

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 501**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 1/24** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12M 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2013 E 13777343 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2739720**

54 Título: **Dispositivos y métodos para el cultivo de células**

30 Prioridad:

**06.09.2012 US 201261697445 P**

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

**20.02.2015**

73 Titular/es:

**PLURISTEM LTD. (100.0%)  
Matam Building 20  
31905 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**KASUTO, HAREL;  
ABRAHAM, EYTAN y  
ABERMAN, ZAMI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 529 501 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

Dispositivos y métodos para el cultivo de células

La presente descripción se refiere, de forma general, a dispositivos y métodos para el cultivo de células.

5 Hay varios métodos actuales de cultivo de células eucariotas. Algunos de estos métodos se han desarrollado para el cultivo de un número de células relativamente pequeño, y otros se han desarrollado para la producción y cosecha de las proteínas secretadas por las células en los medios circundantes. Pocos sistemas, sin embargo, se han desarrollado para el aumento de escala comercial del cultivo de células para producir grandes cantidades de células.

10 El método más común para el cultivo de células eucariotas es por expansión en frascos o en placas bidimensionales como la NUNCLON® Δ CELL FACTORY, que incluye apilamientos de frascos de cultivo de células. Este método tiene varios inconvenientes, incluida la incapacidad para monitorizar y controlar continuamente parámetros medioambientales como la DO, el pH, y alimentar ingredientes/eliminar productos de desecho; baja eficiencia en lo que respecta a las relaciones entre el área superficial y el volumen; la necesidad de incubadoras de gran volumen; la necesidad de una ardua manipulación de los frascos de cultivo; y largos periodos de tiempo para la siembra y el cultivo, que puede ser costoso y perjudicial para la viabilidad celular.

15 Además, las células pueden ser cultivadas en matrices tridimensionales. Tales matrices pueden incluir materiales porosos de fibra no tejida/tejida y similares a esponjas que pueden ser colocados en un lecho empaquetado dentro de un biorreactor. Estos soportes se utilizan principalmente para la producción y recogida de proteínas secretadas, mientras las células permanecen fijadas a la matriz, más que para el cultivo de células que se eliminan en última instancia, y se utilizan como agentes terapéuticos. Ejemplos de tales soportes son los discos FIBRA-CELL® (Nueva Brunswick) y soportes cerámicos porosos. Véase Wang, G., W. Zhang, et al., "Modified CelliGen-packed bed bioreactors for hybridoma cell cultures". Cytotechnology 9(1-3): 41-9 (1992); y Timmins, N.E., A. Scherberich, et al., "Three-dimensional cell culture and tissue engineering in a T-CUP (cultivo de tejido bajo perfusión)". Tissue Eng 13(8): 2021-8 (2007).

25 El cultivo en matrices tridimensionales, sin embargo, puede tener algunos inconvenientes. Por ejemplo, puede ser relativamente difícil eliminar células de las matrices, y los procesos de eliminación pueden dañar las células. La producción utilizando tales dispositivos puede ser difícil debido a que las células dañadas pueden no volver a fijarse fácilmente a las superficies del sistema de cultivo. Las diferencias en el tipo y propiedades de los materiales utilizados en las matrices y frascos pueden causar también variación en las interacciones celulares.

30 Por último, las células pueden ser cultivadas en un biorreactor utilizando micro-soportes no porosos en suspensión o en un lecho fluidizado. Este método permite el crecimiento celular en una sola capa sobre la superficie de micro-soportes. El uso de este método requiere, sin embargo, la separación de los soportes de los medios por sedimentación o filtración, que no son procesos sencillos y pueden no dar como resultado altas tasas de recuperación celular. Además, los micro-soportes tienen desviaciones en las superficies a una escala celular, lo que da como resultado un entorno de cultivo que es diferente de los sistemas de cultivo bidimensional.

35 La presente descripción proporciona dispositivos y métodos para el cultivo bidimensional de las células eucariotas según las reivindicaciones independientes 1 y 2.

40 De acuerdo con varias realizaciones, se proporciona un dispositivo para el cultivo de células. El dispositivo puede comprender un cuerpo tridimensional que comprende múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior del cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento en una sola capa de las células eucariotas sobre, al menos, una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene una dimensión máxima que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm. En contraste con los métodos convencionales para el cultivo bidimensional de las células (donde las células se cultivan en un contenedor que proporciona la superficie bidimensional), los dispositivos descritos en la presente memoria se introducen en un recipiente que contiene un medio de crecimiento celular. Por ejemplo, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden formar parte de un sistema para el cultivo de células como se describe a continuación. Así, en algunas realizaciones, los dispositivos se sumergen dentro del medio de cultivo en el interior de un contenedor adecuado. Para lograr el crecimiento bidimensional de las células en capas individuales, los dispositivos descritos en la presente memoria permiten condiciones de crecimiento controladas que producen células que tienen las características asociadas con células cultivadas en un entorno bidimensional.

55 De acuerdo con varias realizaciones, se proporciona un sistema para el cultivo de células. El sistema puede comprender un contenedor y un grupo de cuerpos tridimensionales. Cada cuerpo tridimensional puede comprender múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior de cada cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre, al menos, una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene una dimensión máxima que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm o una relación del

área superficial frente al volumen entre aproximadamente  $3 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y aproximadamente  $1.000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .

De acuerdo con varias realizaciones, se proporciona un método para el cultivo de las células. El método puede comprender la selección de un grupo de células eucariotas y la puesta en contacto de las células eucariotas con al menos un cuerpo tridimensional, teniendo al menos el cuerpo tridimensional múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior de al menos un cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene una dimensión máxima que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm.

- 5
- 10 De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un dispositivo de cultivo de células. El dispositivo puede comprender un cuerpo tridimensional que comprende múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior del cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene una relación del área superficial frente al volumen entre aproximadamente  $3 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y aproximadamente  $1.000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .

- 15
- 20 De acuerdo con varias realizaciones, se proporciona un dispositivo de cultivo de células. El dispositivo puede comprender un cuerpo tridimensional que comprende una lámina de material conformado en una configuración sustancialmente en espiral. La lámina de material puede comprender al menos dos superficies bidimensionales, en donde las superficies bidimensionales pueden estar configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene una relación del área superficial frente al volumen entre aproximadamente  $3 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y aproximadamente  $1.000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .

#### Descripción de los dibujos

- 25 La Fig. 1A es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 1B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Fig. 1 A.
- La Fig. 2A es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 30 La Fig. 2B es una vista en perspectiva lateral del dispositivo de la Fig. 2 A.
- La Fig. 2C es una vista desde arriba del dispositivo de la Fig. 2A.
- La Fig. 2D es una vista en sección transversal del dispositivo de la Fig. 2A.
- La Fig. 3A es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 35 La Fig. 3B es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 4A es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 40 La Fig. 4B es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 5 es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 6 es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 45 La Fig. 7 es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 8A es una vista en perspectiva de un dispositivo para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La Fig. 8B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Fig. 8A.
- 50 La Fig. 9 es una vista en perspectiva de un sistema para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con

ciertas realizaciones.

