

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 229**

51 Int. Cl.:

G03F 7/00 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61F 2/06 (2013.01)
B29C 67/00 (2007.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2014 E 14192461 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3018531**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2021

73 Titular/es:
**TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Strasse des 17. Juni 135
10623 Berlin, DE**

72 Inventor/es:
KLOKE, LUTZ

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 819 229 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

Procedimiento y dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un objeto multicelular tridimensional conforme al preámbulo de la reivindicación 1, a un dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional conforme al preámbulo de la reivindicación 12 y a el uso de un procedimiento de este tipo conforme al preámbulo de la reivindicación 14.

Los objetos tridimensionales multicelulares pueden recibir también el nombre de objetos celulares de material biológico. Es conocido producir objetos de este tipo mediante procedimientos de bioimpresión (la llamada bioprinting), como se describe por ejemplo en el documento WO 2014/126830 A1). A este respecto el término "impresión" designa la estructuración tridimensional de material biológico. Habitualmente se moldean celdas biológicas con ayuda de un gel en una estructura seleccionada previamente. Las técnicas, que se emplean para estos procedimientos de bioimpresión, son la impresión por chorro de tinta (la llamada inkjet printing), la impresión por jeringa (la llamada syringe printing o bioplotting) y la impresión láser (la llamada laser printing). Cada una de estas tres técnicas tiene unas ventajas específicas, pero también limitaciones.

En el procedimiento de impresión por chorro de tinta se disparan células en un líquido con ayuda de una piezoboquilla sobre un portador. Esta técnica funciona análogamente a la técnica de impresión por chorro de tinta sobre papel comercial, solamente que en lugar de tinta se emplea para imprimir una tinta biológica en forma de un líquido portador con unas células suspendidas en el mismo. Mediante esta técnica pueden imprimirse cantidades muy pequeñas, pero sin embargo se ve afectada la precisión del procedimiento, ya que las gotas producidas mediante las piezoboquillas son disparadas con células biológicas en el líquido portador de la piezoboquilla y tienen que volar por el aire durante el tramo entre el extremo de la piezoboquilla y las superficies destinadas a alojar el objeto a imprimir. Durante el vuelo se producen deformaciones en las gotas, con lo que las gotas ejecutan movimientos de balanceo durante el vuelo. Esto conduce a imprecisiones de una impresora de chorro de tinta de este tipo, ya que las células no siempre alcanzan el punto previsto para ellas. Además de esto, una estructura en capas tridimensional del objeto a producir es limitada, ya que solo puede estratificarse desde arriba, de tal manera que son difíciles de producir estructuras de apoyo y estructuras que sobresalgan.

Los procedimientos de impresión por chorro de tinta de este tipo se describen por ejemplo en los documentos WO 99/48541 A1, US 2009/0208466 A1, US 2011/0076734 A1 y US 2011/0250688 A1.

El procedimiento de impresión por jeringa es actualmente el procedimiento de impresión más usual en el campo de la bioimpresión. Aquí el material a imprimir se carga en una jeringa y se presiona desde la jeringa mediante aire comprimido o mediante una impresión con troquel. La boquilla de la jeringa se mueve a este respecto mediante una unidad de movimiento x-y-z, en función del objeto a imprimir, hasta el punto previsto para la misma. En el punto previsto para la impresión se extrae a presión una cantidad definida del material de impresión desde la jeringa. De esta manera se obtiene un objeto tridimensional compuesto por capas. La ventajas de este procedimiento consiste en una estructura más sencilla, si bien solo puede dosificarse con precisión con una elevada complejidad. Si además se pretende emplear diferentes células para estructurar el objeto tridimensional, es necesario poner a disposición provisionalmente jeringas adicionales y emplearse, adicionalmente a la primera jeringa o en lugar de la primera jeringa para la impresión. Esto aumenta tanto la complejidad constructiva de una impresora correspondiente como el tiempo, que se requiere para la verdadera impresión. Esto se plasma en último término en unos costes elevados.

Unos procedimientos de impresión por jeringa se describen por ejemplo en los documentos WO 2013/113883 A1, US 2011/0313542 A1, US 8,580,546 B2 y US 2012/0288938 A1. También el documento US 2014/0093932 A1 describe un procedimiento de impresión por jeringa, en donde aquí se realiza adicionalmente un endurecimiento mediante luz UV del material biológico ya depositado en el punto previsto.

En el procedimiento de impresión láser se imprime con ayuda de un haz láser. A este respecto se recubre una lámina portadora con un líquido, que contiene unas células. A continuación se dirige sobre la lámina portadora recubierta un pulso de haz láser, con lo que desde la lámina portadora se dispara una gota de la suspensión celular. Las gotas aisladas pueden apilarse entonces unas sobre otras mediante un apilamiento habilidoso – de forma similar a en un procedimiento de impresión por chorro de tinta. Ciertamente puede dosificarse bastante bien la cantidad de las gotas que se aplican en la suspensión celular. Sin embargo, las gotas se deforman durante la fase de vuelo en su recorrido hacia la superficie, sobre la que se pretende producir el objeto a imprimir. A causa del movimiento de balanceo ligado a ello se produce de nuevo una imprecisión a la hora de posicionar las gotas. Debido a que el tamaño de la gota es en total más bien pequeño, el procedimiento de impresión láser es muy lento. De esta forma no pueden imprimirse objetos más grandes y complejos. Además de esto, no puede producirse estructuras suspendidas o estructuras de apoyo.

La presente invención se ha impuesto la tarea de exponer un procedimiento de impresión para un objeto tridimensional de material biológico, que supere los inconvenientes conocidos del estado de la técnica y haga posible, en particular, una configuración del objeto muy precisa y el uso sencillo de diferentes materiales al imprimir el objeto. Además de esto se pretende proporcionar un dispositivo correspondiente, con el que pueda aplicarse el procedimiento.

Esta tarea es resuelta con un procedimiento para producir un objeto multicelular tridimensional con las características de la reivindicación 1. En un procedimiento de este tipo se introduce en primer lugar en un recipiente de reacción un primer líquido fotopolimerizable. A continuación se enfoca una primera radiación luminosa sobre un plano de enfoque, que está situado dentro de una zona del recipiente de reacción lleno de un primer líquido. Mediante esta radiación luminosa se produce después una primera estructura polimerizada en el recipiente de reacción. La primera estructura polimerizada se encuentra a este respecto en una primera capa.

En unos pasos de procedimiento adicionales se introduce un líquido fotopolimerizable adicional en el recipiente de reacción, en donde la estructura polimerizada producida previamente está cubierta al menos en parte con el líquido fotopolimerizable adicional. De forma preferida la estructura polimerizada producida previamente está cubierta por completo con el líquido fotopolimerizable adicional. A continuación se enfoca una radiación luminosa adicional sobre un plano de enfoque adicional, que está situado dentro de una zona del recipiente de reacción llena del líquido adicional. El plano de enfoque adicional se diferencia de esta manera del primer plano de enfoque, al menos en relación a la estructura polimerizada ya producida o en relación a la capa de esta estructura polimerizada.

A continuación se produce en el recipiente de reacción, mediante la radiación luminosa adicional, una estructura polimerizada adicional. A este respecto la estructura polimerizada adicional está dispuesta directamente sobre la estructura polimerizada previamente producida y está enlazada con la misma. En el caso del enlace se trata de forma preferida de un enlace covalente. Sin embargo, básicamente serían también concebibles enlaces no covalentes, por ejemplo sobre la base de interacciones físicas.

Los pasos antes citados de la introducción de un líquido fotopolimerizable adicional, del enfoque de una radiación luminosa adicional y de la producción de una estructura polimerizada adicional en una capa adicional se repiten ahora respectivamente con un líquido fotopolimerizable adicional, hasta que se produce el objeto multicelular tridimensional deseado. Mediante los diferentes planos de enfoque, en los que tiene lugar una polimerización de los líquidos fotopolimerizables, se consigue en consecuencia una estructura por capas del objeto multicelular tridimensional. A este respecto son posibles también rebajamientos y estructuras que sobresalen, ya que una polimerización del líquido fotopolimerizable en un plano de enfoque o en una capa determinado(a) también puede realizarse, si por debajo no está dispuesto un material ya polimerizado, sino solamente un líquido todavía no polimerizado. Una polimerización de este líquido fotopolimerizable presente por fuera del plano de enfoque queda descartada; más bien se polimeriza solo el líquido fotopolimerizable que está situado dentro del plano de enfoque. Sin embargo, el líquido presente por fuera del plano de enfoque se usa para el apoyo temporal del líquido presente en el plano de enfoque, sin que para ello sean necesarias unas estructuras de apoyo fijas.

El primer líquido fotopolimerizable y/o al menos uno de los líquidos fotopolimerizables adicionales contienen células biológicas. Si como consecuencia de la radiación luminosa se produce una polimerización, las células contenidas en el líquido también se embeben en un polímero correspondiente. Debido a que no todos los líquidos fotopolimerizables tienen que contener también células, en el objeto multicelular tridimensional producido pueden configurarse unas estructuras sin células, por ejemplo en forma de estructuras intermedias.

Con estos procedimientos pueden producirse objetos biológicos complejos como modelos, por ejemplo para representar e investigar interacciones célula-célula, la organobiogénesis, enfermedades o funciones orgánicas. Un objeto multicelular tridimensional de este tipo tiene claras ventajas respecto al cultivo celular bidimensional clásico, en particular cuando se trata del modelado del juego combinado de varios tipos de células. Esto es debido a que la complejidad de interacciones célula-célula, las funciones de una barrera natural y el modelado de enfermedades u órganos no puede reproducirse suficientemente con los cultivos celulares bidimensionales.

