(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 282**

(21) Número de solicitud: 201030382

(51) Int. Cl.:

G01R 33/30 (2006.01)

G01R 33/465 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **16.03.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2011**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **28.09.2011**

(71) Solicitante/s: **Centro de Investigación Biomecánica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)**
Campus Rio Ebro-Edificio I+D, Blq. 5, 1ª Plt.
c/ Poeta Mariano Esquillor, s/n
50018 Zaragoza, ES
Universitat de Valencia,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Titular al 10%) y
IKERLAN S. COOP.

(72) Inventor/es: **Celda Muñoz, Bernardo;**
Esteve Moya, Vicent;
Sancho Bielsa, Francisco;
Villa Sanz, Rosa;
Fernández Ledesma, José Luis y
Berganzo Ruiz, Javier

(74) Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

(54) Título: **Microcámara y dispositivo de cultivo celular monitorizables por resonancia magnética nuclear.**

(57) Resumen:
Microcámara y dispositivo de cultivo celular monitorizables por resonancia magnética nuclear.
La presente invención hace referencia a una microcámara y a un dispositivo de cultivo celular, monitorizables por resonancia magnética nuclear y otras técnicas de imagen, donde dicha microcámara de cultivo se encuentra encapsulada y alojada en el interior de un chip. Dicha microcámara y dicho dispositivo resultan de fácil manejo para el usuario, permitiendo su manipulación o su reemplazo sin la necesidad de un montaje laborioso, beneficiando además notablemente el estudio de cultivos durante periodos largos de tiempo, superiores a 24 horas.

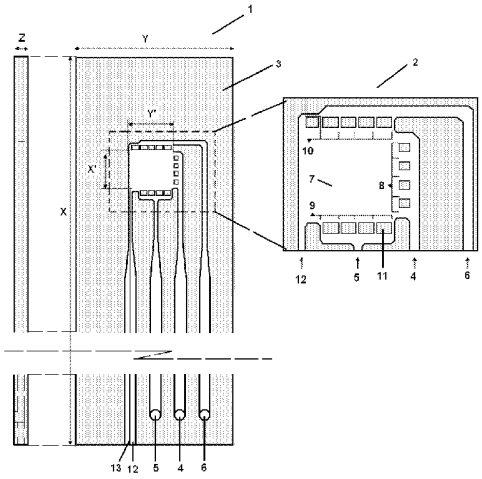

FIG. 1

ES 2 365 282 A1

DESCRIPCIÓN

Microcámara y dispositivo de cultivo celular monitorizables por resonancia magnética nuclear.

Campo de la invención

La presente invención hace referencia a una microcámara y a un dispositivo de preparación y cultivo de sistemas celulares, monitorizables por resonancia magnética nuclear y otras técnicas de imagen.

Antecedentes de la invención

El cultivo de células *in vitro* es uno de los métodos fundamentales en la biomedicina actual. La caracterización de biomarcadores en muestras biológicas es capaz, con el uso de las técnicas vigentes, de proporcionar información valiosa para el análisis de especies químicas, así como para facilitar la detección precoz de enfermedades y para el estudio de los sistemas biológicos.

A pesar del gran desarrollo de este campo, aún se desconocen, sin embargo, muchos de los factores que inducen y mantienen la diferenciación observada en distintos tipos de tejidos y que dan lugar, en consecuencia, a diferentes fenotipos. Conocer los mecanismos que regulan dichos factores de diferenciación resulta de especial relevancia en la observación y el estudio del desarrollo de células tumorales y biomarcadores del cáncer.

Las técnicas utilizadas comúnmente en el estado de la técnica para analizar tejidos biológicos incluyen, por ejemplo, el uso de nanosensores y nanopartículas o técnicas basadas en espectrometría de masas, entre otras. Adicionalmente, los citados estudios biológicos pueden realizarse mediante técnicas ópticas, en dispositivos de estructura superficial o tridimensional, cuyo modo de operación se basa en la difusión de dianas en sistemas de detección o en sistemas de resonancia magnética nuclear (RMN), con o sin el uso de agentes de contraste. Un tipo de dichos agentes de contraste incluye la preparación de partículas magnéticas (nanopartículas) que pueden ser fácilmente manipulables por campos magnéticos débiles. La microscopía por RMN ha ido desarrollándose paralelamente a las técnicas de imagen macroscópicas habituales en aplicaciones clínicas y con animales y, recientemente, se ha comenzado a abordar la obtención de imágenes por RMN de células individuales, así como la obtención de perfiles metabólicos en volúmenes de escala celular. Sin embargo, tanto el aumento de resolución de la técnica, como el reducido tamaño de las muestras vivas a investigar, presentan aún retos tecnológicos importantes.

En un intento de reproducir lo más fielmente posible las condiciones en que las células crecen *in vivo* y, a su vez, de disponer del máximo control sobre su entorno, existen en la actualidad diversos tipos de dispositivos preparados para su análisis por RMN, y que están basados en la combinación de las técnicas de microfluídica y microfabricación, junto con la construcción de matrices tridimensionales que remedan el entorno celular en el seno de los tejidos vivos. De este modo, tanto el aporte de nutrientes, factores de crecimiento y otras señales, así como el intercambio de gases y las fuerzas mecánicas, pueden ser aproximadas a los valores fisiológicos que se pretende simular. Algunos ejemplos del citado tipo de dispositivos son las solicitudes de patente WO2002/041021, EP1500944 y US 5313162, que describen diferentes diseños de microcámaras de cultivo celular, o "microrreactores".

