

MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INVENCION

Sobre:

**“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO CON GENERADOR DE
GRADIENTE PARA LA EVALUACIÓN PREDICTIVA DE LA
RESPUESTA A FÁRMACOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS”**

Solicitada por:

Comisión Nacional de Energía Atómica

con domicilio en Av. Del Libertador 8250, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

&

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

con domicilio en Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Inventores:

Juan Martín CABAILEIRO

Rodrigo Daniel LLOYD

Lucía Laura POLICASTRO

Elena María SANMARCO

Por el plazo de:

20 años

DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO CON GENERADOR DE GRADIENTE PARA LA EVALUACIÓN PREDICTIVA DE LA RESPUESTA A FÁRMACOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS

- [1] La presente invención se refiere a un dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células. A través de este dispositivo microfluídico, se espera obtener parámetros cualitativos y cuantitativos que permitan evaluar el efecto citotóxico a diferentes fármacos en cultivos celulares derivados de biopsias (entre ellas, biopsias tumorales), posibilitando la selección del o los fármaco(s) más efectivos de manera personalizada para cada paciente.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- [2] El campo técnico al cual pertenece la presente invención es el de aparatos físicos para el mezclado de fluidos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- [3] El entendimiento de la variabilidad en la eficacia de un medicamento en la población de pacientes es uno de los principales desafíos de la medicina clínica actual. Un medicamento que ha sido eficaz en un paciente puede no tener ningún efecto o generar reacciones adversas en otro paciente con la misma patología. A pesar de que factores tales como, la severidad de la enfermedad, la edad, el sexo, el estado nutricional, la función renal y hepática contribuyen a la generación de distintas respuestas en pacientes con una misma patología y un mismo tratamiento, la variabilidad genética entre estos permite explicar hasta el 80% de esta heterogeneidad de respuesta a los tratamientos.
- [4] A diferencia de los otros factores, en su mayoría temporales, las variantes genéticas involucradas en el fenotipo de respuesta a drogas están presentes en los individuos a lo largo de toda su vida. En consecuencia, el reconocimiento de

estas variantes permitiría predecir una respuesta personalizada y optimizar el tratamiento, minimizando los efectos tóxicos y maximizando la eficacia. En concordancia, es deseable que cada vez más pacientes reciban diagnósticos individuales y terapias a medida. Actualmente, sólo existen métodos de testeo de drogas de alto rendimiento (también conocido en inglés como “screening”), para la optimización del desarrollo de drogas en estados tempranos que contribuyen entre un 19 a 33% de su optimización. Sin embargo, a pesar de que existe una enorme batería de técnicas a través de las cuales se puede evaluar la carga genética de los pacientes, no existen ensayos de evaluación citotóxica en cultivos de células comercialmente disponibles, que se puedan realizar a partir de una escasa cantidad de muestra biológica proveniente de una biopsia o pieza tumoral postquirúrgica. Esto permitiría evaluar concretamente la respuesta potencial que tendría un paciente a una droga o a una combinación de drogas.

- [5] Los dispositivos que existen están basados, generalmente, en microplacas con múltiples pocillos de tamaño reducido para cultivo de células. Sin embargo, estos dispositivos poseen problemas de evaporación importantes, y debido a la superficie de las cámaras de cultivo, requieren de una gran cantidad de muestra de biopsias -generalmente muy escasas, como ya se ha mencionado- para generar cultivos viables.
- [6] En las últimas décadas han comenzado a desarrollarse los denominados dispositivos “Lab-on-a-chip” donde es posible realizar múltiples pruebas de laboratorio en un pequeño chip o dispositivo microfluídico. Estos dispositivos están contruidos a partir de diversos materiales como vidrio o plástico y poseen una red de microcanales, que pueden incluir electrodos, sensores y circuitos eléctricos. Algunas de las ventajas de estos son: disminución del tamaño de la muestra a utilizar o procesar, menor tiempo de reacción y análisis de los procesos, mayor rendimiento de las reacciones, portabilidad, y automatización, entre otros.
- [7] En el caso de la detección de la susceptibilidad a drogas a través de un dispositivo microfluídico se podría mejorar sustancialmente la efectividad de los

tratamientos, apuntando así a la medicina de precisión o personalizada. Al poder integrar muchas pruebas analíticas en un solo dispositivo microfluídico, se reduciría el volumen de muestra a analizar significativamente (10 a 1000 veces), lo que es crítico en el caso de biopsias de tumores. Esto último implica una disminución sustancial del material de biopsia, una disminución de los reactivos necesarios para la realización de cultivos primarios, que a veces son muy costosos, y la eliminación de los problemas de evaporación.

