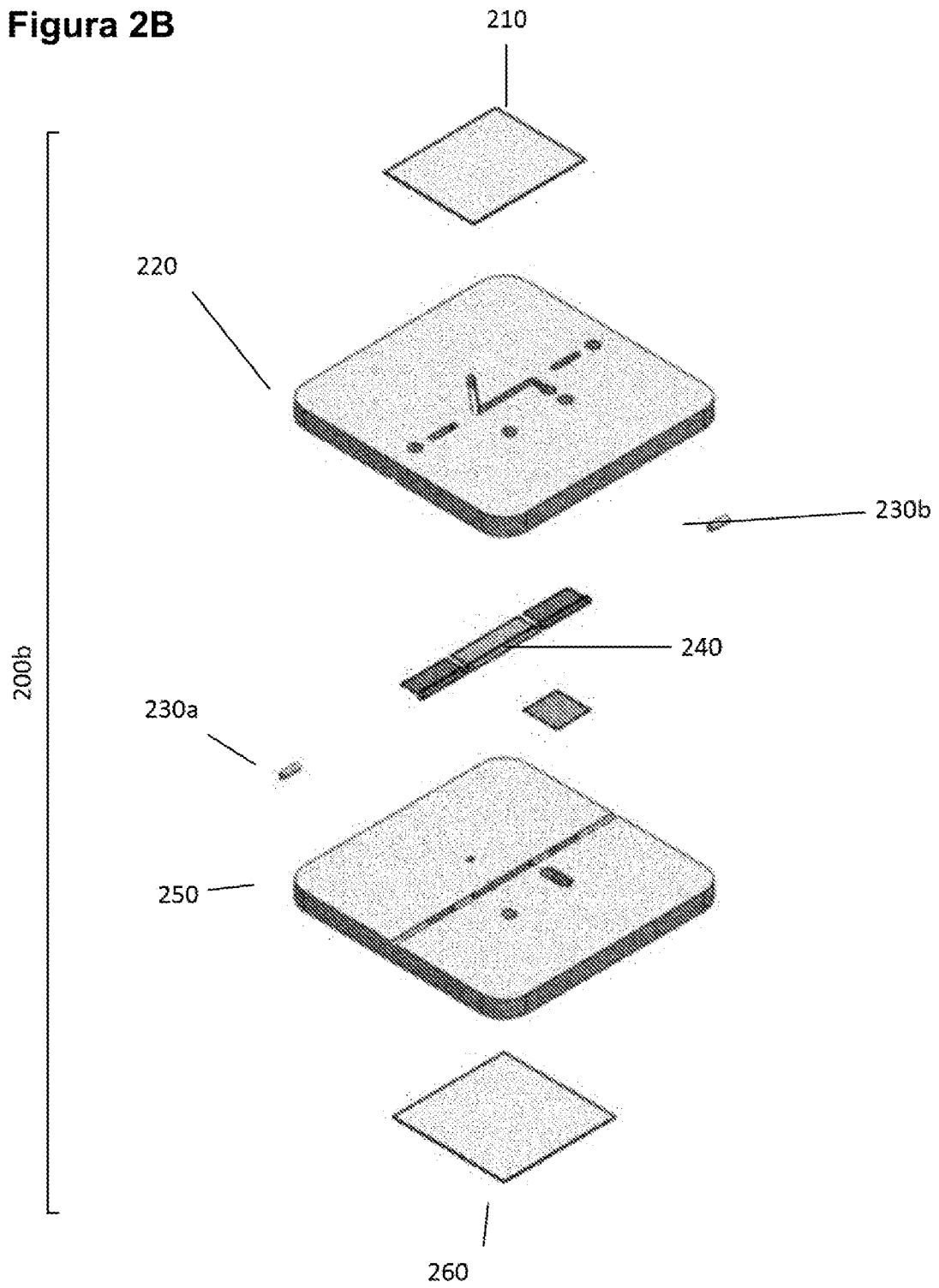


Figura 2C

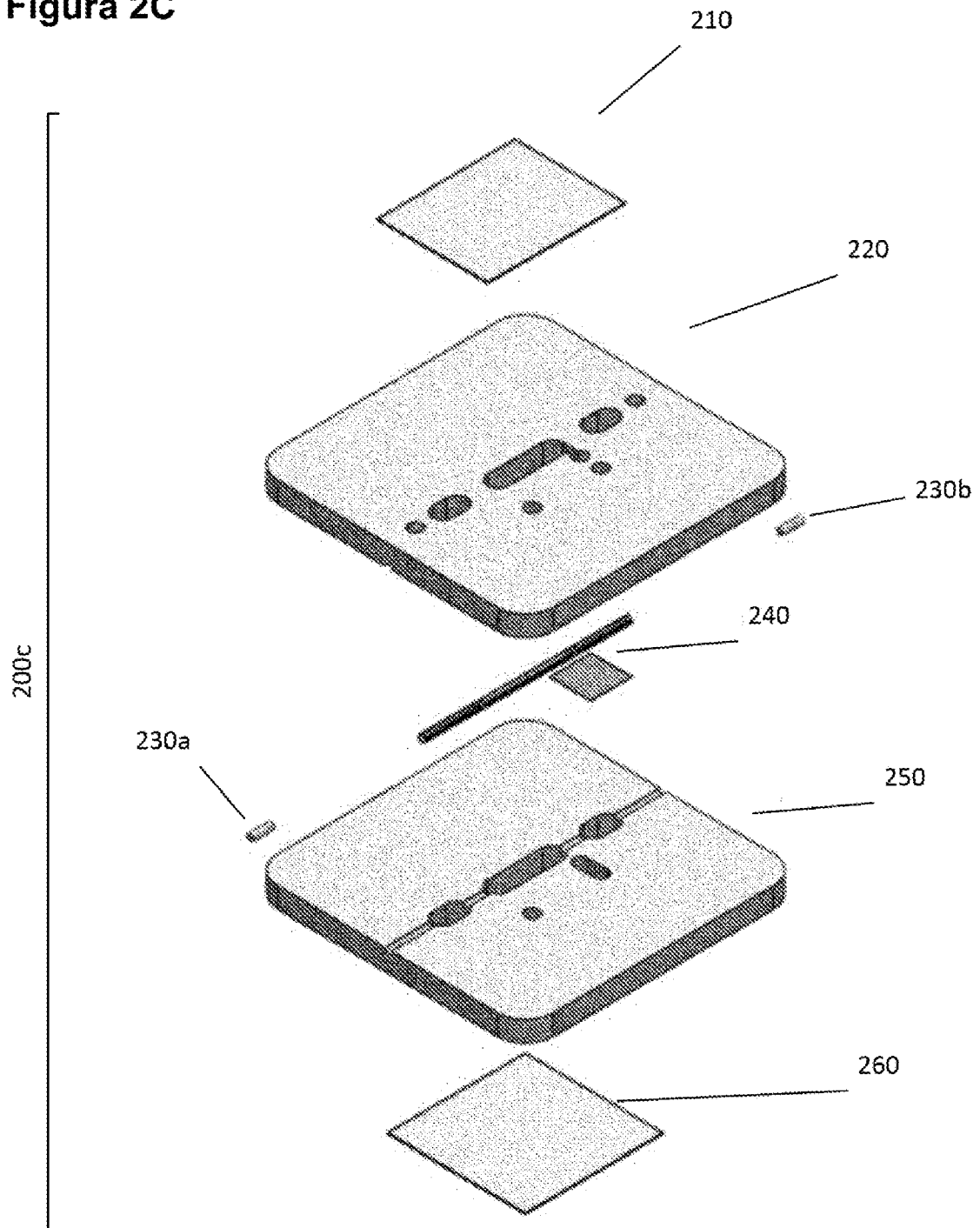


Figura 2D

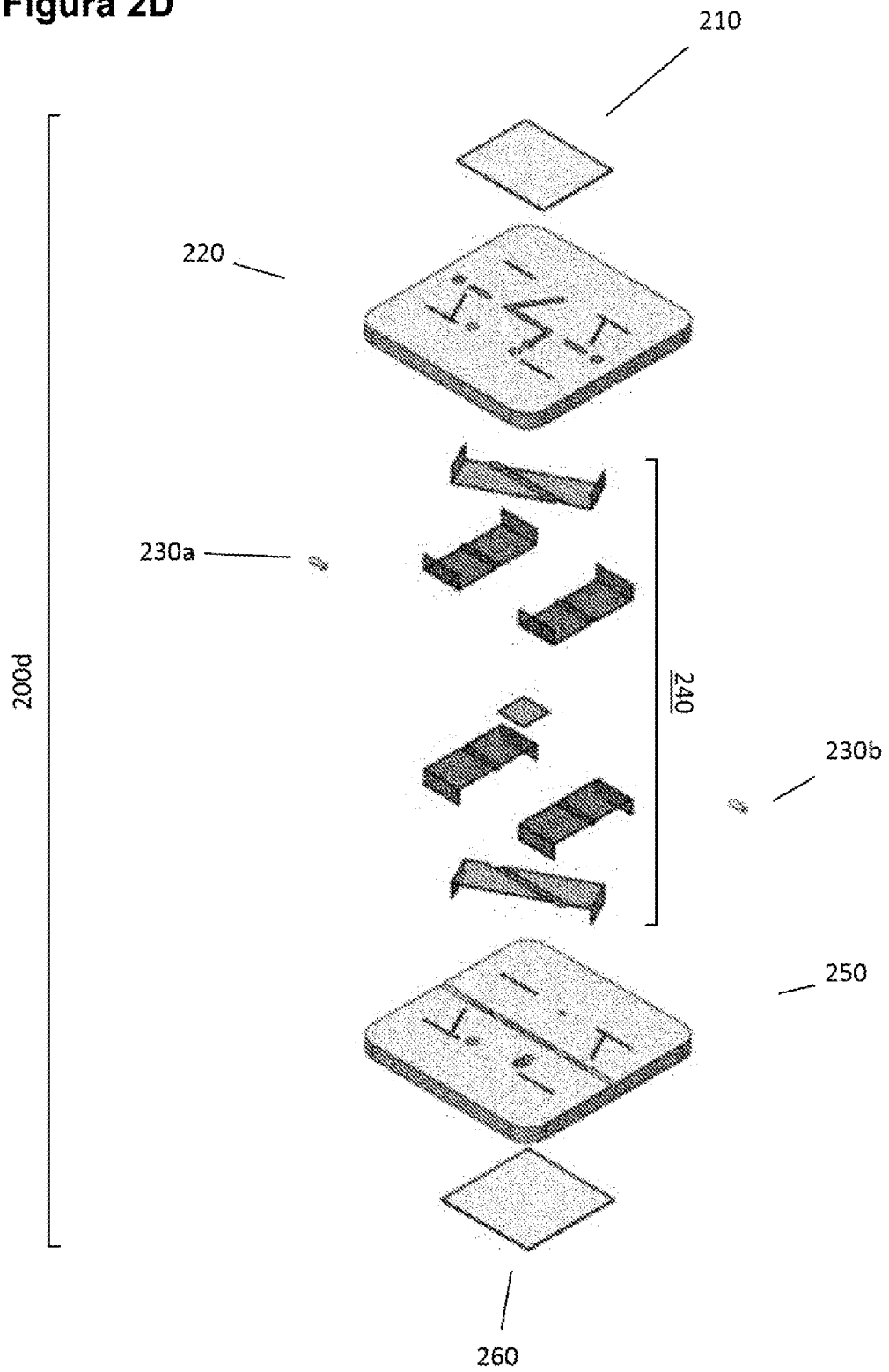


Figura 2E

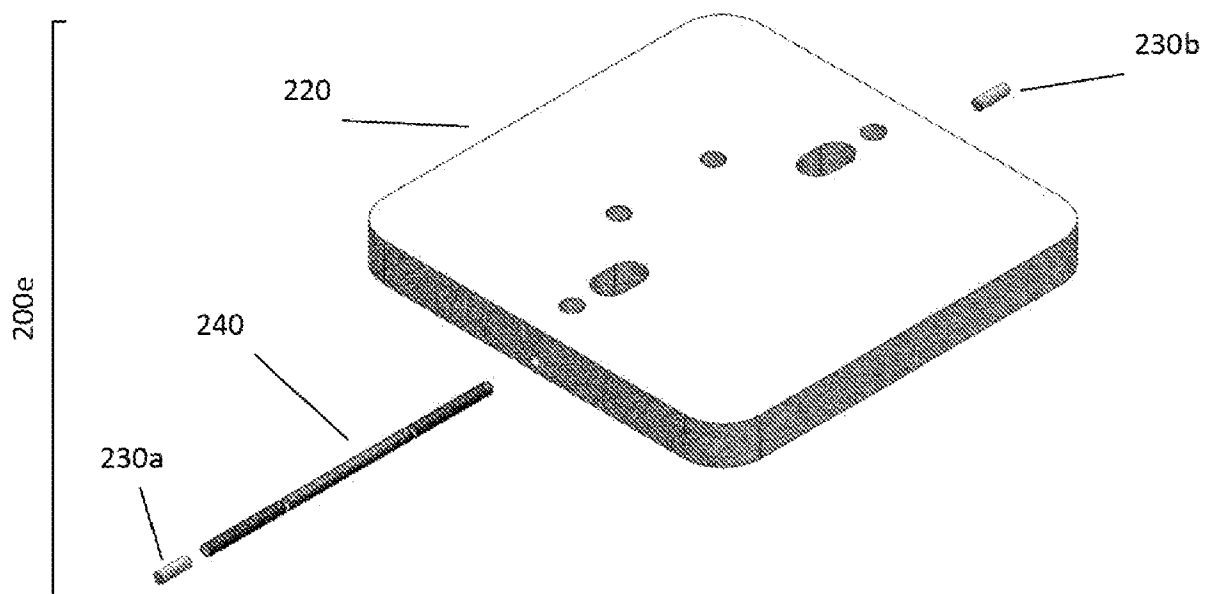


Figura 2F

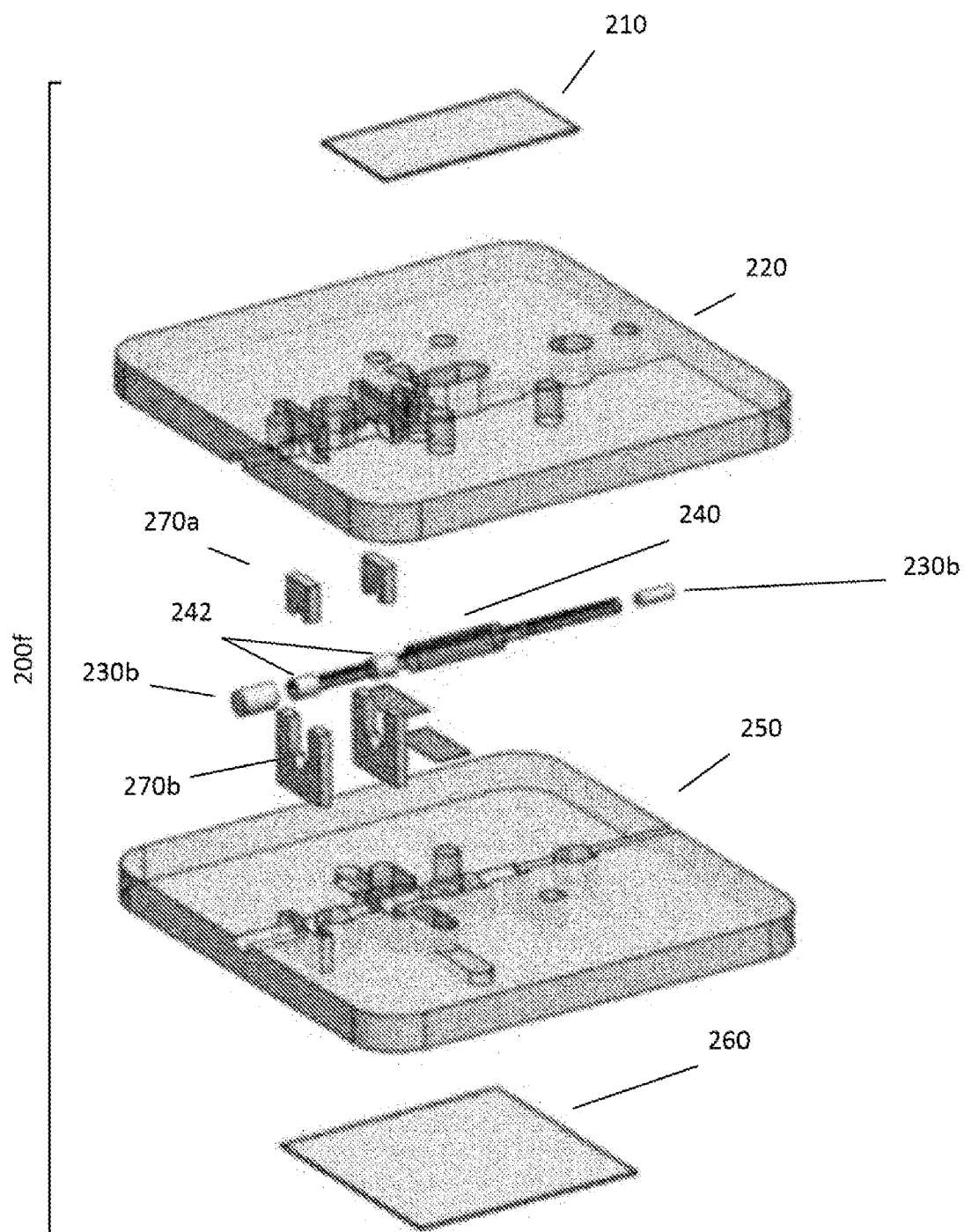


Figura 3A

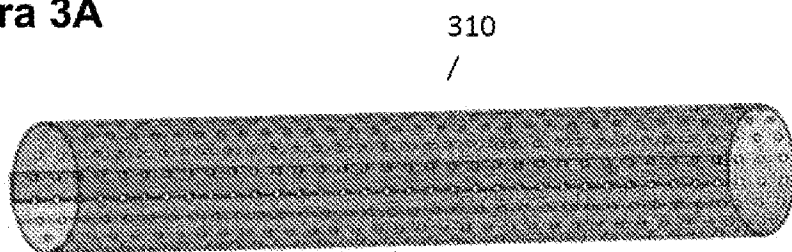


Figura 3B

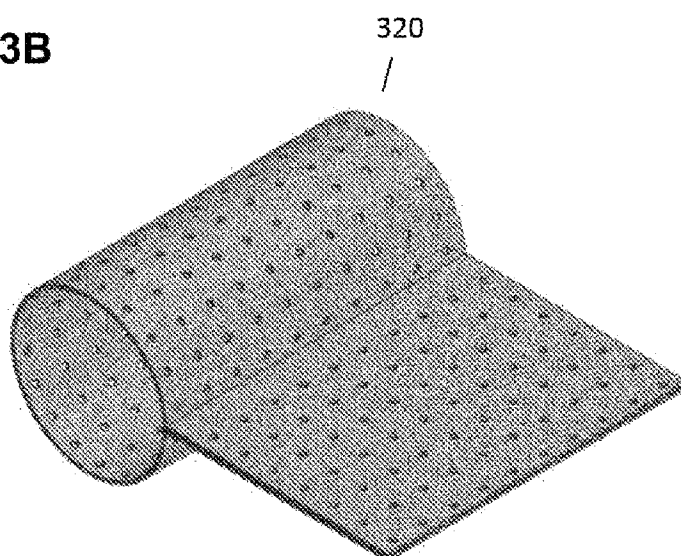


Figura 3C

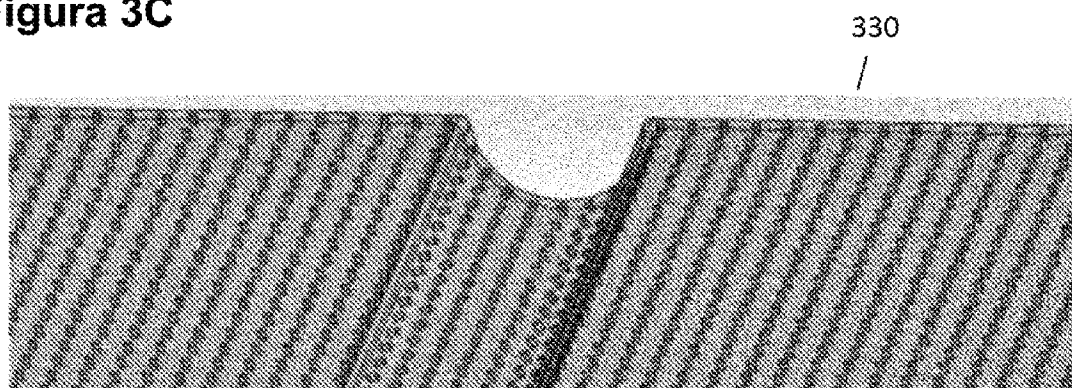


Figura 4A

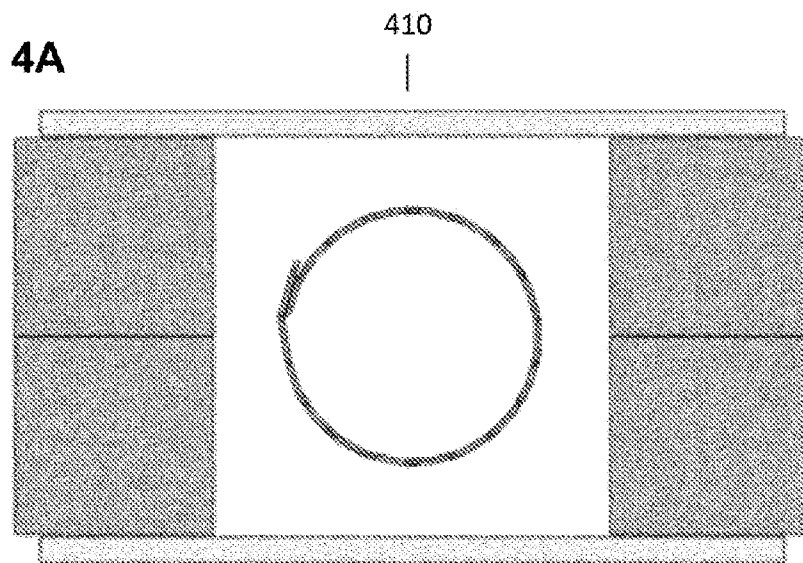


Figura 4B

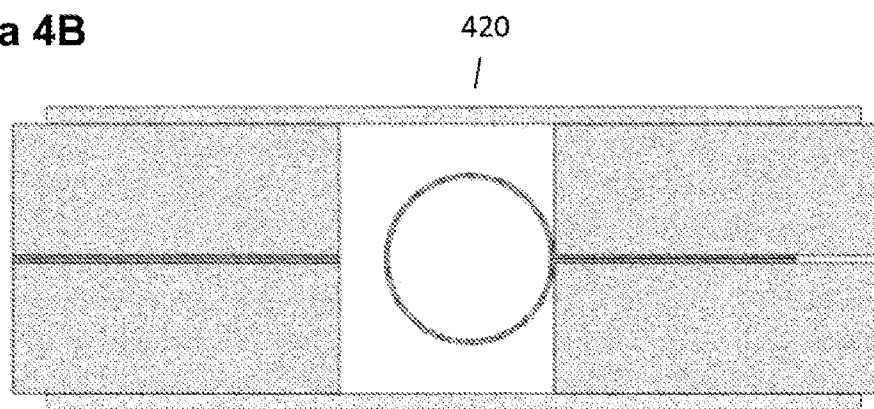


Figura 4C

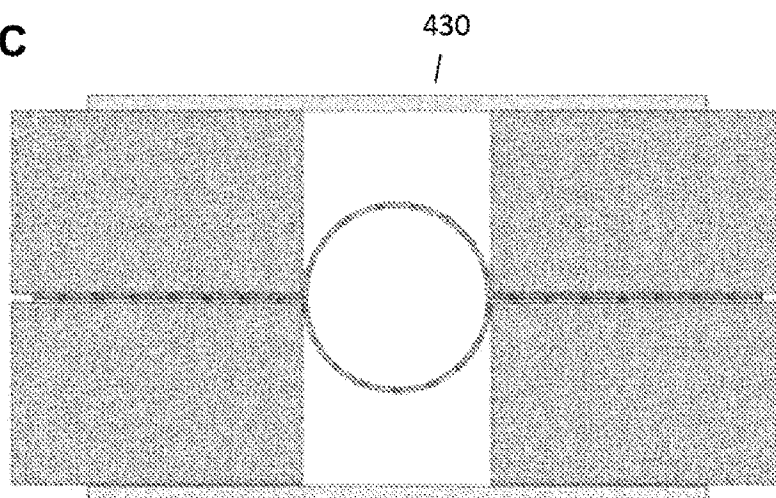


Figura 4D

