

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 738**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2004 E 04714728 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1599571**

54 Título: **Pila de bandejas adaptada para gaseado activo**

30 Prioridad:

**28.02.2003 DK 200300321**

**11.08.2003 US 494379 P**

**05.09.2003 DK 200301280**

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

**03.06.2013**

73 Titular/es:

**NUNC A/S (100.0%)  
Kamstrupvej 90 Postbox 280  
4000 Roskilde, DK**

72 Inventor/es:

**JOHANSSON, ARNE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 405 738 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**

Pila de bandejas adaptada para gaseado activo

- 5 La presente invención se refiere a una pila de bandejas comunicantes para el cultivo de células. La pila de bandejas está equipada con un intercambiador de gas que tiene al menos un orificio procesado para la distribución rápida y sustancialmente uniforme del gas a las bandejas.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Los cultivos celulares se usan para la producción de una inmensa diversidad de productos y existen diversos métodos y aparatos para el cultivo de células bacterianas y fúngicas y células de organismos superiores, es decir, células eucariotas.

- 15 Las células eucariotas son útiles para la generación de una amplia gama de productos tales como vacunas virales, tales como, por ejemplo, vacunas de la polio, productos químicos celulares tales como, por ejemplo, interferón e interleucina, productos inmunobiológicos tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, y hormonas tales como, por ejemplo, insulina.

- 20 Las células eucariotas pueden hacerse crecer de dos modos básicamente diferentes. La mayoría de las células eucariotas pueden inducirse de manera que solo se dividan si primero se han podido unir a una superficie o a un sustrato sólido (dependientes de anclaje), aunque algunas pueden inducirse de manera que crezcan libremente en una suspensión (independientes de anclaje).

- 25 Nunc™ está produciendo sistemas de bandejas comunicantes, apiladas, para el cultivo de células, denominadas Factorías Celulares (Cell Factories). Las Factorías Celulares pueden usarse para el cultivo a pequeña o gran escala de células tanto dependientes de anclaje como independientes de anclaje. Son adecuadas para el cultivo de células dependientes de anclaje ya que proporcionan una gran cantidad de superficie de crecimiento en un área pequeña, por lo que son fáciles de manipular y tienen un bajo riesgo de contaminación. Debido a la sencillez de su  
30 construcción y manejabilidad, el sistema de bandejas comunicantes ofrece una alternativa al biorreactor, sustancialmente más complejo y costoso, o a los matraces de rodillo.

- Sin embargo, durante la fase de cultivo y producción, las células consumirán oxígeno y producirán dióxido de carbono, lo que conduce al empobrecimiento de oxígeno y a la acidificación del medio de cultivo. Esto, a su vez,  
35 limitará el crecimiento y la síntesis de producto. Se ha observado que el crecimiento de las células y la producción basada en células se puede mejorar considerablemente si las células se cultivan en una atmósfera constante de una composición definida.

- El simple suministro de gas al sistema de bandejas comunicantes apiladas introduciendo una mezcla definida de gases tiene la desventaja de que, a menos que se aplique un flujo muy elevado, a las bandejas de cultivo individuales no se les proporciona oxígeno de manera uniforme. Dicho flujo elevado puede ser muy difícil de aplicar debido al hecho de que el gas ha de administrarse a las bandejas de cultivo como un gas estéril, es decir, el gas debe atravesar un filtro estéril antes de entrar en el sistema de bandejas. Normalmente, los filtros estériles no pueden soportar dicho flujo elevado, lo que en la práctica significa que no es posible aplicar dicho flujo elevado. Otro  
45 problema que se produce con un caudal elevado de gas es que antes de que el gas entre en el sistema de bandejas, debe humidificarse haciéndose pasar a través de un humidificador. Normalmente, para garantizar una correcta humidificación del gas, existe un límite superior para el tamaño del flujo a través de dicho humidificador. Si el gas se administra al sistema de bandejas sin haberse humidificado, el medio y/o las células que se cultivan en las bandejas se deshidratarán y esto, a su vez, conduce a una condición de cultivo desfavorable.

- 50 El documento EP 0 592 936 describe un método de suministro de un gas definido a un sistema de bandejas comunicantes apiladas, que usa una línea de suministro microporosa fabricada de un material de tipo teflón con diámetros de poro de entre 0,2  $\mu\text{m}$  y 4,0  $\mu\text{m}$ . Los poros en la línea de suministro microporosa son una característica intrínseca del material y la línea de suministro no tiene orificios adicionales procesados. Cuando el sistema se llena con líquido o se vacía, debe usarse una válvula de desviación, dado que el sistema microporoso no tiene la capacidad de compensar la presión rápida, debido al pequeño tamaño de los poros de la línea de suministro microporosa. Si la presión supera un determinado valor crítico, esto puede ser perjudicial para el sistema y éste puede romperse, etc.

- 60 En el documento EP 0 592 936, tan solo se ilustra que el gas se distribuye a la primera bandeja de un dispositivo de bandejas comunicantes apiladas. En otras palabras, el documento EP 0 592 936 no desvela si la distribución del gas a través de una línea de suministro microporosa proporciona una distribución rápida y uniforme de gas a todas las bandejas de un dispositivo.

65

**Sumario de la invención**

5 Por tanto, se necesita un modo para distribuir gas, de forma rápida y uniforme, a un sistema de bandejas comunicantes apiladas, y donde el líquido pueda suministrarse al dispositivo, o drenarse desde el mismo, a un caudal rápido. La invención solo queda limitada por sus reivindicaciones.

10 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, los objetos anteriormente mencionados y otros se consiguen mediante una pila de bandejas para el cultivo de células, que comprende una pluralidad de bandejas y un primer canal de conexión, teniendo cada bandeja una abertura a través de la cual la bandeja se comunica con el primer canal de conexión, teniendo el canal un intercambiador de gas que tiene al menos un orificio procesado para la distribución rápida y sustancialmente uniforme del gas. De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, los objetos anteriormente mencionados y otros se consiguen mediante un método para el cultivo de células en bandejas comunicantes apiladas, comprendiendo el método aplicar una suspensión de células a la pila de bandejas e incubar en condiciones adecuadas la pila de bandejas que contiene la suspensión de células.

15 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, los objetos anteriormente mencionados y otros se consiguen mediante un intercambiador de gas para su uso en la pila de bandejas.

20 *Definiciones*

A lo largo del texto, incluyendo las reivindicaciones, los siguientes términos se definirán como se indica a continuación.

25 La expresión "pila de bandejas" pretende significar una pluralidad de bandejas que están colocadas una encima de otra cuando las bandejas están en posición horizontal.

El término "orificio" pretende significar un orificio que tiene cualquier forma adecuada, tal como circular, rectangular, cuadrada, poligonal, etc.

30 La expresión "orificio procesado" pretende significar un orificio que se ha realizado en el material intercambiador de gas. En otras palabras, el orificio no es una característica intrínseca del material intercambiador de gas.

La expresión "un eje del orificio" pretende describir un eje que pasa a través del orificio y que se extiende de forma perpendicular al plano del orificio.

35 El término "diámetro" es una dimensión característica del orificio y en el presente contexto incluye, por ejemplo, un diámetro de un círculo, una longitud de una ranura, el lado más largo de un polígono, etc.

40 En el presente contexto, la expresión "intercambio de gas" pretende indicar que al menos aproximadamente el 30% del gas presente en el espacio superior se intercambia con gas procedente de un suministro externo. Normalmente se intercambia al menos aproximadamente el 40% tal como, por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 o al menos aproximadamente el 60%.

45 La expresión "espacio superior" pretende significar el espacio cargado con gas existente encima del líquido en las bandejas.

50 La pila de bandejas de acuerdo con la invención puede tener cualquier forma adecuada tal como, por ejemplo, rectangular, cuadrada, redonda, circular, oblonga, elíptica, poligonal o trapezoidal. Normalmente, las bandejas están conectadas mediante dos canales de conexión distintos, un primer y un segundo canal, usándose el segundo canal para suministrar líquido a las bandejas y usándose el primer canal para transportar el aire fuera de las bandejas cuando las bandejas se llenan de líquido para evitar un aumento de presión (véase la Figura 1). El primer y segundo canales de conexión pueden diseñarse de cualquier forma adecuada y pueden colocarse en cualquier sitio adecuado de la pila de bandejas. Con respecto a la presente invención, el primer canal de conexión tiene un intercambiador de gas que se usa para suministrar gas adicionalmente a las bandejas para permitir mejorar las condiciones del cultivo de las células.

60 El intercambiador de gas y/o la pila de bandejas pueden fabricarse de un material que resista la esterilización tal como, por ejemplo, esterilización por irradiación (radiación beta o gamma), esterilización en autoclave con vapor, óxido de etileno, desinfectantes químicos o esterilización con calor seco.

65 En una realización de la invención, el intercambiador de gas y/o la pila de bandejas están hechos de un material termoplástico y/o de un material que puede procesarse por extrusión. Son ejemplos de materiales que son adecuados para su uso en el presente contexto, por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliestireno, policarbonato, poliuretano, polisulfona, polimetilpenteno, polimetilmetacrilato, polietilentereftalato, politetrafluoroetileno o ABS (acrilonitrilobutadieno estireno). Sin embargo, los ejemplos proporcionados en el presente documento solo ilustran materiales adecuados y un experto en la materia sabrá como seleccionar otros materiales adecuados para su uso

como un material intercambiador de gas.

5 En una realización adicional, el intercambiador de gas y/o la pila de bandejas están hechos de un material que resiste la radiación tal como, por ejemplo, la radiación gamma. Después, antes de la esterilización, el intercambiador de gas puede colocarse en el dispositivo de bandejas comunicantes apiladas de acuerdo con la invención, y todo el dispositivo puede esterilizarse conjuntamente, disminuyendo enormemente el riesgo de contaminación. El intercambiador de gas puede estar hecho de cualquier material adecuado que pueda resistir la radiación, tal como, por ejemplo, un material termoplástico.

10 En otra realización de la invención, el intercambiador de gas puede estar hecho de acero inoxidable.

El intercambiador de gas puede moldearse junto con las bandejas comunicantes apiladas en la pila de bandejas o puede colocarse en la pila de bandejas en una etapa distinta.

15 Cuando se trabaja con células o productos celulares potencialmente peligrosos, puede ser deseable esterilizar en autoclave todo el dispositivo después de su uso. En otras palabras, puede ser deseable usar una pila de bandejas hecha de un material que se funda por esterilización en autoclave. En esta situación específica, se prefiere que el dispositivo esté equipado con un intercambiador de gas fabricado a partir de un material que tenga la misma temperatura de fusión o una temperatura de fusión más baja que el resto del dispositivo.

20 El intercambiador de gas puede formar parte de o constituir el primer canal de conexión (es decir, al procesarse junto con la pila de bandejas) o puede insertarse en el primer canal de conexión en una etapa posterior del procesamiento de la pila de bandejas.

25 El intercambiador de gas se construye de tal manera que sea posible impedir un aumento de presión crítica en la pila de bandejas cuando a la pila de bandejas se le suministra líquido o se drena. Además, permite suministrar a las bandejas de la pila de bandejas un gas desde un suministro externo. Por consiguiente, el intercambiador de gas tiene al menos un orificio. Dicho al menos un orificio es un orificio procesado, es decir, no es una característica intrínseca del material intercambiador de gas. El orificio procesado puede tener cualquier forma adecuada (tal como, por ejemplo, circular, redonda, elíptica, oblonga, poligonal, rectangular, cuadrada, trapezoidal, etc.) y puede tener cualquier tamaño adecuado. El número de orificios puede variar a lo largo de un amplio intervalo. Por tanto, en algunas realizaciones, hay un orificio por bandeja (véase la Figura 2), y en otras realizaciones hay un conjunto de orificios (es decir, dos o más orificios) por bandeja (véase, por ejemplo, la Figura 7 del presente documento). En otras realizaciones, hay solo un orificio (o conjunto de orificios) por cada segunda, tercera, etc. bandejas y en una realización adicional más, solo hay un orificio o conjunto de orificios. Las realizaciones específicas mencionadas en el presente documento no deben limitar de ninguna manera la invención, una vez que un experto en la materia ha entendido la idea subyacente de la invención es posible construir intercambiadores de gas que tengan otras posiciones y tamaños de los orificios y dichos intercambiadores de gas también se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

40 En una realización de la invención, el intercambiador de gas tiene una pluralidad de orificios o conjuntos de orificios. Los orificios, o conjuntos de orificios, pueden equiparse al número de bandejas, tal como, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más orificios o conjunto de orificios. Esto ocurre, por ejemplo, cuando el primer canal de conexión constituye el intercambiador de gas.

45 El número de orificios, o de conjuntos de orificios, del intercambiador de gas puede ser mayor, igual o menor que el número de bandejas. En una realización, puede haber uno o más orificios o conjuntos de orificios por bandeja, tal como, por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 siempre que el área total de los orificios permita una distribución uniforme y rápida del gas a través de la pila de bandejas. En otra realización adicional, el intercambiador de gas tiene solo 1 orificio o conjunto de orificios en la 2ª bandeja, en la 3ª bandeja, en la 4ª bandeja, en la 5ª bandeja o en la 6ª bandeja o en bandejas sucesivas. Otras variaciones también se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

55 En una realización adicional de la invención, a lo largo de una dirección longitudinal de la bandeja respectiva se extiende un eje del orificio.