La sofisticación progresiva de las técnicas de fotolitografía empleadas en la fabricación de chips y dispositivos electrónicos microscópicos, ha permitido el diseño de sistemas en los que se combina la microfluídica, con tratamientos especiales de las superficies y la integración de diversos tipos de sensores, para implementar laboratorios a microescala o "lab-on-chips" como, por ejemplo, el dispositivo descrito en la solicitud de patente WO 2009/045551. En la construcción de dicho tipo de dispositivos se emplean gran variedad de materiales, predominando el uso de resinas y polímeros (SU-8, PMMA, PMMS, etc.). Dichos sistemas lab-on-chip suponen una considerable mejora frente a desarrollos anteriores, presentando ventajas tales como el ahorro en el volumen del fluido analizado, lo que reduce costes en los agentes reactivos y disminuye la necesidad de grandes muestras de análisis; tiempos menores de respuesta y de análisis, como consecuencia de que las distancias de difusión son menores; mayor control de los procesos y una respuesta más rápida de los sistemas; la posibilidad de realizar análisis paralelos masivos, así como la producción a gran escala de dispositivos; y proporcionan, además, plataformas más seguras para realizar estudios químicos, biológicos o radiológicos, como consecuencia de su menor volumen.

Si bien el estado de la técnica es capaz de resolver algunos de los desafíos que plantea el desarrollo de microcámaras de cultivo celular, la presente invención supone una mejora frente a ellas, al estar especialmente concebida como una microcámara encapsulada de material transparente y biocompatible, que proporciona una plataforma de dimensiones aptas para un equipo de RMN, pero utilizable, a la vez, junto con técnicas de microscopía, y que resulta al mismo tiempo de fácil manejo para el usuario, permitiendo su manipulación o su reemplazo sin la necesidad de un montaje laborioso. El hecho de tratar con una microcámara encapsulada beneficia notablemente el estudio de cultivos durante periodos largos de tiempo, permitiendo estudios durante tiempos superiores a 24 horas.

Adicionalmente, el diseño de la microcámara de la presente invención, basado en, al menos, dos canales diferenciados para la entrada de las células de cultivo y del medio de cultivo, proporciona un mayor control sobre el flujo de células introducidas, dado que éstas, al poseer su propia vía de entrada, no se ven condicionadas por el flujo propio del medio de cultivo. Dicha característica permite ajustar y corregir el volumen de células de cultivo a medida que las características del experimento lo requieran, sin modificar el flujo del medio empleado para mantener el cultivo estudiado en condiciones óptimas.

La invención resulta especialmente adecuada para estudiar el efecto de fármacos y otros agentes (tales como nanopartículas) permitiendo, además de los usos habituales de inspección visual y obtención de imágenes, el control metabólico de los sistemas celulares mediante RMN, facultad que resulta de especial relevancia para la comprobación y el análisis de efectos tóxicos en las células de cultivo estudiadas.

A lo largo del presente documento, el término "chip" se refiere a un dispositivo plástico de algunos milímetros cuadrados de área, en el que se fabrica la microcámara de cultivo mediante la combinación de procesos de fotolitografía de diferentes capas que se unen entre sí mediante procesos de pegado o téc-

nicas similares de microfabricación, tales como microinyección o "hot embossing".

El término "encapsulado" se interpreta como un empaquetado compacto del chip procedente de la oblea semiconductora sobre la que se fabrica la microcámara, para efectuar la conexión de dicha microcámara con los demás componentes del dispositivo de cultivo celular.

El término "biocompatible" se refiere, dentro del contexto de la presente invención, a la capacidad de un material para alojar cultivos biológicos vivos, sin producir efectos locales perjudiciales en las funciones o la integridad de dichos cultivos, permitiendo de forma natural su desarrollo celular o su respuesta tisular.

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular encapsulada, monitorizable por RMN y alojada en el interior de un chip. Se consigue con ello un dispositivo de fácil manejo para el usuario, permitiendo su manipulación o su reemplazo sin la necesidad de un montaje laborioso, beneficiando además notablemente el estudio de cultivos durante periodos largos de tiempo, no inferiores a 24 horas.

Un objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN que comprende, adicionalmente, al menos un canal de entrada de las células de cultivo, al menos, un canal de entrada del medio de cultivo y, al menos, un canal de salida. Ello proporciona un mayor control sobre el flujo de células introducidas, dado que éstas, al poseer su propia vía de entrada, no se ven condicionadas por el flujo propio del medio de cultivo. Dicha característica permite, además, ajustar y corregir el volumen de células de cultivo a medida que las características del experimento lo requieran.

Otro objeto de la invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN que comprende, adicionalmente, uno o más canales para la entrada de sensores destinados a la medición de propiedades físicas del cultivo, tales como su temperatura, pH, pNO, pSH_2, pO_2 ó pCO_2, preferentemente fabricados con fibra óptica. Ello permite un mayor control sobre las propiedades físico-químicas del cultivo estudiado.

En concreto, el objeto de la invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN, cuyo volumen está, preferentemente, comprendido entre 1 - 4 mm^3 y cuyas dimensiones de longitud y anchura son, preferentemente, iguales o inferiores a 2 mm x 2 mm, con una altura comprendida entre 400 - 1000 μm. Con ello se consigue una microcámara de cultivo idónea para su instalación en aparatos de detección por RMN y específicamente en su sistema de microbobinas, permitiendo conseguir una alta resolución.

Otro objeto de la invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN donde el chip que aloja dicha microcámara de cultivo está fabricado con materiales transparentes y biocompatibles, preferentemente con un sustrato Glass-SOI ("Silicon on insulator"), SOI-PDMS (Polidimetil siloxano), Glass-SiC (carburo de silicio) ó materiales fotodefinibles (por ejemplo, SU-8). Se consigue con ello microcámaras de cultivo que permiten también su monitorización por medio de dispositivos de microscopía, que favorecen además la pervivencia de las células estudiadas y el mantenimiento de los cultivos en condiciones óptimas durante un mayor tiempo.