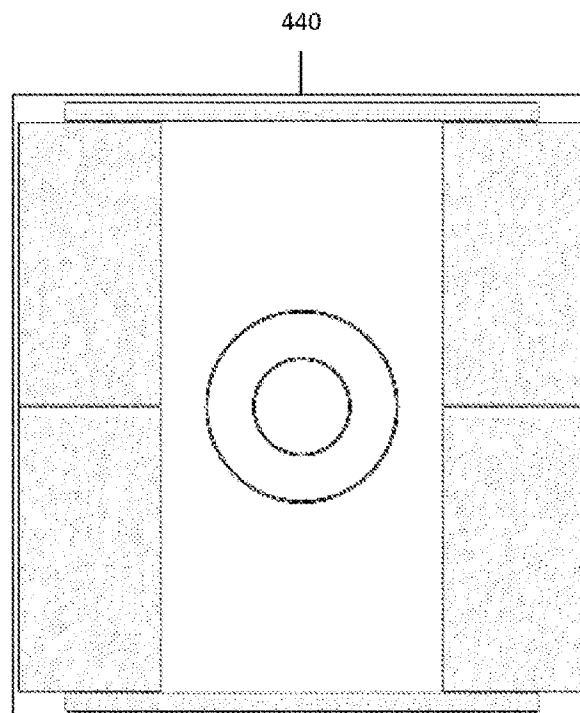


Figura 5A

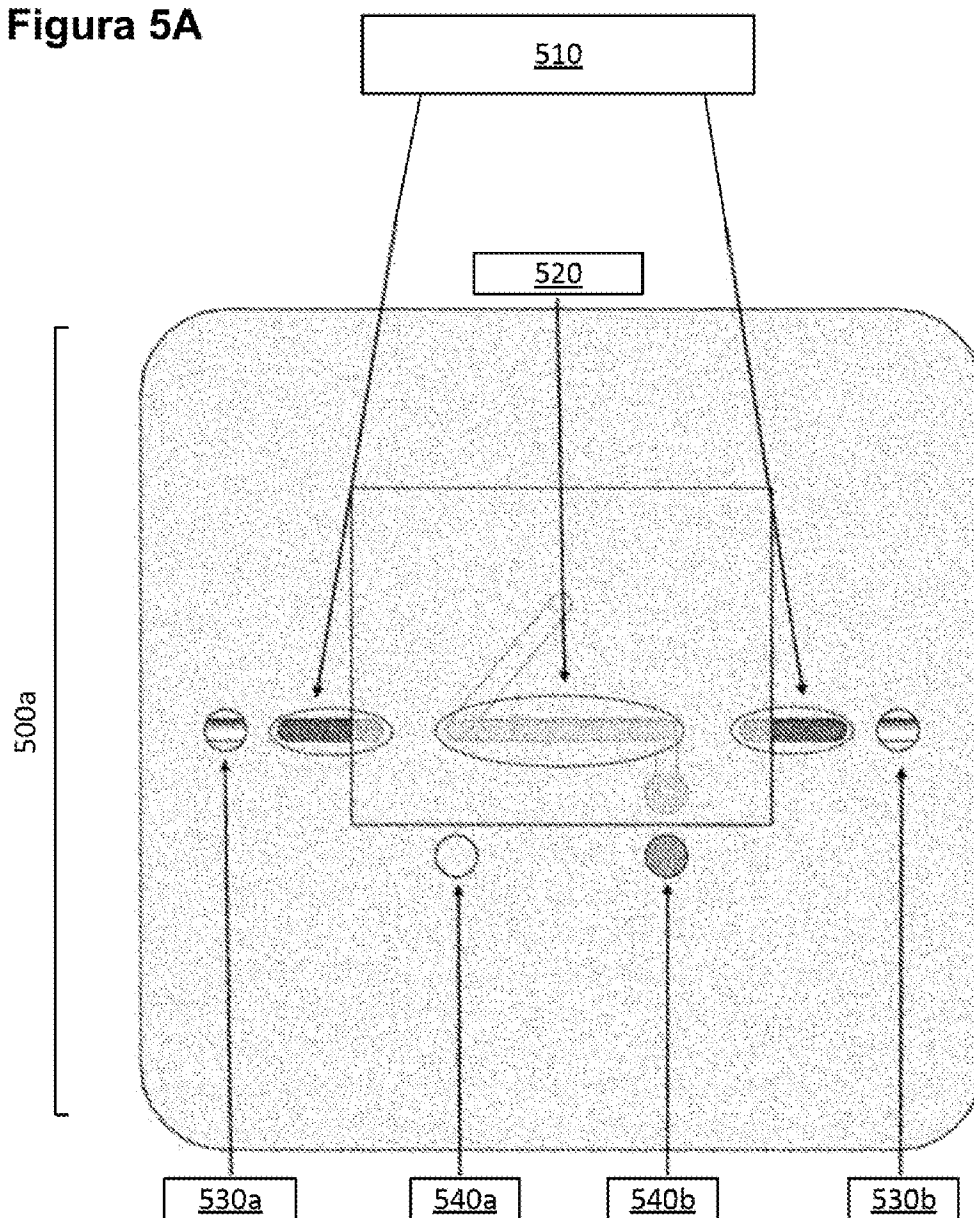


Figura 5B

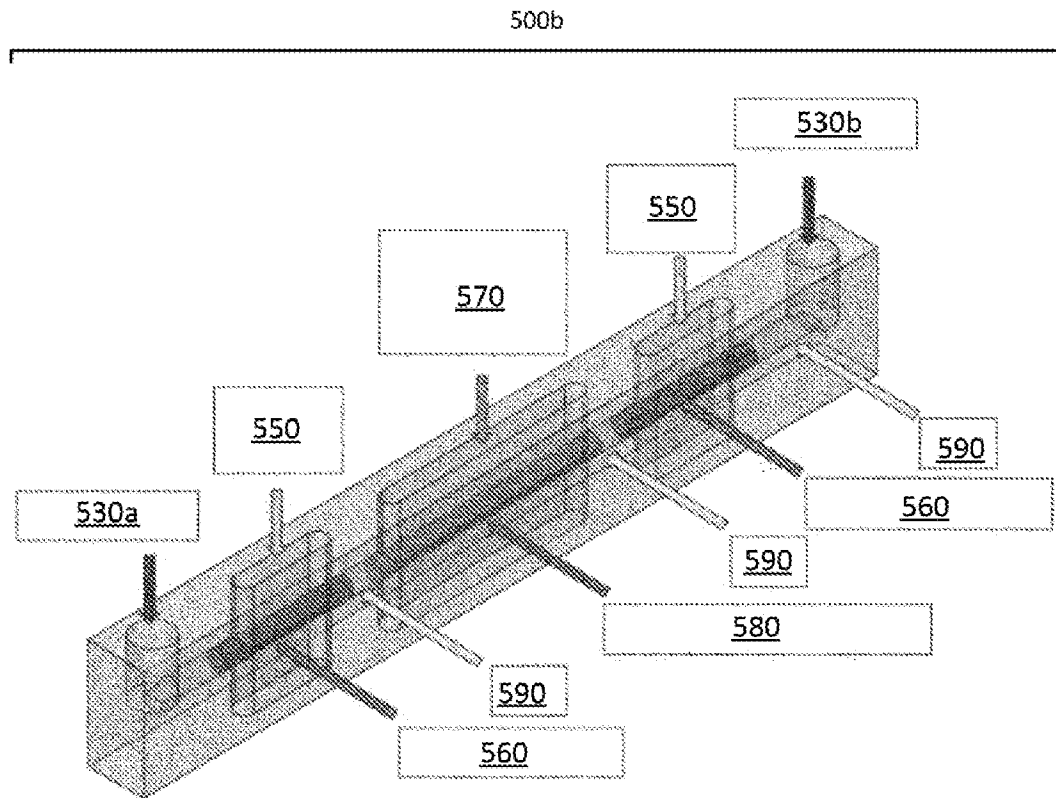


Figura 5C

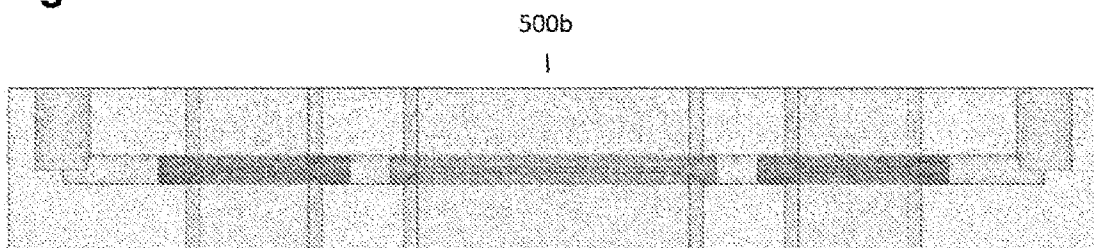


Figura 6A

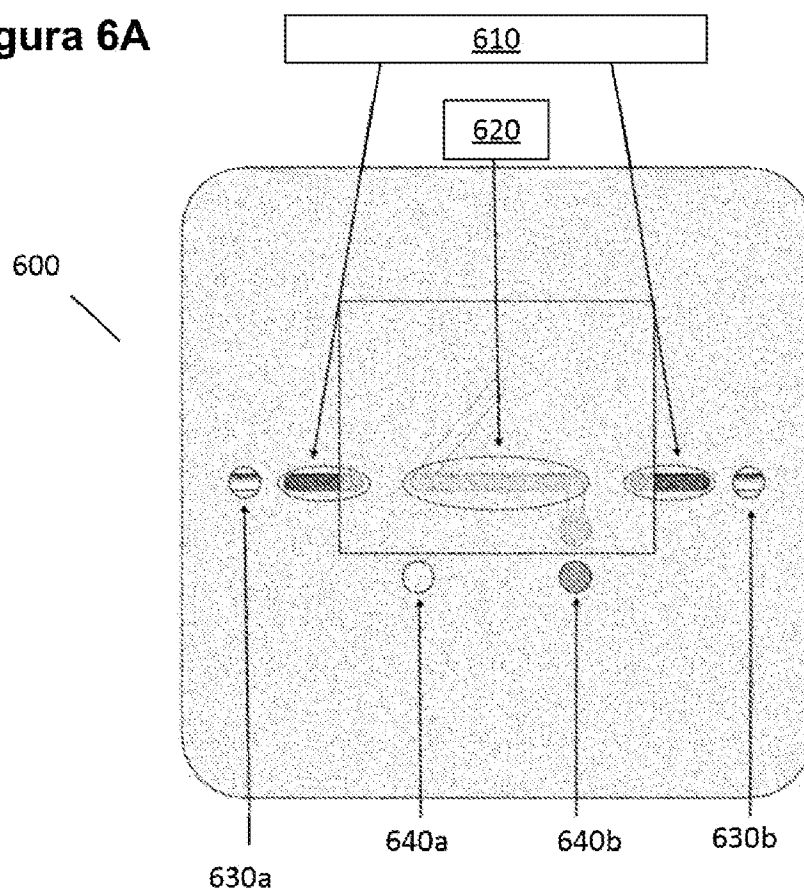


Figura 6B

650

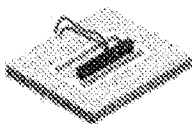
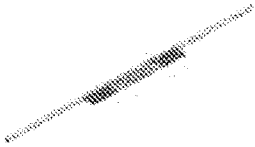
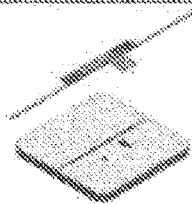
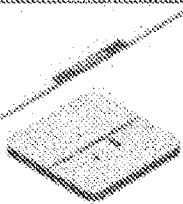
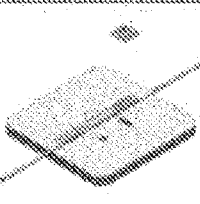
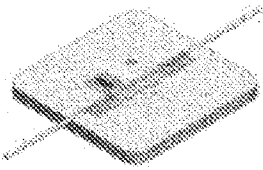
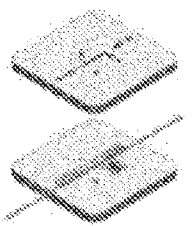
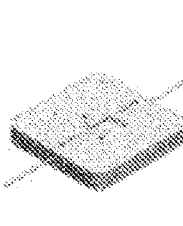