60 El término "longitudinal" se refiere a una pila de bandejas donde las bandejas tienen una forma rectangular, pero las bandejas pueden tener cualquier forma adecuada tal como, por ejemplo, rectangular, cuadrada, redonda, circular, oblonga, elíptica, poligonal o trapezoidal. Por lo tanto, la expresión "extensión longitudinal" pretende significar que el gas se introduce en la bandeja a lo largo de la parte de la bandeja que hace que el gas recorra la trayectoria más larga antes de salir a través del segundo canal de conexión.

65 La invención se refiere a una pila de bandejas, donde el orificio tiene un área que conduce a la creación de un flujo de gas que se desplaza de un modo relativamente rápido al interior de la bandeja respectiva. El orificio puede tener el mismo efecto que una boquilla, creando un flujo de gas que se desplaza de un modo relativamente rápido.

En una realización específica, el intercambiador de gas puede tener un orificio situado en la parte inferior del primer canal de conexión, cuando el dispositivo está colocado en su posición de funcionamiento. El intercambiador de gas puede ser un tubo con el orificio en un extremo y conectado a un suministro de gas por el otro extremo. El orificio puede ser circular y puede tener un diámetro de 1 mm o más tal como, por ejemplo, 2 mm o más, 3 mm o más, 5 mm o más, 8 mm o más, etc. Como se indica en el presente documento, el orificio puede tener cualquier forma y también puede tener forma, por ejemplo, de una ranura.

La expresión "parte inferior" pretende significar la parte de la mitad inferior del canal, cuando el dispositivo está colocado en su posición de funcionamiento en vertical para el cultivo de células. Por ejemplo, el intercambiador de gas puede tener un orificio situado en la parte inferior del primer canal de conexión. Adicionalmente, un eje del orificio puede extenderse hacia la parte inferior del canal. Esta realización es adecuada para usar especialmente en pilas de bandejas que tienen aproximadamente 40 bandejas o menos, tal como, por ejemplo, aproximadamente 35 bandejas o menos, aproximadamente 30 bandejas o menos, aproximadamente 25 bandejas o menos, aproximadamente 20 bandejas o menos, aproximadamente 15 bandejas o menos o aproximadamente 10 bandejas o menos.

Normalmente, una pila de bandejas de acuerdo con la invención tiene más de una bandeja tal como, por ejemplo, al menos 5 bandejas, al menos 10 bandejas, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45 o al menos 50 bandejas.

Como se ha mencionado anteriormente, en determinados casos es una ventaja usar un número limitado de bandejas y por tanto la pila de bandejas contiene a lo sumo 20 bandejas tal como, por ejemplo, a lo sumo 19, a lo sumo 18, a lo sumo 17, a lo sumo 16, a lo sumo 15, a lo sumo 14, a lo sumo 13, a lo sumo 12, a lo sumo 11, a lo sumo 10, a lo sumo 9, a lo sumo 8, a lo sumo 7, a lo sumo 6, a lo sumo 5, a lo sumo 4, a lo sumo 3, o a lo sumo 2 bandejas.

El orificio (u orificios) del intercambiador de gas impide un aumento de presión crítico y permite compensar la presión rápida cuando al dispositivo se le suministra líquido o se drena. A diferencia de lo que ocurre en un sistema microporoso, el tamaño del orificio (u orificios) del intercambiador de gas de la presente invención permite una salida de gas relativamente rápida cuando se suministra líquido al sistema, y una entrada de gas relativamente rápida cuando se drena el líquido del sistema.

El orificio (u orificios) puede estar situado en cualquier posición adecuada del intercambiador de gas. Por tanto, el orificio (u orificios) puede estar situado delante de las aberturas respectivas de las bandejas, puede estar desplazado de las aberturas o el orificio puede estar situado enfrente de las aberturas de las bandejas respectivas. Además, el eje central del orificio puede extenderse hacia el interior de la abertura de las bandejas respectivas en un ángulo específico con respecto a los lados de las bandejas.

En una realización específica, dicho al menos un orificio está situado delante de las aberturas respectivas de las bandejas y/o un eje de dicho al menos un orificio se extiende a lo largo de una dirección longitudinal de la bandeja respectiva.

Normalmente, dicho al menos un orificio de una pila de bandejas de acuerdo con la invención tiene un diámetro de a lo sumo aproximadamente 2,0 mm, tal como, por ejemplo, a lo sumo 1,8 mm, a lo sumo 1,6 mm, a lo sumo aproximadamente 1,5 mm, a lo sumo aproximadamente 1,4 mm, a lo sumo aproximadamente 1,2 mm, a lo sumo aproximadamente 1,0 mm, a lo sumo aproximadamente 0,9 mm, a lo sumo aproximadamente 0,8 mm, a lo sumo aproximadamente 0,7 mm, a lo sumo aproximadamente 0,6 mm, o menor o aproximadamente 0,5 mm.

Debido al hecho de que el orificio (o orificios) puede tener cualquier forma adecuada (redonda, circular, elíptica, oblonga, poligonal, etc.), otra medida del tamaño del orificio es su área. Normalmente, dicho al menos un orificio tiene un área de a lo sumo aproximadamente 3,5 mm<sup>2</sup>, tal como, por ejemplo, a lo sumo aproximadamente 3,2 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 3,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,8 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,5 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,3 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,8 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,6 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,4 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,2 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup> o a lo sumo aproximadamente 0,6 mm<sup>2</sup>.

El gas puede suministrarse al intercambiador de gas desde un suministro de gas externo. El gas usado puede ser aire atmosférico o cualquier gas definido o mezcla de gases con una composición adecuada para el cultivo de las células respectivas. En una realización de la invención, el gas comprende cantidades definidas de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

El gas se distribuye en el espacio superior de las bandejas, poniéndose en contacto directo con el líquido en las bandejas, y el gas tiene que transferirse a través del límite entre la fase gaseosa y la fase líquida. En principio, la fuerza motriz es la diferencia entre la concentración de gas en el líquido en la interfaz y la concentración en la masa del líquido, y el gas se difunde desde el espacio superior de las bandejas al líquido. A temperatura y presión constantes, la concentración de gases en el medio en equilibrio con el espacio superior es proporcional a la presión parcial de los diversos gases en la fase gaseosa.

En principio, puede emplearse cualquier flujo de gas adecuado, pero en los casos – que son relevantes cuando se cultivan células o productos basados en células – en los que el gas tiene que humidificarse y/o esterilizarse antes de entrar en la pila de bandejas, el flujo debe ser menor que un determinado valor crítico. Por lo tanto, en una pila de bandejas de acuerdo con la presente invención, el caudal de gas por bandeja es normalmente a lo sumo de aproximadamente 500 ml/min por bandeja, tal como, por ejemplo, a lo sumo aproximadamente 400 ml/min, a lo sumo aproximadamente 300 ml/min, a lo sumo aproximadamente 250 ml/min o a lo sumo aproximadamente 200 ml/min.

También pueden obtenerse resultados satisfactorios empleando una pila de bandejas de acuerdo con la presente invención, donde el caudal de gas por bandeja sea a lo sumo de aproximadamente 100 ml/min, tal como, a lo sumo aproximadamente 90 ml/min, a lo sumo aproximadamente 85 ml/min, a lo sumo aproximadamente 80 ml/min, a lo sumo aproximadamente 75 ml/min, a lo sumo aproximadamente 70 ml/min, a lo sumo aproximadamente 65 ml/min, a lo sumo aproximadamente 60 ml/min, a lo sumo aproximadamente 55 ml/min o a lo sumo aproximadamente 50 ml/min.

En una realización muy específica, a la pila de bandejas de acuerdo con la invención se la suministra un gas que tiene un caudal de gas por bandeja de 50 ml/min, y dicho al menos un orificio tiene un diámetro de 0,4 mm.

Como se ha mencionado anteriormente, el gas se administra a la pila de bandejas para cambiar el gas contenido en el espacio superior hasta tal punto que las condiciones de cultivo de las células contenidas en las bandejas sean las deseadas. El suministro de gas puede administrarse de manera continua al dispositivo o puede administrarse en impulsos durante determinados periodos de tiempo de ventilación a determinados intervalos de tiempo. Normalmente, no es necesario administrar el gas de manera continua y se administra, por ejemplo, durante un periodo de tiempo de ventilación de a lo sumo aproximadamente 1 h, tal como, a lo sumo aproximadamente 0,75 h, a lo sumo aproximadamente 0,5 h, a lo sumo aproximadamente 0,25 h y/o a lo sumo aproximadamente 0,10 horas. Las condiciones específicas dependen de las células cultivadas, del medio y del tamaño del espacio superior, del flujo, del diseño del intercambiador de gas, etc.

El gas puede administrarse en impulsos con una duración y un caudal que permita el intercambio de al menos el 50% del gas del espacio superior en un periodo de tiempo específico. En una realización, el gas puede administrarse, por ejemplo, a intervalos de tiempo de cada 3 o 2 horas a un caudal de, por ejemplo, 50 ml/min por bandeja durante un periodo de tiempo de ventilación de, por ejemplo, 15 minutos.

Seleccionando un número y áreas de orificios adecuados junto con un caudal correspondiente, normalmente se establece una presión de retorno en algunas de las realizaciones de la invención, lo que permite que el gas se distribuya uniformemente en el intercambiador de gas y por tanto en las bandejas.

En realizaciones específicas, la invención se refiere a una pila de bandejas, donde el caudal de gas por bandeja durante un periodo de tiempo para la ventilación del espacio superior de las bandejas individuales es de 50 ml/min, y dicho al menos un orificio tiene un diámetro de 0,4 mm y/o el intercambiador de gas puede ser un tubo que tiene un orificio por cada bandeja, situándose los orificios a una distancia de aproximadamente 17 mm entre sí.

Es una ventaja de la invención que el flujo de gas proporcionado por el intercambiador de gas no solamente intercambie gas en el espacio superior por encima del líquido en las bandejas, sino que también efectúe una agitación del líquido con lo que se potencia adicionalmente el suministro de oxígeno a las células en el líquido.

En una realización de la invención, el efecto agitador puede utilizarse adicionalmente aumentando el caudal de gas durante un corto periodo de tiempo para efectuar una agitación adicional del líquido. Por tanto, durante un periodo de tiempo de agitación que es típicamente menor que el periodo de tiempo de ventilación, el caudal de gas es al menos mayor, tal como 5 veces mayor, preferentemente aproximadamente 10 veces mayor, etc. que el caudal durante el periodo de tiempo de ventilación, con lo que se agita el líquido en cada una de las bandejas.

La pila de bandejas puede comprender adicionalmente un filtro estéril en la entrada del primer canal de conexión y un colector ramificado con un filtro estéril en la entrada/salida del segundo canal de conexión, facilitando el colector la comunicación con las bandejas, tal como para añadir medio, extraer una muestra, etc. sin tener que manipular los filtros estériles.

Los detalles y particularidades relacionados con el aspecto de la invención anteriormente mencionado (pila de bandejas) se aplican con los cambios que corresponda al resto de aspectos de la invención (intercambiador de gas, método para el cultivo de células etc.).

### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 ilustra esquemáticamente una pila de bandejas comunicantes de la técnica anterior,

Fig. 2 ilustra esquemáticamente una realización de la invención,

- Fig. 2A ilustra esquemáticamente la realización de la Fig. 2 con un colector,  
 Fig. 2B ilustra esquemáticamente un colector de acuerdo con la invención,  
 5 Fig. 3 ilustra esquemáticamente una primera realización de la invención conectada a un suministro de gas,  
 Fig. 4 ilustra esquemáticamente una segunda realización de la invención,  
 Fig. 5 ilustra esquemáticamente una tercera realización de la invención,  
 10 Fig. 6 ilustra esquemáticamente una cuarta realización de la invención,  
 Fig. 7 es una vista en perspectiva de una parte de una realización de la invención,  
 15 Fig. 8 son representaciones del contenido de oxígeno de una de cada tres bandejas para diversas realizaciones y condiciones,  
 Fig. 9 son representaciones del contenido de oxígeno de una de cada tres bandejas para diversas realizaciones y condiciones,  
 20 Fig. 10 ilustra la aireación de una bandeja con un medio tamponado con bicarbonato que comprende rojo de fenol y  
 Fig. 11 ilustra como funciona una pila de bandejas para el cultivo de células de acuerdo con la invención.

25

**Descripción de realizaciones preferidas**

La Figura 1 ilustra esquemáticamente una pila de bandejas 10 de la técnica anterior para el cultivo de células, que comprende una pluralidad de bandejas 12, un primer canal de conexión 14 y un segundo canal de conexión 16.  
 30 Cada bandeja 12 tiene una abertura 18 a través de la cual la bandeja 12 se comunica con el primer canal de conexión 14 para intercambiar aire entre el canal 14 y la bandeja 12 respectiva. De manera similar, cada bandeja 12 tiene una abertura 20 a través de la cual la bandeja 12 se comunica con el segundo canal de conexión 16 para intercambiar aire o líquido entre el segundo canal 16 y la bandeja 12 respectiva. El aire puede ser de entrada o de salida desde el primer canal de conexión 14 a través de un primer puerto 22, y el aire o el líquido puede ser de  
 35 entrada o de salida desde el segundo canal de conexión 16 a través de un segundo puerto 24.