La Fig. 10 es un gráfico de barras que muestra los resultados de cultivo de células en frascos o utilizando los dispositivos de cultivo bidimensional de la presente descripción, como se describe en el Ejemplo 1.

5 La Fig. 11 es un gráfico de barras que muestra el número de duplicación de la población de células cultivadas en frascos o utilizando los dispositivos de cultivo bidimensional de la presente descripción, como se describe en el Ejemplo 1.

La Fig. 12 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando los dispositivos de cultivo bidimensional, a diferentes velocidades de mezclado del medio (RPM), como se describe en el Experimento 1.

10 La Fig. 13 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando dispositivos de cultivo bidimensional, como se describe en el Experimento 1.

La Fig. 14 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando varios dispositivos de cultivo bidimensional recubiertos, como se describe en el Experimento 1.

15 La Fig. 15 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando dispositivos de cultivo bidimensional con medio de cultivo preincubado, como se describe en el Experimento 1.

La Fig. 16 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando varios dispositivos de cultivo bidimensional recubiertos con o sin tratamiento de la superficie con plasma de los dispositivos, como se describe en el Experimento 1.

20 La Fig. 17 es un gráfico de barras que ilustra la comparación de la D.P.D. (duplicación de la población por día) entre frascos de 175 cm<sup>2</sup> y soportes 2D, tal como se describe en el Experimento 3.

#### Descripción de las realizaciones ilustrativas

25 A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones ejemplares de acuerdo con la presente descripción, ciertos de cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Donde quiera que sea posible, en todos los dibujos se utilizarán los mismos números de referencia para referirse a partes iguales o similares.

30 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. También en esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no son limitantes. Cualquier intervalo descrito en la presente memoria se entiende que incluye los valores de los extremos y todos los valores entre los valores de los extremos.

35 Los dispositivos de la presente descripción permiten el crecimiento bidimensional de células eucariotas. Se entiende que "crecimiento bidimensional" incluye el crecimiento de células eucariotas a lo largo de una superficie en donde la mayoría del crecimiento celular se realiza en una sola capa. Se entiende que "mayoría de crecimiento celular en una sola capa" incluye el crecimiento de células de al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos el 99 % de las células en una sola capa. "Crecimiento bidimensional" puede incluir el crecimiento a lo largo de planos (es decir, superficies planas) y/o el crecimiento a lo largo de superficies que tienen algún grado de curvatura, como se describe más detalladamente a continuación. Por ello, se entiende que una "superficie bidimensional" incluye una superficie que es plana y/o una superficie que tiene cierta curvatura. Además, como se usa en la presente memoria, la frase "crecimiento tridimensional" se refiere a crecimiento bajo condiciones que son compatibles con el crecimiento celular en un andamio que permite el contacto de célula con célula en tres dimensiones.

45 Al permitir el crecimiento bidimensional, los dispositivos de la presente descripción proporcionan grandes relaciones de área superficial frente a volumen, permitiendo de ese modo el crecimiento de grandes cantidades de células en pequeños volúmenes, en comparación con el crecimiento bidimensional en frascos. Además, los dispositivos de la presente descripción se pueden configurar para facilitar la eliminación de las células después del crecimiento y/o la transferencia de las células a otros entornos para el almacenamiento, el uso comercial (por ejemplo, como agentes terapéuticos), o para el crecimiento de células adicionales. Además, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden estar configurados para permitir el crecimiento de células de alta calidad que sea al menos tan bueno como la alcanzada utilizando sistemas de cultivo de células estándar en lo que respecta a la viabilidad celular, la capacidad de fijado, y/o el mantenimiento o el control de otras propiedades celulares.

50 Los dispositivos de la presente descripción pueden ser empleados para el cultivo de una variedad de diferentes tipos de células eucariotas. Los dispositivos son adecuados para el crecimiento de las células madre, células dependientes de anclaje, células mesenquimales y células adherentes. Como se usa en la presente memoria la expresión "células adherentes" se refiere a células que son dependientes de anclaje, es decir, requieren la fijación a

una superficie para crecer in vitro. Células adherentes adecuadas pueden incluir células estromales mesenquimales, que son una población heterogénea de células obtenidas a partir de, por ejemplo, médula ósea, tejido adiposo, placenta y sangre, y que pueden ser o no ser capaces de diferenciarse en diferentes tipos de células (por ejemplo, células endoteliales reticulares, fibroblastos, adipocitos, células precursoras osteogénicas) dependiendo de las influencias de diversos factores bioactivos.

El crecimiento eficiente de los diversos tipos de células adherentes puede ser muy dependiente del entorno o de las interacciones experimentadas por las células durante el crecimiento. Por ejemplo, las células adherentes pueden ser involuntariamente puestas en contacto con otras células adherentes. Si una monocapa de células se pone en contacto involuntariamente con otra monocapa de células, las dos monocapas pueden adherirse entre sí. Tal interacción entre monocapas de diferentes dispositivos puede dar como resultado la unión de dispositivos entre sí. La interacción puede ser mediada por la matriz extracelular secretada por las células. Debido a que los dispositivos descritos en la presente memoria pueden limitar tales interacciones no deseadas de célula con célula, la aglutinación o agregación pueden limitarse de forma general. Además, los presentes dispositivos pueden proporcionar una distribución eficiente de los nutrientes, del medio y de los gases a través del cultivo para proporcionar un entorno estable para el crecimiento de monocapas de células adherentes y la eficiente cosecha de las células. Los dispositivos pueden promover también el crecimiento más consistente de las células mediante la limitación de subpoblaciones de células que crecen bajo condiciones tridimensionales en comparación con las condiciones bidimensionales.

En un aspecto, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden estar configurados para limitar el contacto entre las superficies configuradas para el crecimiento celular. Como tal, los dispositivos pueden ser en general circulares, redondeados o arqueados para minimizar, generalmente, el contacto entre superficies de los dispositivos adyacentes. Los dispositivos individuales se pueden diseñar para ponerse en contacto con los dispositivos adyacentes sobre un área relativamente pequeña. Tal limitado contacto entre dispositivos puede proporcionar superficies de crecimiento que someten las células en cultivo a interacciones relativamente pequeñas con otros crecimientos de células en otros dispositivos. Múltiples dispositivos en un único recipiente de incubación puede así proporcionar un entorno de crecimiento más eficiente, controlado y estable para las células adherentes.

En algunas realizaciones, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden tener una sección transversal generalmente circular. Por ejemplo, la forma exterior de los dispositivos puede ser esférica, cilíndrica, y otros volúmenes generalmente redondeados. Tales dispositivos pueden proporcionar áreas de contacto de menos que aproximadamente 10 % con respecto al área total de la superficie exterior del dispositivo. En otras realizaciones, un área de contacto puede ser menor que aproximadamente 5 %, 2 %, o 1 % del área superficial total. Otras formas podrían también utilizarse si el contacto entre los dispositivos adyacentes pudiera minimizarse suficientemente.