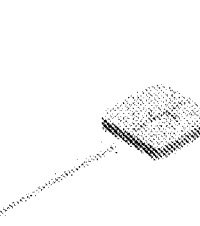
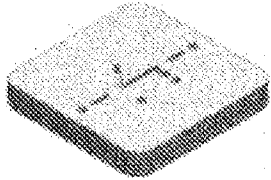
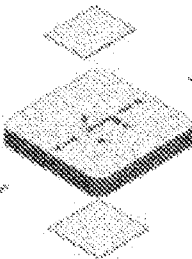
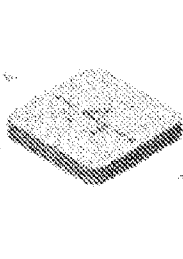
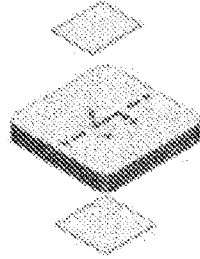
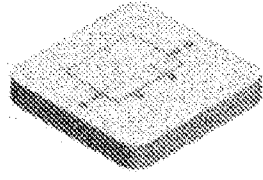
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (curvatura de membrana)				
Procedimiento 2 (unión térmica de membrana)				
Procedimiento 3 (procedimiento de unión química de ensamblaje de membranas inferiores de armazón)				
Procedimiento 4 (procedimiento de ensamblaje de la prensa térmica del armazón asistido químicamente)				