Además de esto, el procedimiento que se acaba de describir hace posible la elaboración de modelos miniaturizados de una forma especialmente sencilla. Los modelos miniaturizados de este tipo se elaboraban hasta ahora en parte manualmente. El esfuerzo necesarios para ello es muy elevado; además se precisa una experiencia de varios años.

Por último, mediante el procedimiento que se acaba de describir se puede garantizar una elevada capacidad de reproducción de diferentes ejemplares del mismo objeto multicelular tridimensional. En consecuencia, mediante el procedimiento que se acaba de describir no solo se puede acelerar la producción con respecto a otros procedimientos, conocidos del estado de la técnica, más bien los objetos producidos presentan también siempre la misma calidad. Una elevada capacidad de reproducción de este tipo es especialmente ventajosa en la biotecnología. Esto es debido a que, a la hora de analizar y desarrollar nuevos productos farmacéuticos, un ensayo en cultivos celulares tridimensionales siempre duraderos reduce considerablemente los costes de desarrollo. Si por el contrario estas estructuras tridimensionales tan complejas se producen a mano, son inevitables las fluctuaciones individuales. Sin embargo, de esta forma es prácticamente imposible obtener resultados de ensayos reproducibles. Frente a esto, el procedimiento que se acaba de describir ofrece unos objetos, que son extremadamente apropiados para la producción de resultados de ensayos reproducibles.

Como recipientes de reacción pueden usarse cavidades (las llamadas wells) de placas de micro-título comerciales (por ejemplo placas de micro-título con 6, 12, 24, 48, 96, 384 ó 1.536 cavidades), botellas de cultivo celular o placas de Petri.

El objeto multicelular tridimensional producido mediante el procedimiento puede estar estructurado a partir de un

material homogéneo y, en consecuencia, comprender solamente células de un solo tipo. Además de esto, el material polimérico que circunda las células puede estar conformado uniformemente. En una variante se trata sin embargo, en el caso del primer líquido fotopolimerizable y de al menos unos de los líquidos fotopolimerizables adicionales, de diferentes líquidos. De este modo se hace posible producir objetos multicelulares con una estructura heterogénea, que comprenden células de diferentes tipos. Además de esto, de esta forma es posible proporcionar células iguales o diferentes en diferentes polímeros envolventes. Es decir, los diferentes líquidos pueden diferenciarse tanto en cuanto al material polimerizable en el líquido como en cuanto a las células contenidas en el líquido. En consecuencia, con esta variante se proporciona un procedimiento con el que diferentes tipos de células pueden componerse para formar un órgano artificial. En el caso de este órgano artificial puede tratarse de un órgano, que reproduzca o imite un órgano humano o animal. A este respecto es posible, dentro de un único proceso de impresión producir diferentes objetos dentro del mismo recipiente de reacción o dentro de recipientes de reacción adyacentes.

Si mediante el presente procedimiento se produce un órgano artificial, en el caso de este modelo de órgano puede tratarse de un modelo que reproduzca un órgano sano. Alternativamente puede producirse también un modelo de enfermedad en forma de un órgano que presente un determinado defecto. Por ejemplo puede introducirse un estrechamiento mecánico en un objeto producido con el presente procedimiento, para producir una lesión "incorporada", como por ejemplo en el caso de un golpe roma o una lesión roma. De esta forma es posible proporcionar una estructura estandarizada para modelos de enfermedad de este tipo. También es posible producir dentro de un objeto un gradiente degenerativo. De esta manera puede producirse en una primera zona del objeto una estructura celular relativamente sana, que después se transforma continuamente, a través de un gradiente local en el objeto producido, en una estructura enferma. Entre las dos estructuras extremas se encontrarían entonces unas estructuras intermedias, parcialmente enfermas, en el objeto producido. Además de esto también es posible, mediante la incorporación de virus o bacterias, producir modelos de infección para órganos artificiales. Una incorporación de este tipo de bacterias o virus puede realizarse del modo descrito anteriormente, durante el proceso de impresión, mediante la selección de un líquido fotopolimerizable adicional adecuado, que contenga virus o bacterias correspondientes como células.

Mediante la elección de tipos de células adecuados pueden producirse además modelos de enfermedad para enfermedades normales como por ejemplo diabetes, tumores o tejido afectado, como el que puede darse después de un infarto de miocardio o un derrame cerebral en un organismo vivo. Debido a que pueden emplearse, además de líquidos fotopolimerizables que contengan células, también líquidos fotopolimerizables sin células, puede producirse un "embalaje" del objeto producido en un polímero sin células en el mismo proceso de impresión, en el que también se produce el objeto en sí. Es decir, el objeto se genera al mismo tiempo que y en su portador, de tal manera que el embalaje y el objeto multicelular se obtienen en paralelo.

En una variante el líquido fotopolimerizable presenta un compuesto acrílico, mediante el cual se realiza la polimerización. El compuesto acrílico se elige de forma preferida del grupo compuesto por metacrilatos, acrilatos de metilo, acrilatos de etilo, acrilatos de hidroxietilo, acrilatos de butilo, acrilatos de trimetilolpropano, acrilatos de triacrilato y poliácrilatos (PA) en general.

En compuesto acrílico se acopla en una variante a una sustancia de partida a gelificar o a polimerizar. Mediante este acoplamiento se obtiene en especial un enlace covalente entre el compuesto acrílico y la sustancia de partida a polimerizar. En el caso de esta sustancia de partida puede tratarse por ejemplo de un polímero sobre base de carbono, como por ejemplo polietilenglicol (PEG), polietileno (PE), polipropileno (PP), policetona (PK), polivinilcloruro (PVC), Poliestirol (PS), politetrafluoretileno (PTFE), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polietilentereftalato (PET) y poliuretano (PU). Como sustancia de partida son también adecuados polímeros sintéticos como silicona, polidimetilsiloxano (PDMS) o resinas, como por ejemplo resinas de melamina o de melamina formaldehído. Además de esto son adecuados como sustancias de partida biopolímeros como por ejemplo proteínas, DNA, RNA, hidratos de carbono y derivados de hidratos de carbono, colágenos, fibrinas, alginatos o gelatinas. En lugar de los polímeros antes citados pueden emplearse como sustancias de partida también respectivamente las fases previas de monómeros o de oligómeros de estos polímeros, siempre que los mismos puedan proporcionarse de forma estable en un estado de agregación sólido o líquido. Mediante la introducción de una función acrílica en la sustancia de partida mediante el acoplamiento entre el compuesto acrílico y la sustancia de partida se proporciona una matriz polimerizable, incluso si en el caso de las sustancias de partida se trata ya de polímeros.

Si se emplea PDMS fotopolimerizable como matriz o como sustancia envolvente, es posible un intercambio gaseoso entre las células embebidas en esa matriz. Como ya se ha mencionado, pueden emplearse diferentes sustancias envolventes o matrices. De esta manera puede emplearse para la restante matriz un plástico estable, además de PDMS o de otra matriz que presente una buena biocompatibilidad, para de esta forma producir un objeto estable hacia el exterior, en cuyo interior se presente una matriz con menor estabilidad, que haga posible el crecimiento celular. Como ya se ha mencionado, puede decirse por lo tanto que, en paralelo al objeto multicelular tridimensional, puede producirse su propia protección o su propio embalaje.

La sustancia de partida complementada en la función de acrilato se emplea de forma líquida, en donde son posibles diferentes viscosidades. Es decir, el procedimiento que se acaba de describir no está limitado a líquidos con una determinada viscosidad, sino que puede emplear también líquidos con baja viscosidad como sustancias de partida. A este respecto el comportamiento de fluencia de estos líquidos puede ir de la tixotropía a la reopexia.

Los líquidos pueden ser soluciones o mezclas dispersas de coloides, como por ejemplo suspensiones. Los líquidos pueden tener a este respecto un carácter de acuoso a aceitoso. Esto se determina, entre otras cosas, mediante la elección de las sustancias de partida y su tamaño de partícula.

5 Para que pueda lograrse una fotopolimerización de una sustancia de partida que soporte una función de acrilato, se emplea además un formador de radicales (un llamado fotoiniciador) que, en el caso de una longitud de onda seleccionada de la luz empleadas en el marco del procedimiento, forma radicales.

10 Formadores de radicales adecuados son por ejemplo derivados de la antraquinona, como por ejemplo violantraquinona o isoviolantraquinona, fluoresceína, rubrene, derivados de la atracina, derivados del tetraceno, benzatina, benzatropina, eosina, derivados del ácido levulínico, derivados de la fosfina, mono y bis-acil-fosfina, metaloceno, acetofenona, benzofenona, xantona, quinona, derivados de la cetona, hidroxicetona, aminocetona, benzoilo peróxido, sales de piridina, fenilglioilatos y/o sales de idonium.

De forma preferida se emplean, además de los formadores de radicales, también un macrómero de viniloiniciador de Co basado en aminas, para que la fotopolimerización se desarrolle de una forma especialmente adecuada. Como iniciador de Co son apropiados por ejemplo ácidos ascórbicos y aminoderivados terciarios, como por ejemplo metildietanolamina.