Los métodos de crecimiento celular descritos en la presente memoria pueden también estar configurados para su uso con los dispositivos descritos en la presente memoria. Los recipientes configurados para resistir, en general, la fijación celular se pueden utilizar con estos dispositivos. Por ejemplo, pueden utilizarse recipientes formados de, o recubiertos con, vidrio o plásticos conocidos por limitar la adhesión celular. Tales recipientes pueden fomentar el crecimiento adecuado de las monocapas de células adherentes en los dispositivos descritos en la presente memoria. Tales recipientes pueden también limitar posibles interacciones celulares no deseadas, que pueden dar como resultado inadvertidas adhesiones de célula con célula como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con varias realizaciones, se proporcionan dispositivos para el cultivo de células. Los dispositivos pueden comprender un cuerpo tridimensional que comprende múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior del cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales. En algunas realizaciones, las múltiples superficies bidimensionales pueden o no soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales. "Múltiples" superficies bidimensionales significa "más de una" superficie bidimensional e incluye al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o al menos diez superficies bidimensionales. También se contemplan más de diez superficies bidimensionales como, por ejemplo, 50, 100, 500 o más superficies. Se entiende que una "mayoría del área superficial" incluye al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % del área superficial. En varias realizaciones, los dispositivos tienen una dimensión máxima que es menor que aproximadamente 50 mm y/o una relación del área superficial frente al volumen entre aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 1.000 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>. Se entiende que "dimensión máxima" incluye altura, anchura, longitud, diagonal del espacio, distancia al vértice, diámetro transversal, diámetro, tramos de la sección transversal exteriores más grandes, o cualquier otra dimensión espacial exterior más grande del cuerpo tridimensional.

Los dispositivos de cultivo de células de la presente descripción pueden tener un número de diferentes formas y configuraciones, pueden formarse a partir de cualquiera de un número de materiales adecuados, y pueden incluir varios tratamientos y/o recubrimientos superficiales para facilitar el crecimiento celular. Las Fig. 1A-8B, ilustran dispositivos de cultivo de células de acuerdo con varias realizaciones, que se describen más detalladamente a

continuación. Además, la Fig. 9 ilustra un sistema ejemplar de cultivo de células que incluye un contenedor y un grupo de dispositivos de cultivo de células. Se comprenderá que los dispositivos y sistemas mostrados en las figuras y descritos a continuación son ejemplares, y varias características de las diferentes realizaciones descritas en la presente memoria pueden combinarse o intercambiarse.

5 La Fig. 1 A es una vista en perspectiva de un dispositivo 10 para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones; y la Fig. 1B es una vista en sección transversal del dispositivo 10 de la Fig. 1A. Como se muestra, el dispositivo 10 incluye múltiples superficies bidimensionales 12 que se extienden desde un exterior del dispositivo 10 hacia un interior del dispositivo 10. Como se muestra, las superficies están formadas por un grupo de nervaduras 14 que están distanciadas para formar aberturas 16, que pueden estar dimensionadas para permitir el  
10 flujo de células y medios de cultivo durante el uso. El dispositivo 10 puede incluir también uno o más planos laterales que se extienden desde un eje central del dispositivo 10 y que se extienden generalmente perpendiculares a las nervaduras 14.

En algunas realizaciones, un diámetro exterior del dispositivo 10 puede variar de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm. En otras realizaciones, el diámetro exterior puede variar de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 20 mm y de aproximadamente 4 mm a aproximadamente 10 mm. Dependiendo del tamaño global del dispositivo 10, las nervaduras 14 y las aberturas 16 pueden ser de distintos tamaños. Por ejemplo, las nervaduras 14 pueden variar en espesor de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 2 mm y de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 1 mm. En particular, las nervaduras 14 pueden tener un espesor de aproximadamente 0,5 mm, de aproximadamente 0,6 mm o de aproximadamente 0,7 mm. Las aberturas 16 pueden  
20 variar en anchura de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 1 mm y de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 0,5 mm. En particular, las aberturas 16 pueden tener una anchura de aproximadamente 0,3 mm, de aproximadamente 0,4 mm o de aproximadamente 0,5 mm.

En la realización mostrada en las Fig. 1A-1B, las nervaduras 14 son sustancialmente planas y se extienden paralelas entre sí desde el centro del dispositivo hasta la periferia del dispositivo. Las nervaduras, sin embargo, pueden incluir una variedad de configuraciones. Por ejemplo, las Fig. 2A-2D ilustran un dispositivo 20 que tiene múltiples superficies bidimensionales 22 formadas por nervaduras 24 en una configuración diferente. La Fig. 2A es una vista en perspectiva del dispositivo 20 para un cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones; la Fig. 2B es una vista en perspectiva lateral del dispositivo de la Fig. 2A; la Fig. 2C es una vista desde arriba del dispositivo de la Fig. 2A; y la Fig. 2D es una vista en sección transversal del dispositivo de la Fig. 2A. El dispositivo 20 de las Fig. 2A-2D es similar al dispositivo 10 de las Fig. 1A-1B, pero las nervaduras 24 del dispositivo 20 están conformadas para formar aberturas 26 que están separadas alrededor de la circunferencia del dispositivo 20. Las aberturas 26 pueden tener generalmente forma de cuña. Las nervaduras 24 pueden extenderse de forma generalmente radial desde un eje central del dispositivo 20 hasta una superficie periférica del dispositivo 20. El dispositivo 20 puede incluir también uno o más planos laterales que se extienden desde el eje central del dispositivo 20 y que se extienden generalmente perpendiculares a las nervaduras 24. Además, el dispositivo 20 incluye una  
30 abertura 36 que se extiende a través del centro del dispositivo y que forma superficies adicionales 32, que pueden soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa.

Como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 10, las dimensiones del dispositivo 20 pueden ser de distintos tamaños. Por ejemplo, un diámetro exterior del dispositivo 20 puede variar de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm. En otras realizaciones, el diámetro exterior puede variar de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 20 mm y de aproximadamente 4 mm a aproximadamente 10 mm. Dependiendo del tamaño global del dispositivo 20, las nervaduras 24 y las aberturas 26 pueden ser de distintos tamaños. Por ejemplo, las nervaduras 24 pueden variar en espesor de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 2 mm y de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 1 mm. En particular, las nervaduras 24 pueden tener un espesor de aproximadamente 0,5 mm, de aproximadamente 0,6 mm o de aproximadamente 0,7 mm. Como se muestra en las Fig. 2A-2C, las aberturas 26 pueden variar en anchura desde un ancho mínimo situado generalmente aproximadamente en un eje central que se extiende a través del dispositivo 20 o la abertura 36, hasta una anchura máxima generalmente situada aproximadamente en una periferia del dispositivo 20. Una anchura mínima de las aberturas 26 puede variar de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 1 mm y de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 0,5 mm. Específicamente, la anchura mínima de las aberturas 26 puede ser de aproximadamente 0,3 mm, de aproximadamente 0,4 mm o de aproximadamente 0,5 mm. Además, la abertura 36 puede variar en diámetro de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 5 mm y de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2 mm. Más particularmente, la abertura 36 puede tener un diámetro de aproximadamente 0,8 mm, de aproximadamente 1 mm o de aproximadamente 1,2 mm.