Otro objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN, donde la anchura del canal de entrada de células de cultivo está comprendida entre 150-500 μm. Dicho tamaño resulta especialmente apropiado para el cultivo de neuroesferas (estructuras celulares libres generadas *in vitro* por células troncales de tejido nervioso) o esferoides obtenidos de otras células tracales o con alta tasa de división, como las células tumorales.

Otro objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN donde los canales de entrada y de salida se conectan con una pluralidad de canales de difusión divididos a través de tabiques, estando dichos canales destinados a obtener una distribución más uniforme del flujo de células dentro de la cámara de cultivo, facilitando además el confinamiento de dichas células.

Otro objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN donde los canales de difusión para la entrada y la salida del medio de cultivo poseen una anchura menor que las células de cultivo. Ello favorece que dichas células permanezcan localizadas en el interior de la zona de cultivo.

Otro objeto de la presente invención es una microcámara de cultivo celular monitorizable por RMN donde los canales de difusión de entrada de las células de cultivo poseen una anchura de, preferentemente, 200 μm, y los canales de difusión de entrada y de salida del medio de cultivo poseen, preferentemente, una anchura comprendida entre 40 - 75 μm, siendo dicho rango suficientemente pequeño para mantener confinadas las células de cultivo dentro de la cámara.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo celular que comprende:

i) una microcámara de cultivo celular;

ii) un solenoide plano impreso para la monitorización del cultivo por RMN;

iii) un sistema de fijación encapsulado que comprende el acoplamiento solidario de los elementos i), ii) y una conexión hermética, opcionalmente desacoplable, entre la microcámara y una pluralidad de tubos capilares para la circulación de las células de cultivo y del medio de cultivo;

y que es monitorizable por RMN.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo celular que comprende, al menos un equipo de resonancia magnética nuclear para la monitorización del cultivo celular.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo celular donde la distancia de contacto entre el solenoide plano impreso y la microcámara es igual o inferior a 50 μm. Esta distancia resulta óptima para una adecuada monitorización por RMN.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo celular que comprende, adicionalmente, al menos un equipo de microscopía para la monitorización del cultivo celular.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo celular donde los tubos capilares están conectados, opcionalmente, a sistemas de impulsión de los líquidos empleados, a válvulas y/o filtros para regular la circulación de dichos líquidos, así como a contenedores de desecho o a puntos de acceso adicionales para la conexión de otros elementos al sistema.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo donde los sistemas de impulsión del fluido son jeringas reguladas mediante microbombas de inyección.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo donde los tubos capilares que se conectan a los canales de entrada y de salida poseen una longitud de, al menos, 3 m.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de montaje de un dispositivo de cultivo celular, donde dicho montaje se realiza situando la superficie del chip que aloja la microcámara sobre una base de circuito impreso PCB que posee el solenoide plano impreso, acoplándose dicho chip y la base de circuito impreso a presión entre una base y una cubierta, disponiendo la base de un alojamiento sobre el que se asienta el chip, una abertura en la parte posterior de la base que permite que los sensores salgan del chip, y unos alojamientos sobre los que se insertan conectores fluídicos para conectar la microcámara a una pluralidad de tubos capilares para la circulación de las células de cultivo y del medio de cultivo.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una microcámara en el estudio y monitorización de cultivos biológicos, preferentemente que comprenden células tumorales.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un dispositivo de cultivo celular en el estudio y monitorización de cultivos biológicos, preferentemente que comprenden células tumorales.

Otro objeto de la presente invención es un método de monitorización de un cultivo celular que comprende el uso de una microcámara, donde se acopla dicha microcámara a un equipo de resonancia magnética nuclear.

Otro objeto de la presente invención es un método donde, adicionalmente, se monitoriza la microcámara por medio de, al menos, un equipo de microscopía.

Otro objeto de la presente invención es un método de monitorización de un cultivo celular que comprende el uso de un dispositivo de cultivo celular, donde se acopla dicho dispositivo a un equipo de resonancia magnética nuclear, adaptándose al sistema de imanes de monitorización del citado equipo de resonancia magnética nuclear.

Otro objeto de la presente invención es un método donde, adicionalmente, se monitoriza el dispositivo de cultivo celular por medio de, al menos, un equipo de microscopía.

Otras características y ventajas de la presente invención se desprenderán de la descripción de la invención que sigue, así como de la realización ilustrativa de las figuras que la acompañan.

Descripción de las figuras

La Figura 1 representa el chip y la microcámara de cultivo de un dispositivo según la presente invención.

La Figura 2 representa el procedimiento de encapsulado del chip y de la microcámara de cultivo de un dispositivo según la presente invención.

La Figura 3 representa una de las posibles configuraciones para el uso del dispositivo de la invención, donde la microcámara de cultivo está conectada a una pluralidad de tubos capilares, sistemas de inyección y otros elementos para la regulación y el análisis del cultivo estudiado.

Descripción detallada de la invención

El dispositivo de cultivo celular (1) monitorizable por RMN según la presente invención comprende, al menos, una microcámara de cultivo (2) alojada en el interior de un chip (3). Tal y como se representa en la Figura 1, el chip (3) posee una forma preferentemente cuadrada o rectangular, siendo sus dimensiones de longitud (X), anchura (Y) y altura (Z), preferentemente, de 56.0 x 5.5 x 0.56 mm, respectivamente. Dichas dimensiones resultan adecuadas para la producción en serie del dispositivo, permitiendo aplicar para su fabricación las técnicas habituales empleadas en la producción de chips en microelectrónica para el desarrollo de microcircuitos en obleas.