15 En una variante, el líquido fotopolimerizable presenta un derivado del tiol. Derivados del apropiados son tiolditiotreitól, cisteínas monofuncionales, péptidos bifuncionales y compuestos similares.

20 Además de esto al líquido fotopolimerizable puede añadirse una sustancia, que impida una fotopolimerización de capas líquidas más profundas. De este modo la solución líquida por fuera del plano de enfoque permanece líquida, incluso si se encuentra en la zona de irradiación del plano de enfoque situado sobre la misma. Esto funciona mediante una absorción de la longitud de onda polimerizadora a través de la sustancia. La absorción tiene lugar en el plano de enfoque, de tal manera que no es posible una penetración de la longitud de onda polimerizable en capas más profundas. Son adecuadas todas las sustancias que absorben en la longitud de onda deseada, como por ejemplo colorantes.

En otra variante, el líquido fotopolimerizable presenta un monómero monofuncional, como por ejemplo N-vinilpirrolidona.

25 Además de esto es posible, en una variante, que el primer líquido fotopolimerizable y/o uno de los líquidos fotopolimerizables adicionales y/o otro líquido, que no tiene que ser fotopolimerizable, presenten un formador de gel sensible a la temperatura. En particular está previsto el empleo de un formador de gel inversamente sensible a la temperatura (también llamado reversiblemente sensible a la temperatura). Un formador de gel de este tipo se hace más sólido conforme aumenta la temperatura. Mediante un calentamiento del recipiente de reacción se solidifica el líquido reactivo y forma un gel en principio solo metaestable. Si el líquido no se fotopolimerizara al mismo tiempo, mediante un enfriamiento subsiguiente del objeto el gel metaestable puede licuarse de nuevo y evacuarse por bomba. En los formadores de gel sensibles a la temperatura habituales, las relaciones de temperatura a aplicar son exactamente inversas. De esta manera, en caso necesario, puede crearse por ejemplo una estructura de apoyo, de tal manera que puedan producirse estructuras suspendidas. Si por el contrario el gel metaestable se irradia al menos parcialmente con luz en una longitud de onda adecuada, se produce una fotopolimerización, de tal forma que el gel metaestable se transforma en esas zonas en un gel o polímero estable.

40 En otras palabras, mediante el formador de gel sensible a la temperatura, en especial inversamente sensible a la temperatura, y un control de temperatura del espacio reactivo puede trabajarse todavía más fácilmente con partes suspendidas y rebajamientos. Asimismo, en esta variante también puede trabajarse con estructuras líquidas como soporte.

Además de esto es posible prever un gradiente de temperatura, de tal manera que no se obtenga un gel metaestable en todas las zonas del líquido convertido con el formador de gel sensible a la temperatura, en particular inversamente sensible a la temperatura. Con ayuda de un gradiente de este tipo pueden producirse estructuras todavía más complejas.

45 Los componentes aislados antes citados pueden estar contenidos como sustancias individuales en el líquido fotopolimerizable. Alternativamente, también es posible materializar las sustancias o los grupos empleados de forma preferida para la formación del gel, en un único polímero, mediante una síntesis correspondiente. En lugar de una mezcla formada por componentes aislados, un polímero de este tipo presentaría entonces diferentes grupos funcionales, que reúnan en sí todas las funciones necesarias o de forma preferida a emplear para una fotopolimerización. Además de esto, también es concebible prever solamente alguna(o)s de las funciones o de los grupos empleada(o)s de forma preferida para la fotopolimerización en un polímero y añadir mezclando otra(o)s funciones o grupos a emplear de forma preferida para la fotopolimerización, en componentes individuales separados, al líquido fotopolimerizable.

55 Como células biológicas, que se emplean para estructurar el objeto multicelular tridimensional, se contemplan todas las células eucariotas y procariotas que se presentan naturalmente. De forma preferida se trata, en el caso de las células empleadas, de células eucariotas. Son particularmente adecuadas todas las células y todos los tipos de células que se presentan en el cuerpo de un mamífero, en especial de un roedor y muy especialmente de un ser humano, o que

configuran ese cuerpo. En una variante se trata, en el caso de las células biológicas empleadas, de células omnipotentes o pluripotentes. A este respecto, la invención se refiere en una variante solamente al empleo de estas células, que pueden obtenerse sin la destrucción de embriones humanos. Además de las células que se presentan naturalmente, pueden usarse como células biológicas también células de líneas celulares que no se presentan naturalmente. Las líneas celulares generadas artificialmente de este tipo hacen posible la configuración hecha a medida del objeto multicelular tridimensional a producir.

Debido a que el presente procedimiento hace posible una combinación de diferentes tipos de células para formar un objeto multicelular tridimensional, es especialmente adecuado para producir órganos artificiales. Los órganos artificiales de este tipo pueden ser por ejemplo objetos modelados miniaturizados de un órgano que se presente naturalmente, en especial de un órgano que se presente naturalmente de una persona o de un animal, como por ejemplo de un mamífero o de un roedor. Debido a que pueden emplearse diferentes líquidos fotopolimerizables, son posibles también diferentes tipos de geles, en los que estén embebidas las células biológicas. Además de esto es posible combinar polímeros artificiales y biopolímeros, de tal manera que pueden producirse unas estructuras muy estables, en las que están embebidas las células biológicas. Durante un proceso de impresión aislado pueden producirse simultáneamente varios objetos tridimensionales, incluso con diferentes formas.

Asimismo puede simularse también mediante esta tecnología, mediante la función de membrana y barrera en combinación con la función de órgano, el modelo de un embarazo.

En una variante se trata, en el caso de los órganos artificiales producidos, en especial de aquellos órganos que reproducen la función de músculos, del esqueleto, de la piel, del tejido graso, del intestino, del hígado, de la médula ósea, del cerebro, del pulmón, del corazón, de los riñones, del tiroides o del bazo y, en consecuencia, pueden recibir el nombre de músculos artificiales, esqueleto artificial, etc.

Sobre un portador dentro de un recipiente de reacción o también en diferentes recipientes de reacción pueden proporcionarse combinaciones de diferentes órganos artificiales, que por ejemplo se hayan producido durante el mismo proceso de impresión.

En una variante el líquido fotopolimerizable adicional no se introduce en el recipiente de reacción, hasta que no se haya extraído el líquido fotopolimerizable situado previamente en el recipiente de reacción (aquí puede tratarse por ejemplo del primer líquido fotopolimerizable o de un líquido fotopolimerizable adicional). Para ello es por ejemplo posible que esté prevista una bomba, que evacúe por bomba del recipiente de reacción un líquido fotopolimerizable ya usado e introduzca por bomba en el recipiente de reacción un nuevo líquido fotopolimerizable. En lugar de bombas aisladas pueden usarse para este tipo de procesos también dos o más bombas diferentes.

Está previsto, en una variante, introducir en el recipiente de reacción un líquido desinfectante para hacer posible una producción esterilizada del objeto multicelular tridimensional. Un líquido desinfectante de este tipo puede introducirse por ejemplo en el recipiente de reacción, cuando se haya extraído del recipiente de reacción un líquido fotopolimerizable usado previamente y todavía no se haya introducido en el recipiente de reacción un líquido fotopolimerizable adicional. Además de esto, también es posible introducir en el recipiente de reacción un líquido desinfectante adicionalmente a un líquido fotopolimerizable, de tal manera que el mismo esté contenido en el recipiente de reacción durante el proceso de fotopolimerización.

Como líquido desinfectante puede emplearse por ejemplo un alcohol, como por ejemplo etanol o propanol. A este respecto son apropiadas para la desinfección en especial soluciones acuosas de estos alcoholes, en donde la concentración de alcohol está situada por ejemplo en un rango del 40 % al 90 %, en especial del 50 % al 80 % y muy especialmente del 60 % al 70 % (respectivamente viceversa).

En una variante el objeto multicelular tridimensional puede irradiarse, durante o al final de su proceso de producción, con luz de una longitud de onda inferior, por ejemplo en el rango UV, es decir, por debajo de 380 nm), para de esta manera conseguir una esterilización. Las esterilizaciones UV de este tipo son básicamente conocidas. Sin embargo, en el presente caso pueden aplicarse convenientemente si las células biológicas, que están contenidas en el objeto tridimensional, no resultan dañadas por una radiación UV de este tipo.

En una variante está dispuesta una placa portadora o estructura portadora en el recipiente de reacción, con la que se enlaza la primera estructura polimerizada. El empleo de una placa portadoras de este tipo es apropiado cuando el objeto multicelular tridimensional producido no se pretende analizar más tarde en el propio recipiente de reacción, sino que se pretende extraer del recipiente de reacción. En la placa portadoras pueden estar presentes por ejemplo unas conexiones roscadas (como por ejemplo conexiones roscadas DIN), para hacer posible un suministro subsiguiente de líquidos y gases al objeto multicelular tridimensional. También es posible introducir unas conexiones roscadas de este tipo en la matriz del objeto multicelular tridimensional en el marco del procedimiento de producción, es decir, generar estas conexiones roscadas allí en la matriz. La producción de estas conexiones roscadas en la matriz puede llevarse a cabo, con independencia de si se emplea o no una placa portadora.