55 Como se muestra, los dispositivos 10, 20 son sustancialmente esféricos y tienen un diámetro 18 que forma la dimensión más grande de los dispositivos. Los dispositivos descritos en la presente memoria pueden tener una variedad de formas y configuraciones diferentes, siempre y cuando los dispositivos proporcionen superficies bidimensionales para la fijación y el crecimiento en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales 12 y 22.

60 Los dispositivos de cultivo de células de la presente descripción pueden incluir una variedad de formas y configuraciones. Por ejemplo, aunque los dispositivos descritos anteriormente con respecto a las Fig. 1A-2D son

sustancialmente esféricos, pueden utilizarse otras formas adecuadas. Por ejemplo, las Fig. 3A-3B son vistas en perspectiva de los dispositivos de 10', 20' para el cultivo bidimensional de células. Los dispositivos 10', 20' son similares a los dispositivos 10, 20 de las Fig. 1A-2D, excepto que los dispositivos 10' y 20' tienen formas sustancialmente ovoides, pero de forma similar proporcionan múltiples superficies bidimensionales 12' y 22' formadas por las nervaduras 14', 24' o las aberturas 36'. Además, pueden utilizarse otras formas adecuadas, incluidas otras formas poliédricas y/o poliédricas irregulares.

Como se ha discutido anteriormente, los dispositivos de la presente descripción pueden incluir múltiples superficies bidimensionales configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales. En ciertas realizaciones, las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento en una sola capa sobre sustancialmente la totalidad de su área superficial. Por ejemplo, las Fig. 4A-4B son vistas en perspectiva de dispositivos para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones, que están configuradas para soportar el crecimiento en una sola capa sobre sustancialmente la totalidad de su área superficial. Los dispositivos de 10", 20" de las figuras. 4A-4B son similares a otros dispositivos descritos anteriormente y comprenden las superficies 12' y 22' formadas por las nervaduras 14' y 24'. Sin embargo, los dispositivos 10" y 20" tienen aberturas 16' y 26' con superficies 12' y 22' que forman curvas suaves a lo largo de todas sus áreas, eliminando o reduciendo de ese modo las áreas de curvatura aguda donde puede tener lugar el crecimiento tridimensional. Por ejemplo, como se muestra, los dispositivos 10" y 20" tienen superficies inferiores 40 y 42, suavemente curvadas, en oposición a las curvas más agudas, como se ilustra con respecto a los dispositivos de las Fig. 1A-2D.

En varias realizaciones, la curvatura y configuración específicas de las múltiples superficies bidimensionales pueden ser modificadas, por ejemplo, para proporcionar áreas superficiales mayores y/o controlar el crecimiento celular. Por ejemplo, la Fig. 5 es una vista en perspectiva de un dispositivo 50 para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones. El dispositivo 50 incluye nervaduras 54 que se extienden desde una periferia del dispositivo 50 hacia un interior del dispositivo para formar aberturas 56 y múltiples superficies bidimensionales 52 para el crecimiento en una sola capa. Como se muestra, las nervaduras 54 y las superficies 52 están curvadas. La forma curvada de las superficies 52 puede aumentar aún más el área superficial de las múltiples superficies bidimensionales 52, en comparación con superficies planas, proporcionando de ese modo un área adicional para la fijación y el crecimiento de las células en una sola capa.

La Fig. 6 es una vista en perspectiva de un dispositivo 60 para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones. Como se muestra, el dispositivo 60 incluye nervaduras 64 que se extienden desde un interior del dispositivo 60 hacia una periferia del dispositivo 60. Las nervaduras 64 pueden incluir una configuración en espiral que se extiende al menos parcialmente a lo largo de un diámetro del dispositivo 60 para formar al menos dos superficies bidimensionales 62 y 62' para el crecimiento bidimensional de las células eucariotas. Como se muestra, las nervaduras se extienden desde una parte del núcleo 68 hacia la periferia del dispositivo 60.

En cada una de las realizaciones descritas anteriormente, las múltiples superficies bidimensionales se extienden desde un núcleo interior. Según otras realizaciones, sin embargo, las superficies pueden extenderse hacia dentro en el ámbito de ser dirigidas hacia un núcleo central. Por ejemplo, la Fig. 7 ilustra otro dispositivo 70, de acuerdo con algunas realizaciones. El dispositivo 70 incluye al menos una hoja de material en la forma de una pared sustancialmente en forma de espiral 74 con una abertura 76, y que tiene al menos una primera superficie 72 y una segunda superficie 72' configurados para permitir el crecimiento bidimensional de células eucariotas. Se comprenderá, sin embargo, que otras formas pueden ser utilizadas, y el dispositivo 70 no necesita ser una espiral continua, y puede incluir otras configuraciones.

También se contempla que un dispositivo 90 puede incluir uno o más componentes desmontables, como se muestra en las Fig. 8A y 8B. Por ejemplo, el dispositivo 90 puede incluir uno o más discos desmontables 92. Cada disco 92 puede incluir uno o más conectores 94 configurados para acoplarse a otro elemento estructural del dispositivo 90. Como tal, una pluralidad de discos 92 se pueden acoplar entre sí para formar un conjunto 96. El conjunto 96 puede incluir cualquier número de discos 92 o conectores de diferentes formas o tamaños, incluidas las realizaciones mostradas anteriormente en las Fig. 1-7.

El disco 92 puede tener cualquier forma y puede incluir un acoplamiento hembra (no mostrado), configurado para acoplarse al conector 94. El acoplamiento entre el disco 92 y el conector 94 puede ser permanente o desmontable. En otras realizaciones, una pluralidad de discos 92 pueden estar acoplados a un sólo conector 94 configurado para recibir la pluralidad de discos 92 y mantener una distancia adecuada entre la pluralidad de discos 92.