- [8] Existe una variedad de prototipos de dispositivos microfluídicos realizados principalmente en polidimetilsiloxano (PDMS) para este tipo de propósito, pero este material tiene una superficie hidrofóbica que hay que pretratar para permitir el pegado de células, lo que se convierte en un problema. Por otro lado, este material absorbe sustancias, lo que también es un inconveniente, porque genera variaciones en la concentración de sustancias en los medios de cultivo, y también genera inconvenientes para evaluar metabolitos generados por las células. Otros materiales, cuya manipulación es más compleja, como el polimetilmetacrilato (PMMA) y los policarbonatos (PC) resultan más adecuados ya que permiten el escalado y en la mayoría de los casos no es necesario tratar la superficie.

- [9] En particular, en el diseño de un dispositivo microfluídico para testeo de drogas es necesario generar concentradores de gradientes para lograr testear un amplio rango de concentraciones de las drogas a evaluar y así obtener parámetros como el IC50 (dosis letal 50) que permitan la comparación de la efectividad terapéutica de estas drogas sobre un determinado tipo de tumor.

- [10] En el estado de la técnica existen diversos dispositivos microfluídicos para la generación de gradientes de concentración, tales como la invención propuesta en la patente N° [ITBO20110247A1](#), la cual hace referencia a un dispositivo microfluídico que genera un gradiente de concentración y comprende dos entradas para un primer y segundo fluido, respectivamente. La formación del gradiente se da por las sucesivas ramificaciones que parten desde los canales de entrada. Los objetivos de esta invención son: realizar una serie de diluciones de una determinada sustancia química disuelta en un solvente acuoso u

orgánico, realizar reacciones químicas con diferentes concentraciones o para la separación de diferentes tipos de células presentes en fluidos biológicos.

- [11] En la solicitud de patente N° [WO2012050981A1](#) se propone un dispositivo microfluídico que se puede utilizar como un bioensayo 3D, por ejemplo, para detección de drogas en medicina personalizada. El gradiente de concentración se forma por la difusión entre los distintos medios o drogas colocados en la entrada.
- [12] La solicitud de patente N° [WO2018067802A1](#) hace referencia a composiciones, sistemas y métodos, y proporciona dispositivos microfluídicos que permiten el análisis de una variedad de productos químicos (por ejemplo, medicamentos o compuestos de prueba) en una amplia gama de concentraciones y proporciones de mezcla. En estos sistemas a partir de dos o tres entradas, conectadas a serpentinas, se van bifurcando y conectando a otras serpentinas que tienen en común y es ahí donde se produce el mezclado. Pero para lograr la concentración de gradientes es necesario que el mezclado haya ocurrido antes de pasar a la siguiente bifurcación. Este dispositivo posee cámaras para la formación de cultivo celular 3D como ser la formación de esferoides. Principalmente el material utilizado es PDMS, por lo que es necesario tratar previamente la superficie, y además se incorporan micropilares para mejorar la estructura mecánica del dispositivo. Estas consideraciones no son necesarias en la presente invención ya que el PMMA no requiere un pretratamiento y, debido a su rigidez, no son necesarias estructuras adicionales para evitar el colapso de las microestructuras.
- [13] En la solicitud de patente N° [US20100035292A1](#) se proponen dispositivos y métodos para la formación de gradientes para el estudio de células vivas. El gradiente se forma por el flujo de dos fluidos diferentes a través de un microcanal dando la formación de un gradiente por difusión a través de la cámara central en donde están cultivadas las células.
- [14] En el artículo Flowrate independent 3D printed microfluidic concentration gradient generator (Juan Martín Cabaleiro. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122742>), el cual ha sido publicado por uno de

los autores de la presente invención, se detallan los principios físicos del funcionamiento del generador de gradiente. Además, se compara con la geometría “árbol de navidad”, el cual es el generador de gradiente más utilizado en microfluídica. Es importante destacar que en este artículo el dispositivo se encuentra fabricado por impresión 3D por estereolitografía, lo cual difiere de la presente invención ya que el dispositivo aquí presentado se encuentra realizado en PMMA, ya que, debido a sus propiedades ópticas y microestructurales, es más adecuado para esta aplicación. Además, hay que resaltar que el artículo mencionado no incorpora las microcámaras de cultivo celular, las cuales son un elemento fundamental para la aplicación mencionada en la presente invención.