En una variante se produce una placa portadora antes del paso de la producción de una estructura polimerizada, mediante la irradiación de una radiación luminosa en un plano de enfoque que está situado dentro de una zona del

recipiente de reacción, relleno de un líquido fotopolimerizable (en especial con el primer líquido o uno de los otros fotopolimerizables), por medio de que se forma una estructura portadora polimerizada, que presenta o representa la placa portadora. Es decir, en esta variante no solo se producen las verdaderas estructuras polimerizadas, sino también la estructura portadora mediante una reacción de polimerización.

5 La estructura portadora puede tener una forma tal, que entre la placa portadora y un fondo del recipiente de reacción se forme una separación. De este modo los planos de enfoque de las verdaderas reacciones de polimerización presentan entonces una mayor separación respecto al fondo del recipiente de reacción. En particular, la primera estructura polimerizada formada presenta entonces una mayor separación respecto al fondo del recipiente de reacción. Después pueden aspirarse del recipiente de reacción, de forma especialmente sencilla, los líquidos polimerizables que ya no se necesitan.

Para que los líquidos puedan penetrar fácilmente a través de la placa portadora o de la estructura portadora, la estructura portadora puede estar equipada con unas perforaciones permeables a los líquidos, en especial en la zona de la placa portadora.

15 En una variante se dispone un sistema óptico entre una fuente luminosa, que se usa para producir las radiaciones luminosas primera y/o adicional, y el recipiente de reacción, la cual se usa para enfocar la radiación luminosa sobre el respectivo plano de enfoque en el recipiente de reacción. A este respecto está previsto, en una variante, que pueda producirse un reenfoque de este sistema óptico, para modificar el plano de enfoque dentro del recipiente de reacción. Un reenfoque de este tipo puede conseguirse por ejemplo mediante una modificación de la separación del sistema óptico respecto a la fuente luminosa. A este respecto puede estar previsto un motor paso a paso controlado por ordenador, para hacer posible un movimiento correspondiente del sistema óptico. En el caso del sistema óptico puede tratarse de lentes ópticas o – en el caso de un montaje constructivo especialmente sencillo – de una única lente de enfoque.

20 Si se lleva a cabo un reenfoque de un sistema óptico, para modificar o desplazar el plano de enfoque dentro del recipiente de reacción, no se impone a la conformación del recipiente de reacción regularmente ningún requisito especial.

25 En una variante es también posible llevar a cabo un movimiento relativo entre el recipiente de reacción o una placa portadora dispuesta en el recipiente de reacción, por un lado, y una fuente luminosa que se usa para generar las radiaciones luminosas primera y/o adicional, por otro lado. Esto es debido a que mediante un movimiento relativo de este tipo, que puede materializarse por ejemplo mediante un movimiento del recipiente de reacción, mediante un movimiento de la placa portadora dispuesta en el recipiente de reacción o mediante un movimiento de la fuente luminosa, puede modificarse también el plano de enfoque dentro del recipiente de reacción. En esta variante no se requiere en consecuencia un reenfoque de un sistema óptico que se emplee opcionalmente. De este modo puede reducirse el riesgo de desajustes ópticos.

30 En otra variante de procedimiento se dirigen las radiaciones luminosas primera y/o adicional hacia una zona definida y predeterminable en el respectivo plano de enfoque, dentro del primer líquido fotopolimerizable y/o del líquido fotopolimerizable adicional. Es decir, puede fijarse un modelo luminoso específico, que incida en el líquido fotopolimerizable y que se use, en estos puntos, para una polimerización del líquido para formar un polímero o un gel (de la matriz). Un modelo luminoso de este tipo puede generarse por ejemplo mediante el empleo de máscaras o diafragmas, pero también mediante el empleo de una radiación luminosa pulsada o la modulación digital de una señal luminosa. En las zonas del líquido fotopolimerizable, en las que incide la radiación luminosa, se produce una polimerización. En las otras zonas, no afectadas por la radiación luminosa, el líquido fotopolimerizable permanece en su estado no polimerizado. De este modo la radiación luminosa define las zonas en las que se produce una impresión de la estructura polimerizada. Con una impresión apoyada por la luz de este tipo son posibles unas resoluciones ampliamente mayores, de lo que es el caso en los procedimientos conocidos del estado de la técnica. La resolución depende a este respecto de la longitud de onda de la luz empleada. La misma es mejor, en el caso de longitudes de onda grandes empleadas regularmente, que la resolución que puede obtenerse con los procedimientos convencionales, conocidos del estado de la técnica. Cuanto más precisamente pueda enfocarse la fuente luminosa, mayor será la resolución resultante. Por ejemplo, con un láser pueden conseguirse resoluciones muy elevadas.

35 La radiación luminosa puede dirigirse hacia el respectivo plano de enfoque, en caso necesario, a través de unos espejos.

40 El modelo de iluminación respectivamente elegido puede ser proporcionado por ejemplo por un programa de ordenador. De esta manera es concebible que un usuario elabore el objeto tridimensional a producir mediante un programa CAD. El objeto digital elaborado de este modo se secciona después en planos de iluminación aislados mediante un programa de ordenador adecuado. Además de esto, a cada plano o a diferentes puntos de cada plano se asocia un determinado líquido fotopolimerizable o un determinado tipo de célula. Respecto a estas informaciones se elaboran informaciones de control para una impresora, mediante las cuales se lleva a cabo el procedimiento descrito. Estas informaciones de control prefijan, cuándo y qué líquido fotopolimerizable debe introducirse en el recipiente de reacción. Además de esto, estas informaciones de control prefijan cuándo y qué imagen de un plano de iluminación debe proyectarse sobre el respectivo plano de enfoque en el recipiente de reacción. De esta manera el objeto digital elaborado previamente en el

ordenador puede transformarse después en un objeto multicelular tridimensional.

Conforme a la invención se produce más de una estructura polimerizada en la misma capa (es decir, en el mismo plano de enfoque). Para ello se producen en primer lugar una polimerización de un primer líquido fotopolimerizable y, por ejemplo, una imbibición de un primer tipo de célula en el polímero formado por el primer líquido. A continuación se extrae del recipiente de reacción el primer líquido fotopolimerizable y se introduce en el recipiente de reacción un segundo líquido fotopolimerizable. A continuación sólo se iluminan aquellas zonas dentro del plano de enfoque en el recipiente de reacción, que previamente no hayan sido iluminadas y en las que en consecuencia todavía no se presenta una estructura polimerizada. De este modo pueden generarse diferentes tipos de células o diferentes matrices en una y la misma capa. En consecuencia se forman varias estructuras polimerizadas en una y la misma capa, de tal manera que se obtiene una capa heterogénea. A continuación puede extraerse del recipiente de reacción el segundo líquido fotopolimerizable e introducirse en el recipiente de reacción un líquido fotopolimerizable adicional. El nivel de llenado de este líquido fotopolimerizable adicional puede llevarse ahora a un nivel tal, que la capa previamente formada esté completamente cubierta. Después puede desplazarse el plano de enfoque y configurarse una capa adicional del objeto multicelular tridimensional a producir mediante una estructura polimerizada correspondiente. A este respecto es básicamente posible que capas aisladas del objeto multicelular tridimensional estén compuestas homogéneamente (que comprendan una estructura polimerizada de un único tipo) y otras capas heterogéneamente (que comprendan estructuras polimerizadas de diferentes tipos), en donde no está limitado el número de estructuras aisladas por cada capa. En la práctica han demostrado ser prácticas, además de una única estructura polimerizada por capa, capas compuestas heterogéneamente con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 estructuras polimerizadas.

En una variante se irradian con la primera radiación luminosa desde dos direcciones diferentes al menos la primera estructura de la primera capa, pero en especial cada estructura de la primera capa. A este respecto, estas dos diferentes direcciones están de forma preferida mutuamente contrapuestas. Con una radiación de este tipo desde dos diferentes direcciones se consigue un anclaje especialmente fijo de la primera capa sobre la superficie interior del recipiente de reacción, respectivamente sobre una placa portadora que está dispuesta en el recipiente de reacción. De este modo se logra una sujeción segura posterior de todo el objeto multicelular tridimensional producido en el recipiente de reacción o en una placa portadora en el recipiente de reacción, con lo que se facilitan las investigaciones subsiguientes en el objeto. Normalmente la irradiación se realiza desde arriba, en el caso de un recipiente de reacción abierto hacia arriba. La primera capa se irradia en esta variante entonces adicionalmente, de forma preferida, desde abajo a través del fondo del recipiente de reacción. Para ello el recipiente de reacción tiene que estar fabricado con un material, que sea permeable a la radiación luminosa con la longitud de onda elegida. Las capas subsiguientes, que están dispuestas por encima de la primera capa, se iluminan después de forma preferida a su vez solamente desde una dirección (precisamente de forma preferida desde arriba), para que las estructuras polimerizadas ya formadas no estén situadas entre el plano de enfoque de la radiación luminosa y una fuente luminosa empleada para la emisión de la radiación luminosa y, de esta forma, no sean irradiadas de nuevo por la radiación luminosa delante de su plano de enfoque.

En una variante la primera radiación luminosa y/o la radiación luminosa adicional presentan una longitud de onda en un rango de 200 nm a 1.000 nm (es decir, una longitud de onda situada entre el rango UV y el rango infrarrojo). Con longitudes de onda de este tipo pueden excitarse especialmente bien las sustancias empleadas como formadores de radicales, de tal manera que se forman unos radicales para hacer posible una polimerización de sustancias de partida que soportan funciones acrílicas.