La microcámara (2) alojada dentro del chip (3) posee, preferentemente, un volumen comprendido entre 1 - 4 mm^3. Las dimensiones de longitud (X') y anchura (Y') de dicha microcámara de cultivo (2) son, preferentemente, iguales o inferiores a 2 mm x 2 mm, siendo su altura, preferentemente, igual o inferior a 400 - 1000 μm.

Adicionalmente, la microcámara (2) está conectada a, al menos, un canal de entrada de las células de cultivo (4), al menos, un canal de entrada del medio de cultivo (5) y, al menos, un canal de salida (6). Los canales de entrada (4, 5) y de salida (6) poseen, preferentemente, una anchura comprendida entre 150 - 500 μm.

Los canales de entrada (4, 5) y de salida (6) se conectan con la microcámara (2) por medio de canales de difusión (8, 9, 10) divididos a través de tabiques (11). Los canales de difusión para la entrada de las células de cultivo (8) poseen, según la presente invención, una anchura mayor que la de los canales de difusión de entrada (9) y de salida (10) del medio de cultivo, de forma que se favorezca que las células estudiadas permanezcan en la zona de cultivo (7). En una realización de la presente invención donde las estructuras celulares estudiadas son neuroesferas, los canales de difusión de entrada de las células de cultivo (8) poseen una anchura de, preferentemente, 200 μm, apta para la correcta circulación de dicho tipo de estructuras celulares. En la misma realización, los canales de difusión de entrada (9) y de salida (10) del medio de cultivo poseen, preferentemente, una anchura comprendida entre 40 - 75 μm, lo que permite mantener confinadas las células de cultivo dentro de la microcámara, sin añadir una complejidad excesiva a la tecnología de fabricación del chip.

El chip (3) donde se aloja la microcámara de cultivo (2) está fabricado con materiales transparentes y biocompatibles, preferentemente con sustratos Glass-SOI ("Silicon on insulator"), SOI-PDMS (Polidimetil siloxano), Glass-SiC (carburo de silicio) o materiales fotodefinibles (por ejemplo, SU-8). El disponer de un chip (3) transparente permite obtener microcámaras de cultivo que permitan, adicionalmente, su monitorización por medio de dispositivos de microscopía, proporcionando así un mayor control sobre las células estudiadas.

Además de los canales de entrada (4, 5) y de salida (6) de las células estudiadas y del medio de cultivo, la microcámara (2) según la presente invención puede presentar uno o más canales (12) para a la entrada de sensores (13) destinados a la medición de propiedades físicas del cultivo celular, tales como su temperatura, pH, pNO, pSH_2, pO_2 ó pCO_2. Ello permite un mayor control sobre las propiedades físico-químicas del cultivo estudiado. Preferentemente, dichos sensores (13) son sensores de fibra óptica.

Las dimensiones y el sistema de canales de la microcámara de cultivo según la presente invención resultan, junto con su capacidad de ser monitorizable tanto por RMN como por sistemas de microscopía, especialmente adecuados para probar el efecto de fár-

macos y otros agentes, tales como nanopartículas (entendidas éstas como cuerpos o partículas de un tamaño inferior a 100 nm), que permite, además de los usos de obtención de imágenes por inspección visual, el control metabólico de los sistemas celulares estudiados (mediante la espectroscopia de RMN).

El encapsulado de la microcámara de cultivo (2) según la presente invención está representado en la Figura 2. En dicha figura, se muestra cómo la superficie del chip (3) que aloja la microcámara (2) se sitúa sobre una base de circuito impreso (14) PCB ("printed circuit board") que posee una placa de vidrio (15) sobre la que se monta un solenoide plano impreso (16), de modo que el conjunto sea transparente, para poder visualizar la microcámara. Dicho solenoide (16) es un componente necesario en equipos de monitorización por RMN. Con el fin de obtener un acoplamiento óptimo entre la microcámara (2) y el solenoide plano impreso (16), para lograr una adecuada monitorización, la distancia entre sus superficies no ha de superar los 50 μm.

El encapsulado realiza varias funciones: fija el chip (3) a la placa de circuito impreso (14) con el solenoide (16) para RMN; permite introducir y extraer los diferentes contenidos de la microcámara (2); y garantiza el sellado de los diferentes elementos. Tal y como se muestra en la Figura 2, el montaje del encapsulado se realiza mediante una base (17) y una cubierta (18), ambas realizadas en resina epoxi u otro material plástico o cerámico. La base (17) dispone de un alojamiento (19) sobre el que se asienta el chip (3). Sobre el alojamiento (19) se colocan unas juntas (20) de material elástico. Dichas juntas (20) aseguran la estanqueidad entre el chip (3) y la base (17). Una abertura (21) en la parte posterior de la base (17) permite que los sensores de fibra óptica (13) salgan del chip sin impedimentos. La base dispone de unos alojamientos (22) sobre los que se insertan conectores fluídicos (23) que permiten conectar de forma hermética, a través de tubos, el encapsulado a diferentes elementos del dispositivo, tales como microbombas, jeringas, dispositivos de análisis, etcétera. Los conectores fluídicos (23), de material plástico, se amarran en los alojamientos (22) de la base (17), mediante presión, adhesión, juntas elásticas, sistemas de rosca, biconos o mediante cualquier otro método que los fije a la base (17) y garantice la estanqueidad de la conexión, permitiendo, al mismo tiempo, el desacople del dispositivo de cultivo celular (1) según las necesidades del experimento realizado. La base (17) dispone, asimismo, de conductos internos (24) que comunican los conectores fluídicos (23) con los canales (4, 5, 6) del chip (3). La cubierta (18) se fija a la base (17) a presión para garantizar que las juntas (20) efectúen un sellado correcto. Ello se realiza mediante tornillos (25), abrazaderas, grapas, o cualquier otro medio, siempre de material aislante eléctrico, como por ejemplo el plástico. Esta fijación, además de garantizar el sellado, mantiene a todos los elementos del encapsulado unidos, fijando también el encapsulado a la placa de circuito impreso (14) con el solenoide (16).