- [15] Si bien en los antecedentes de patentes citados anteriormente se presentan generadores de gradientes, el trabajo publicado en el artículo antedicho presenta una nueva disposición de gradiente que consiste en dos entradas, cada una conectada a un reservorio, y estos a su vez a un canal, en donde conociendo la longitud de los canales y la sección hasta los nodos de mezcla, queda determinado qué proporción de líquido va a entrar de cada reservorio, por lo tanto, no es necesario un mezclado previo, no arrastrándose así errores de dosis. Dentro de las ventajas de este dispositivo cabe destacar que es posible ingresar a la zona de mezcla con caudales predeterminados, a concentraciones conocidas, y hacer la disolución en paralelo. Por lo tanto, si uno conoce los caudales con los que ingresa al gradiente y conoce la concentración de las soluciones que ingresan, es posible saber cuál es la concentración final, independientemente de que se haga o no el mezclado. Otra ventaja importante es que es posible trabajar a caudales más elevados que los convencionalmente utilizados conocidos como “árbol de navidad”.
- [16] Por último, se destaca que la principal incorporación de la presente invención son las microcámaras de cultivo celular a cada uno de los canales del dispositivo microfluídico. Dentro de las características de éstas, se destaca que tienen una superficie menor que las convencionalmente utilizadas para técnicas de cultivo celular, lo que conlleva a una menor cantidad de células por microcámara, para que el cultivo sea viable. Además, al estar fabricadas en PMMA no necesariamente requieren un pretratamiento de la superficie para la adhesión

celular, asimismo, tienen buenas propiedades ópticas, lo que resulta indispensable en caso de ser necesario aplicar técnicas de fluorescencia, resolviendo así los problemas que se citan en el estado de la técnica.

OBJETO DE LA INVENCION

- [17] El objeto de la presente invención es un dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células. Dicho dispositivo comprende al menos una unidad de testeo de fármacos y una salida; donde dicha unidad de testeo comprende dos entradas; dos microcanales de entrada; dos reservorios; al menos un microcanal de reservorio; al menos un microcanal de intersección, al menos un microcanal de gradiente; al menos un nodo de mezclado; al menos una microcámara de cultivo celular por cada microcanal de gradiente y por cada microcanal de reservorio; una cámara de confluencia y un microcanal de salida.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- [18] Para mayor claridad y comprensión del objeto de la presente invención, se presentan las siguientes figuras de ejemplos de realización del dispositivo microfluídico:
- [19] Figura 1: Vista superior de una variante de realización del dispositivo microfluídico.
- [20] Figura 2: Esquema de una microcámara de cultivo celular del dispositivo microfluídico del ejemplo de realización.
- [21] Figura 3: Cultivo de la línea celular humana HCT116 dentro de las microcámaras de cultivo celular del ejemplo de realización. Izquierda: Campo claro de la microcámara. Centro: Células vivas. Derecha: Células muertas.

[22] Figura 4: Cultivo de la línea celular humana LN229 dentro de las microcámaras de cultivo celular del ejemplo de realización. Izquierda: Campo claro de la microcámara. Centro: Células vivas. Derecha: Células muertas.

[23] Figura 5: Vista superior de otra variante de realización del dispositivo microfluídico, con cuatro unidades de testeo de fármacos.

[24] Referencias en las Figuras:

(100) Dispositivo microfluídico:

(110) Unidad de testeo de fármacos:

(111) Entradas

(112) Microcanales de entrada

(113) Reservorios

(114) Microcanal de reservorio

(115) Microcanal de intersección

(116) Microcanal de gradiente

(117) Microcámara de cultivo celular

(118) Nodo de mezclado

(119) Cámara de confluencia

(120) Microcanal de salida

(130) Salida

(Lge) Distancia entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de gradiente y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente.