El segundo canal de conexión 16 se usa para suministrar o drenar líquido desde la pila de bandejas 10 y para que salga gas durante el cultivo y cuando se añade gas a la pila de bandejas 10 a través del primer puerto 22.

40 Durante el cultivo de células y la producción basada en células en la pila de bandejas 10 de la técnica anterior ilustrada, las células consumen oxígeno y producen dióxido de carbono. Esto conduce al empobrecimiento de oxígeno y a la acidificación del medio de crecimiento. Esto, a su vez, limitará el crecimiento y la síntesis de productos. Se ha observado que el crecimiento de las células y la producción basada en células pueden mejorarse considerablemente si las células se cultivan en una atmósfera constante de una composición definida.

45 Como se describe con más detalle en la introducción, el simple suministro de gas al sistema de bandejas comunicantes apiladas 10 introduciendo una mezcla definida de gases a través del primer puerto 22 – y sin emplear un flujo relativamente alto – tiene la desventaja de que a las bandejas 12 de cultivo individuales no se les proporciona oxígeno de manera uniforme, lo que conduce a un crecimiento desigual de células y rendimientos reducidos. Además, el gas necesita introducirse a un caudal muy elevado, lo que hace que sea un método muy  
 50 costoso en base a un mal resultado.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente una pila de bandejas 10 de acuerdo con la presente invención para el cultivo de células, que comprende una pluralidad de bandejas 12 y un primer y segundo canales de conexión 14, 16. Cada  
 55 bandeja 12 tiene una abertura 18 a través de la cual la bandeja 12 se comunica con el primer canal de conexión 14 para intercambiar aire entre el primer canal de conexión 14 y la bandeja 12 respectiva. De manera similar, cada bandeja 12 tiene una abertura 20 a través de la cual la bandeja 12 se comunica con el segundo canal de conexión 16 para intercambiar aire o líquido entre el segundo canal de conexión 16 y la bandeja 12 respectiva. El aire puede ser de entrada o de salida desde el primer canal de conexión 14 a través de un primer puerto 22, y el aire o el líquido puede ser de entrada o salida desde el segundo canal de conexión 16 a través de un segundo puerto 24.  
 60

La pila de bandejas 10 de la Figura 2A comprende adicionalmente un intercambiador 26 de gas que tiene al menos un orificio procesado 28 para la distribución rápida y sustancialmente uniforme de gas a las bandejas 12. En la realización ilustrada 10, el intercambiador 26 de gas tiene un orificio 28 por bandeja 12 y cada uno de dichos orificios  
 65 28 se sitúa delante de la abertura de la bandeja, es decir, un eje del orificio 28 y un eje de la abertura 18 respectiva coinciden sustancialmente, con lo que se proporciona una distribución muy rápida y eficaz de gas.

Los orificios 28 del intercambiador 26 de gas y el caudal de gas en el primer puerto 22 cooperan para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme de gas 30 entre las bandejas 12. Además, el gas 30 se distribuye sustancialmente a través de toda la superficie del líquido 32 en las bandejas, y el gas 30 también se transfiere a través del límite 34 entre la fase gaseosa 36 y la fase líquida 32. En principio, la fuerza motriz es la diferencia entre la concentración de gas en el líquido en la interfaz 34 y la concentración en la masa de líquido 32, y el gas 30 se difunde desde el espacio superior 36 de las bandejas 12 al líquido 32. A temperatura y presión constantes, la concentración de gases en el medio 32 en equilibrio con el espacio superior 36 es proporcional a la presión parcial de los diversos gases en la fase gaseosa.

La Figura 2A ilustra esquemáticamente la realización de la Figura 2 con un colector colocado en el segundo puerto 24.

La Figura 2B ilustra esquemáticamente, con más detalle, el colector ramificado colocado en el segundo puerto 24. El primer puerto 22 y el segundo puerto 24 se proporcionan adicionalmente con un filtro estéril FE. Dicha realización permite la entrada o salida adicional de, por ejemplo, medios (adición de más medio y/o retirada de medio o sustitución de medio), muestreo o adición de más material sin tener que manipular el filtro estéril. Por tanto, se reduce el riesgo de contaminación microbiana.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente una instalación que suministra gas a una pila de bandejas 10 de acuerdo con la presente invención durante el cultivo de células. La instalación comprende una fuente de aire 40 presurizado conectado a la pila de bandejas mediante un caudalímetro 42, un calentador 44, un humidificador 46 y un filtro estéril 48 y el primer puerto 22. Otro filtro estéril 50 está conectado al segundo puerto 24. Es importante observar que los filtros estériles 48, 50 así como el humidificador 46 limitan el caudal máximo obtenible y es una ventaja importante de la presente invención que los orificios 28 del intercambiador 26 de gas puedan diseñarse para cooperar con el caudal de gas de entrada para obtener una distribución rápida y uniforme de gas entre las bandejas 12 manteniendo al mismo tiempo el caudal de gas de entrada por debajo del límite permitido por los filtros estériles 48, 50, por ejemplo, un caudal por debajo de 250 ml/min por bandeja.

La Figura 4 ilustra esquemáticamente una realización de la invención donde el intercambiador 26 de gas está constituido por un primer canal de conexión 14. El intercambiador 26 de gas tiene un orificio 28 por bandeja 12.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente una realización de la invención donde el intercambiador 26 de gas es un tubo con un orificio 28 en el extremo del tubo orientado hacia la parte inferior 52 del primer canal de conexión 14.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente una realización de la invención donde el intercambiador 26 de gas es un tubo con un orificio 28 por cada segunda bandeja 12. Otras realizaciones pueden tener un orificio por cada 3ª bandeja, por cada 4ª bandeja, por cada 5ª bandeja o por cada 6ª bandeja.

La Figura 7 es una vista tridimensional en perspectiva de una parte de una pila de bandejas 10 de acuerdo con la invención. La realización ilustrada tiene tres orificios 28 por bandeja 12, y la situación de los orificios 28 es en la parte superior de la bandeja 12 respectiva, lo que permite suministrar gas desde un suministro externo en una dirección G que es perpendicular a la dirección D hacia el segundo canal de conexión 16 (no mostrado). Un eje de cada orificio 28 se extiende hacia el interior de la abertura 18 de la bandeja respectiva a lo largo de la dirección G. En otra realización, el intercambiador de gas tiene al menos un orificio por abertura de bandeja, tal como, por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6.

La Figura 8A ilustra el tiempo de distribución de un gas. La Figura 8B ilustra la distribución de gas a diferentes caudales de gas. La Figura 8C ilustra la distribución de gas cuando se usan diferentes diseños de intercambiador de gas.

La Figura 9A ilustra el tiempo de distribución de un gas. La Figura 9B ilustra la distribución de gas a diferentes caudales de gas. La Figura 9C ilustra la distribución de gas cuando se usan diferentes posiciones de los orificios en el intercambiador de gas, y cuando el dispositivo CF40 contiene líquido.

La Figura 10 muestra la aireación de un medio tamponado con bicarbonato que comprende rojo de fenol. La bandeja se gasea con CO<sub>2</sub> a través de un orificio de 0,4 mm donde el eje central del orificio apunta en la dirección de la flecha.

La Figura 11 ilustra cómo funciona una pila de bandejas para el cultivo de células de acuerdo con la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

*Materiales y métodos*



Se usó un sistema de Cuarenta Bandejas CF40 (Nunc, Roskilde) con un sensor de O<sub>2</sub> (Fiber-Optic Oxygen Minisensor de PreSens Precision Sensing GmbH, Alemania) instalado en una de cada tres bandejas en el lado de la bandeja opuesto a los canales de conexión. El CF40 tiene un volumen de aproximadamente 3,6 l.

- 5 El CF40 inicialmente lleno de aire atmosférico se gaseó con N<sub>2</sub> en las condiciones mencionadas más adelante y se determinó el porcentaje relativo de oxígeno en el gas presente en las bandejas después de gasear con N<sub>2</sub> durante 15 min, 30 min, 45 min y/o 60 min usando un Oxígenoómetro FIBOX de PreSens Precision Sensing GmbH, Alemania.

10 El experimento 1A ilustra el tiempo de distribución de un gas en el sistema CF40. En el experimento se usa un intercambiador de gas con 40 orificios circulares procesados que tienen un diámetro de 0,4 mm y donde el eje central de cada orificio se extiende hacia el interior del orificio de la bandeja respectiva en un ángulo de 45° con respecto a los lados de las bandejas. El caudal del N<sub>2</sub> proporcionado es de 1,3 Umin y los porcentajes de oxígeno se determinan después de gasear con N<sub>2</sub> durante 15 min, 30 min, 45 min y 60 min.

15 El experimento 1B ilustra la distribución de gas a diferentes caudales de gas. En el experimento se usa un intercambiador de gas colocado como se describe en el Ejemplo 1A, y caudales de gas de 0,3 Umin, 1,3 Umin y 2,7 l/min. El porcentaje de oxígeno se determina después de gasear durante 30 min y 60 min.

20 El experimento 1C ilustra la distribución de gas en las bandejas del sistema CF40 cuando se usan diferentes diseños de intercambiador de gas: 1) un intercambiador de gas en forma de un tubo abierto en ambos extremos, donde un extremo está situado en la parte inferior del canal ("tubo inferior"), 2) un intercambiador de gas en forma de un tubo con 40 orificios circulares procesados y donde cada orificio (diámetro externo de 0,4 mm) está situado de tal manera que el eje central del orificio se extiende hacia el interior del orificio de la bandeja respectiva en un ángulo de 45° con respecto a los lados de las bandejas ("acanaladura directa"), y 3) un intercambiador de gas en forma de un tubo con 25 40 orificios circulares procesados (diámetro interno de 0,4 mm), donde los orificios están situados enfrente de las aberturas de las bandeja respectivas, es decir, de tal manera que el gas fluye a través de los orificios y sale al interior del canal de conexión en dirección opuesta a las aberturas de las bandejas respectivas ("acanaladura indirecta"). El caudal de gas era de de 1,3 Umin y el porcentaje relativo de oxígeno se determinó después de gasear con N<sub>2</sub> durante 60 min.

30 *Resultados y análisis*

Los resultados mostrados en la Figura 8A muestran que después de gasear con N<sub>2</sub> durante 60 minutos, el gas se distribuye uniformemente a las bandejas 7 a 37.

35 El resultado mostrado en la Figura 8B refuerza este hallazgo. Esta figura muestra que a un caudal de 0,3 Umin, el aire en la mitad inferior del CF40 no se ha intercambiado incluso después de 60 minutos, mientras que un caudal de 1,3 Umin proporciona un intercambio de aire claramente mejor ya que aproximadamente el 80% del aire en el CF40 se ha intercambiado después de 60 minutos, pero aún no es suficiente para obtener un intercambio de gas uniforme en el CF40 durante este periodo. A un caudal de 2,7 Umin, aproximadamente el 90% del gas en el CF40 se ha intercambiado después de 30 minutos. Por lo tanto, parece ser que la tasa de intercambio del contenido de aire total de aproximadamente 36 l en el CF40 puede ser más del doble a un caudal de 2,7 Umin en comparación con 1,3 Umin.

45 La Figura 8C muestra la correlación entre la distribución de gas y el diseño del intercambiador de gas. Usando un tubo con un gran orificio situado en la parte inferior del primer canal de conexión, aproximadamente el 60% del aire se intercambia con N<sub>2</sub> en las bandejas en la mitad superior del CF40 después de 60 minutos. Usando un tubo con 40 orificios circulares procesados, donde los orificios están situados enfrente de las aberturas de las bandejas respectivas, es decir, de tal manera que el gas fluya a través de los orificios y salga al interior del canal de conexión 50 en dirección opuesta a los orificios de las bandejas respectivas, se obtiene un intercambio de gas del 95% al 30%, la cantidad de gas intercambiada disminuye casi proporcionalmente al número de bandejas.

Los resultados de la Figura 8C muestran que la distribución de gas en el sistema CF40 también puede mejorarse considerablemente usando un intercambiador de gas en forma de un tubo donde los orificios están situados enfrente 55 de las aberturas de las bandejas respectivas, es decir, de tal manera que el gas fluya a través de los orificios y salga al interior del canal de conexión en la dirección opuesta a los orificios de las bandejas respectivas ("acanaladura indirecta") o solo mediante un tubo con un gran orificio que alcanza la parte inferior del CF ("tubo inferior"), en comparación con suministrar solo gas al canal de conexión del CF40, sin el uso de un intercambiador de gas. Los resultados también muestran que el intercambiador de gas de "tubo inferior" funciona mejor en un sistema con 60 menos de 25 bandejas.