Procedimiento 5 (taponamiento de conductos y ensamblaje de vidrio)				

Figura 7A

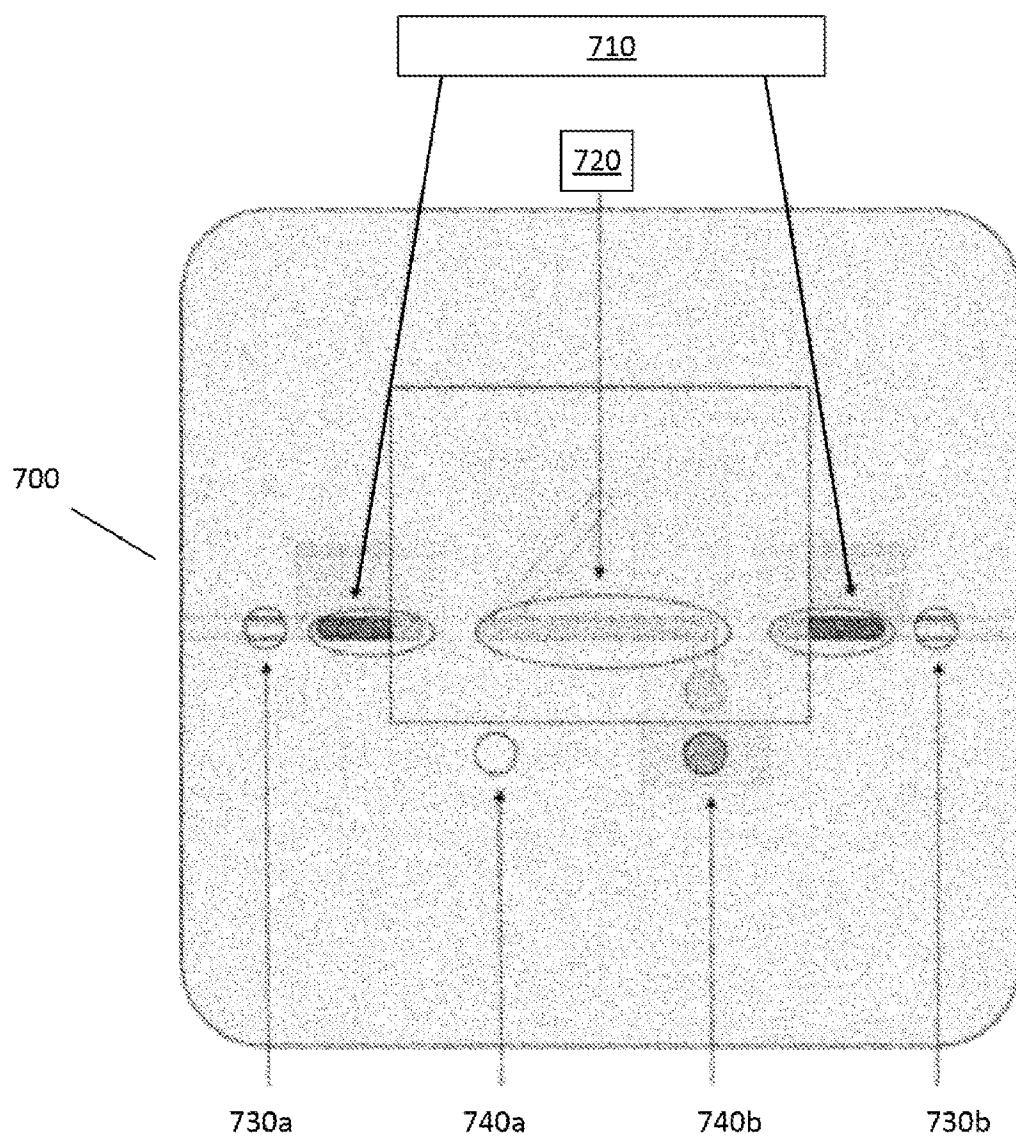


Figura 7B

750

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (curvatura de membrana)				
Procedimiento 2 (ensamblaje de membranas en la parte inferior del armazón)				
Procedimiento 3 (procedimiento de unión térmica y química de membranas inferiores de armazón)				
Procedimiento 4 (apertura del taladro de membrana)				
Procedimiento 5 (corte de extensión de membrana)				
Procedimiento 6 (taponamiento de conductos y ensamblaje de vidrio)				