(Lre) Distancia entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de reservorio y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio.

(Lgs) Distancia entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente.

(Lrs) Distancia entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[25] A continuación, se describe el dispositivo de la presente invención:

[26] El dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células de la presente invención comprende:

- al menos una unidad de testeo de fármacos, donde cada una de dicha o dichas unidades de testeo de fármacos comprende:
 - o dos entradas;
 - o dos microcanales de entrada;
 - o dos reservorios;
 - o al menos un microcanal de reservorio;
 - o al menos un microcanal de intersección;
 - o al menos un microcanal de gradiente;
 - o un nodo de mezclado por cada microcanal de gradiente;
 - o al menos una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos microcanales de gradiente;
 - o al menos una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos microcanales de reservorio;
 - o una cámara de confluencia; y
 - o un microcanal de salida; y
- una salida;
donde dicho dispositivo microfluídico es de polimetilmetacrilato (PMMA);
donde cada uno de dichos microcanales de entrada conecta a cada una de dichas entradas con cada uno de dichos reservorios;
donde dichos microcanales de entrada son iguales entre sí;
donde cada uno de dichos microcanales de reservorio se ubica entre cada uno de dichos reservorios y dicha salida;
donde dichos reservorios son iguales entre sí;
donde dichos microcanales de intersección se ubican entre dichos reservorios;
donde cada uno de dichos microcanales de gradiente se ubica entre cada uno de dichos nodos de mezclado y dicha salida;

donde cada uno de dichos nodos de mezclado es la intersección entre cada uno de dichos microcanales de intersección y cada uno de dichos microcanales de gradiente;

donde dichas microcámaras de cultivo celular son iguales entre sí, para lograr presiones de los fluidos equivalentes entre microcanales y hacer funcional al dispositivo, y para que los tratamientos entre microcámaras puedan ser comparables;

donde cada uno de dichos microcanales de gradiente y cada uno de dichos microcanales de reservorio poseen la misma cantidad de microcámaras de cultivo celular, para aumentar el número de réplicas por condición de tratamiento y mantener presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales que hagan funcional al dispositivo;

donde las distancias entre dichas microcámaras de cultivo en cada uno de dichos microcanales de gradiente y en cada uno de dichos microcanales de reservorio son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de gradiente y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas L_{ge} , son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de reservorio y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas L_{re} , son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde dichas distancias L_{ge} y L_{re} son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde las distancias entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente y el extremo final

de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas Lgs, son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde las distancias entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas Lrs, son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde dichas distancias Lgs y Lrs son iguales entre sí, para mantener las presiones de fluidos equivalentes entre los microcanales y hacer funcional al dispositivo;

donde dicha cámara de confluencia se ubica entre el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente y dicha salida;

donde dicha cámara de confluencia se ubica entre el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio y dicha salida; y

donde dicho microcanal de salida se ubica entre dicha cámara de confluencia y dicha salida.

- [27] En caso de que dicho dispositivo microfluídico comprenda dos o más unidades de testeo de fármacos, las longitudes de cada uno de dichos microcanales de salida de cada unidad de testeo son iguales entre sí.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

- [28] Para el dispositivo microfluídico descrito en la presente invención, se llevó adelante el siguiente ejemplo de realización:

- [29] Una variante del dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células utilizado para el presente ejemplo de realización, tal como se puede observar en la Figura 1, comprende:

- una unidad de testeo de fármacos, la cual a su vez comprende:
 - o dos entradas;