Los diversos dispositivos de cultivo de células descritos anteriormente se pueden formar en una variedad de formas. Mientras muchas realizaciones representan los dispositivos redondeados, los dispositivos pueden ser también cúbicos, rectangulares, o una combinación de formas lineales y arqueadas. Además, con estos dispositivos pueden usarse estabilizantes adicionales, conectivos, u otras características estructurales. Por ejemplo, un miembro filiforme puede acoplar múltiples dispositivos entre sí, un miembro adhesivo puede acoplar un dispositivo a una pared de un recipiente de incubación, o un miembro de flotación puede permitir que un dispositivo se mantenga flotante en un fluido para limitar que las células entren en contacto involuntariamente con otras superficies. Tales miembros

pueden mejorar la manipulación utilizando técnicas manuales o automáticas. Por ejemplo, puede incorporarse material magnético en los dispositivos para ayudar en las etapas de recogida y procesado. Los dispositivos también se pueden configurar para exposición continua a un fluido de incubación o para exposición intermitente al fluido.

5 Los dispositivos de cultivo de células descritos en la presente memoria se pueden producir utilizando una diversidad de diferentes materiales adecuados. Generalmente, los dispositivos se pueden producir utilizando materiales que  
 10 tengan una amplia gama de atributos seleccionados para permitir el cultivo de células para fines farmacéuticos. En varias realizaciones, los materiales pueden estar aprobados como clase 6 de la Farmacopea de los EE.UU. (US Pharmacopeial Convention Class VI), pueden soportar altas temperaturas y pueden ser sometidos a autoclave, son susceptibles para un tratamiento con plasma o de corona para mejorar la fijación de las células, pueden soportar un  
 15 amplio intervalo de pH, no lixiviar sustancias nocivas durante el proceso de crecimiento celular, y/o pueden estar expuestos a tensiones enzimáticas y físicas que retira las células sin que se degraden o dejen residuos no deseados en el producto. Además, el material utilizado para producir cualquiera de los dispositivos descritos en la presente memoria puede ser sólido o tener un interior hueco o poroso. Además, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden ser producidos a partir de una única pieza de material, o de dos o más piezas que estén unidas  
 entre sí (por ejemplo, por unión química o física). El material puede ser rígido o flexible según lo requiera la aplicación.

20 El material utilizado para producir cualquiera de los dispositivos de cultivo de células descritos en la presente memoria puede incluir metales (por ejemplo titanio), óxidos metálicos (por ejemplo, películas de óxido de titanio), vidrio, borosilicato, fibras de carbono, materiales cerámicos, materiales biodegradables (por ejemplo, colágeno, gelatina, PEG, hidrogeles), y o polímeros. Los polímeros adecuados pueden incluir poliamidas, tales como GRILAMID® TR 55 (EMS-Grivory); policarbonatos tales como LEXAN® (Sabic) y Macrolon® (Bayer); polisulfonas como RADEL® PPSU (Solvay) y UDEL® PSU (Solvay); poliésteres como TRITAN® (Polyone) y PBT® HX312C; poliacetales como CELON® (Ticana) y poli(cloruro de vinilo).

25 En algunas realizaciones, al menos parte de los dispositivos pueden formarse utilizando un polímero de poliestireno. El poliestireno se puede modificar adicionalmente utilizando descarga de corona, plasma de gas (botellas sobre rodillos y tubos de cultivo), u otros procesos similares. Estos procesos pueden generar iones oxigenados muy energéticos que se injertan sobre las cadenas de poliestireno superficial de modo que la superficie se vuelva hidrófila y se cargue negativamente cuando se añade el medio (Hudis, 1974; Amstein y Hartman, 1975; Ramsey et al., 1984). Además, cualquiera de los dispositivos puede producirse al menos en parte a partir de combinaciones de  
 30 materiales. Los materiales de los dispositivos pueden ser recubiertos o tratados adicionalmente para soportar la fijación de las células. Tal recubrimiento y/o pretratamiento puede incluir el uso de colágeno I, colágeno IV, gelatina, poli-d-lisina, fibronectina, laminina, amina, y carboxilo.

35 En algunas realizaciones, los materiales utilizados para producir los dispositivos se seleccionan para permitir la fijación directa por células eucariotas. Los dispositivos descritos en la presente memoria se pueden producir utilizando una variedad de procesos de producción adecuados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los dispositivos se pueden producir mediante moldeo por inyección usando, por ejemplo, uno o más materiales poliméricos.

40 Además, las propiedades del material y la curvatura en la mayor parte o la totalidad del área superficial de las superficies bidimensionales se pueden seleccionar para controlar ciertas propiedades biológicas. Por ejemplo, el material puede ser seleccionado para que tenga un cierto módulo elástico y curvatura para producir las propiedades biológicas deseadas. Por ejemplo, módulos elásticos adecuados pueden ser de entre aproximadamente 0,1-100 kPa.

45 En varias realizaciones, los dispositivos tienen un tamaño seleccionado para facilitar la recogida (por ejemplo, mediante medios de filtración, recogida y eliminación), y minimizar el espacio vacío entre los dispositivos. Por ejemplo, los cuerpos tridimensionales pueden tener una dimensión máxima de entre aproximadamente 1 mm y 50 mm, entre aproximadamente 1 mm y 20 mm, o entre aproximadamente 2 mm y 10 mm. En ciertas realizaciones, los dispositivos son esféricos y tienen un diámetro máximo que está entre aproximadamente 1 mm y 50 mm, entre aproximadamente 1 mm y 20 mm o entre aproximadamente 2 mm y 10 mm.

50 En ciertas realizaciones, los dispositivos están configurados para evitar el daño o la retirada de las células de las superficies bidimensionales durante el cultivo. Por ejemplo, como se muestra en las Fig. 1A-8B, los dispositivos pueden incluir aberturas 16, 26, 16', 26' y 76, y las superficies bidimensionales se encuentran dentro de las aberturas. En varias realizaciones, las múltiples superficies bidimensionales están distanciadas entre sí a una distancia seleccionada para evitar el contacto de objetos adyacentes al cuerpo tridimensional con el crecimiento de las células en las múltiples superficies bidimensionales. En concreto, las aberturas 16, 26, 16', 26' o 76 pueden tener  
 55 un tamaño tal que las superficies bidimensionales no entrarán en contacto con los dispositivos adyacentes dentro de un sistema de cultivo y/o no entrarán en contacto con la pared de un contenedor o recipiente de cultivo. Como tal, el crecimiento de las células en una sola capa a lo largo de las superficies bidimensionales no será perturbado por un contacto mecánico. Además, las superficies bidimensionales pueden estar distanciadas lo suficientemente lejos unas de otras para evitar el contacto entre las células en las superficies adyacentes.

En varias realizaciones, los dispositivos de cultivo de células de la presente descripción pueden estar configurados para proporcionar una relación deseada entre área superficial y volumen. Por ejemplo, la relación entre área superficial y volumen de cualquiera de los dispositivos de cultivo de células descritos en la presente memoria puede estar entre aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y 30 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>, entre aproximadamente 5 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y 20 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>, o entre aproximadamente 10 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y 15 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>. En otras realizaciones, la relación entre área superficial y volumen puede variar a aproximadamente 50, 100, 200, 500 o 1000 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.