Figura 8A

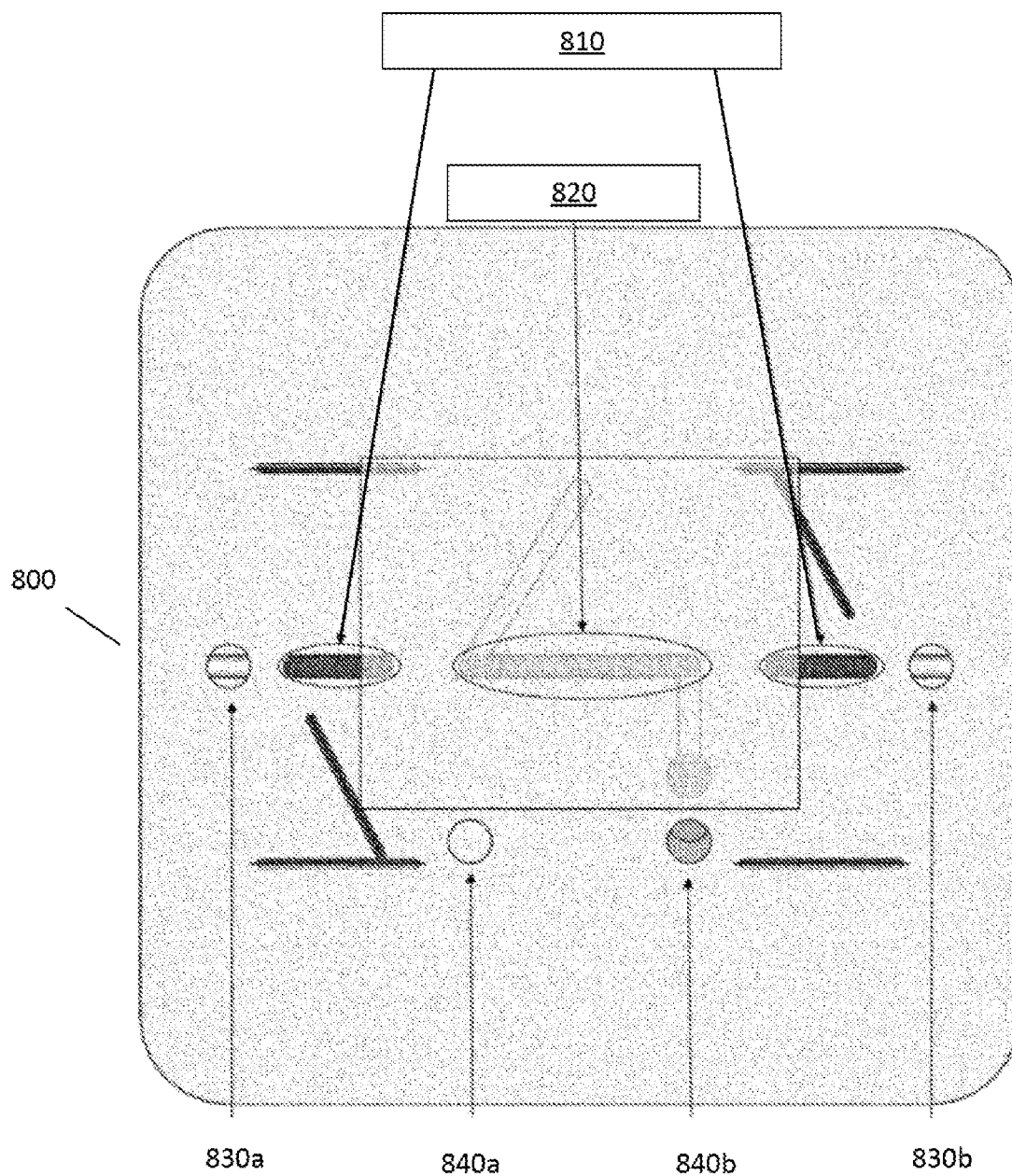


Figura 8B

850

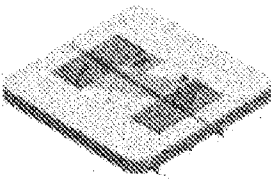
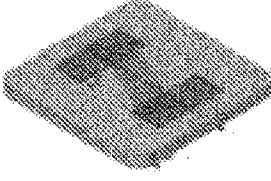
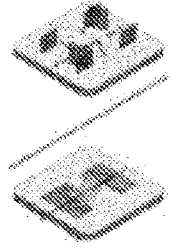
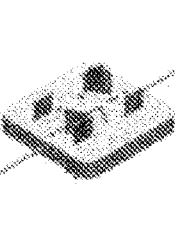
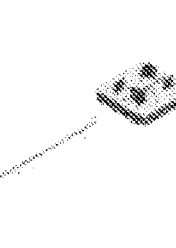
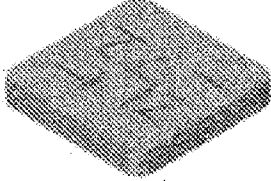
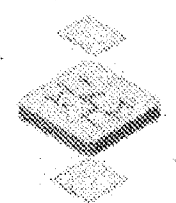
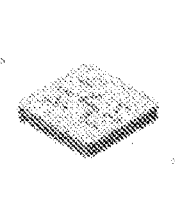
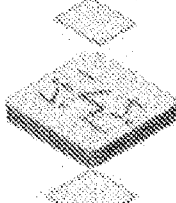
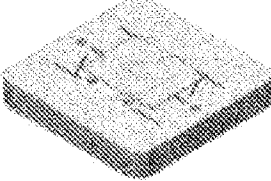
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (ensamblaje de membranas del armazón inferior)				
Procedimiento 2 (ensamblaje de membranas del armazón superior)				
Procedimiento 3 (procedimiento de ensamblaje de la prensa térmica y unión química del armazón)				
Procedimiento 4 (taponamiento de conductos y ensamblaje de vidrio)				

Figura 9A

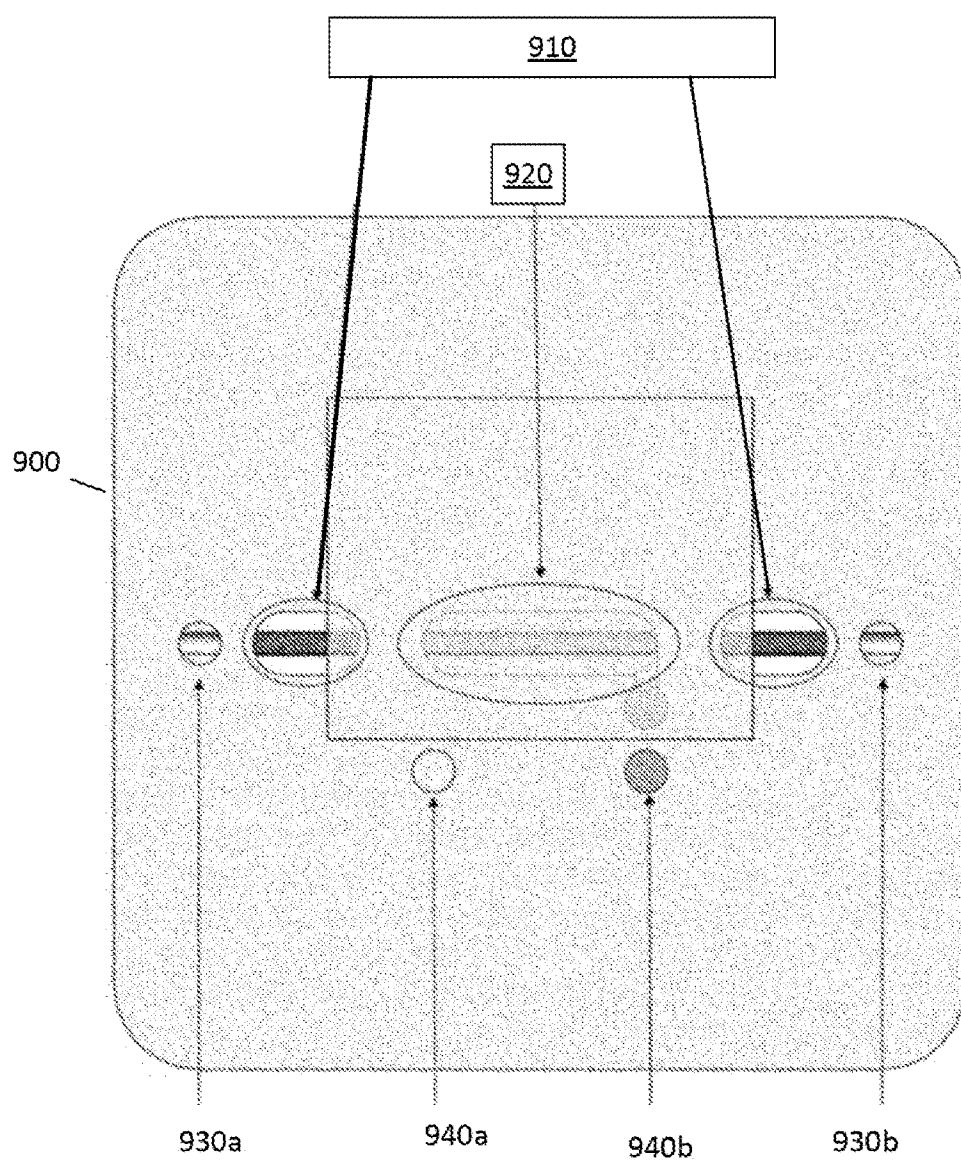


Figura 9B

950

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (ensamblaje de varillas curvas de membrana)				
Procedimiento 2 (curvatura de la membrana en varillas)				
Procedimiento 3 (etapa de unión previa y corte de la membrana)				
Procedimiento 4 (procedimiento de unión térmica y química de ensamblaje de amazón y membranas)				
Procedimiento 5 (laponamiento de conductos y ensamblaje de vidrio)				