Otras longitudes de onda apropiadas de la radiación luminosa empleada están situadas en un rango de 250 a 950 nm, en especial de 300 a 850 nm, en especial de 400 a 750 nm, en especial de 450 a 700 nm, en especial de 500 a 650 nm y muy especialmente de 500 a 600 nm.

Debido a que la luz UV puede dañar las células biológicas, en una variante solo se emplea luz con una longitud de onda en el rango visible, es decir de unos 380 nm a unos 780 nm. A este respecto también pueden estar previstos unos filtros UV, que extraen por filtrado fragmentos UV de una radiación luminosa, para extraer por filtrado, con seguridad, radiación UV posiblemente dañina desde la radiación luminosa.

Las radiaciones luminosas empleadas para la polimerización pueden comprender la misma longitud de onda o bien diferentes longitudes de onda procedentes del rango de longitudes de onda antes citado, para hacer posible una polimerización apropiada de los diferentes líquidos fotopolimerizables. A este respecto las radiaciones luminosas aisladas pueden generarse mediante diferentes o una y la misma fuente luminosa. También es posible, dentro de una capa (y con ello dentro de un plano de enfoque), emplear consecutivamente diferentes longitudes de onda, para polimerizar en la misma capa diferentes líquidos fotopolimerizables, si se pretende formar una capa heterogénea a partir de diferentes estructuras polimerizadas.

En una variante el procedimiento se lleva a cabo de tal manera que, durante la producción del objeto multicelular tridimensional, se introduce al menos un elemento funcional en el objeto multicelular tridimensional. El elemento funcional se ha elegido a este respecto del grupo compuesto por membranas, canales, poros, sensores, portadores eléctricamente conductores y preparados quimiotácticos. Los canales y poros pueden integrarse por ejemplo en el objeto, por medio de que determinas zonas de la estructura polimerizada formada se dejen al descubierto en varias capas superpuestas.

Las membranas pueden formarse mediante la introducción de moléculas lipídicas en el líquido fotopolimerizable.

Además de esto, con ayuda de la fotopolimerización pueden introducirse también puentes salinos dentro del objeto. Esto es posible de forma especialmente sencilla, si el líquido fotopolimerizable contiene sales, es decir, tiene contenido salino. De esta manera puede realizarse a continuación una desviación y un enervado eléctricos del objeto impreso.

- 5 A través de unos sensores introducidos en el objeto ya durante el proceso de producción, ya no es necesario que posteriormente se manipule el objeto multicelular tridimensional producido, sino que puede seleccionarse directamente a través de los sensores ya introducidos. Esto facilita los análisis subsiguientes del objeto tridimensional.

10 Mediante la introducción de portadores eléctricamente conductores, como por ejemplo electrodos, se hace especialmente sencillo analizar el potencial eléctrico o las características eléctricas del objeto, en el caso de un estudio subsiguiente del objeto multicelular tridimensional formado.

15 Mediante la introducción de preparados quimiotácticos, que en una variante pueden introducirse en diferentes capas y en diferentes concentraciones, para de este modo generar un gradiente, se hace posible el crecimiento específico de células dentro del objeto multicelular tridimensional después de su acabado. Si en el caso del preparado quimiotáctico se trata de un material blando, el mismo ejerce una quimiotaxis positiva, de tal manera que las células del objeto tridimensional pueden orientarse hacia zonas de mayor concentración del material blando. Sin embargo, si en el caso del preparado quimiotáctico se trata de un material de temple, el mismo ejerce una quimiotaxis negativa, de tal manera que las células en el objeto tridimensional se orientan hacia zonas de menor concentración del material de temple o hacia zonas, en las que ni siquiera está presente el material de temple. De este modo puede conseguirse un crecimiento específico de células dentro del objeto multicelular.

20 De forma preferida se emplea al menos un sensor de nivel de llenado, para detectar siempre con precisión la altura del líquido en el recipiente de reacción. Basándose en esta información sobre el nivel de llenado puede determinarse después el plano de enfoque, en el que se pretende llevar a cabo el siguiente paso de polimerización. Los datos proporcionados por un sensor de nivel de llenado de este tipo puede usarse también para adaptar de forma automatizada el plano de enfoque. A través de los datos proporcionados por un sensor de nivel de llenado también puede controlarse una bomba, que facilita la afluencia de los líquidos fotopolimerizables en el recipiente de reacción. De esta manera puede introducirse siempre exactamente una cantidad tal de líquidos fotopolimerizables en el recipiente de reacción, que sea necesaria para la configuración de la capa que se desee en cada caso. De este modo se mantienen pequeñas las cantidades de residuos. Además de esto, de este modo se hace posible una ejecución económica de todo el procedimiento.

30 Como se deduce de la representación anterior del procedimiento descrito anteriormente, este procedimiento puede llevarse a cabo de forma completamente automatizada, de tal manera que no sea necesaria la intervención de un usuario. Esto facilita adicionalmente la aplicación del procedimiento.

35 El periodo de tiempo durante el cual se irradia la radiación luminosa sobre el respectivo plano de enfoque, puede adaptarse a los requisitos respectivos de los líquidos fotopolimerizables empleados. Es decir, a cada material se asigna para el endurecimiento un tiempo que, para la polimerización deseada, sea necesario y conveniente.

40 Si un portador está dispuesto dentro del recipiente de reacción puede producirse, en el caso de que ese portador se eleve con relación al recipiente de reacción, una presión negativa sobre el portador entre un lecho de líquido circundante y las estructuras ya polimerizadas. Sin embargo, puede relajarse una presión negativa que pudiera imperar mediante la absorción de los restos del líquido fotopolimerizable, que se encuentre todavía en el recipiente de reacción para el paso de polimerización anterior, y la introducción de un nuevo líquido fotopolimerizable. De este modo el portador puede moverse con relación al recipiente de reacción, sin que haya que temer un desprendimiento desde el portador de las estructuras ya polimerizadas del objeto tridimensional.

45 Si el objeto tridimensional se produce sobre una placa portadora, esta placa portadora puede extraerse por completo subiéndola desde el líquido que todavía permanezca en el recipiente de reacción, una vez finalizado el proceso de producción. A continuación el usuario puede extraer el objeto producido desde la placa portadora. Para que el objeto no se destruya durante su extracción desde una placa portadora, la placa portadora puede estar conformada de tal manera, que pueda llevarse a cabo un corriente de aire esterilizada entre la superficie de la placa portadora y el lado inferior del objeto multicelular tridimensional. De este modo se extrae entonces el objeto homogéneamente presionándolo hacia fuera de la placa portadora, con lo que se garantiza una extracción cuidadosa del objeto tridimensional desde la placa portadora.

50 La tarea en la que se basa la invención también es resuelta, con las siguientes características, mediante un dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables.

55 Un dispositivo de este tipo presenta un recipiente de reacción y una fuente luminosa, que está dispuesta de tal manera que durante el funcionamiento del dispositivo puede irradiar luz en el recipiente de reacción, en donde esa luz se enfoca sobre un plano de enfoque dentro del recipiente de reacción. El dispositivo presenta además un reservorio para diferentes líquidos fotopolimerizables. Además de esto está prevista una bomba, que puede llevarse a unión por flujo tanto con el reservorio como con el recipiente de reacción. Para ello pueden estar previstas unas válvulas adecuadas

entre la bomba y el reservorio o entre la bomba y el recipiente de reacción. De este modo es posible, mediante la bomba, introducir los diferentes líquidos fotopolimerizables en el recipiente de reacción y evacuarlos del recipiente de reacción. Por último está prevista también una unidad de control para controlar la fuente luminosa y la bomba.

La unidad de control está configurada a este respecto para

- 5 - controlar la fuente luminosa en un primer paso de polimerización, para irradiar luz sobre un primer plano de enfoque, que esté situado dentro de una zona del recipiente de reacción rellena del primer líquido, para producir una primera estructura polimerizable;
- introducir un líquido fotopolimerizable adicional en el recipiente de reacción;
- 10 - controlar la fuente luminosa en un segundo paso de polimerización adicional, de tal manera que la luz se irradie sobre zonas dentro de un plano de enfoque, sobre el que no se haya irradiado luz en el primer paso de polimerización en el mismo plano de enfoque, para producir una estructura polimerizada adicional en una capa adicional, en donde la estructura polimerizada adicional está dispuesta directamente sobre la primera estructura polimerizada producida previamente y está unida a la misma, y en donde se produce más de una estructura polimerizada en la misma capa.

- 15 La función básica los elementos aislados de este dispositivo ya se ha expuesto con relación a las explicaciones sobre el procedimiento descrito anteriormente.

Si el recipiente de reacción es una cavidad de una placa de micro-título, en una variante pueden estar previstos numerosos conductos diferentes, que pueden activarse a través de diferentes válvulas, de tal manera que sea posible un llenado o vaciado simultáneo de los diferentes recipientes de reacción. Además de esto puede estar previsto también un único dispositivo de llenado y aspiración, que pueda moverse hasta las diferentes cavidades de una placa de micro-título.

De forma preferida se producen una alimentación y/o una extracción de líquidos fotopolimerizables desde el recipiente de reacción en una zona próxima al fondo del recipiente de reacción. Esto es debido a que de esta manera puede asegurarse, por un lado, que también se extraen del recipiente de reacción cantidades residuales de un líquido fotopolimerizable a extraer. Además de esto, de esta manera puede garantizarse una alimentación cuidadosa de un nuevo líquido fotopolimerizable en el recipiente de reacción, de tal manera que las estructuras ya polimerizadas no se vean afectadas por el nuevo líquido alimentado.