## Ejemplo 2

*Materiales y métodos*

- 5 Se usó un sistema de Cuarenta Bandejas CF40 (Nunc, Roskilde) con un sensor de O<sub>2</sub> (véase el Ejemplo 1) instalado en una de cada tres bandejas en el lado de la bandeja opuesto a los canales de conexión. El electrodo de O<sub>2</sub> está situado en el espacio superior por encima del líquido, cuando se aplican 8 l de líquido al dispositivo. El CF40 tiene un volumen de aproximadamente 36 l.
- 10 El CF40 inicialmente lleno de aire atmosférico o lleno de aire atmosférico + de 8 l de líquido se gaseó con N<sub>2</sub> en las condiciones mencionadas más adelante y se determinó el porcentaje relativo de oxígeno en el gas presente en las bandejas después de gasear con N<sub>2</sub> durante 5 min, 20 min, 30 min y/o 60 min usando el mismo aparato que en el Ejemplo 1.
- 15 El experimento 2A ilustra el tiempo de distribución de gas en el dispositivo CF40. En el experimento se usa un intercambiador de gas con 40 orificios circulares procesados (diámetro interno de 0,4 mm), donde el eje central de cada orificio se extiende a lo largo de una extensión longitudinal de la bandeja respectiva como se ilustra en la Figura 7 (excepto porque solo hay un orificio por bandeja). El caudal de N<sub>2</sub> suministrado es de 2,7 Umin y el porcentaje relativo de oxígeno se determina después de gasear con N<sub>2</sub> durante 5 min, 20 min y 30 min.
- 20 El experimento 2B ilustra la distribución de gas a diferentes caudales de gas. En el experimento se usa un intercambiador de gas colocado como se describe en el Experimento 2A, y caudales de gas de 1,0 Umin, 2,7 l/min y 8,7 Umin. El porcentaje de oxígeno se determina después de gasear durante 5 min, 30 min y 60 min.
- 25 El experimento 2C ilustra la distribución de gas en el dispositivo CF40 cuando se usan diferentes posiciones de los orificios en el intercambiador de gas, y cuando el dispositivo CF40 contiene líquido. Adicionalmente, el CF40 se ha equipado con filtros bacterianos (que permiten un caudal mínimo de 2 Umin) y un humidificador para estimular las condiciones de cultivo. En el experimento se usa un intercambiador de gas como se describe en las Figuras 2A y 2B (“acanaladura directa”) sin líquido en el dispositivo y con 8 l de líquido en el dispositivo (“acanaladura directa con 8 l de líquido”), y un intercambiador de gas donde los orificios están desplazados 2 mm con respecto a la abertura de la bandeja (“acanaladura desplazada 2 mm”). El caudal de gas fue de 2,7 l/min y el porcentaje relativo de oxígeno se determinó después de gasear con N<sub>2</sub> durante 30 min.
- 30

*Resultados y análisis*

- 35 La Figura 9A muestra que, a un caudal de N<sub>2</sub> de 2,7 Umin, el gas se distribuye uniformemente entre las 40 bandejas en el dispositivo de bandejas comunicantes apiladas. La figura también muestra que el 90% del aire en el dispositivo se intercambia con N<sub>2</sub> en 30 minutos.
- 40 La Figura 9B muestra que el periodo de tiempo de ventilación para obtener una distribución uniforme de gas en las bandejas en un dispositivo de 40 bandejas depende del caudal de gas suministrado al intercambiador de gas. A un caudal de 1 l/min se tarda al menos 60 minutos antes de que se haya intercambiado en las bandejas entre el 70% y el 85% del gas, es decir el gas no se distribuye uniformemente en las bandejas. A un caudal de 2,7 Umin el 90% del gas se intercambia en 30 minutos, mientras que un flujo de gas de 8,7 conduce a un intercambio de
- 45 aproximadamente el 70% de gas en 5 minutos. Por tanto, el caudal de un gas suministrado a un intercambiador de gas de un dispositivo CF40 debe ser al menos de 2 Umin o de 50 ml/min por bandeja.
- La Figura 9C muestra que la adición de un humidificador y un filtro bacteriano al dispositivo CF40 sigue proporcionando un intercambio de gas uniforme donde aproximadamente el 80% del gas se reemplaza por N<sub>2</sub> después de 30 minutos. Adicionalmente, a un caudal de 2,7 Umin un desplazamiento de los orificios en el intercambiador de gas en relación con las aberturas de bandeja solo tiene una mínima influencia sobre la uniformidad de la distribución de gas. La figura también ilustra una simulación de intercambio de gas en condiciones de cultivo, donde se añaden 8 litros de líquido a la bandeja.
- 50
- 55 La adición de líquido no tiene un impacto significativo sobre la velocidad o uniformidad del intercambio de gas, pero se espera que cuanto mayor sea la cantidad de líquido en las bandejas menor será la cantidad de aire y, por consiguiente, más rápido será el intercambio de gas.
- 60 Como se muestra en las Figuras 8C y 9C, la distribución de gas en una pila de bandejas de acuerdo con la invención puede mejorar considerablemente, aunque el orificio esté situado de tal manera que el gas fluye a través del orificio en cuestión y sale al interior del canal de conexión a una distancia desde el orificio correspondiente de la bandeja respectiva, por ejemplo, el flujo de gas que sale del orificio tiene lugar en dirección opuesta a la abertura de la bandeja (Fig. 8C) o se aleja de la abertura de la bandeja, o, el orificio está desplazado, por ejemplo, 2 mm con respecto a la abertura de la bandeja (Fig. 9C).
- 65

Ejemplo 3

*Materiales y métodos*

- 5 Se usó un dispositivo de Bandejas CF1 (Nunc, Roskilde) con un tubo con un orificio circular procesado de 0,4 mm, donde el eje central del orificio apunta en la dirección de la flecha. La bandeja contenía 200 ml de un medio tamponado con bicarbonato que comprendía rojo de fenol como un indicador de pH.
- 10 La bandeja se gaseó con CO<sub>2</sub> a un caudal de 50 ml/min, y se tomaron fotografías cada minuto durante 7 minutos después de comenzar el gaseado para ilustrar la aireación del medio en la bandeja.

*Resultados y análisis*

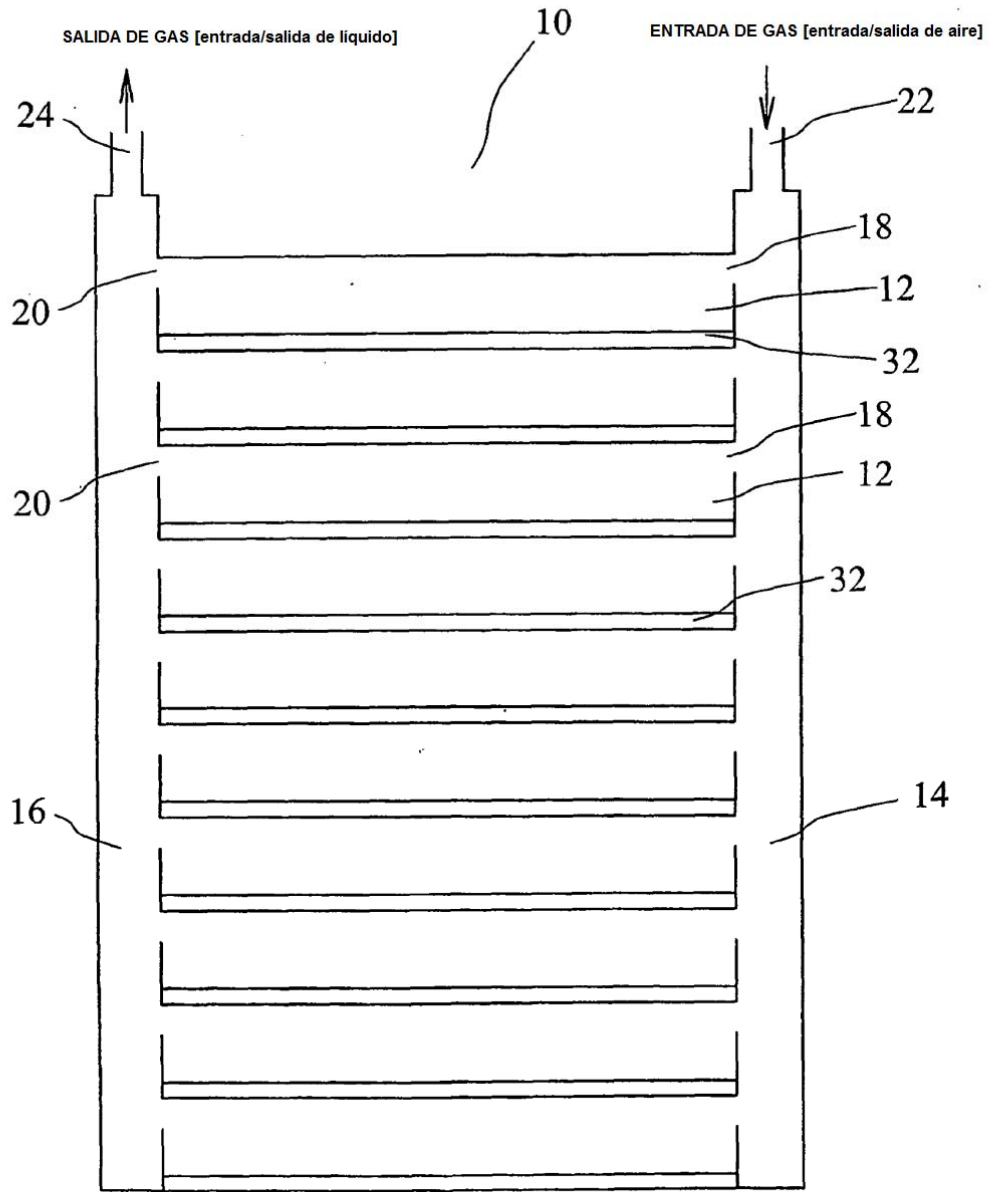
- 15 La Figura 10 muestra la aireación del medio con CO<sub>2</sub> y por tanto la distribución del gas en la bandeja, lo cual también puede deducirse a partir de la figura. Primero se airea el medio a lo largo de los lados de la bandeja, es decir, la corriente de gas se desplaza desde el orificio a lo largo de los lados de la bandeja alrededor de todos los lados de las bandejas desde el intercambiador de gas en el primer canal de conexión al segundo canal de conexión. Este movimiento del gas se refleja en los cambios de color del medio.
- 20 A partir de la figura también se observa que el suministro de gas conduce a una distribución uniforme en un corto periodo de tiempo de ventilación producido por un intercambio de gas eficaz en el espacio superior por encima del líquido en las bandejas y agitando el líquido mediante el flujo de gas.