- o dos microcanales de entrada, uno por cada una de dichas entradas;
 - o dos reservorios, uno por cada una de dichas entradas;
 - o dos microcanales de reservorio;
 - o seis microcanales de intersección;
 - o seis microcanales de gradiente;
 - o seis nodos de mezclado, uno por cada uno de dichos microcanales de gradiente;
 - o ocho microcámaras de cultivo celular, es decir:
 - una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos seis microcanales de gradiente;
 - una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos dos microcanales de reservorio;
 - o una cámara de confluencia; y
 - o un microcanal de salida; y
- una salida;
- donde dicho dispositivo microfluídico es de polimetilmetacrilato (PMMA);
- donde cada uno de dichos microcanales de entrada conecta a cada una de dichas entradas con cada uno de dichos reservorios;
- donde dichos microcanales de entrada son iguales entre sí;
- donde cada uno de dichos microcanales de reservorio se ubica entre cada uno de dichos reservorios y dicha salida;
- donde dichos reservorios son iguales entre sí;
- donde dichos microcanales de intersección se ubican entre dichos reservorios;
- donde cada uno de dichos microcanales de gradiente se ubica entre cada uno de dichos nodos de mezclado y dicha salida;
- donde cada uno de dichos nodos de mezclado es la intersección entre cada uno de dichos microcanales de intersección y cada uno de dichos microcanales de gradiente;
- donde dichas microcámaras de cultivo celular son iguales entre sí y tienen una profundidad de 800 μm y una superficie aproximada de 2,85 mm^2 , de acuerdo con lo que se observa en la Figura 2;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de gradiente y la entrada de la microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas Lge, son iguales entre sí;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de reservorio y la entrada de la microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas Lre, son iguales entre sí;

donde dichas distancias Lge y Lre son iguales entre sí;

donde las distancias entre la salida de la microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas Lgs, son iguales entre sí;

donde las distancias entre la salida de la microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas Lrs, son iguales entre sí;

donde dichas distancias Lgs y Lrs son iguales entre sí (en particular, se han diseñado los microcanales con una forma de zig-zag, a fin de que el dispositivo microfluídico pueda ser más pequeño);

donde el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente y de dichos microcanales de reservorio se conecta con dicha cámara de confluencia; y

donde dicho microcanal de salida conecta a dicha cámara de confluencia con dicha salida.

[30] A fin de demostrar el correcto funcionamiento del dispositivo microfluídico del presente ejemplo de realización, se han llevado a cabo ensayos de viabilidad celular dentro de las microcámaras de cultivo celular. Para ello, se sembraron dos líneas celulares distintas, HCT116 (cáncer colorrectal) en la Figura 3, y LN229 (glioblastoma) en la Figura 4, exponiéndolas, o no, a un fármaco quimioterapéutico. Se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO₂ durante 72 horas. Se les hizo un ensayo de viabilidad celular utilizando un Kit LIVE/DEAD™ (Invitrogen™), dando como resultados lo que se observa en dichas figuras.

[31] Otra variante del dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células utilizado para el presente ejemplo de realización, tal como se puede observar en la Figura 5, comprende:

- cuatro unidades de testeo de fármacos; y
- una salida;

donde dichas unidades de testeo son iguales entre sí; y

donde cada uno de los microcanales de salida de dichas unidades de testeo tienen la misma longitud y se conectan a dicha salida.

A continuación, siguen 4 reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y especificado la naturaleza y alcance de la presente invención, se declara reivindicar como invención de exclusivo derecho y propiedad:

1) Un dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células, **caracterizado porque** comprende:

- al menos una unidad de testeo de fármacos, donde cada una de dicha o dichas unidades de testeo de fármacos comprende:
 - o dos entradas;
 - o dos microcanales de entrada;
 - o dos reservorios;
 - o al menos un microcanal de reservorio;
 - o al menos un microcanal de intersección;
 - o al menos un microcanal de gradiente;
 - o un nodo de mezclado por cada microcanal de gradiente;
 - o al menos una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos microcanales de gradiente;
 - o al menos una microcámara de cultivo celular por cada uno de dichos microcanales de reservorio;
 - o una cámara de confluencia; y
 - o un microcanal de salida; y

- una salida;
donde dicho dispositivo microfluídico es de polimetilmetacrilato (PMMA);
donde cada uno de dichos microcanales de entrada conecta a cada una de dichas entradas con cada uno de dichos reservorios;
donde dichos microcanales de entrada son iguales entre sí;
donde cada uno de dichos microcanales de reservorio se ubica entre cada uno de dichos reservorios y dicha salida;
donde dichos reservorios son iguales entre sí;

donde dichos microcanales de intersección se ubican entre dichos reservorios;

donde cada uno de dichos microcanales de gradiente se ubica entre cada uno de dichos nodos de mezclado y dicha salida;

donde cada uno de dichos nodos de mezclado es la intersección entre cada uno de dichos microcanales de intersección y cada uno de dichos microcanales de gradiente;