En una variante, la fuente luminosa está prevista y configurada para emitir luz en diferentes longitudes de onda. A este respecto la longitud de onda de la luz a emitir puede fijarse a través de un usuario o de un programa de control. De esta manera puede obtenerse diferentes longitudes de onda de polimerización, sin que para ello sea necesario emplear diferentes fuentes luminosas.

En una variante está previsto al menos un espejo, para dirigir la primera radiación luminosa y/o la adicional sobre los líquidos fotopolimerizables. De esta manera pueden materializarse todavía más diferentes disposiciones de fuentes luminosas y recipiente de reacción.

35 El dispositivo descrito anteriormente es especialmente adecuado para producir un órgano artificial o un modelo de embarazo, como se ha explicado ya anteriormente en una visión conjunta con los procedimientos allí descritos. A este respecto, el órgano artificial puede ser un modelo de órgano sano o un modelo de enfermedad.

Unas conformaciones preferidas o alternativas del procedimiento aquí descrito pueden transferirse de forma análoga al procedimiento descrito o al uso descrito, y a la inversa. A este respecto están previstas combinaciones a voluntad de las variantes individuales.

40 A continuación se explican con más precisión detalles adicionales de la presente invención, basados en unos ejemplos de realización y a las figuras correspondientes. Aquí muestran:

- la figura 1 un primer ejemplo de realización de un dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables,
- la figura 2 un segundo ejemplo de realización de un dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables, y
- la figura 3 un ejemplo de realización de una variante del procedimiento, en la que se imprime una estructura portadora.

45 La figura 1 muestra la estructura esquemática de una impresora 3D como dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables. La impresora 3D presenta una primera fuente luminosa 1 y una segunda fuente luminosa 2. La luz, que es emitida por la primera fuente luminosa 1, es dirigida a través de una primera lente 3 sobre una pluralidad de recipientes de reacción 4, de los que en la representación de la figura 1 solamente se han mostrado tres. Del mismo modo es dirigida la luz, que es emitida por la segunda fuente

luminosa 2, sobre los recipientes de reacción 4 a través de una segunda lente 5. En lugar de dos fuentes luminosas 1, 2 diferentes podría emplearse también una sola fuente luminosa, en donde la trayectoria de radiación estaría conformada entonces de tal manera, que la luz emitida por esa única fuente luminosa sería dirigida sobre los recipientes de reacción 4, a elección, desde el lado superior de los recipientes de reacción 4 y/o desde el lado inferior de los recipientes de reacción 4.

La primera fuente luminosa 1 y la segunda fuente luminosa 2 pueden emitir luz con diferentes longitudes de onda, en donde la longitud de onda puede regularse automáticamente.

Una pluralidad de diferentes cámaras 6, que contienen respectivamente diferentes líquidos de partida como líquidos fotopolimerizables, forman juntas un reservorio 7 que está unido, a través de un número de conductos 8 correspondiente al número de cámaras 6, a una bomba 9. Mediante la bomba 9 pueden transportarse hasta los recipientes de reacción 4, a través de los conductos 8, los líquidos fotopolimerizables contenidos en las cámaras 6 del reservorio 7. Para ello los recipientes de reacción 4 están conectados a la bomba 9 a través de un sistema de conducción 10 correspondiente. La bomba 9 está conectada además a un contenedor de residuos 11, en el que pueden introducirse los restos de líquido que ya no se necesiten. Esto es debido a que la bomba 9 se usa también para aspirar hacia fuera de los recipientes de reacción 4, a través del sistema de conducción 10, el líquido fotopolimerizables que ya no se necesite y alimentarlo después al contenedor de residuos 11.

Durante el funcionamiento de la impresora 3D mostrada en la figura 1 se transmiten en primer lugar datos sobre un objeto digital 12, producido mediante un programa CAD, a una unidad de control central 13. En esta unidad de control central 13 puede realizarse después una descomposición del objeto digital 12 en diferentes planos, siempre que esto no se haya producido ya mediante las informaciones transmitidas. La unidad de control central 13 se usa después para activar la primera fuente luminosa 1, la segunda fuente luminosa 2 y la bomba 9. Además de esto, la unidad de control central 13 puede mover también la segunda lente 5, en el caso de que lo desee un usuario. A continuación el líquido fotopolimerizable, necesario para la primera capa del objeto multicelular tridimensional y que ya contiene las células a introducir en la primera capa, es aspirado desde las cámaras 6 correspondientes del reservorio 7 mediante la bomba 9 y se transporta, a través del conducto 8 correspondiente y del sistema de conducción 10, hasta los recipientes de reacción 4 individuales. A continuación se enfoca tanto luz procedente de la primera fuente luminosa 1 como luz procedente de la segunda fuente luminosa 2 sobre los recipientes de reacción 4, de tal manera que se realiza una polimerización del líquido fotopolimerizable situado en los recipientes de reacción 4 y la estructura polimerizada formada de este modo se adhiere fijamente al lado interior de los recipientes de reacción 4. A continuación el líquido no polimerizado que todavía queda es aspirado mediante la bomba 9, a través del sistema de conducción, hacia fuera de los recipientes de reacción 4 y se alimenta al contenedor de residuos 11.

A continuación se aspira mediante la bomba 9 desde las cámaras 6 correspondientes del reservorio, de forma correspondiente a los datos prefijados por la unidad de control central 13, un líquido fotopolimerizable adicional y se alimenta de nuevo a los recipientes de reacción 4, a través del conducto 8 correspondiente y del sistema de conducción 10. Ahora la unidad de control central 13 es responsable de que se modifique el plano de enfoque de la luz irradiada sobre los recipientes de reacción. Con esta finalidad la unidad de control central 13 activa un motor 14, que es responsable de un descenso de los recipientes de reacción 4 en una altura, que se corresponde con el grosor de la estructura polimerizada de la primera capa producida en el primer paso. A continuación se produce una irradiación de luz desde la primera fuente luminosa 1, desde arriba, sobre los recipientes de reacción 4, para producir una segunda capa de una estructura polimerizada, que está formada directamente por encima de la primera capa y que está enlazada de forma covalente a la primera capa mediante reacciones químicas.

La segunda fuente luminosa 2 ya no se necesita para este paso, ya que una radiación por ambos lados solo debe llevarse a cabo para la capa más inferior, debido a que esa capa debe adherirse de forma especialmente fija al lado interior de los recipientes de reacción 4. A continuación no se extrae por bomba todavía líquido polimerizado desde los recipientes de reacción 4 y, de forma correspondiente a las especificaciones de la unidad de control central 13, se introduce un líquido polimerizable adicional en los recipientes de reacción 4. Después se bajan de nuevo los recipientes de reacción 4, de tal manera que se modifica el plano de enfoque y puede formarse otra capa. Estos pasos se repiten hasta que se produce el objeto tridimensional deseado.

Como se ha explicado anteriormente, a este respecto pueden llevarse a cabo también varios pasos de polimerización consecutivamente en la misma capa, para generar una capa heterogénea a partir de diferentes estructuras polimerizadas. Además de esto, pueden generarse diferentes capas consecutivas a partir del mismo líquido fotopolimerizable. En un caso así no es necesario aspirar desde los recipientes de reacción 4 el líquido todavía no polimerizado en un primer proceso de polimerización. Más bien los recipientes de reacción 4 pueden simplemente bajarse para modificar el plano de enfoque, de tal manera que después, mediante el uso de los restos del líquido fotopolimerizable que se encuentre todavía en los recipientes de reacción, se genere otra capa de una estructura polimerizada sobre la capa formada anteriormente.

La unidad de control central 13 se usa además para la activación de una unidad de temperado 18, que puede refrigerar y/o calentar los recipientes de reacción 4 o un espacio que circunda los recipientes de reacción 4 y/o el reservorio 7 y/o las cámaras 6 del reservorio 7, para de esta forma hacerse responsable de condiciones reactivas definidas. La unidad de temperado 18 hace posible, de forma especialmente sencilla, el empleo de formador de gel dependientes de la

temperatura y la formación de geles metaestables dependientes de la temperatura.

La figura 2 muestra otra impresora 3D, como ejemplo de realización adicional de un dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables. A este respecto los elementos iguales reciben los mismos símbolos de referencia que en la figura 1, en donde respecto a esto se hace referencia a las explicaciones anteriores en una visión conjunta con la figura 1.

La impresora 3D representada en la figura 2 se diferencia de la impresora 3D representada en la figura 1, en especial en la configuración del recipiente de reacción 4. Esto se debe a que en la impresora 3D representada en la figura 2 está dispuesta una placa portadora 15 dentro del recipiente de reacción 4, que se usa como base para el objeto tridimensional a producir. A este respecto se produce una radiación con luz desde la primera fuente luminosa 1, desde un lado inferior del recipiente de reacción 4. Es decir, el objeto tridimensional a producir se produce con el lado superior hacia abajo dentro del recipiente de reacción 4. En primer lugar se polimeriza por lo tanto la capa más inferior del objeto a producir sobre la placa 15. A continuación se eleva la placa 15 mediante el motor 14, de tal manera que después se genera la siguiente capa sobre la capa que ya está adherida a la placa 15. Es decir, aquí se produce un desplazamiento del plano de enfoque de la luz irradiada en el recipiente de reacción 4, mediante la fuente luminosa 1, mediante una elevación de la placa 15. A este respecto la placa portadora 15 solo se eleva hasta un punto tal, que una capa ya configurada sobre la misma a partir de una estructura polimerizada hace contacto justo con la superficie de un líquido polimerizable 16 situado en el recipiente de reacción 4. Si ahora se irradia la luz desde la fuente luminosa 1 en el recipiente de reacción 4, la capa adicional generada de este modo a partir de una estructura polimerizada se precipita sobre la capa ya generada previamente, de tal manera que puede producirse un enlace covalente entre ambas capas, con lo que el objeto producido en último lugar presenta una elevada estabilidad.