En varias realizaciones, los dispositivos descritos en la presente memoria pueden además estar recubiertos con uno o más recubrimientos. Los recubrimientos adecuados se pueden seleccionar para controlar la fijación de las células o cambios en la biología celular. Los recubrimientos adecuados pueden incluir, por ejemplo, péptidos, proteínas, carbohidratos, ácido nucleico, lípidos, polisacáridos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, hormonas, moléculas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular, polímeros naturales, enzimas, anticuerpos, antígenos, polinucleótidos, factores de crecimiento, polímeros sintéticos, polilisina, fármacos y/u otras moléculas o combinaciones o fragmentos de las mismas.

Además, en varias realizaciones, las superficies de los dispositivos descritos en la presente memoria pueden ser tratadas o, de otro modo, alteradas. Para el control de la fijación de las células y/u otras propiedades biológicas. Las opciones para el tratamiento de las superficies, que incluye el tratamiento químico, el tratamiento con plasma, y/o el tratamiento de corona. Además, en varias realizaciones, los materiales pueden ser tratados para introducir grupos funcionales en o sobre el material, que incluye grupos que contienen hidrocarburos, oxígeno y nitrógeno. Además, en varias realizaciones, el material puede ser producido o alterado para que tenga una textura que facilite la fijación de las células o el control de otras propiedades celulares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los materiales utilizados para producir los dispositivos de cultivo de células tienen una rugosidad en una escala de nanómetros o micrómetros que facilita la fijación de las células y/o controla otras propiedades celulares.

De acuerdo con varias realizaciones, se proporciona un sistema para el cultivo de células. El sistema puede comprender un contenedor y un grupo de cuerpos tridimensionales. Los cuerpos tridimensionales pueden comprender múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia de cada cuerpo tridimensional hacia un interior de cada cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales.

La Fig. 9 es una vista en perspectiva de un sistema 100 para el cultivo bidimensional de células, de acuerdo con ciertas realizaciones. Como se muestra, el sistema 100 incluye un contenedor 110 y uno o más dispositivos de cultivo de células 110 que se puede colocar dentro del contenedor 100, junto con medios 120 y/u otros materiales que permitan el crecimiento bidimensional de las células en la superficie del contenedor 110.

Como se muestra, el contenedor 100 incluye un frasco de cultivo de células común que tiene una abertura 130 para la introducción de células, dispositivos de cultivo de células 110, medios y/u otros materiales. Se comprenderá, sin embargo, que pueden seleccionarse otros contenedores. Por ejemplo, el contenedor puede ser mucho más grande, por ejemplo, seleccionado para contener docenas, cientos, miles, cientos de miles, o millones de dispositivos de cultivo de células. El tamaño y la configuración específicos se pueden seleccionar basándose en la cantidad de células que se cultivarán y/u otros criterios, tales como la necesidad de sistemas integrados para el control de las condiciones de cultivo como temperatura, pH, niveles de gases circundantes, etc.

En varias realizaciones, el sistema puede incluir un contenedor biorreactor tal como un reactor de lecho empaquetado, un reactor fluidizado, o un reactor de suspensión. Por ejemplo, el sistema puede incluir uno o más de los dispositivos que permiten el crecimiento bidimensional, que luego se puede colocar en el contenedor de un biorreactor. Ejemplos de tales biorreactores incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario (biorreactor de lecho empaquetado) y un biorreactor de lecho fluidizado.

Un ejemplo de un biorreactor adecuado es el biorreactor Celligen (New Brunswick Scientific), que es capaz de expansión de las células adherentes en condiciones controladas (por ejemplo, pH, temperatura y niveles de oxígeno) y con perfusión constante del medio de crecimiento de las células. Además, los cultivos celulares pueden ser monitorizados para detectar niveles de concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio. La tasa de consumo de glucosa y la tasa de formación de lactato de las células adherentes permiten medir la tasa de crecimiento de las células y determinar el momento de la cosecha.

Otros biorreactores tridimensionales que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de tanque agitado continuo, donde se alimenta continuamente un medio de cultivo en el biorreactor y el medio usado se extrae continuamente, para mantener un estado estacionario constante en el tiempo dentro del biorreactor. El biorreactor de tanque agitado se puede utilizar con lecho fluidizado (soportes en suspensión) o con una cesta de lecho fibroso (que está disponible por ejemplo, de New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.), un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de aire comprimido, donde el aire es alimentado típicamente por la parte inferior de un tubo de aspiración central que fluye hacia arriba mientras se forman burbujas, desprendiéndose gases de escape por la parte superior de la columna, un biorreactor con espumas poliactivas [como se describe en Wendt, D. et al.,

Biotechnol Bioeng 84: 205-214, (2003)], unos andamios porosos en un biorreactor de perfusión de flujo radial [como se describe en Itagawa et al., *Biotechnology and Bioengineering* 93(5): 947-954 (2006)], un biorreactor de flujo radial con andamio o soportes, un biorreactor de fibra hueca, y microsopores. Otros biorreactores, que pueden utilizarse con los dispositivos y el sistema descritos por la presente, se describen en las patentes de EE.UU. n° 6.277.151; 6.197.575; 6.139.578; 6.132.463; 5.902.741; y 5.629.186.

La presente descripción proporciona también métodos para el cultivo de células utilizando cualquiera de los dispositivos o sistemas discutidos en la presente memoria. De acuerdo con diversas realizaciones, el método puede comprender la selección de un grupo de células eucariotas y poner en contacto las células eucariotas con al menos un cuerpo tridimensional, teniendo al menos el cuerpo tridimensional múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior de al menos un cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales. En varias realizaciones, los dispositivos tienen una dimensión máxima que es menor que aproximadamente 50 mm y/o una relación del área superficial frente al volumen de entre aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 1.000 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.

Además, se comprenderá que diversas etapas del proceso se pueden realizar para controlar o mejorar la fijación y el crecimiento de las células. Por ejemplo, las células pueden ponerse en contacto con los cuerpos tridimensionales mediante la colocación de las células y de los cuerpos dentro de un contenedor o recipiente de cultivo junto con medios de cultivo. Además, las células y/o los medios pueden mezclarse o, de otro modo, hacer que se muevan, por ejemplo, girando el contenedor, revolviendo el medio de cultivo (por ejemplo, agitando), y suministrando flujo de fluido dentro y fuera del contenedor.