**REIVINDICACIONES**

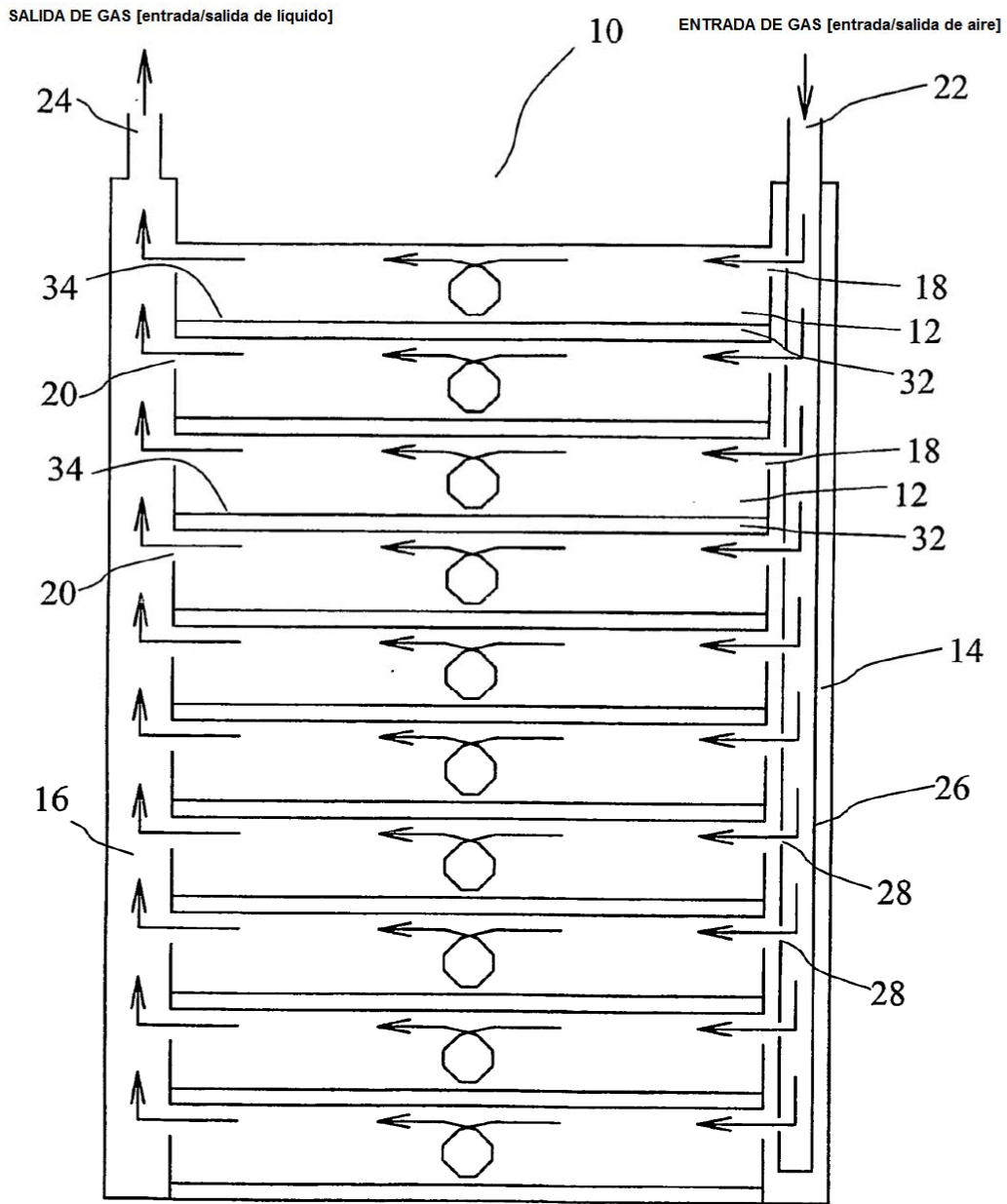
1. Una pila (10) de bandejas para el cultivo de células en un líquido, que comprende una pluralidad de bandejas (12) colocadas una encima de otra cuando las bandejas están en posición horizontal, estando el líquido en contacto directo con el gas presente en las bandejas y  
 5 un primer canal de conexión (14), teniendo cada bandeja una abertura a través de la cual la bandeja se comunica con el primer canal de conexión, teniendo el canal un intercambiador (26) de gas que tiene al menos un orificio (28) procesado para la distribución rápida y sustancialmente uniforme de gas a las bandejas, teniendo dicho al menos un orificio procesado un diámetro de 0,4 mm a 2,0 mm.
- 10 2. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 1, donde la pila de bandejas está fabricada de un material que soporta la esterilización.
3. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 2, donde el material se selecciona de un material termoplástico.  
 15 4. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 2, donde el material puede esterilizarse por irradiación.
5. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 2, donde el material se funde por esterilización en autoclave.  
 20 6. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 3, donde el material se selecciona del grupo que consiste en polietileno, polipropileno, poliestireno, policarbonato, poliuretano, polisulfona, polimetilpenteno, polimetilmetacrilato, polietilentereftalato, politetrafluoroetileno y ABS (acrilonitrilobutadieno estireno).
- 25 7. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el intercambiador de gas tiene una pluralidad de orificios.
8. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el número de orificios del intercambiador de gas es igual al número de bandejas.  
 30 9. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un orificio está situado enfrente de las aberturas respectivas de las bandejas.
10. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 9, donde un eje dicho al menos un orificio se extiende a lo largo de una dirección longitudinal de la bandeja respectiva.  
 35 11. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada orificio de dicho al menos un orificio tiene un área que conduce a la creación de un flujo de gas que se desplaza de un modo relativamente rápido en la bandeja respectiva.
- 40 12. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho al menos un orificio tiene un área de a lo sumo aproximadamente 3,5 mm<sup>2</sup>, tal como, por ejemplo, a lo sumo aproximadamente 3,2 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 3,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,8 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,5 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,3 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 2,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,8 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,6 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,4 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,2 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 1,0 mm<sup>2</sup>, a lo sumo aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup> o a lo sumo aproximadamente 0,6 mm<sup>2</sup>.  
 45 13. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la pila de bandejas contiene al menos 10 bandejas.
- 50 14. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la pila de bandejas contiene al menos 15 bandejas.
- 55 15. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la pila de bandejas contiene al menos 20 bandejas.
16. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el intercambiador de gas tiene un orificio situado en la parte inferior del primer canal de conexión, donde la pila de bandejas está colocada en su posición de funcionamiento.  
 60 17. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 16, donde el intercambiador de gas tiene un orificio situado en la parte inferior del primer canal de conexión.

## ES 2 405 738 T3

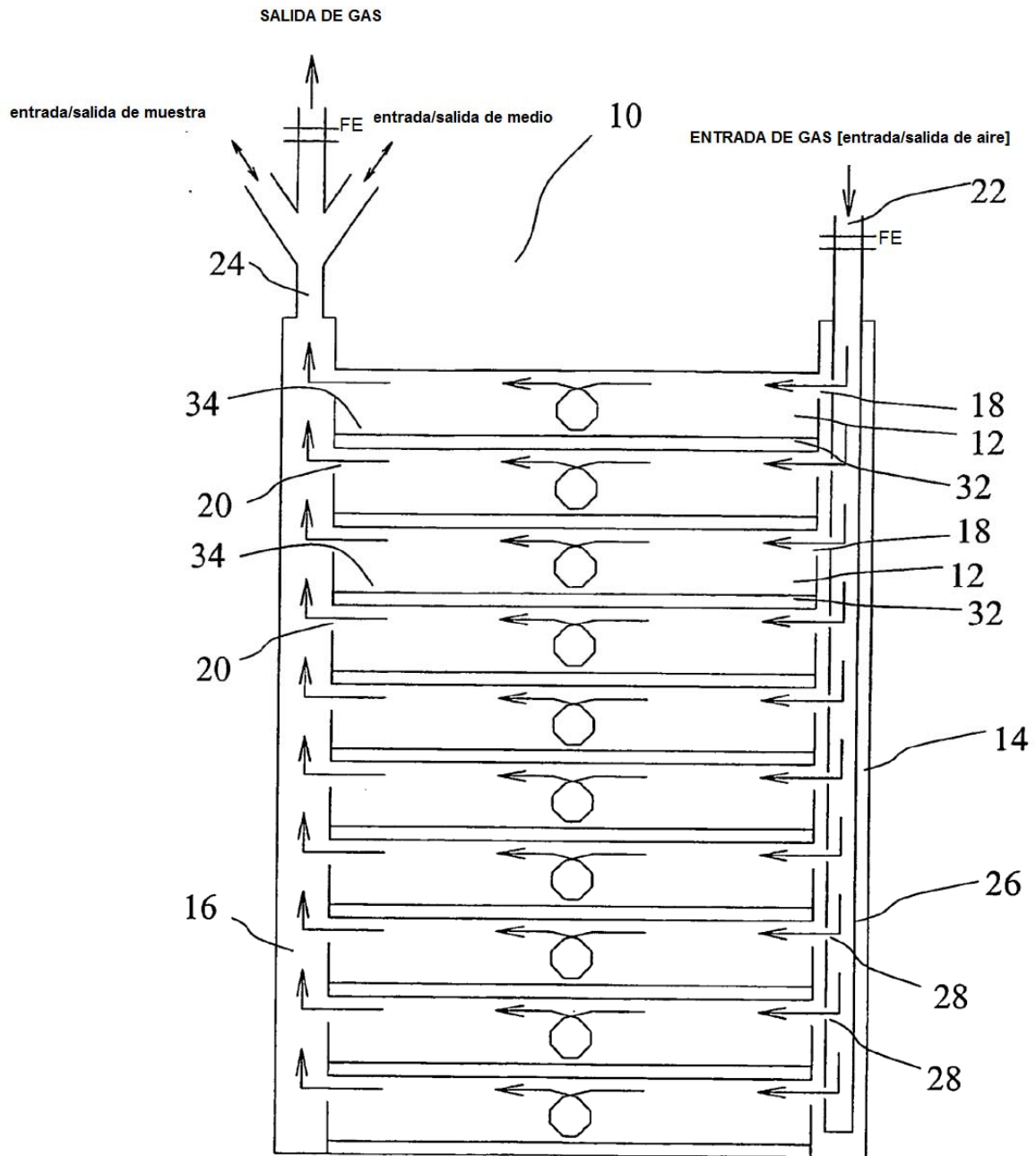
18. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 16, donde un eje del orificio es sustancialmente paralelo a la dirección longitudinal del primer canal de conexión.
- 5 19. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde la pila de bandejas contiene a lo sumo 15 bandejas.
20. Una pila de bandejas de acuerdo con la reivindicación 19, donde la pila de bandejas contiene a lo sumo 10 bandejas.
- 10 21. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada bandeja tiene adicionalmente una abertura a través de la cual la bandeja se comunica con un segundo canal de conexión para el intercambio de fluido entre el segundo canal de conexión y la bandeja respectiva, comprendiendo la pila de bandejas adicionalmente un filtro estéril en la entrada al primer canal de conexión y un colector ramificado con un filtro estéril en la entrada/salida del segundo canal de conexión facilitando la comunicación con las bandejas sin tener que manipular el filtro estéril.
- 15 22. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el intercambiador de gas tiene forma de un tubo que tiene un orificio por cada bandeja, situándose los orificios a la misma distancia entre sí.
- 20 23. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el intercambiador de gas tiene forma de un tubo que tiene un orificio por cada bandeja, situándose los orificios a una distancia de aproximadamente 17 mm entre sí.
- 25 24. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el orificio tiene un diámetro de 0,4 mm.
- 30 25. Una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde el intercambiador de gas está fabricado de acero inoxidable.
- 35 26. Un método para cultivar células en bandejas comunicantes apiladas, comprendiendo el método aplicar una suspensión de células en una pila de bandejas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores e incubar en condiciones adecuadas la pila de bandejas que contiene la suspensión de células.
- 40 27. Un método de acuerdo con la reivindicación 26, donde al intercambiador de gas se le administra gas desde un suministro de gas externo a periodos de tiempo de ventilación frecuentes a un caudal de 50 ml/min por bandeja en un periodo de tiempo de ventilación de al menos aproximadamente 5 minutos.
- 45 28. Un método de acuerdo con la reivindicación 27, donde el periodo de tiempo frecuente es cada hora o cada 2 horas y el suministro de gas externo se administra durante un periodo de tiempo de al menos 10 minutos, tal como, por ejemplo, aproximadamente 15 minutos.
29. Un método de acuerdo con la reivindicación 28, donde el gas procedente del suministro de gas externo se administra continuamente al intercambiador de gas a un caudal de a lo sumo 500 ml/min por bandeja.