Debido a que en el caso de la impresora 3D de la figura 2 solo está previsto un único recipiente de reacción 4, en el caso del sistema de conducción 10, que conecta la bomba 9 al recipiente de reacción 4, se trata también solamente de un solo conducto.

Para que el objeto producido sobre la placa portadora 15 pueda extraerse bien de la placa portadora 15, está prevista además una fuente de presión neumática 16 esterilizada, que puede llevarse a unión por flujo con la placa portadora 15 a través de un conducto de presión neumática 17. Cuando el objeto tridimensional se ha acabado de producir, puede presionarse a través de la fuente de presión neumática 16 esterilizada aire entre un lado inferior de la placa portadora 15 y la primera capa del objeto producido, de tal manera que el objeto puede extraerse fácilmente de la placa portadora 15.

La unidad de control central 13 se emplea, además de para las funciones ya citadas, tanto en el ejemplo de realización de la figura 1 como en el ejemplo de realización de la figura 2, también para controlar la imagen o el modelo generada(o) por la fuente luminosa, la duración de la iluminación, la altura del recipiente de reacción 4 o del portador 15 dentro del recipiente de reacción 4, el plano de enfoque, la altura de llenado del líquido fotopolimerizable 16 dentro del recipiente de reacción 4, la elección del líquido fotopolimerizable y/o las válvulas previstas en los conductos 8 y en el sistema de conducción 10. De esta manera las impresoras 3D pueden funcionar de forma totalmente automatizada y producir, basándose en unos datos informativos alimentados de forma correspondiente, un objeto tridimensional sin interacción con un usuario.

Como también en el ejemplo de realización de la figura 1, está prevista una unidad de temperado 18. Con relación a esto se hace referencia a las explicaciones anteriores.

En el otro ejemplo de realización explicado a continuación se representa una posible sensibilidad a la temperatura del líquido fotopolimerizable empleado.

Mediante la adición de una sustancia sensible a la temperatura, en especial inversamente sensible a la temperatura, puede mejorarse adicionalmente la producción de objetos suspendidos y cámaras huecas. A este respecto puede añadirse mezclando por ejemplo una sustancia como por ejemplo un poloxámero, en una concentración tal que el líquido fotopolimerizable o un líquido no fotopolimerizable se gelifique en un rango de temperatura deseado, incluso sin radiación luminosa.

A modo de ejemplo el procedimiento puede desarrollarse de la manera siguiente: si se quiere conseguir una gelificación a una temperatura de aprox. 20 °C, se añade mezclando al líquido fotopolimerizable un poloxámero en una concentración, de tal manera que el líquido se gelifique en ese rango. También son posible mezclas a partir de varios poloxámeros. Si es posible, el líquido puede refrigerarse primero hasta una temperatura por debajo del punto de gelificación. Si se desea una estructura suspendida dentro del objeto, el líquido, que contiene el formador de gel sensible a la temperatura, puede calentarse hasta una temperatura que esté situada por encima de la temperatura de gelificación. El líquido se gelifica entonces. En paralelo a ello, el líquido puede también fotopolimerizarse. Si no se quisiera fotopolimerizar una zona del líquido sensible a la temperatura, la misma es sólida a la temperatura que se ha elevado, pero puede fluidificarse de nuevo en cualquier momento con una bajada de la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación. De esta forma la parte gelificada sensible a la temperatura puede funcionar como estructura de apoyo hasta el final del proceso de impresión. Una vez terminada la impresión puede bajarse la temperatura de nuevo por debajo de la temperatura de gelificación a modo de ejemplo, citada anteriormente, de 20 °C. En consecuencia

la parte del líquido no polimerizada, sensible a la temperatura, se fluidiza de nuevo y puede evacuarse por bomba. Si se fluidiza el gel, se extrae la estructura de apoyo y la parte del objeto impreso que antes estaba apoyada, que ahora está fotopolimerizada, cuelga libremente.

- 5 La figura 3 muestra un objeto 19 impreso en un recipiente de reacción 4. El objeto 19 impreso se compone de varias estructuras polimerizadas 20, 21, 22 situadas unas sobre otras que, en la representación de la figura 3, solo se muestran esquemáticamente. La estructura polimerizada más inferior está formada sobre una plataforma 23, que se usa como placa portadora. La plataforma 23 está unida al fondo del recipiente de reacción 4 a través de un pie 24 dispuesto centralmente. Mediante el pie 24 se configura una separación A entre la plataforma 23 y el suelo del recipiente de reacción 4.
- 10 La plataforma 23 y el pie 24 forman juntos un soporte 25, que también puede recibir el nombre de estructura portadora. En la plataforma 23 están configurados unos orificios 26, a través de los cuales pueden fluir líquidos sobre el fondo del recipiente de reacción 4. Los líquidos pueden después aspirarse, de forma especialmente sencilla, a través de un sistema de conducción 10 (véase para ello también las figuras 1 y 2). Además de esto pueden introducirse así fácilmente líquidos frescos en el recipiente de reacción, a través del sistema de conducción 10, y distribuirse bien, ya
- 15 que entonces la estructura polimerizada 20 más inferior no obstaculiza una distribución de líquido.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para producir un objeto multicelular tridimensional, con los pasos siguientes:

- a) introducción de un primer líquido fotopolimerizable en un recipiente de reacción (4),
- 5 b) enfoque de una primera radiación luminosa sobre un primer plano de enfoque, que está situado dentro de una zona del recipiente de reacción (4) rellena del primer líquido,
- c) producción de una primera estructura polimerizada en una primera capa en el recipiente de reacción (4), mediante la primera radiación luminosa,
- 10 d) introducción de un líquido fotopolimerizable adicional en el recipiente de reacción (4), de tal manera que una estructura polimerizada producida anteriormente está cubierta, al menos en parte, con el líquido fotopolimerizable adicional,
- e) enfoque de una radiación luminosa adicional sobre un plano de enfoque adicional, que está situado dentro de una zona del recipiente de reacción (4) relleno del líquido adicional,
- 15 f) producción de una estructura polimerizada adicional en una capa adicional en el recipiente de reacción (4), mediante la radiación luminosa adicional, en donde la estructura polimerizada adicional está dispuesta directamente sobre la estructura polimerizada producida anteriormente y unida a la misma,
- g) repetición de los pasos d) a f) en cada uno de ellos con un líquido fotopolimerizable adicional, hasta que se produce el objeto multicelular tridimensional, en donde el primer líquido fotopolimerizable y/o al menos uno de los líquidos fotopolimerizables adicionales contienen células biológicas,

caracterizado porque se produce más de una estructura polimerizada en la misma capa.

20 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el primer líquido fotopolimerizable y al menos unos de los líquidos fotopolimerizables adicionales son diferentes líquidos.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el líquido fotopolimerizable adicional no se introduce en el recipiente de reacción (4), hasta que no se ha extraído del recipiente de reacción (4) el líquido fotopolimerizable situado previamente en el recipiente de reacción (4).

25 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** está dispuesta una placa portadora (15) en el recipiente de reacción (4), a la que se enlaza la primera estructura polimerizada.

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se lleva a cabo un reenfoque en un sistema óptico (5) que está dispuesto entre una fuente luminosa (2), para generar las radiaciones primera y/o adicional, y el recipiente de reacción (4), para modificar el plano de enfoque dentro del recipiente de reacción (4).

30 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se lleva a cabo un movimiento relativo entre el recipiente de reacción (4) o una placa portadora (15) dispuesta en el recipiente de reacción (4), por un lado, y una fuente luminosa (1, 2) para generar las radiaciones luminosas primera y/o adicional, por otro lado, para modificar el plano de enfoque.

35 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se dirigen las radiaciones luminosas primera y/o adicional hacia una zona definida y predeterminable en el respectivo plano de enfoque, dentro del primer líquido fotopolimerizable y/o del líquido fotopolimerizable adicional.