Ejemplos no limitantes de medios de cultivo base útiles en el cultivo utilizando los dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria incluyen Medio Esencial Mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (exento de seroalbúmina bovina), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, Medio BGJ (con y sin modificación de Fitton-Jackson), Medio Basal de Eagle (BME-con la adición de base de sal de Earle), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, Medio de Eagle con la Modificación de Glasgow (GMEM), Medio L-15 de Leibovitz, Medio McCoy 5A, Medio MI 99 (M199E-con base de sal de Earle), Medio MI 99 (M199H-con base de sal de Hank), Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM-E-con base de sal de Earle), Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM-H-con base de sal de Hank) y Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre muchos otros, incluidos medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB75261, MAB 8713, DM 145, Williams' G, Neuman y Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferido para uso en la invención es DMEM. Estos y otros medios de cultivo útiles están disponibles de GIBCO, Grand Island, N.Y., EE.UU. y Biological Industries, Bet HaEmek, Israel, entre otros. Varios de estos medios se resumen en *Methods in Enzymology*, Volumen LVIII, "Cell Culture", pág. 62-72, editado por William B. Jakoby y Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

El medio puede ser suplementado con suero tal como suero fetal de bovino o humano u otra especie, y, opcional o alternativamente, factores de crecimiento, vitaminas (por ejemplo, ácido ascórbico), citocinas, sales (por ejemplo, B-glicerofosfato), esteroides (por ejemplo, dexametasona) y hormonas, por ejemplo, la hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor de estimulación de colonias de macrófagos, ligando de c-kit/factor de células madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea en concentraciones de entre niveles del picogramos/ml a miligramos/ml.

Después del crecimiento de las células utilizando los dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria, las células se pueden cosechar en varias formas diferentes. Por ejemplo, las células se pueden cosechar lavando con medios adecuados y/o mediante el cosechado a base de vibraciones, como se describe a continuación.

Se reconoce además que al medio de cultivo se pueden añadir componentes adicionales. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células.

#### Ejemplo 1

Se evaluó la idoneidad del cultivo de células utilizando diversos soportes, como se describe en la presente memoria. Células frescas o congeladas PD051010 p.3/2 se cultivaron con DMEM completo en una incubadora humidificada. Las células se cultivaron con soportes moldeados por inyección producidos a partir de diversos materiales poliméricos o frascos, como se identifica a continuación. Se variaron el material, la forma y la configuración, los tratamientos superficiales, y la textura de la superficie, como se describe en detalle a continuación y/o se indica en las figuras. Se midieron la tasa de crecimiento y la eficiencia de fijación de las células utilizando diferentes soportes, y los resultados se resumen a continuación.

La Fig. 10 es un gráfico de barras que muestra los resultados del cultivo de las células en frascos de 175 cm<sup>2</sup> o

utilizando dispositivos de cultivo bidimensional de la presente descripción. La Fig. 11 es un gráfico de barras que muestra el número de duplicación de la población de células cultivadas en frascos de 175 cm<sup>2</sup> o utilizando dispositivos de cultivo bidimensional de la presente descripción. Los resultados mostrados en las Fig. 10-11 se basan en el cultivo de células frescas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de LEXAN® moldeado por inyección con una textura lisa de la superficie y que tiene una configuración como se muestra en las Fig. 1A-1B. Como se muestra en las figuras, la cantidad de células obtenidas y el número de duplicación celular fueron similares utilizando dispositivos de cultivo de células en lugar de frascos.

La Fig. 12 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando dispositivos de cultivo bidimensional. Los resultados mostrados en la Fig. 12 se basan en el cultivo de células congeladas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de LEXAN® moldeado por inyección con una textura rugosa de la superficie y que tiene una configuración como se muestra en las Fig. 1A-1B. La Fig. 13 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando dispositivos de cultivo bidimensional. Los resultados mostrados en la Fig. 13 se basan en el cultivo de células congeladas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de GRILAMID® moldeado por inyección con una textura rugosa de la superficie y que tiene una configuración como se muestra en las Fig. 1A-1B.

La Fig. 14 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando varios dispositivos de cultivo bidimensional recubiertos. Los resultados mostrados en la Fig. 14 se basan en cultivo de células congeladas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de LEXAN® o GRILAMID® moldeados por inyección (como se indica en la figura) que tienen una textura lisa de la superficie y que tienen una configuración como se muestra en las Fig. 2A-2D. Además, como se muestra, la Fig. 14 demuestra el efecto del tratamiento de la superficie utilizando proteínas como medio de crecimiento y/o polilisina en soportes de LEXAN® o GRILAMID®. Como se muestra, el tratamiento con polilisina y el tratamiento con proteínas como medio de crecimiento aumentan generalmente la eficiencia de la fijación celular.

La Fig. 15 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando dispositivos de cultivo bidimensional recubiertos. Los resultados mostrados en la Fig. 15 se basan en el cultivo de células congeladas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de GRILAMID® moldeado por inyección con una superficie rugosa que se preincubó con proteínas como medio de crecimiento y que tiene una configuración como se muestra en las Fig. 1A-1B.

La Fig. 16 es un gráfico de barras que ilustra la eficiencia de la fijación celular para el crecimiento de células utilizando varios dispositivos de cultivo bidimensional recubiertos con o sin tratamiento de la superficie de los dispositivos con plasma. Los resultados mostrados en la Fig. 16 se basan en el cultivo de células congeladas PD051010 p.3/2 utilizando dispositivos de cultivo de células formados de LEXAN® o GRILAMID® moldeados por inyección (como se indica en la figura) con una textura lisa de la superficie y que tienen una configuración como se muestra en las Fig. 2A-2D. Además, como se muestra, la Fig. 16 demuestra el efecto del tratamiento de la superficie utilizando proteínas como medio de crecimiento y/o el tratamiento con plasma en soportes LEXAN® o GRILAMID®. Como se muestra, el tratamiento con plasma y el tratamiento con proteínas como medio de crecimiento aumenta generalmente la eficiencia de la fijación celular.

#### Ejemplo 2

En este experimento, el crecimiento de las células en dispositivos de cultivo bidimensional se cosecharon utilizando un método de cosecha basado en vibraciones como se describe en el documento PCT/IB2012/000933, presentado el 15 de abril de 2012. Los dispositivos de cultivo bidimensional se prepararon suspendiendo 220 de los dispositivos en medio esencial mínimo de Dulbecco ("DMEM") y sembrándolos con las células estromales adherentes derivadas de placenta humana a una concentración de 3.000 células por cm<sup>2</sup>. Los dispositivos se incubaron durante la noche con un suave mezclado para permitir que las células se fijen a los dispositivos. Después de la incubación durante la noche 90-100 de los dispositivos sembrados se transfirieron a un frasco rotatorio de 250 ml que contiene 150 ml de DMEM completo y se incubaron tres días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Después de tres días de crecimiento, las células se cosecharon de los dispositivos mediante vibración de la siguiente manera. Los frascos y tubos rotatorios se retiraron de la incubadora y diez de los dispositivos de cultivo se retiraron para una tinción de las células. La eficiencia de la cosecha se determinó por tinción de las células y recuentos de las células. El medio de cultivo se desechó y los dispositivos restantes se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en un contenedor relleno con 800 ml de solución TrypLE precalentada. Los dispositivos se hicieron vibrar inmediatamente después durante 5 segundos a 5 Hz, 5 minutos a 1 Hz y 30 segundos a 5 Hz (todo a una amplitud de 25 mm). Después de la vibración, se retiraron otros diez dispositivos para la tinción celular. A los dispositivos restantes se añadieron 200 ml de FBS y el medio se transfirió a botellas de centrifuga de 2.500 ml. Las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el sedimento celular se resuspendió, y se realizaron recuentos de células.