Las ventajas que un dispositivo encapsulado otorgan a la presente invención están fundamentalmente orientadas a conseguir una microcámara de cultivo que resulte de fácil manejo, permitiendo acoplar y desacoplar de forma sencilla el dispositivo sin necesidad de montajes individualizados. Las propiedades de encapsulamiento del presente dispositivo benefician, adicionalmente, el mantenimiento de los cultivos celulares en condiciones óptimas, sin contaminación, durante periodos largos de tiempo, facilitando el estudio de dichos cultivos durante tiempos superiores a 24 horas.

El montaje encapsulado del dispositivo de cultivo (1) según la presente invención es fácilmente adaptable a los aparatos de RMN empleados habitualmente en el sector y existentes en el mercado. Adicionalmente, y según lo descrito anteriormente, en distintas realizaciones de la invención también es posible acoplar al dispositivo (1) a uno o más aparatos de microscopía, instalados como apoyo a la monitorización realizada por RMN.

La Figura 3 representa, para una posible configuración de la invención, el sistema de conexión del dispositivo de cultivo (1) a una pluralidad de tubos capilares (26), así como los sensores de fibra óptica (13). El dispositivo de cultivo (1) se conecta, a través de los conectares fluídicos (23), a cada uno de los citados tubos capilares (26), acoplando los tubos (26) de entrada de células de cultivo y de entrada del medio de cultivo a sus respectivas jeringas (27) reguladas mediante microbombas de inyección, los sensores de fibra óptica (13) a los dispositivos de análisis empleados para la monitorización de las propiedades físicas deseadas (temperatura, pH, pNO, pSH_2, pO_2 ó pCO_2), y el tubo capilar de salida a un contenedor de desecho (28). Los tubos (26) que conectan los conectares fluídicos (23) de entrada con las jeringas (27) poseen una longitud preferente de, al menos, 3 m, siendo dicha distancia la mínima necesaria entre los sistemas electro mecánicos empleados para la impulsión del fluido y para el control de los sensores, al tiempo que se pueda alcanzar el interior del aparato de RMN donde se aloja la muestra. El sistema de conexión, opcionalmente, puede incluir la presencia de válvulas (29) que permiten regular el flujo de los líquidos empleados, de filtros (30) que facilitan la retención de burbujas generadas por cambios de presión y/o temperatura, o de puntos de acceso (31) adicionales para la conexión de otros elementos al sistema (microbombas, depósitos, válvulas, etc.), según resulte conveniente para el estudio de un determinado cultivo.

Una vez descrita la presente invención, cabe resaltar que las realizaciones preferentes de la misma no han de ser consideradas como limitativas frente variaciones de su diseño o de los elementos empleados para su fabricación, siempre que dichas variaciones no alteren la esencia de la invención, así como el objeto de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Microcámara de cultivo celular (2) alojada en el interior de un chip (3) sustancialmente plano, que comprende:

- al menos, un canal de entrada (4) de las células de cultivo;
- al menos, un canal de entrada (5) del medio de cultivo;
- al menos, un canal de salida (6);
- al menos, un canal (12) para la entrada de sensores (13) destinados a la medición de propiedades físicas del cultivo celular, tales como su temperatura, pH, pNO, pSH_2, pO_2 ó PCO_2;

y que es monitorizable por RMN.

2. Microcámara (2) según la reivindicación 1, donde el chip (3) está fabricado con un material transparente y biocompatible, preferentemente con un sustrato Glass-SOI, SOI-PDMS, Glass-Carburo de silicio o SU-8.

3. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde su volumen está comprendido entre 1-4 mm^3.

4. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde sus dimensiones de longitud y anchura son, preferentemente, iguales o inferiores a 2 mm x 2 mm.

5. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la anchura del canal de entrada de células de cultivo (4) está comprendida entre 150-500 μm.

6. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde los sensores (13) destinados a la medición de propiedades físicas del cultivo celular están fabricados con fibra óptica.

7. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde los canales de entrada (4, 5) y de salida (6) se conectan a canales de difusión para la entrada de células de cultivo (8), canales de difusión para la entrada del medio de cultivo (9) y canales de difusión para la salida del medio de cultivo (10), estando divididos dichos canales de difusión (8, 9, 10) a través de tabiques (11).

8. Microcámara (2) según la reivindicación 7, donde los canales de difusión de entrada (9) y de salida (10) del medio de cultivo poseen una anchura menor que las células de cultivo estudiadas, de forma que se favorezca que dichas células permanezcan en el interior de la zona de cultivo (7).

9. Microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde los canales de difusión de entrada de las células de cultivo (8) poseen una anchura de, preferentemente, 200 μm, y los canales de difusión de entrada (9) y de salida (10) del medio de cultivo poseen, preferentemente, una anchura comprendida entre 40-75 μm.

10. Dispositivo de cultivo celular (1), que comprende:

i) una microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9;

ii) un solenoide plano impreso (16) para la monitorización del cultivo por RMN;

iii) un sistema de fijación encapsulado que comprende el acoplamiento solidario de los elementos i), ii) y una conexión hermética, opcionalmente desacoplable, entre la microcámara (2) y una pluralidad de tubos capilares (26) para la circulación de las células de cultivo y del medio de cultivo;

y que es monitorizable por RMN.

11. Dispositivo (1) según la reivindicación 10, que comprende, al menos un equipo de resonancia magnética nuclear para la monitorización del cultivo celular.

12. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde la distancia de contacto entre el solenoide plano impreso (16) y la microcámara (2) es igual o inferior a 50 μm.

13. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende, adicionalmente, al menos un equipo de microscopía para la monitorización del cultivo celular.

14. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde los tubos capilares (26) están conectados, opcionalmente, a sistemas de impulsión (27) de los líquidos empleados, a válvulas (29) y/o filtros (30) para regular la circulación de dichos líquidos, así como a contenedores de desecho (28) o a puntos de acceso (31) adicionales para la conexión de otros elementos al sistema.

15. Dispositivo (1) según la reivindicación 14, donde los sistemas de impulsión (27) del fluido son jeringas reguladas mediante microbombas de inyección.

16. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-15, donde los tubos capilares (26) que se conectan a los canales (4, 5, 6) poseen una longitud de, al menos, 3 m.

17. Procedimiento de montaje de un dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-16, donde dicho montaje se realiza situando la superficie del chip (3) que aloja la microcámara (2) sobre una base de circuito impreso (14) PCB que posee el solenoide plano impreso (16) para la monitorización del cultivo por RMN, acoplándose dicho chip (3) y la base de circuito impreso (14) a presión entre una base (17) y una cubierta (18), disponiendo la base (17) de un alojamiento (19) sobre el que se asienta el chip (3), una abertura (21) en la parte posterior de la base (17) que permite que los sensores (13) salgan del chip, y unos alojamientos (22) sobre los que se insertan conectores fluídicos (23) para conectar la microcámara (2) a una pluralidad de tubos capilares (26) para la circulación de las células de cultivo y del medio de cultivo.

18. Uso de una microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el estudio y monitorización de cultivos biológicos, preferentemente que comprenden células tumorales.

19. Uso de una microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el estudio del efecto de fármacos sobre cultivos biológicos.

20. Uso de una microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el estudio del efecto de nanopartículas sobre cultivos biológicos.

21. Uso de un dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-16 en el estudio y monitorización de cultivos biológicos, preferentemente que comprenden células tumorales.

22. Uso de un dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-16 en el estudio del efecto de fármacos sobre cultivos biológicos.

23. Uso de un dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-16 en el estudio del efecto de nanopartículas sobre cultivos biológicos.

24. Método de monitorización de un cultivo celular que comprende el uso de una microcámara (2) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde

se acopla dicha microcámara (2) a un equipo de resonancia magnética nuclear.

25. Método según la reivindicación 24 donde, adicionalmente, se monitoriza la microcámara (2) por medio de, al menos, un equipo de microscopía.

26. Método de monitorización de un cultivo celular que comprende el uso de un dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 10-16, donde se acopla dicho dispositivo (1) a un equipo de resonancia magnética nuclear, adaptándose al sistema de imanes de monitorización del citado equipo de resonancia magnética nuclear.

27. Método según la reivindicación 26 donde, adicionalmente, se monitoriza el dispositivo (1) por medio de, al menos, un equipo de microscopía.