Figura 10A

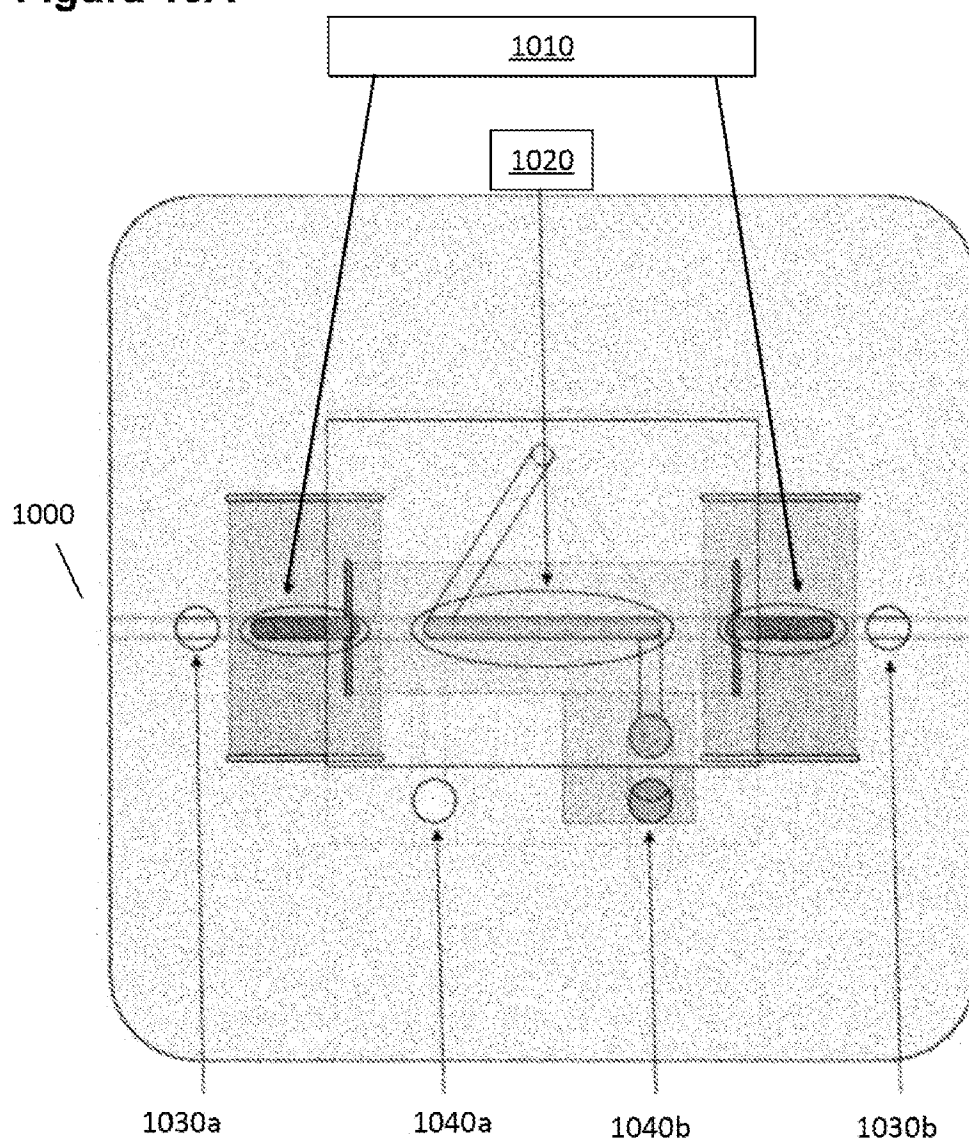


Figura 10B

1050

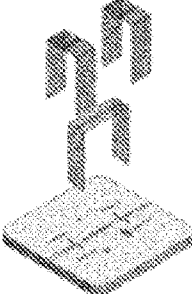
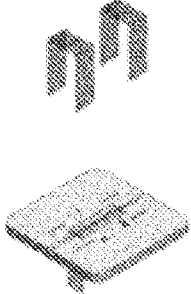
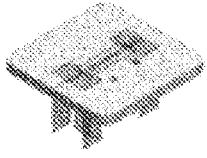
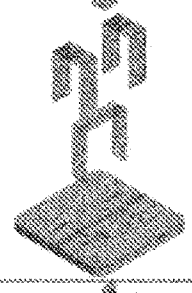
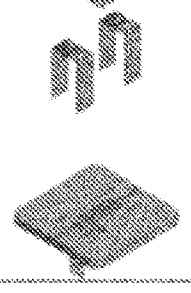
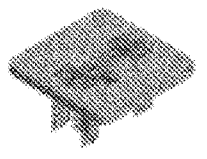
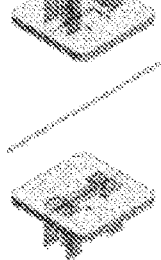
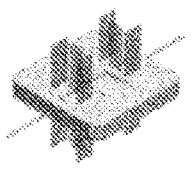
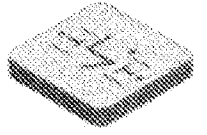
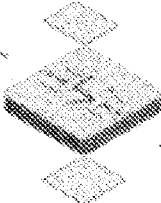
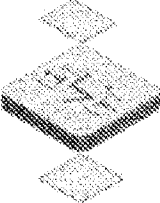
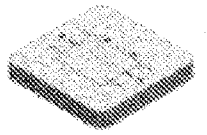
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (ensamblaje de membranas del armazón inferior)				
Procedimiento 2 (ensamblaje de membranas del armazón superior)				
Procedimiento 3 (procedimiento de ensamble de la prensa térmica y química del armazón)				
Procedimiento 4 (taponamiento de conductos y ensamble de vidrio)				

Figura 11A

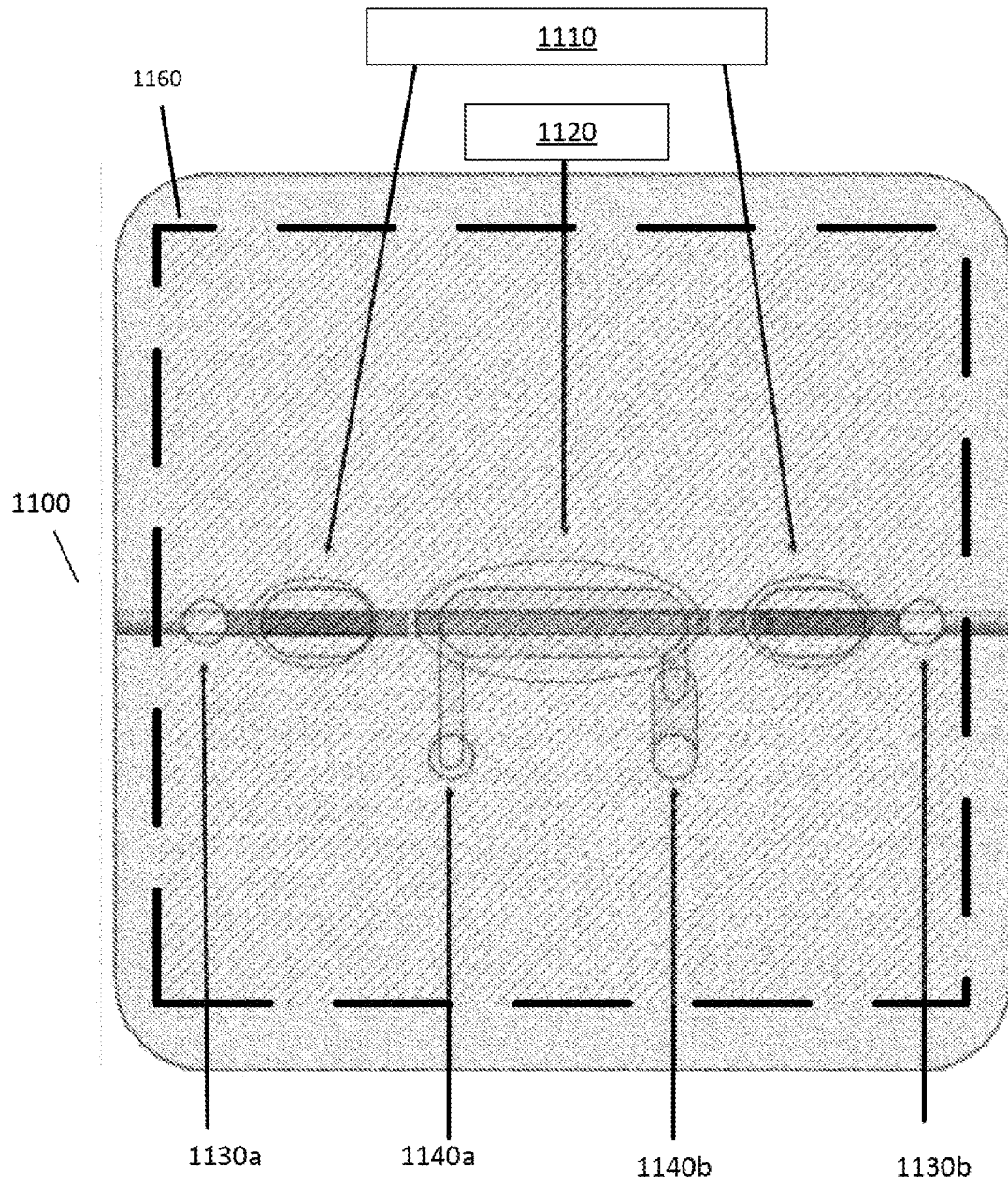


Figura 11B

1150

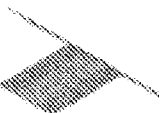
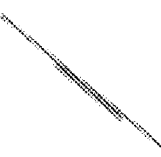
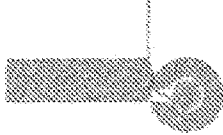
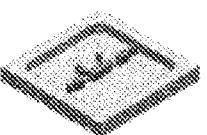
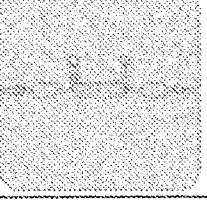
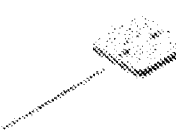
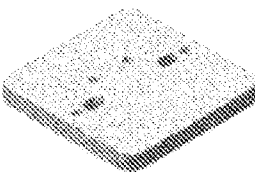
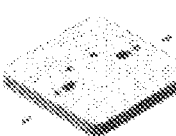
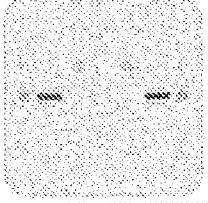
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Procedimiento resultante
Procedimiento 1 (ensamblaje de varillas curvas de membrana)				
Procedimiento 2 (curvatura de la membrana en varillas)				
Procedimiento 3 (etapa de unión previa y corte de la membrana)				
Procedimiento 4 (moldeo del armazón y eliminación de la capa de sacrificio)	<u>molde de sacrificio</u> 	<u>Moldeo de vidrio o polímero</u> 	<u>Grabado UV o químico</u> 	
Procedimiento 5 (procedimiento de unión térmica y química de ensamblaje de armazón y membranas)				
Procedimiento 6 (taponamiento de conductos)				