**Fig. 1**

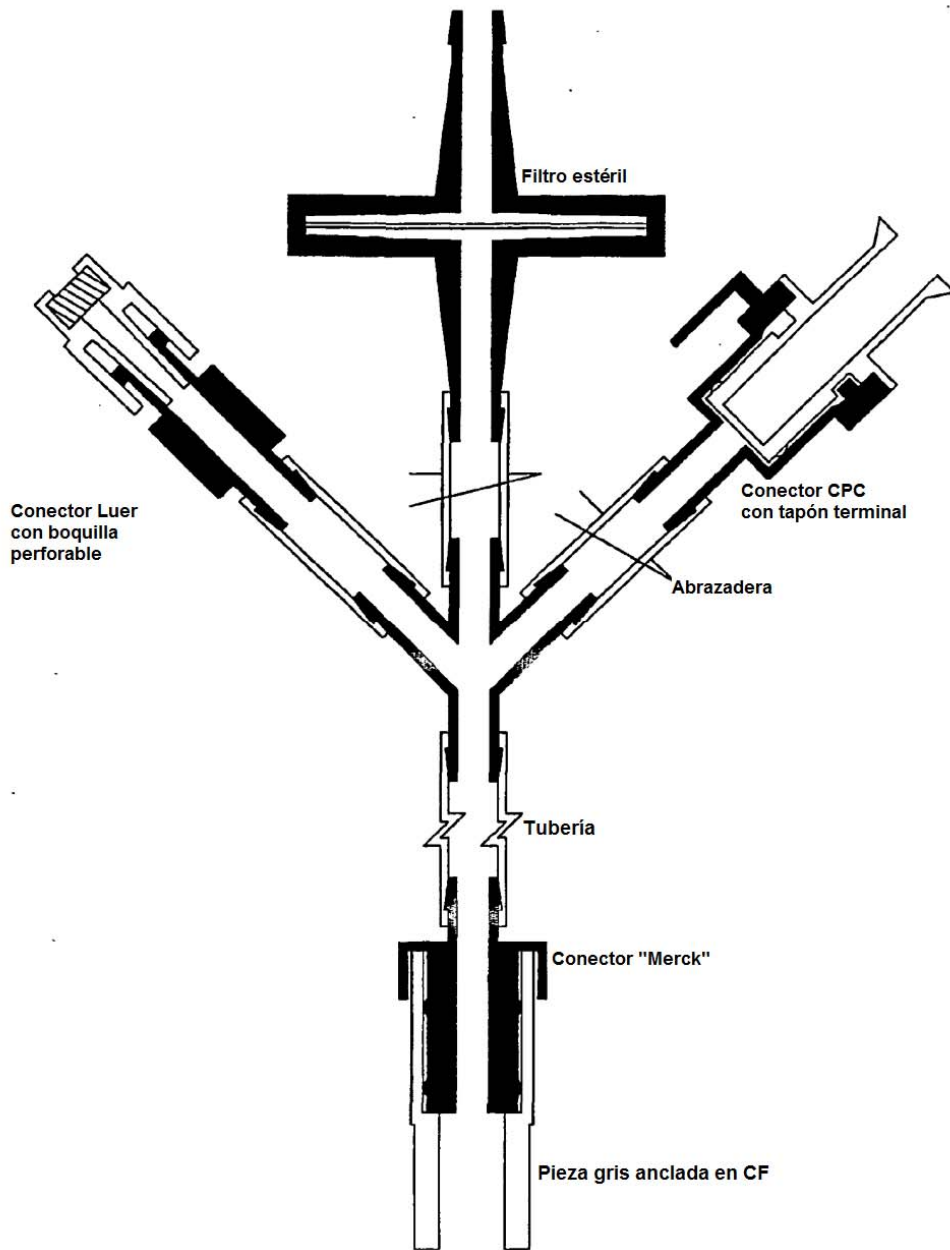


**Fig. 2**

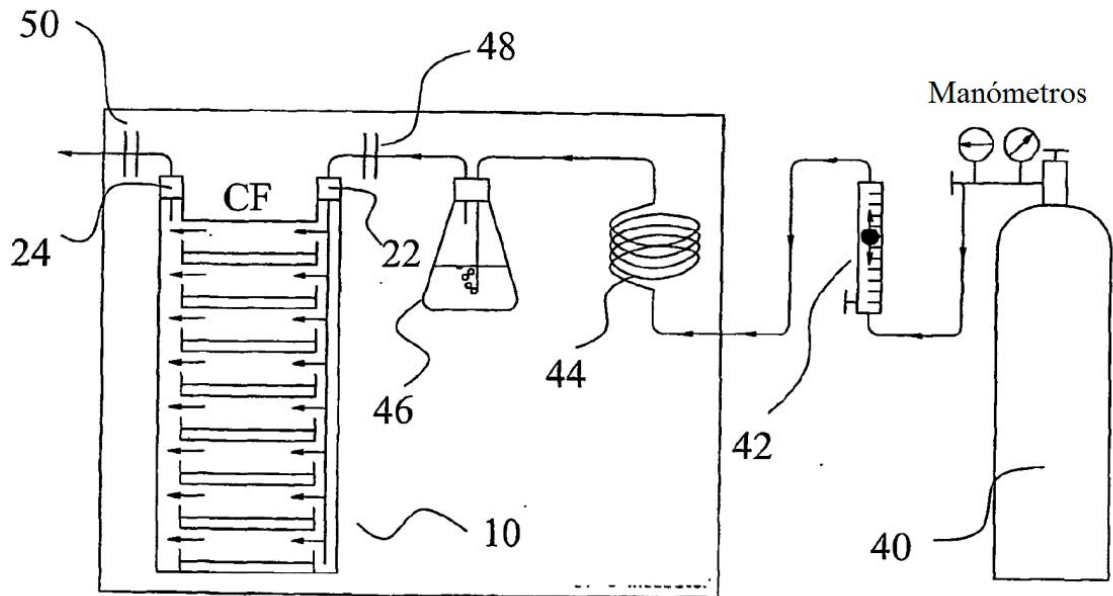


**Fig. 2A**

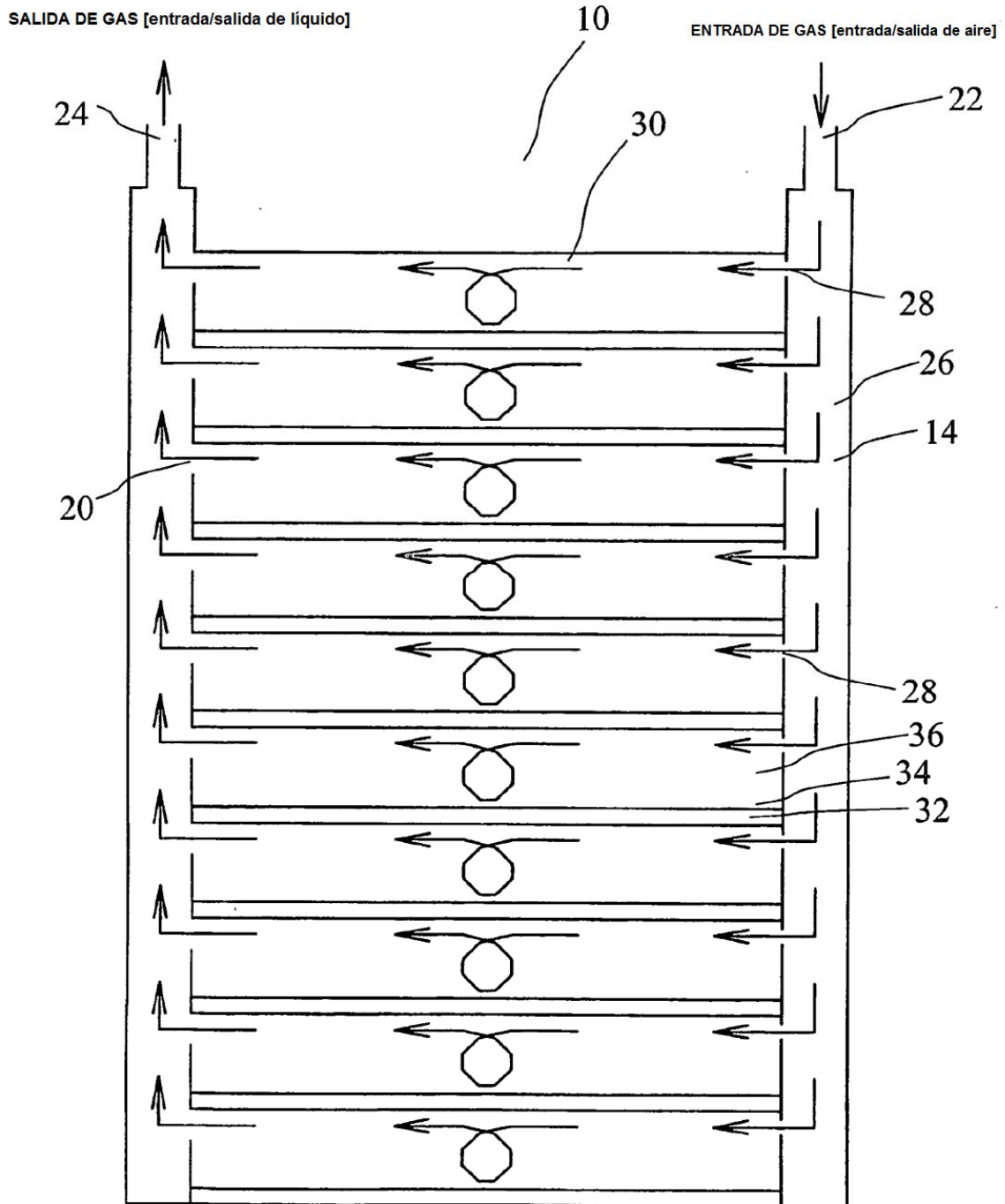




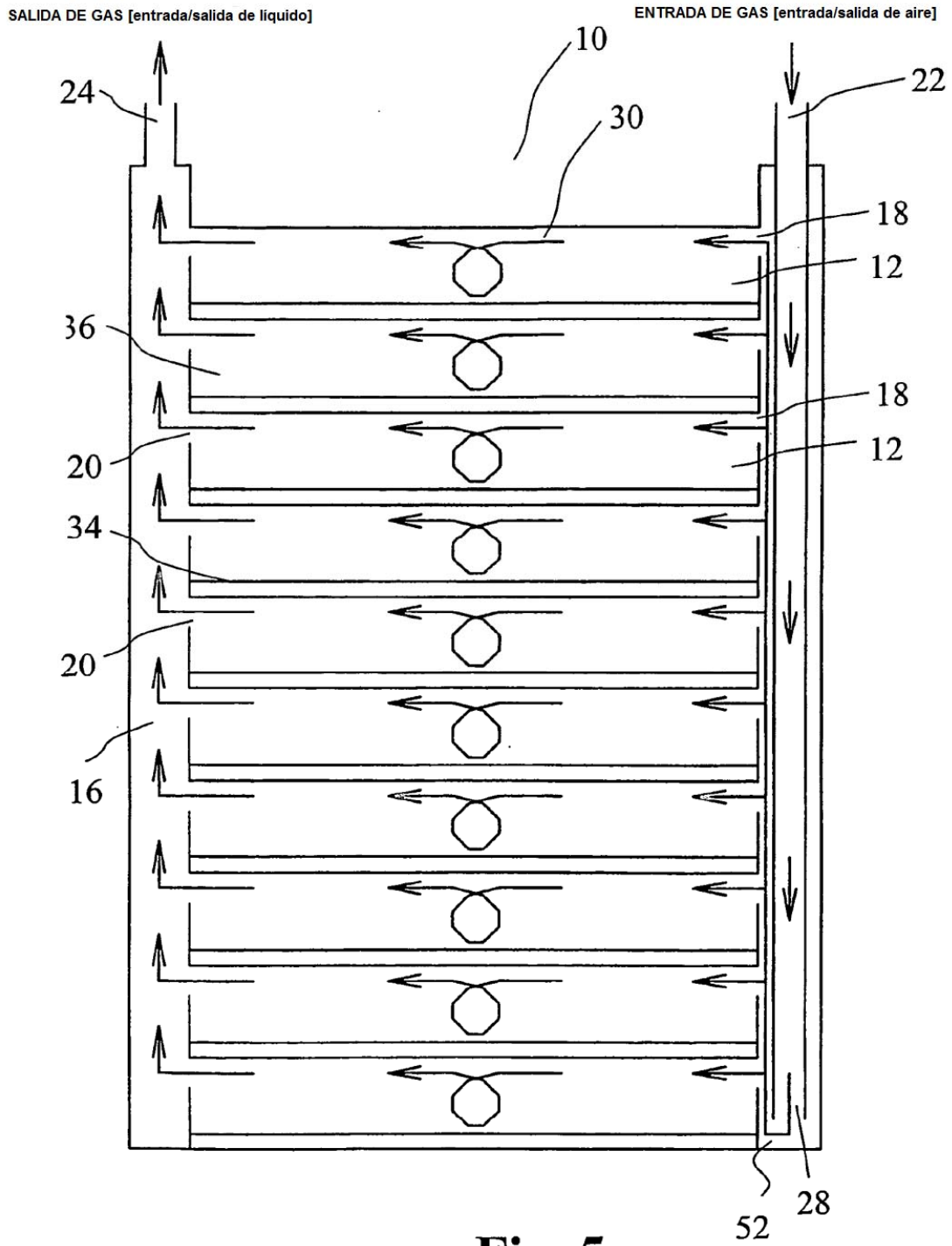
**Fig. 2B**



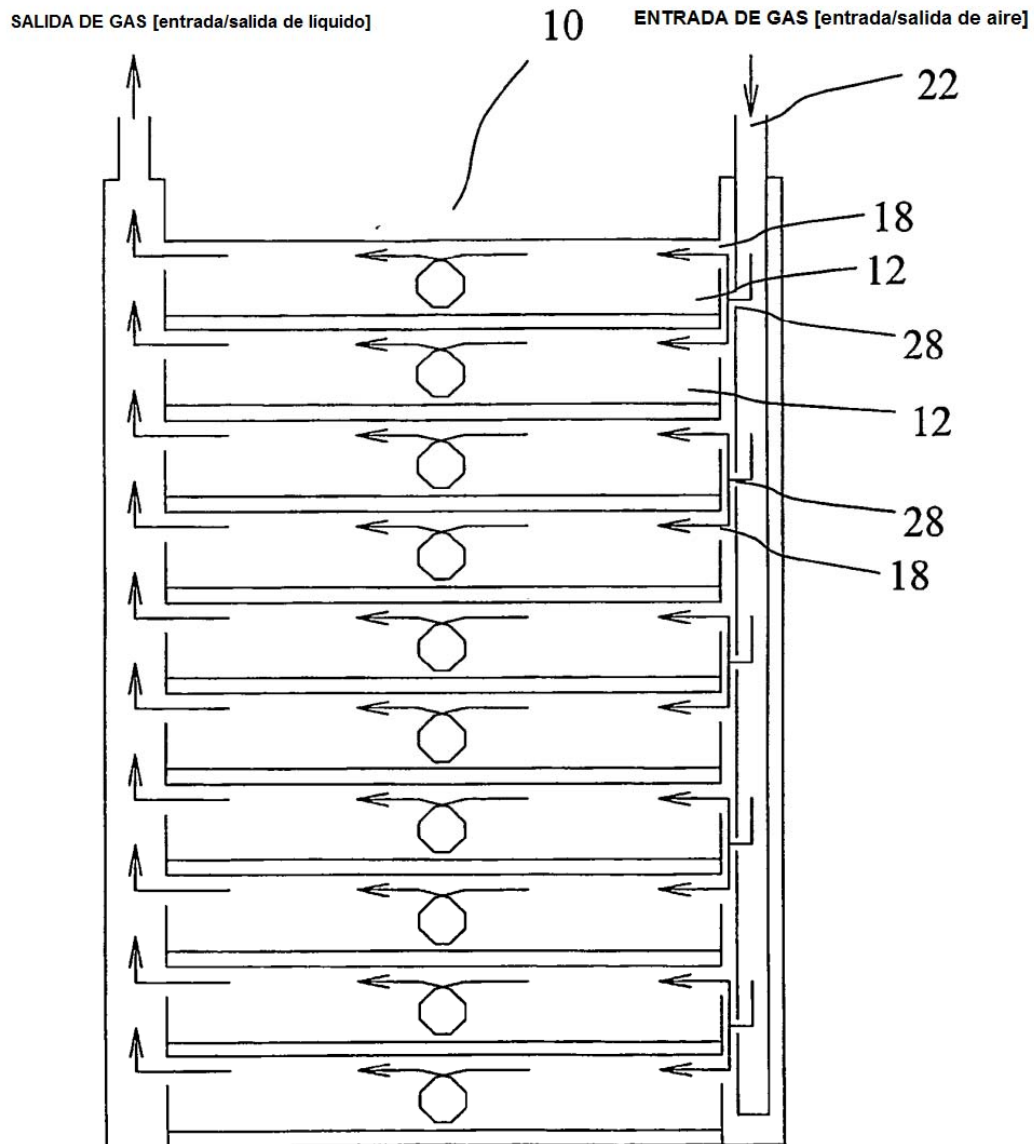
**Fig. 3**



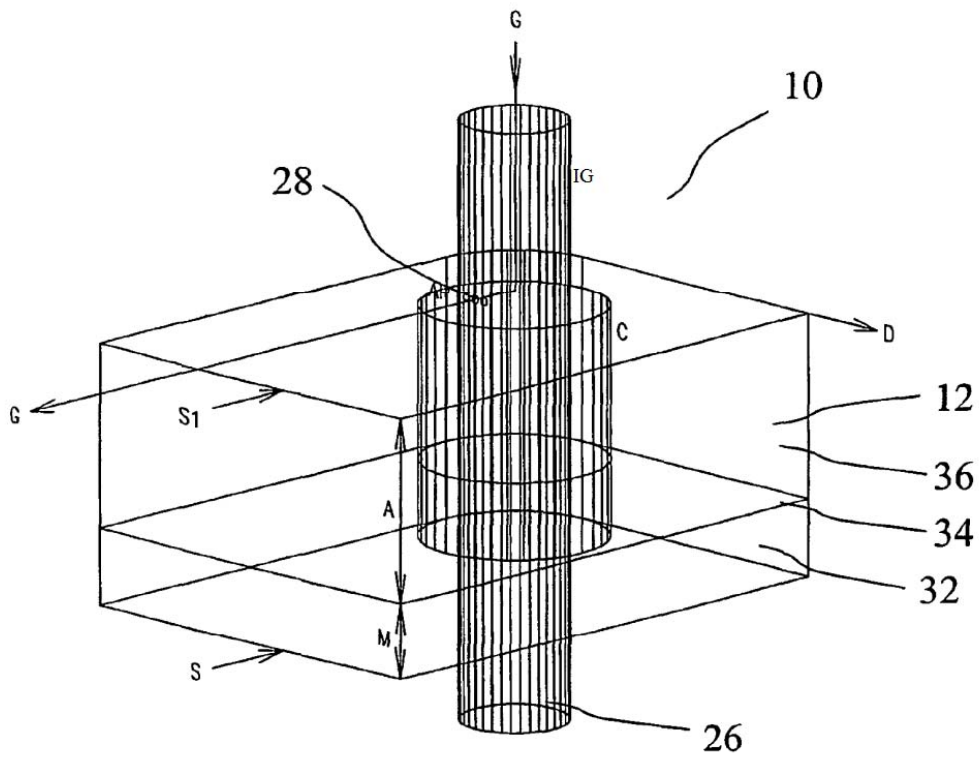
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