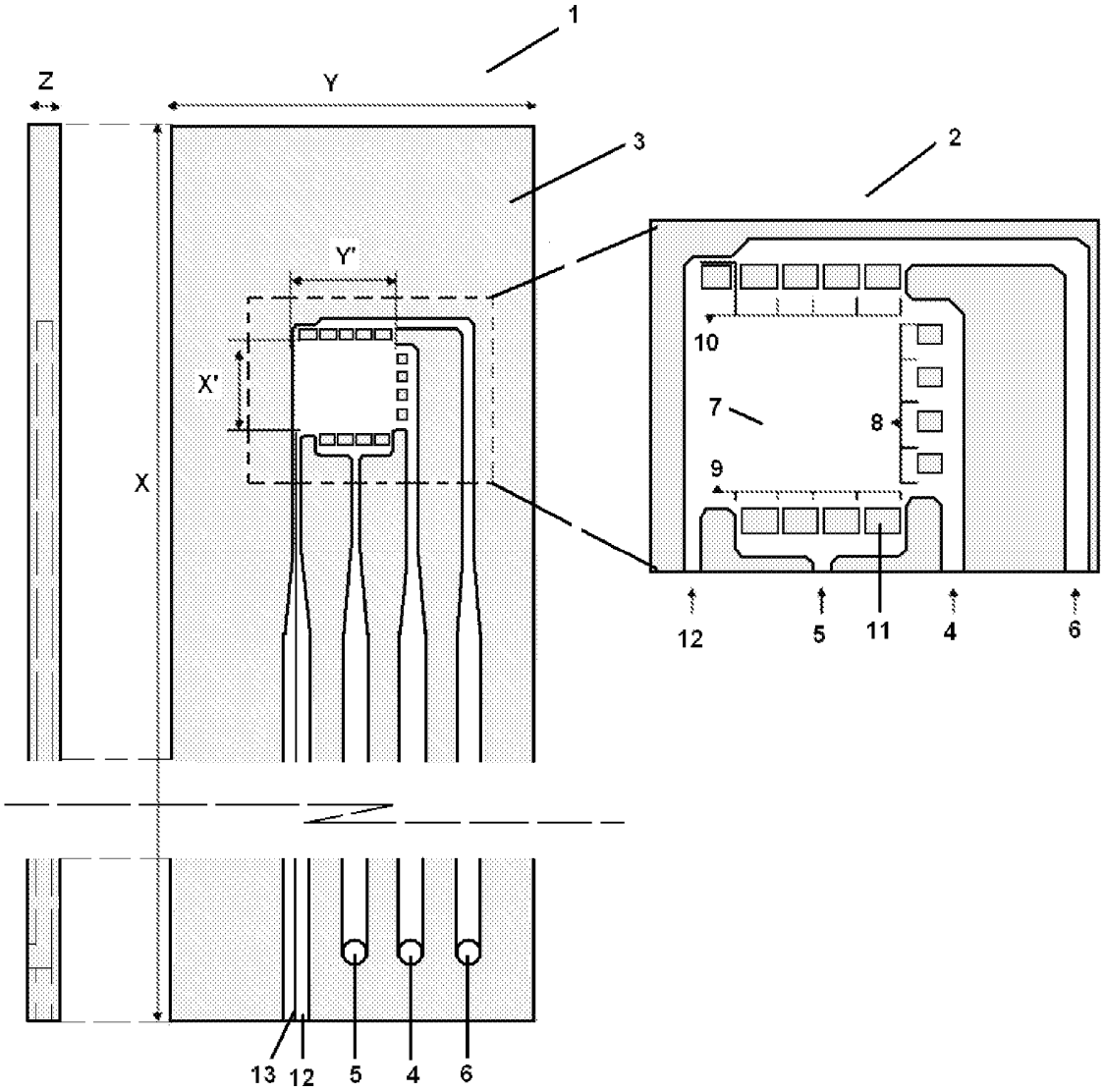

FIG. 1

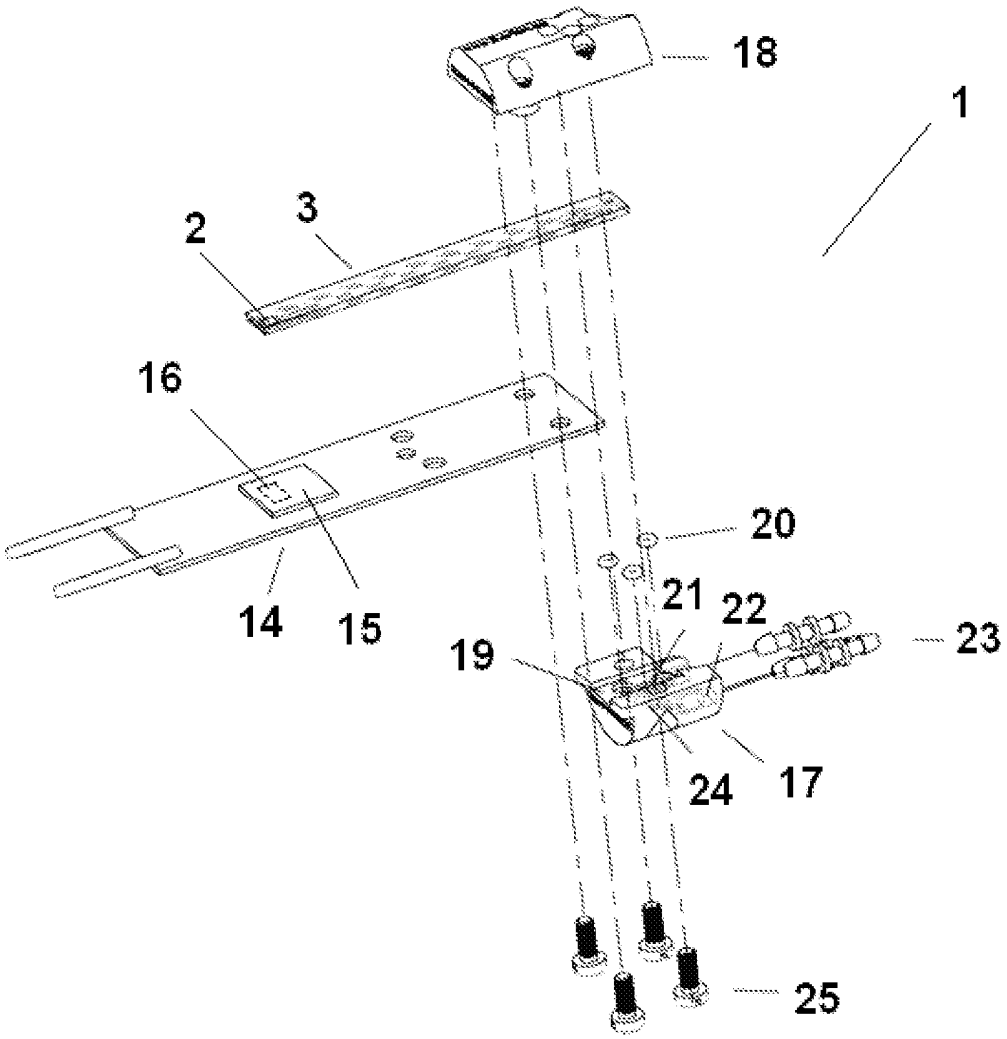

FIG. 2

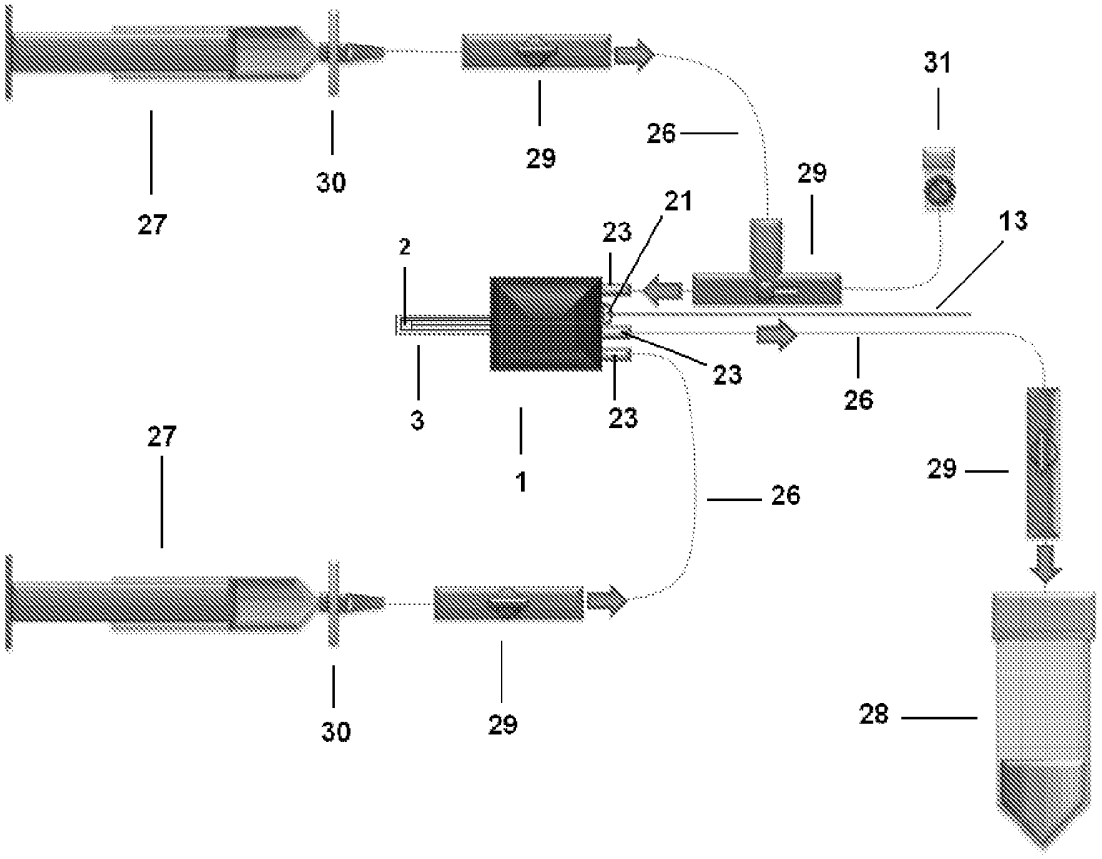

FIG. 3

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201030382

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0241021 A1 (METABOLIC EXPLORER) 23.05.2002, resumen; figuras 1-7; reivindicaciones 1-17.	1-27
A	EP 1500944 A1 (BRADAMANTE S) 26.01.2005, resumen; figuras 1-4; reivindicaciones 1-9.	1-27
A	US 5313162 (DE GRAAF et al.) 17.05.1994, resumen; figuras 1-5.	1-27

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
26.07.2011	M. García Grávalos	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01R33/30 (2006.01)
G01R33/465 (2006.01)
C12M1/34 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01R, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, GOOGLE PATENTS, USPTO PATENT DATABASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-27	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-27	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 0241021 A1	23.05.2002
D02	EP 1500944 A1	26.01.2005
D03	US 5313162	17.05.1994

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga una microcámara de cultivo celular, alojada en el interior de un chip plano, que contiene una serie de canales para entrada y salida de las células y del medio de cultivo; así como de entrada de sensores para control de propiedades físicas; es monitorizable por RMN (reivindicaciones 1-9). Se refiere también a un dispositivo para cultivo celular que incluye, junto a la cámara reivindicada, un solenoide plano impreso y un sistema de fijación encapsulado para acoplamiento de la cámara al solenoide; una conexión hermética entre la microcámara y unos conectores capilares para circulación de las células y del medio de cultivo; también es monitorizable por RMN (reivindicaciones 10-17). Incluye también el uso de la microcámara y del dispositivo para estudio y monitorización de cultivos biológicos, así como efecto que producen fármacos y/o nanopartículas sobre ellos (reivindicaciones 18-27).