donde dichas microcámaras de cultivo celular son iguales entre sí;

donde cada uno de dichos microcanales de gradiente y cada uno de dichos microcanales de reservorio poseen la misma cantidad de microcámaras de cultivo celular;

donde las distancias entre dichas microcámaras de cultivo en cada uno de dichos microcanales de gradiente y en cada uno de dichos microcanales de reservorio son iguales entre sí;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de gradiente y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas L_{ge} , son iguales entre sí;

donde las distancias entre el extremo inicial de cada uno de dichos microcanales de reservorio y la entrada de la primera microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas L_{re} , son iguales entre sí;

donde dichas distancias L_{ge} y L_{re} son iguales entre sí;

donde las distancias entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de gradiente y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente, denominadas L_{gs} , son iguales entre sí;

donde las distancias entre la salida de la última microcámara de cultivo celular de cada uno de dichos microcanales de reservorio y el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio, denominadas L_{rs} , son iguales entre sí;

donde dichas distancias L_{gs} y L_{rs} son iguales entre sí;

donde dicha cámara de confluencia se ubica entre el extremo final de cada uno de dichos microcanales de gradiente y dicha salida;

donde dicha cámara de confluencia se ubica entre el extremo final de cada uno de dichos microcanales de reservorio y dicha salida; y donde dicho microcanal de salida se ubica entre dicha cámara de confluencia y dicha salida.

- 2) El dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las longitudes de cada uno de dichos microcanales de salida de cada unidad de testeo de fármacos son preferentemente iguales entre sí.
- 3) El dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células, según la reivindicación 2, **caracterizado porque** dichas unidades de testeo son preferentemente iguales entre sí.
- 4) El dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichas unidades de testeo son preferentemente iguales entre sí.