A = Atmósfera por encima del medio de cultivo

O = Orificio

C = Canal de conexión

D = Dirección con respecto al otro canal de conexión

G = Dirección del gaseado

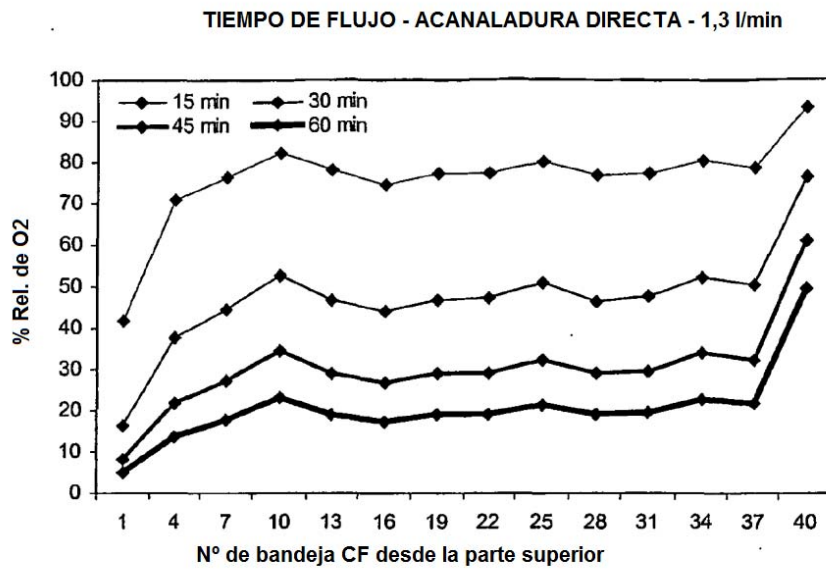
IG = Intercambiador de gas

M = Medio de cultivo por encima de las células

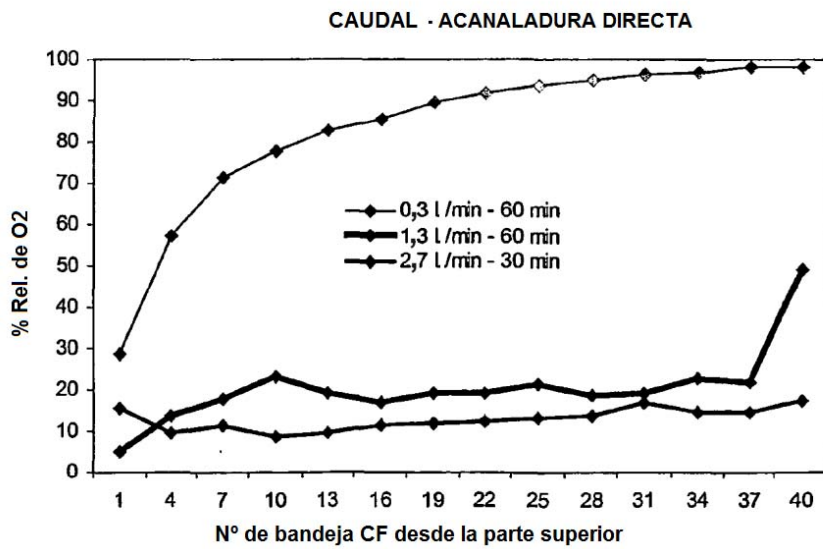
S = Sustrato celular de la bandeja

S1 = Sustrato celular de la bandeja superior

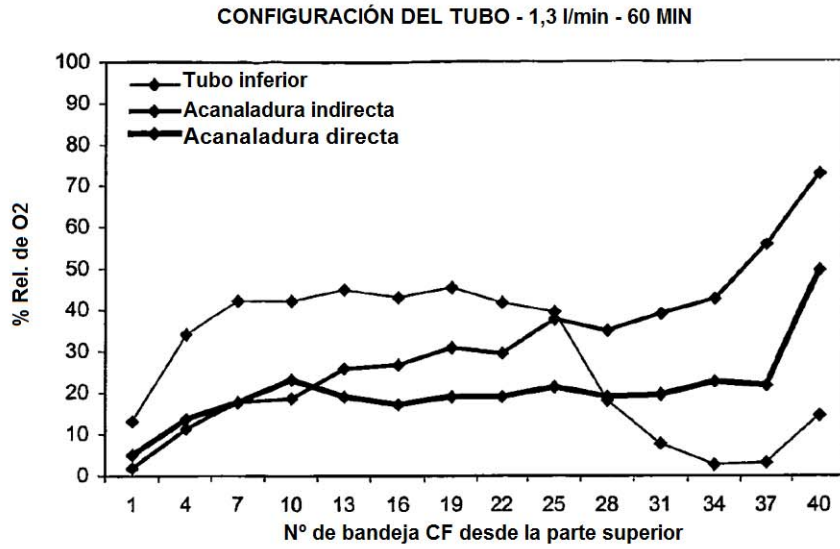
**Fig. 7**



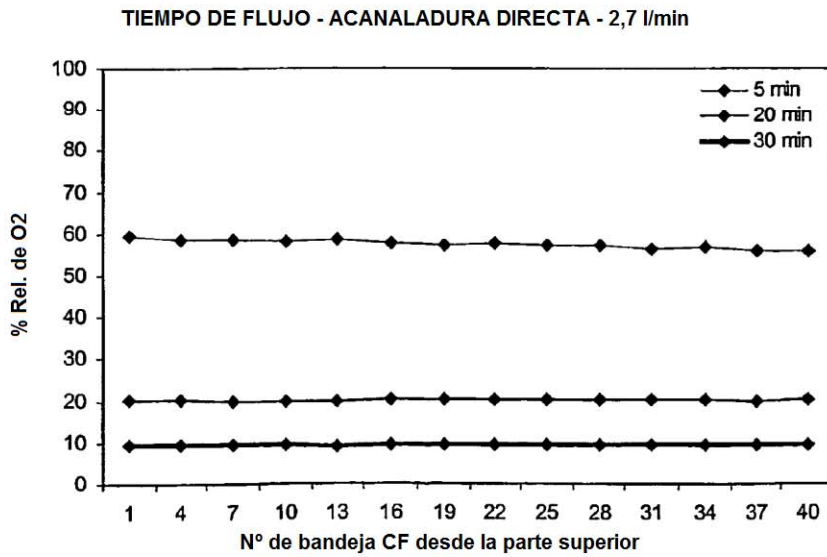
**Fig. 8A**



**Fig. 8B**

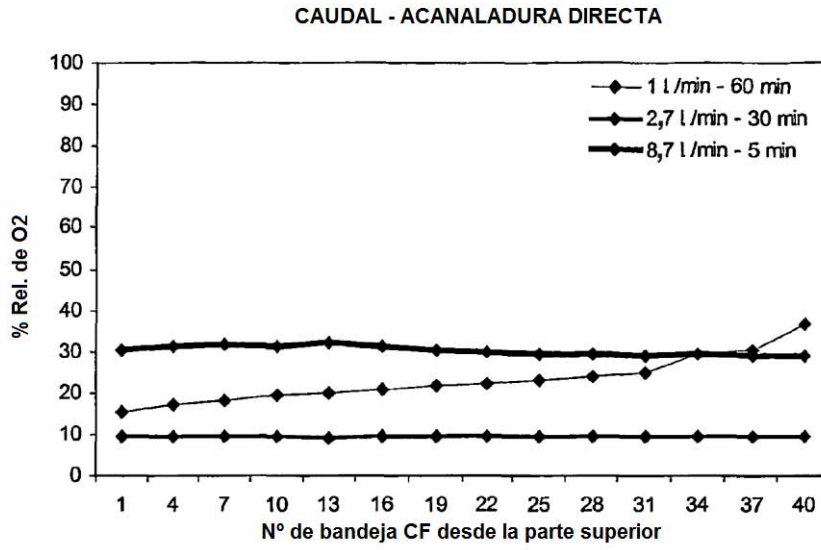


**Fig. 8C**

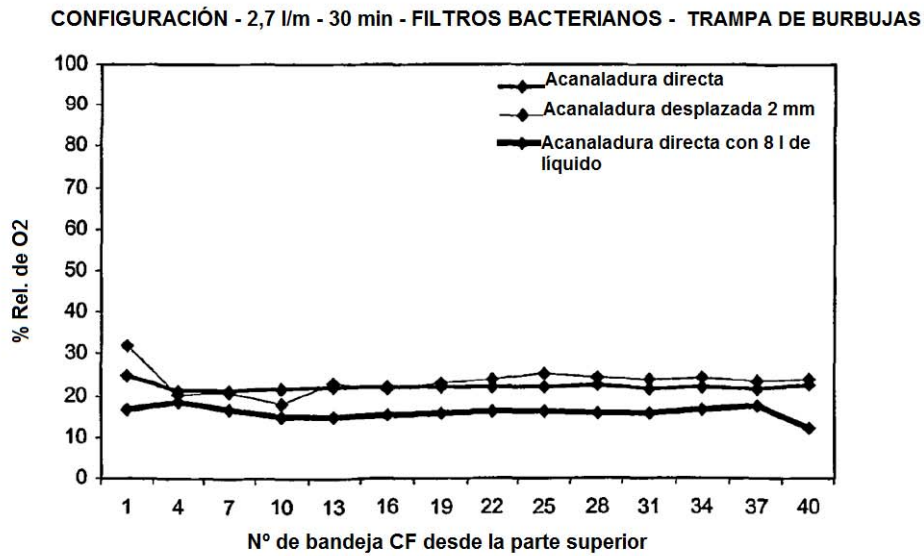


**Fig. 9A**

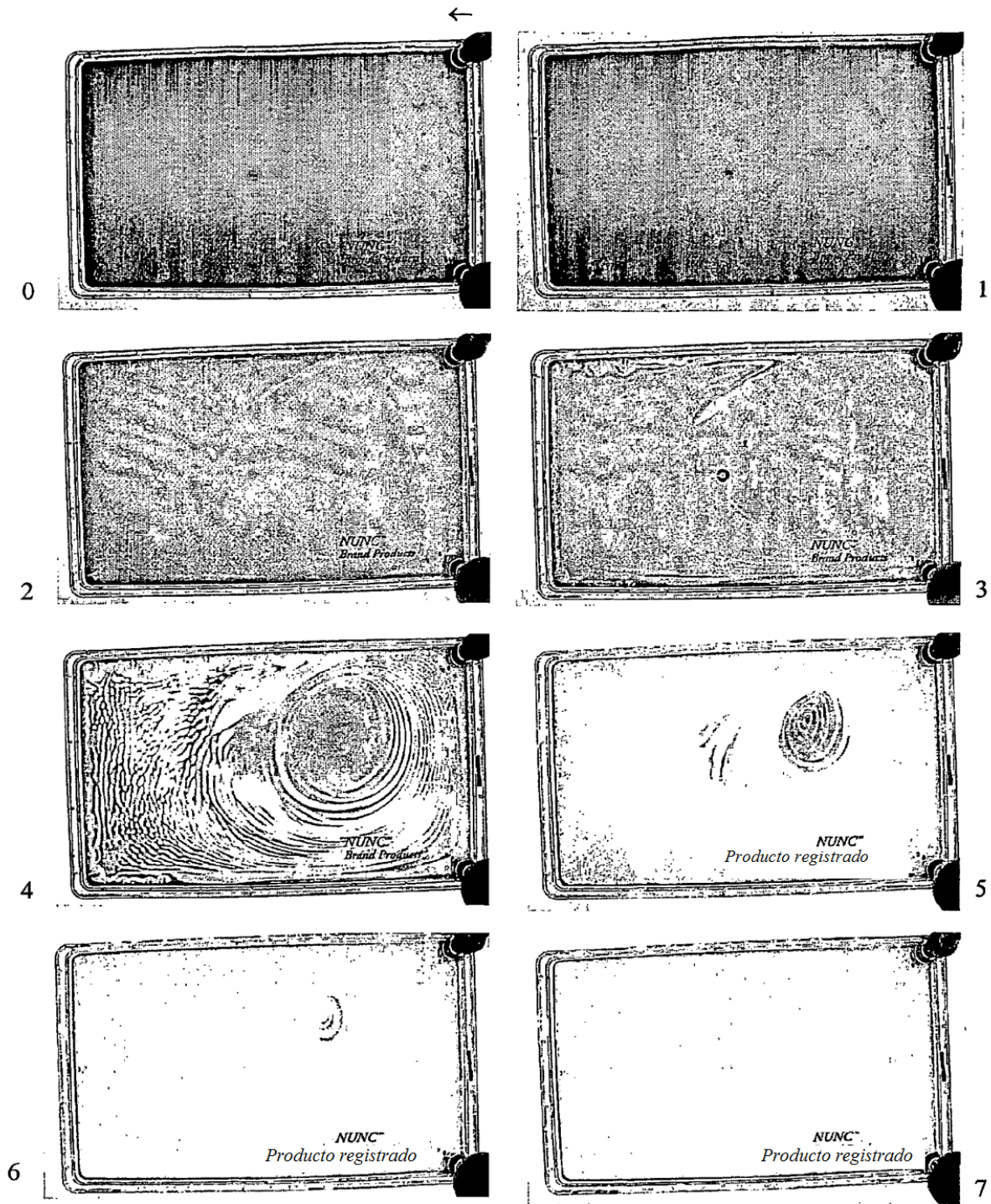




**Fig. 9B**

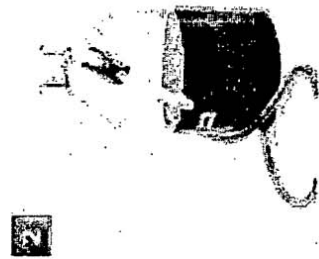


**Fig. 9C**



**Fig. 10**

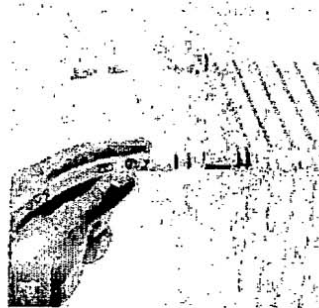
Preparar la suspensión celular en un frasco aspirador, instalado con un conector y una abrazadera estériles



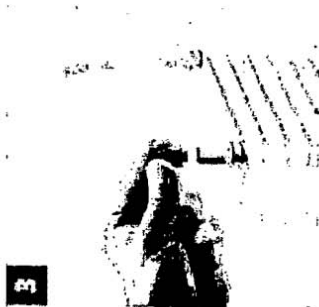
Desembalar la Factoria Celular y colocarla en una cabina de flujo de aire laminar para trabajar en condiciones estériles



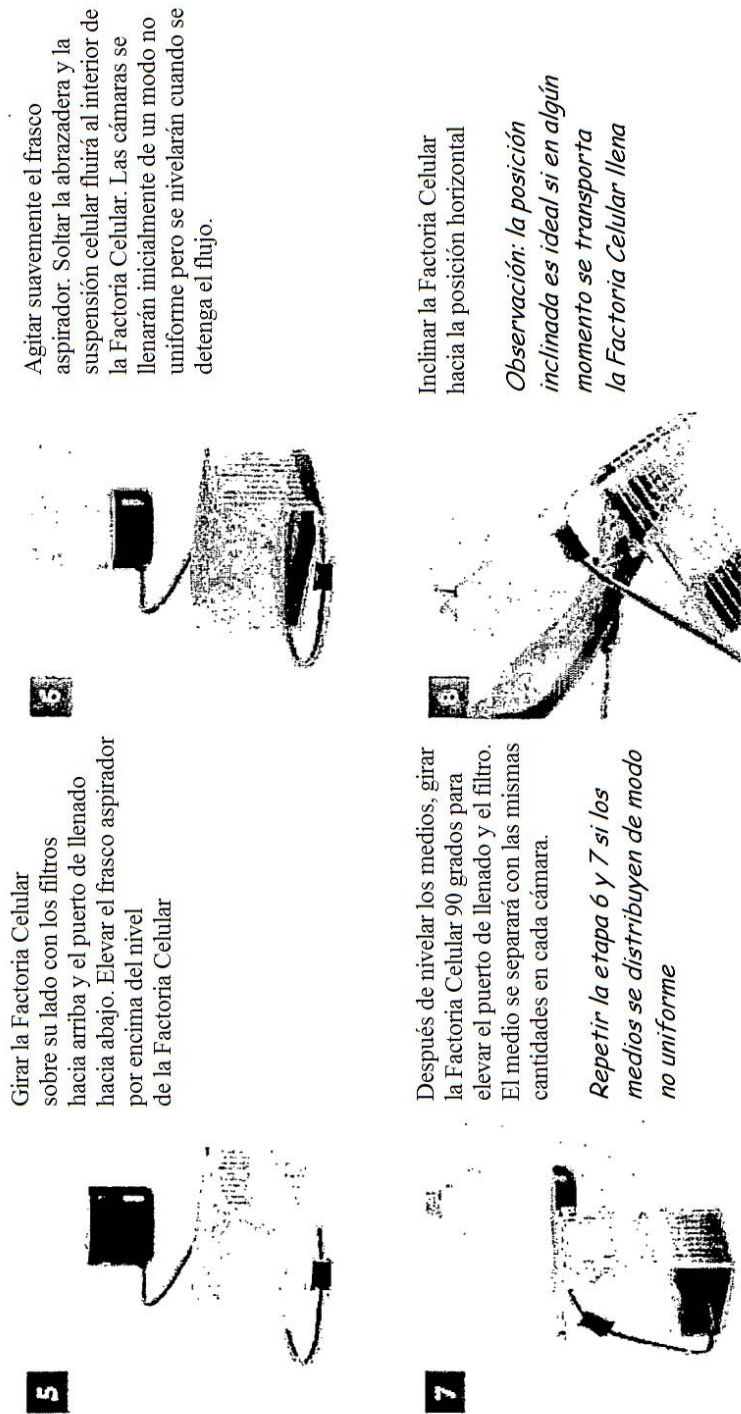
Inmediatamente insertar el conector. Evitar tocar el puerto gris



Retirar la tapa protectora azul. Evitar tocar el puerto gris



**Fig. 11A**



Girar la Factoria Celular sobre su lado con los filtros hacia arriba y el puerto de llenado hacia abajo. Elevar el frasco aspirador por encima del nivel de la Factoria Celular

Agitar suavemente el frasco aspirador. Soltar la abrazadera y la suspensión celular fluirá al interior de la Factoria Celular. Las cámaras se llenarán inicialmente de un modo no uniforme pero se nivelarán cuando se detenga el flujo.