8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se irradian con la primera radiación luminosa desde dos direcciones diferentes al menos la primera estructura polimerizada en la primera capa,

40 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la primera radiación luminosa y/o la radiación luminosa adicional presentan una longitud de onda en un rango de 200 nm a 1.000 nm

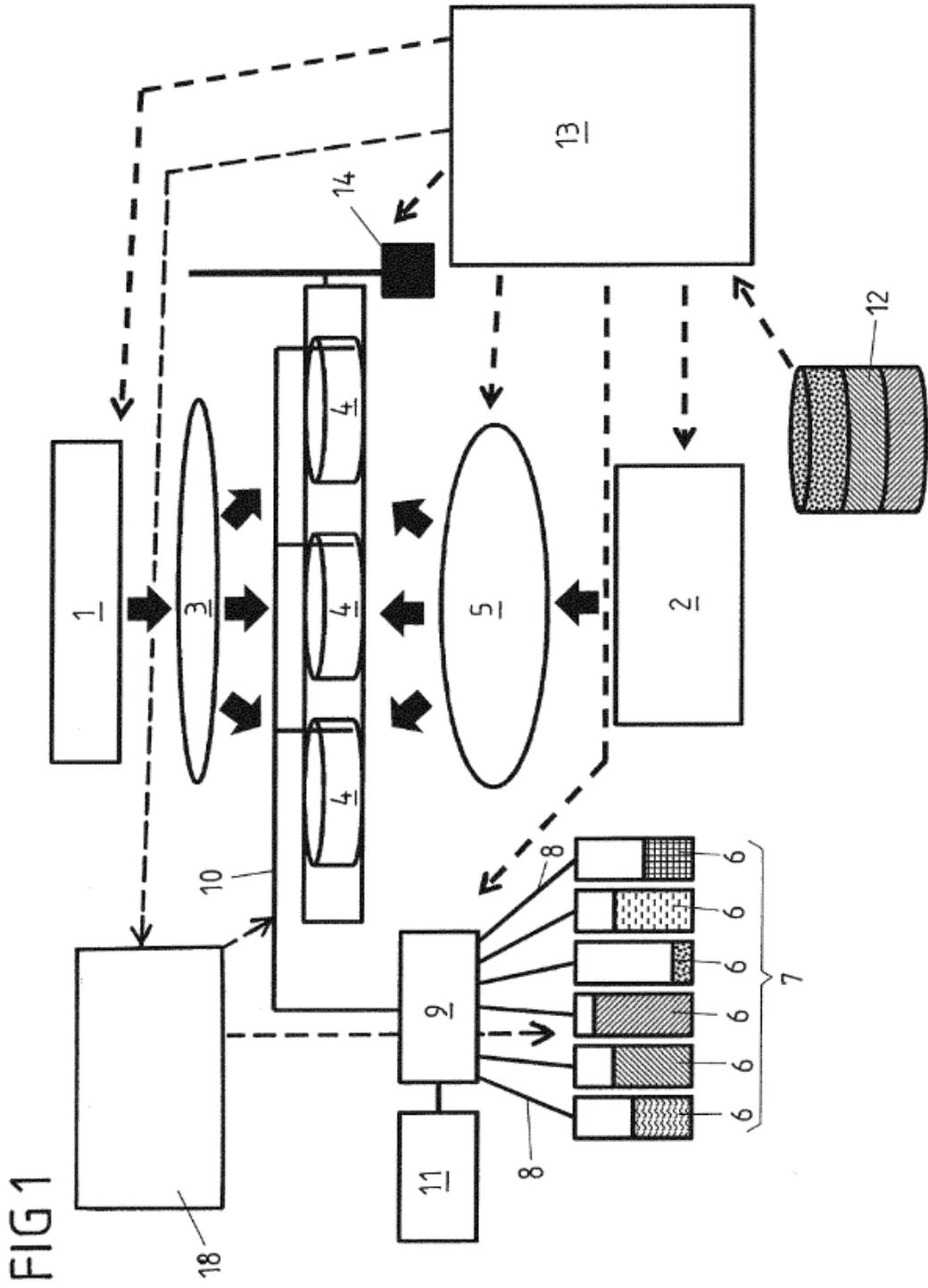
10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la primera radiación luminosa y/o la radiación luminosa adicional presentan una longitud de onda en un rango de 380 nm a 780 nm.

45 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** durante la producción del objeto multicelular tridimensional se integra al menos un elemento en el objeto multicelular tridimensional, que se elige del grupo compuesto por membranas, canales, poros, sensores, portadores eléctricamente conductores y preparados quimiotácticos.

12.- Dispositivo para producir un objeto multicelular tridimensional a partir de unos líquidos fotopolimerizables, con

- un recipiente de reacción (4),

- una fuente luminosa (1, 2), que está dispuesta de tal manera que durante el funcionamiento del dispositivo puede irradiar luz en el recipiente de reacción (4), en un plano de enfoque,
- un reservorio (7) para diferentes líquidos fotopolimerizables,
- 5 • una bomba (9), que puede llevarse a unión por flujo con el reservorio (7) y con el recipiente de reacción (4), para introducir los diferentes líquidos fotopolimerizables en el recipiente de reacción (4) y evacuarlos del recipiente de reacción, y
- una unidad de control (13) para controlar la fuente luminosa (1, 2) y la bomba (9), **caracterizado porque** la unidad de control está configurada para
- 10 - controlar la fuente luminosa en un primer paso de polimerización, para irradiar luz sobre un primer plano de enfoque, que está situado dentro de una zona del recipiente de reacción (4) rellena del primer líquido, para producir una primera estructura polimerizable;
- introducir un líquido fotopolimerizable adicional en el recipiente de reacción (4) mediante la activación de la bomba;
- 15 - controlar la fuente luminosa en un segundo paso de polimerización adicional, de tal manera que la luz se irradie sobre zonas dentro de un plano de enfoque, sobre el que no se ha irradiado luz en el primer paso de polimerización en el mismo plano de enfoque, para producir una estructura polimerizada adicional en una capa adicional, en donde la estructura polimerizada adicional está dispuesta directamente sobre la primera estructura polimerizada producida previamente y está unida a la misma, y en donde se produce más de una estructura polimerizada en la misma capa.
- 20 13.- Dispositivo según la reivindicación 12, **caracterizado porque** la fuente luminosa (1, 2) está prevista y configurada para emitir luz en diferentes longitudes de onda, en donde puede fijarse previamente la longitud de onda de la luz a emitir.
- 14.- Uso de un dispositivo conforme a las reivindicaciones 12 o 13 para producir un órgano artificial o un modelo de embarazo.



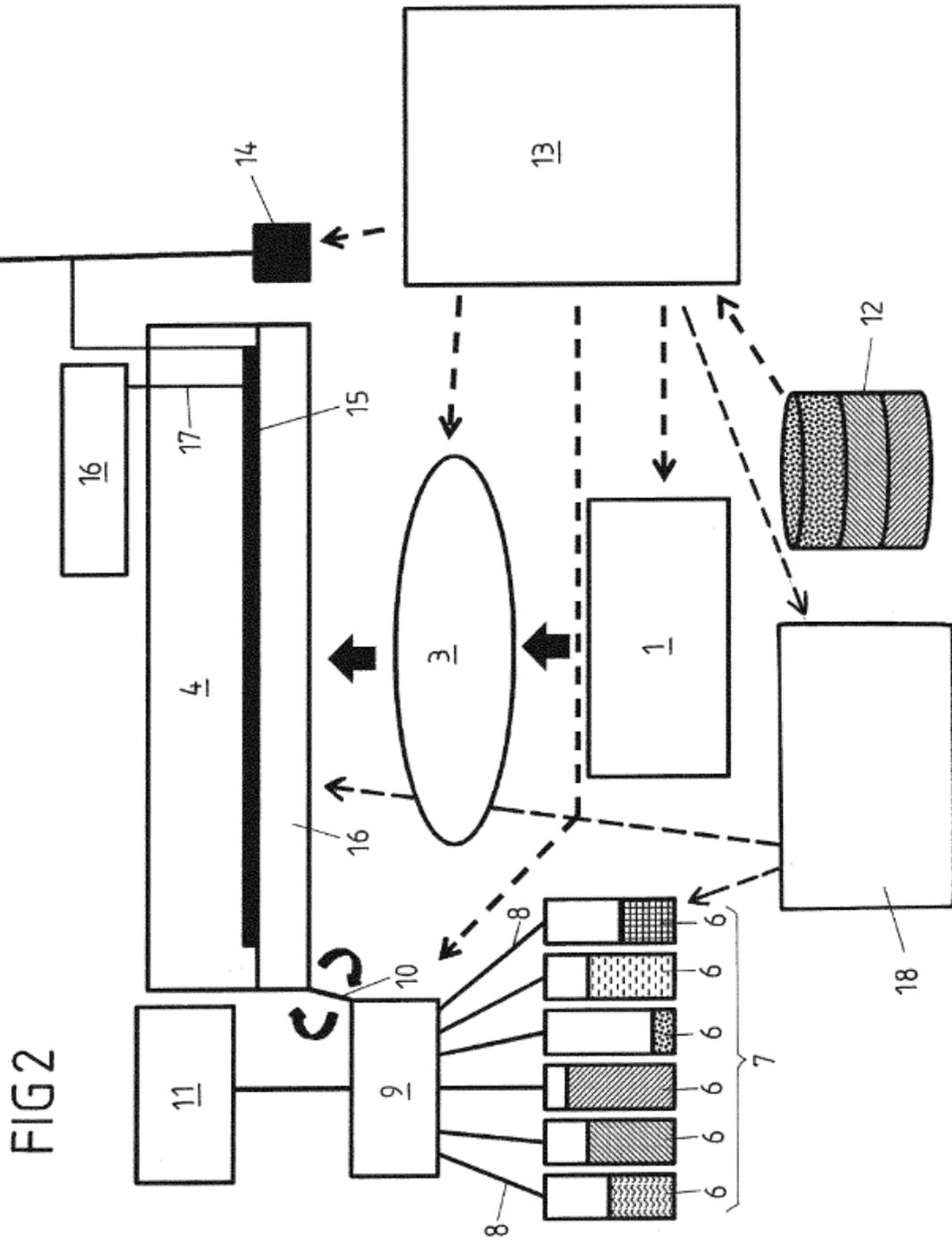


FIG 2

FIG 3