Ing. Edgardo S. ALANIZ

Agente de la Propiedad Industrial

Matrícula N° 2282

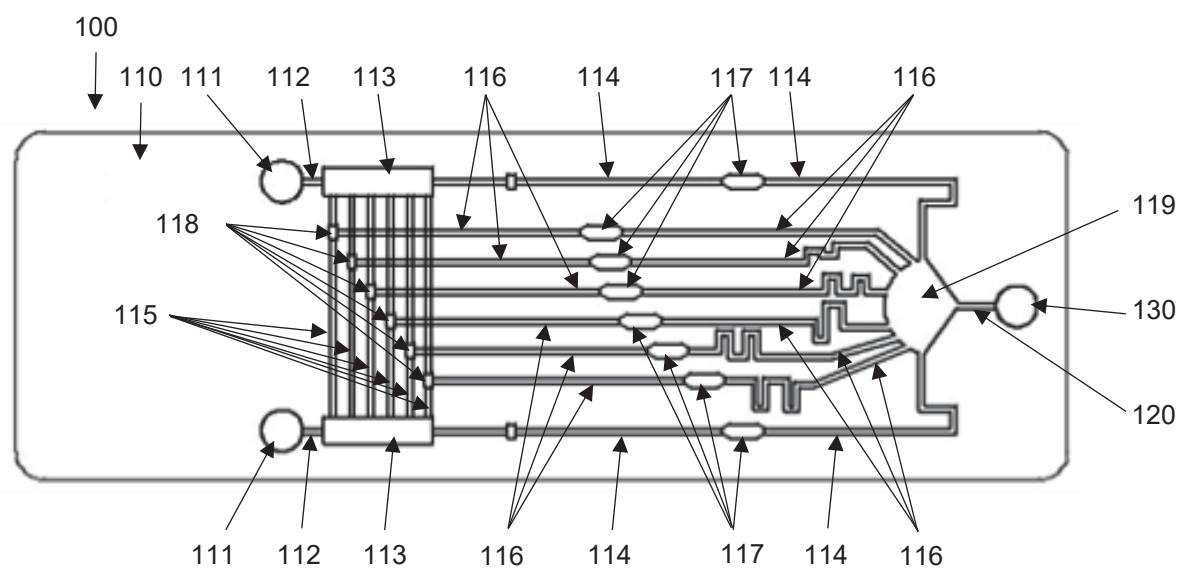


Figura 1

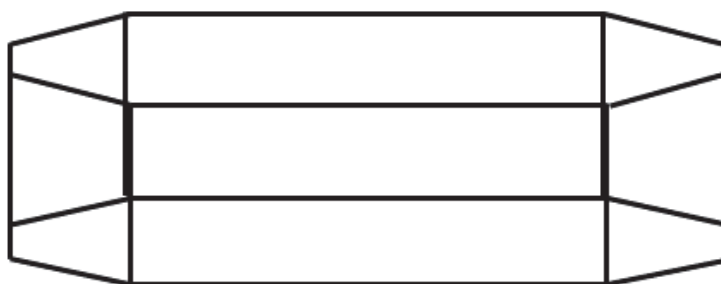


Figura 2

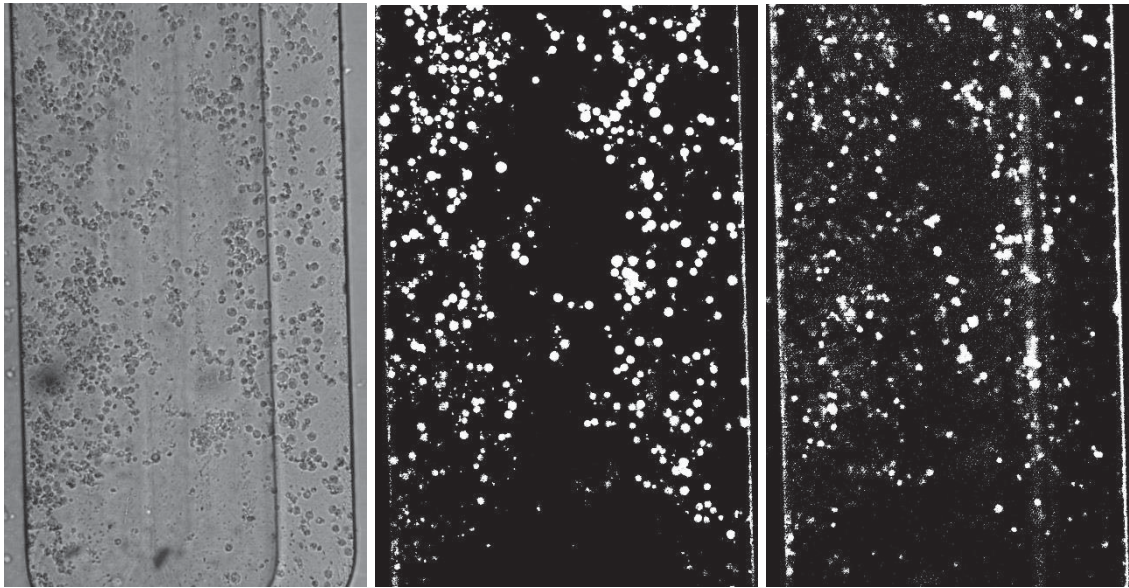


Figura 3

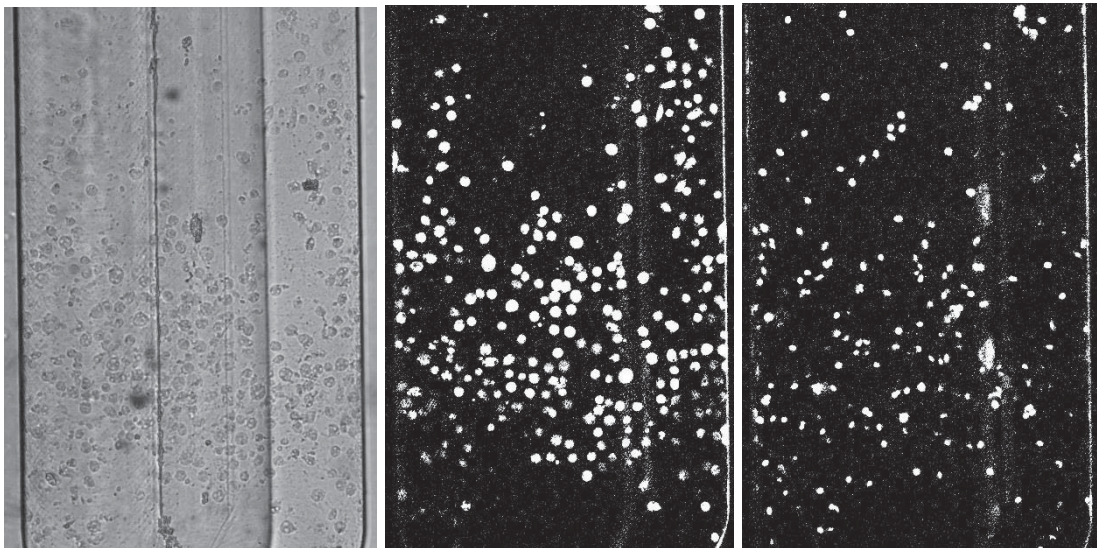


Figura 4

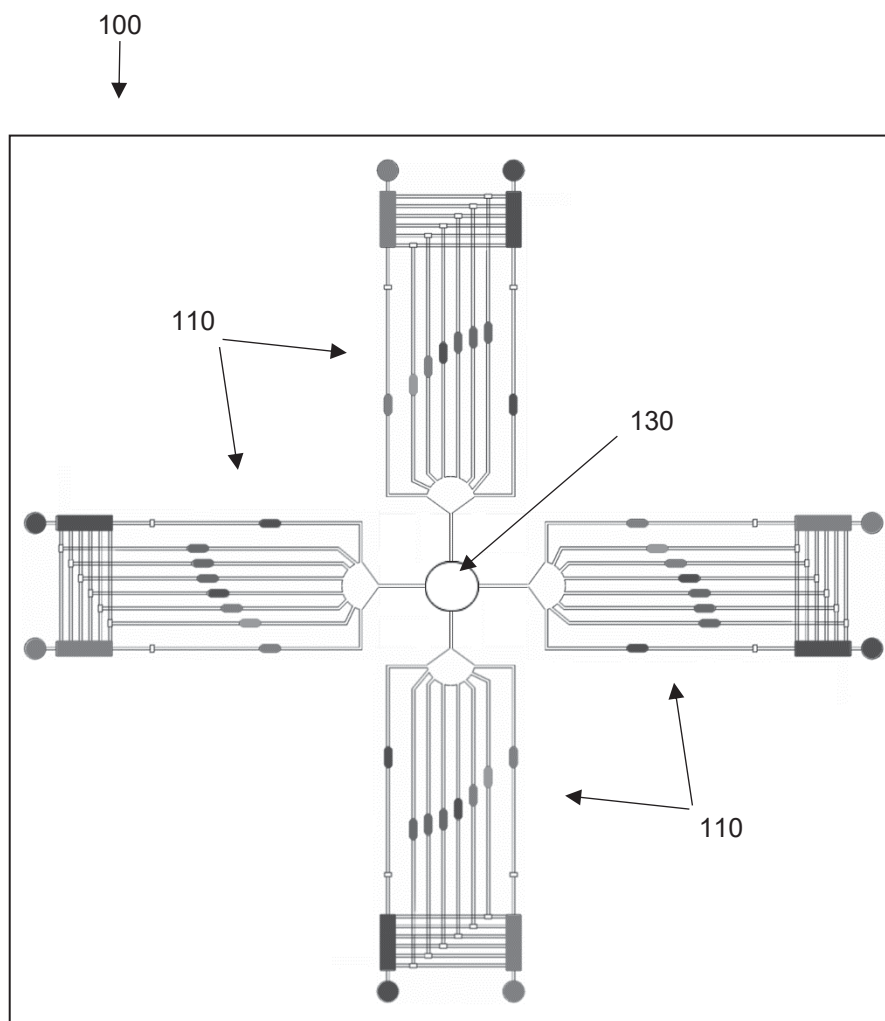


Figura 5

RESUMEN

Dispositivo microfluídico con generador de gradiente para la evaluación predictiva de la respuesta a fármacos en cultivos de células. Dicho dispositivo comprende al menos una unidad de testeo de fármacos y una salida; donde dicha unidad de testeo comprende dos entradas, dos microcanales de entrada, dos reservorios, al menos un microcanal de reservorio, al menos un microcanal de intersección, al menos un microcanal de gradiente, al menos un nodo de mezclado, al menos una microcámara de cultivo celular por cada microcanal de gradiente y por cada microcanal de reservorio, una cámara de confluencia y un microcanal de salida.