Después de nivelar los medios, girar la Factoria Celular 90 grados para elevar el puerto de llenado y el filtro. El medio se separará con las mismas cantidades en cada cámara.

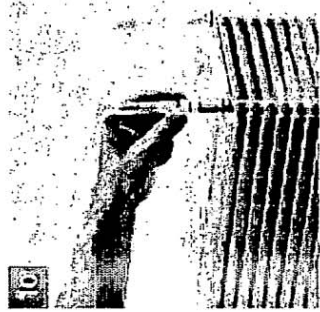
Inclinar la Factoria Celular hacia la posición horizontal

*Observación: la posición inclinada es ideal si en algún momento se transporta la Factoria Celular llena*

*Repetir la etapa 6 y 7 si los medios se distribuyen de modo no uniforme*

**Fig. 11B**

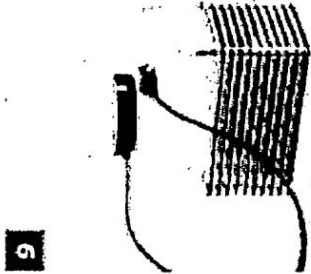
Retirar el conector y sustituir por un conector pre-esterilizado con filtro



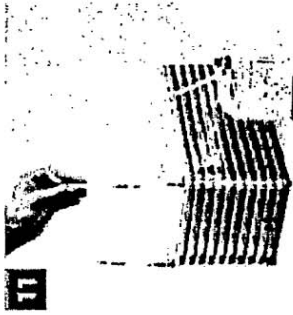
Controlar el suministro del gas durante la incubación (por ejemplo, gaseado continuo o intermitente, mezcla de gas, etc.)



Colocar suavemente la Factoria Celular en posición de incubación horizontal. Las superficies de todas las bandejas estarán cubiertas con medio

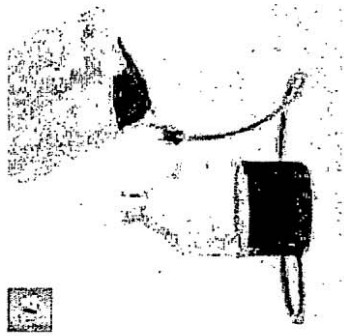


Instalar la tubería de la unidad de intercambio de gas con el filtro pre-instalado de Nunc.



**Fig. 11C**

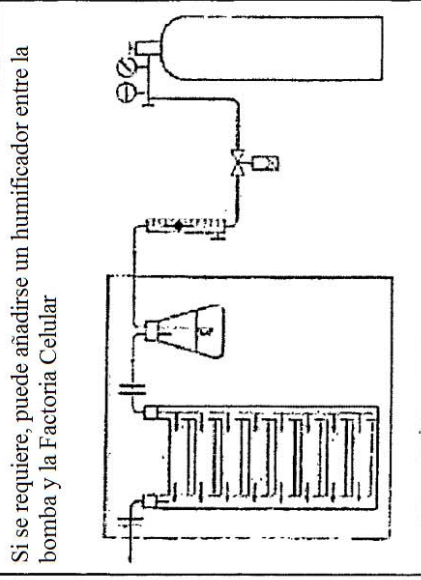
Inclinar la Factoria Celular para drenarla completamente



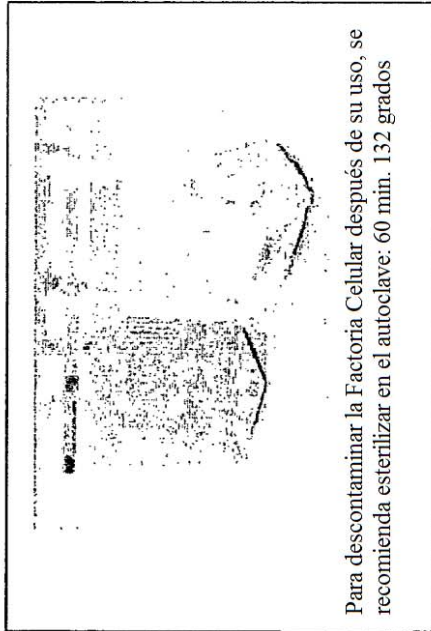
Para vaciar la Factoria Celular colocarla encima del frasco aspirador y el liquido saldrá de la Factoria Celular



13



Si se requiere, puede añadirse un humidificador entre la bomba y la Factoria Celular



Para descontaminar la Factoria Celular después de su uso, se recomienda esterilizar en el autoclave: 60 min. 132 grados

Fig. 11D