Figura 12A

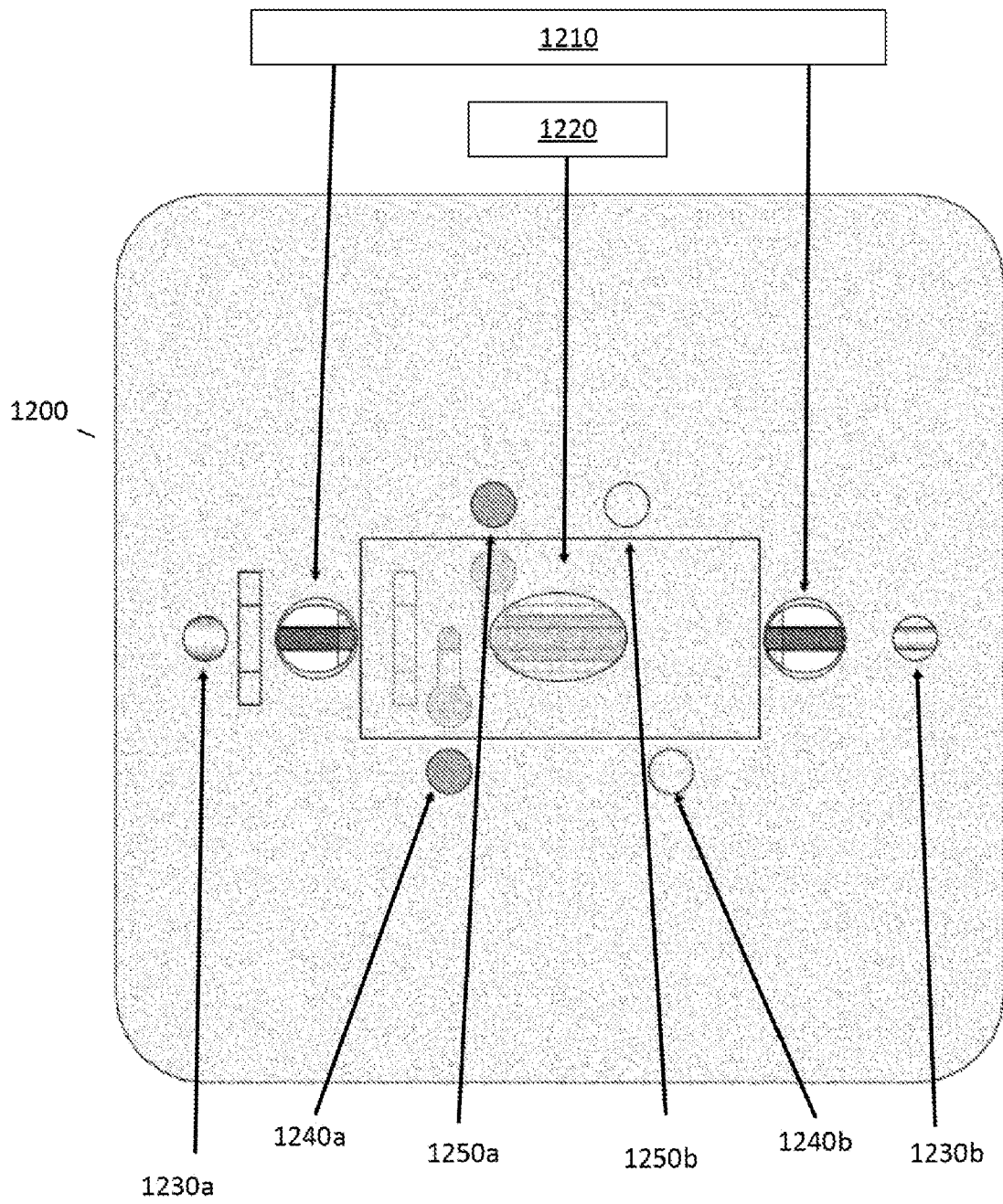


Figura 12B

1260

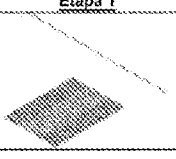
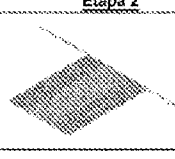
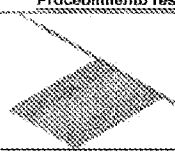
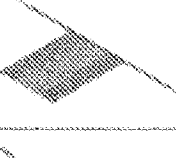
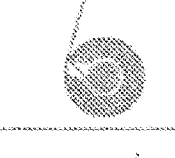
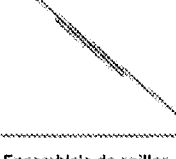
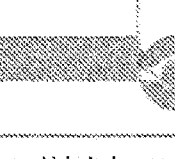
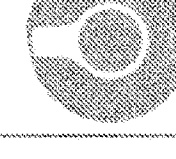
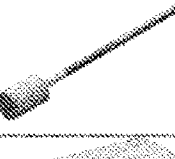
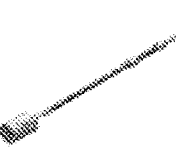
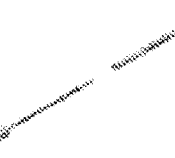
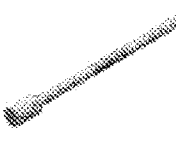
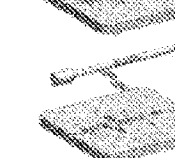
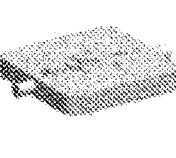
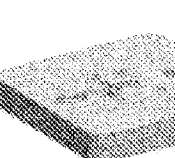
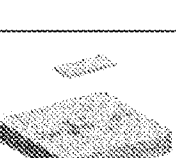
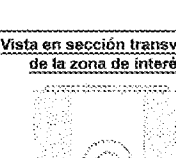
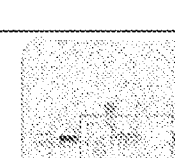
	<u>Etapa 1</u>	<u>Etapa 2</u>	<u>Etapa 3</u>	<u>Procedimiento resultante</u>
Procedimiento 1 (ensamblaje de varillas curvas de membrana)				
Procedimiento 2 (curvatura de la membrana en un pasador pequeño)				
Procedimiento 3 (etapa de unión previa y corte de la membrana)				
Procedimiento 4 (pasador pequeño ensamblado en un pasador grande, con membranas y entre el armazón)	<u>Ensamblaje de anillos</u> 	<u>Ensamblaje de dos pasadores</u> 		
Procedimiento 5 (procedimiento de unión química y térmica, extracción de pasadores y taponamiento de conductos)				
Procedimiento 6 (ensamblaje de cubreobjetos)			<u>Vista en sección transversal de la zona de interés</u> 	