El documento D01 divulga un dispositivo para análisis de metabolitos, por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), en un medio de cultivo celular. Está formado por un conjunto de conductos tubulares, dispuestos en un equipo de análisis por RNM, que presentan una parte de entrada y otra de salida, adaptadas para ser conectadas a un reactor que contiene el medio de cultivo; consta de un tramo helicoidal, donde son magnetizados los núcleos de las células del medio de cultivo, y otro tramo recto de doble dirección en el curso del cual se efectúa la excitación de los núcleos y se registra su espectro de RMN (ver resumen; figuras 1-7; reivindicaciones 1-17).

El documento D02 divulga un biorreactor para espectroscopia de RMN, formado por un contenedor para cultivo celular y unos conductos de entrada y salida del medio de cultivo. El primer conducto está conectado a un dispositivo en forma de espiral, de modo que cuando el medio fluye de un canal a otro, origina una propulsión hidrostática y fuerza hidrodinámica que producen una condición de simulada reducción de gravedad en el contenedor con el cultivo celular (ver resumen; figuras 1-4; reivindicaciones 1-9).

El documento D03 divulga un dispositivo para cultivo celular formado por la combinación de un fermentador y un tubo para medir espectroscopia de RMN de una suspensión celular de flujo continuo. El tubo tiene una capacidad de 3 a 20 ml en la zona de medida del imán y el fermentador es un reservorio de premagnetización cuya mayor sección tiene una capacidad de 100 ml. Está provisto de un circuito de flujo continuo de 5 a 250 ml/s (ver resumen; figuras 1-5).

1. NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)

El objeto técnico de la invención es una microcámara para cultivo celular, encapsulada y alojada en el interior de un chip, y un dispositivo de cultivo celular, ambos monitorizables por RMN y otras técnicas de imagen.

1.1. REIVINDICACIONES 1-27

Los documentos D01-D03, anticipan dispositivos que incluyen microcámaras o biorreactores, para estudios biológicos, acoplados a equipos de RMN. Sin embargo, las características de la cámara y del dispositivo reivindicados en la presente solicitud, no coinciden con las de estos documentos, ni tampoco serían obvias para un experto en la materia, considerando estos documentos individualmente o en conjunto.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-27 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)