Figura 13A

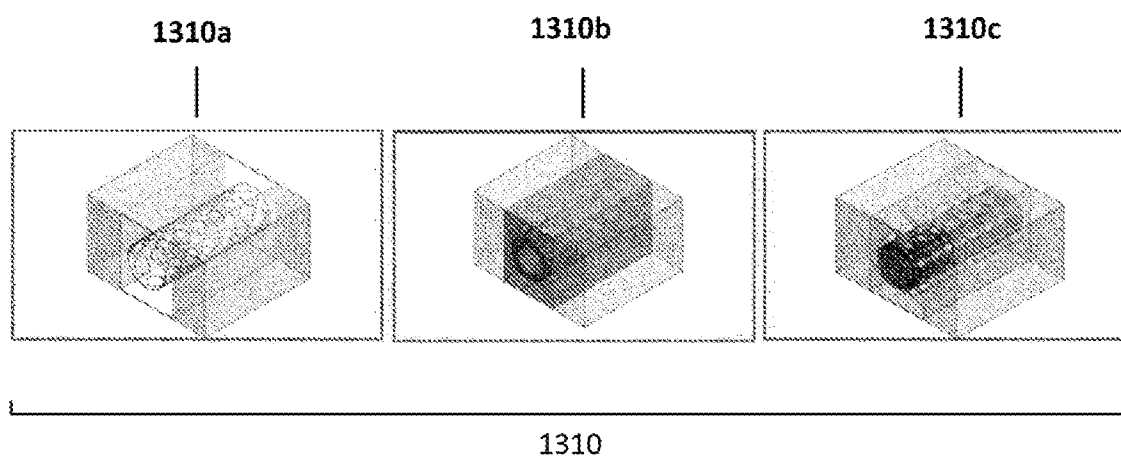


Figura 13B

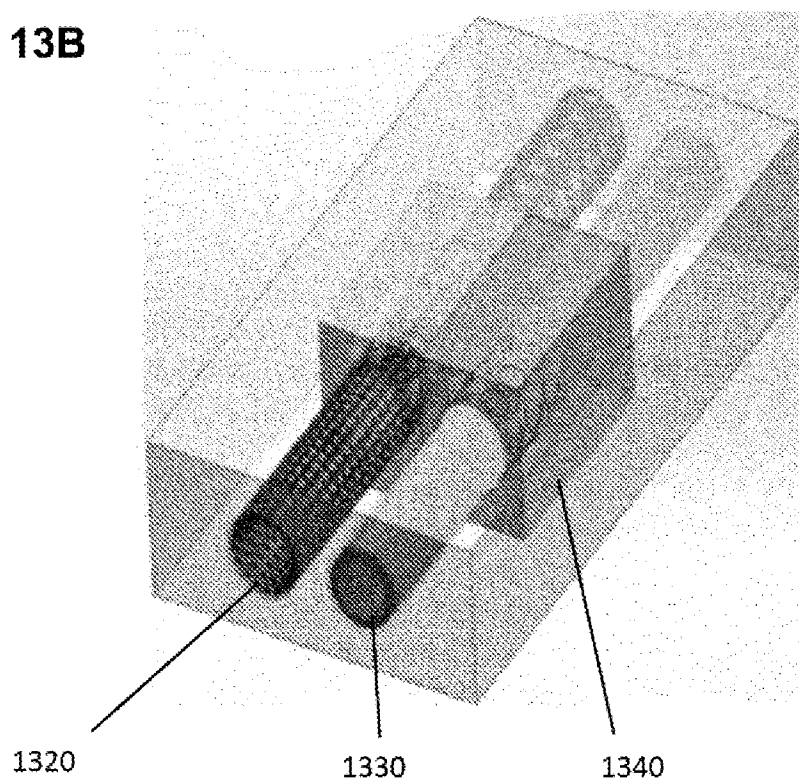


Figura 13C

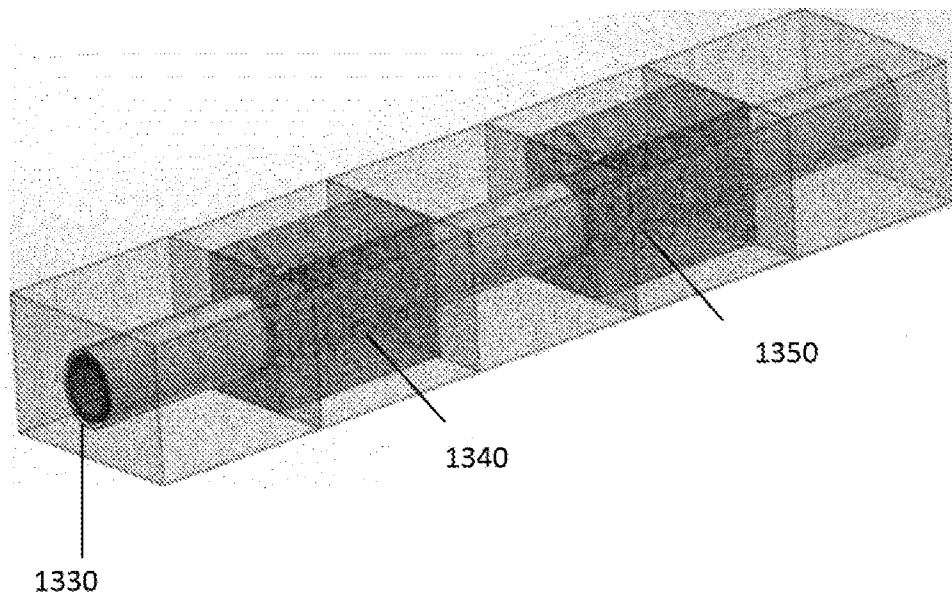


Figura 14

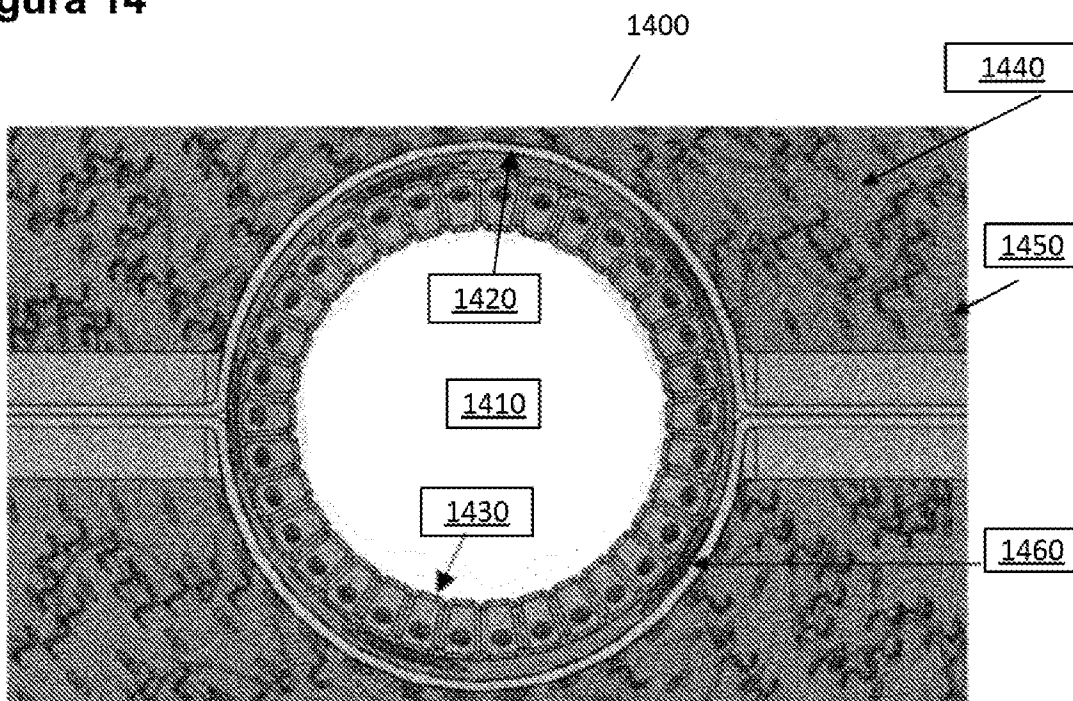


Figura 15A

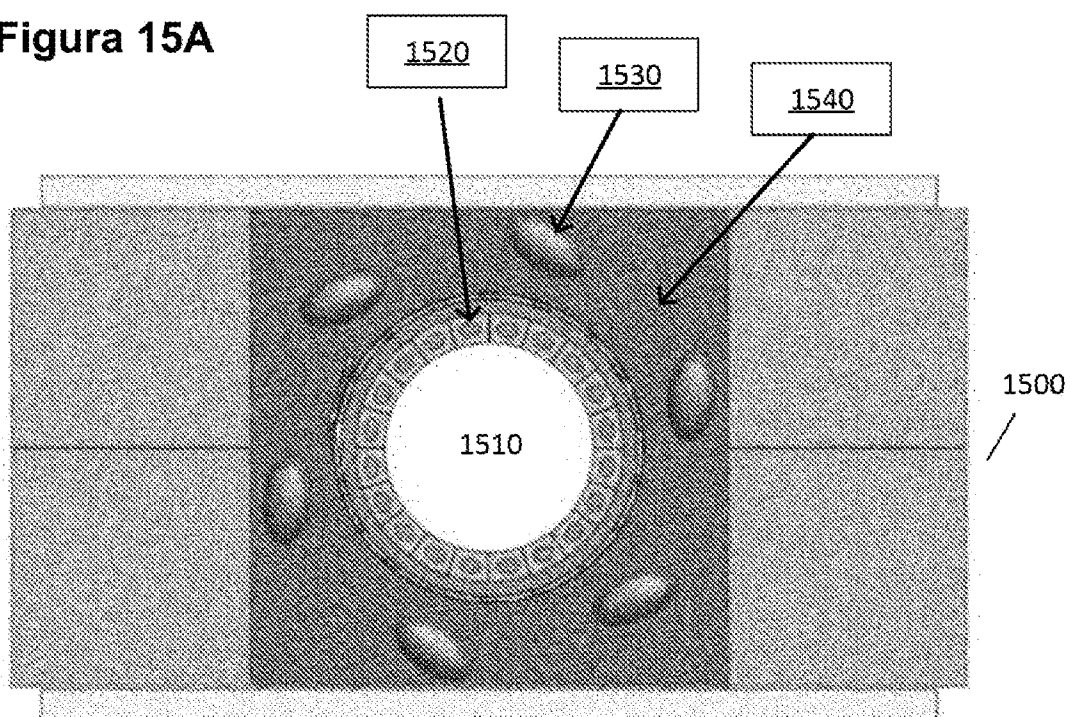


Figura 15B

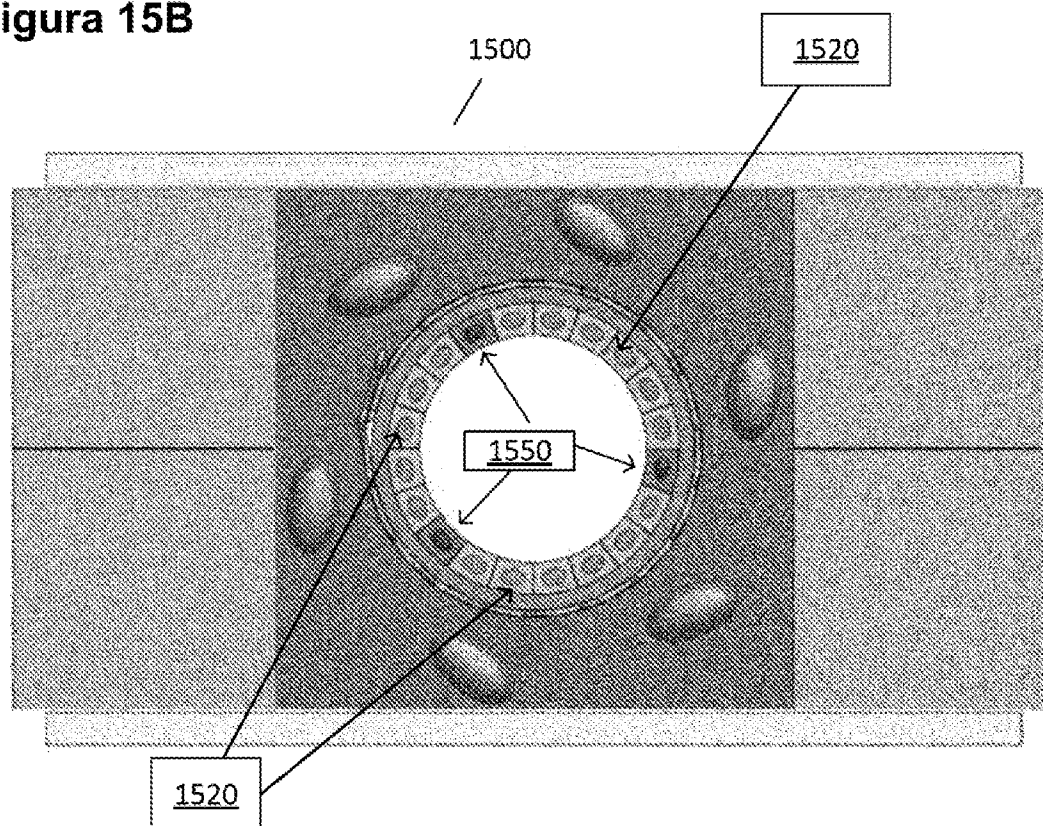


Figura 15C

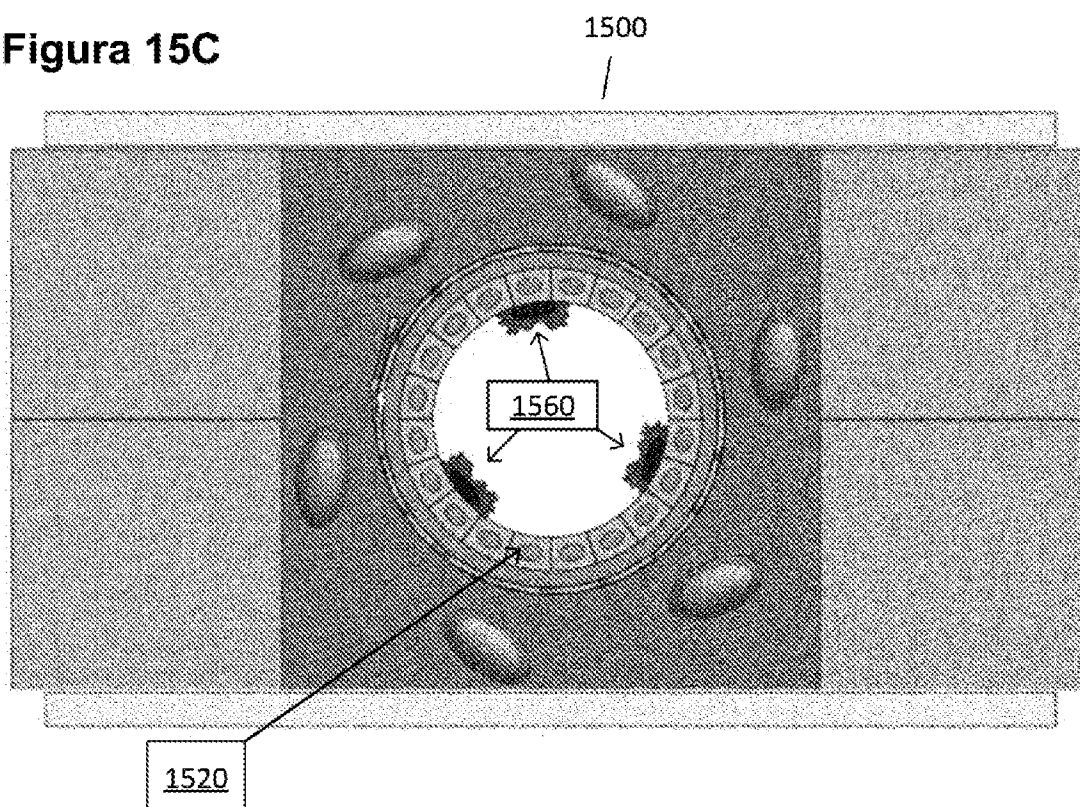


Figura 15D

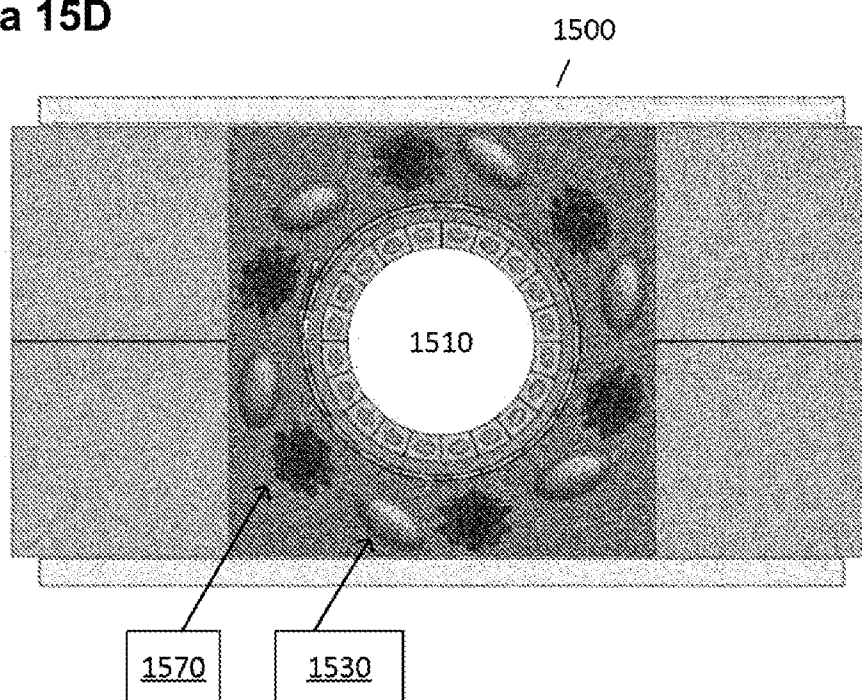


Figura 16