Se demostró que la cosecha por vibración era un medio eficaz para la recuperación de las células de estos dispositivos, recuperándose 7,8 x 10<sup>6</sup> células. Se demostró que las células tenían un 95 % de viabilidad mediante

exclusión con colorante azul tripán.

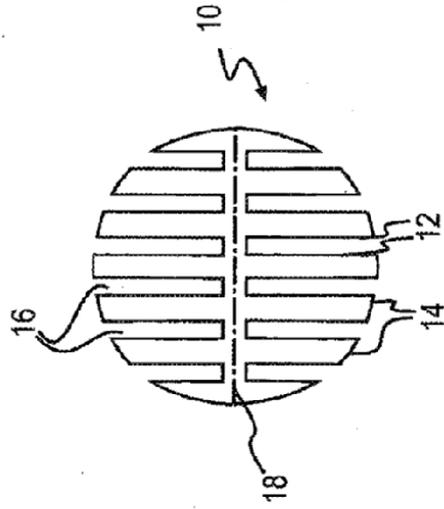
Ejemplo 3

- 5 En otro experimento, MSC de placenta (PD020112), tejido adiposo (PLA25) y médula ósea (BM122) se sembraron en frascos de 175 cm<sup>2</sup>, 0,5 x 10<sup>6</sup> células/frasco, en un medio de crecimiento DMEM completo (DMEM As22320 n° de Cat. 041-96417A de GIBCO, 10 % de FBS n° de Cat. S0115 de BIOCHROM, 1 % de L-glutamina n° de Cat. G7513 de SIGMA). Las células se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C durante 4 días. Cada tipo de célula se cosechó utilizando TrypLE (n° de Cat. 12563-029 de GIBCO). Cada tipo de célula se sembró después tanto en frascos de 175 cm<sup>2</sup> como en soportes 2D, en DMEM completo, en duplicados. A continuación, se sembraron 0,5 x 10<sup>6</sup> células en frascos y se sembraron 1 x 10<sup>6</sup> células en 90 soportes 2D, en viales de 20 ml. Los frascos se incubaron en una incubadora a 37 °C. Los viales de los soportes 2D se rotaron durante 24 horas para la fijación y después se transfirieron a un frasco con cesta rotatorio de 250 ml. Los rotores se colocaron sobre un agitador en incubadora a 37°C durante otros 3 días, a una velocidad de agitación de 40 rpm. Después de la duración total del cultivo de 4 días las células se cosecharon de los frascos y de los soportes 2D mediante TrypLE y se contaron mediante un contador de células Casy.
- 10
- 15 La Fig. 17 muestra un gráfico de barras de la comparación de la PDD (duplicación de la población por día) entre frascos de 175 cm<sup>2</sup> y soportes 2D. Las PDD calculadas muestran tasas de crecimiento comparables de la placenta, de la médula ósea y de las células adiposas entre soportes 2D y frascos.

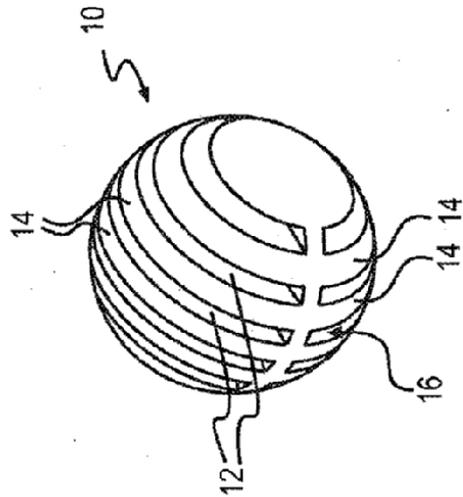
**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de cultivo de células, que comprende:
- 5 un cuerpo tridimensional que comprende múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior del cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde el cuerpo tridimensional tiene
- 10 (a) una dimensión máxima que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm; o  
(b) una relación del área superficial frente al volumen entre aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 1.000 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.
2. Un dispositivo de cultivo de células, que comprende:
- 15 un contenedor; y  
un grupo de cuerpos tridimensionales, comprendiendo cada cuerpo tridimensional:
- 20 múltiples superficies bidimensionales que se extienden hacia dentro desde una periferia del cuerpo tridimensional hacia un interior del cuerpo tridimensional, en donde las múltiples superficies bidimensionales están configuradas para soportar el crecimiento de células eucariotas en una sola capa sobre al menos una mayoría de o la totalidad del área superficial de las múltiples superficies bidimensionales, y en donde los cuerpos tridimensionales tienen:
- 25 (a) una dimensión máxima que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm; o  
(b) una relación entre el área superficial y el volumen entre aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 1.000 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 o el sistema de la reivindicación 2, en donde las múltiples superficies bidimensionales:
- 30 (a) comprenden una pluralidad de nervaduras que se extienden desde un interior del cuerpo tridimensional hacia la periferia del cuerpo tridimensional;  
(b) comprenden una pluralidad de nervaduras que se extienden sustancialmente paralelas entre sí desde un interior del cuerpo tridimensional hacia la periferia del cuerpo tridimensional;  
(c)
- 35 (i) tienen una forma curvada y/o comprenden al menos una nervadura en forma de espiral que se extiende desde un interior del cuerpo tridimensional hacia la periferia del cuerpo tridimensional; o  
(ii) son sustancialmente planas en al menos una parte de su área superficial; y/o
- (d) comprenden una pluralidad de nervaduras que se extienden desde un núcleo central hacia una periferia del cuerpo tridimensional.
4. El dispositivo de las reivindicaciones 1 ó 3 o el sistema de reivindicaciones 2 ó 3, en donde el cuerpo tridimensional comprende uno al menos de forma sustancialmente esférica, de forma sustancialmente elipsoidal y de forma poliédrica irregular.
- 40 5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el material que forma las múltiples superficies bidimensionales comprende un material seleccionado de al menos uno de metales, vidrio, borosilicato, fibras de carbono, materiales cerámicos, colágeno, gelatina, hidrogeles y polímeros.
- 45 6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde el material que forma las múltiples superficies bidimensionales comprende al menos un polímero, en donde opcionalmente el polímero es:
- 50 (a) seleccionado de una poliamida, un policarbonato, una polisulfona, un poliéster, un poliacetal y poli(cloruro de vinilo);  
(b) una poliamida, o  
(c) un policarbonato.
- 55 7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-6 o el sistema de las reivindicaciones 2-6, en donde las múltiples superficies bidimensionales comprenden adicionalmente al menos un recubrimiento seleccionado para facilitar la fijación y el crecimiento de células eucariotas, en donde opcionalmente al menos un recubrimiento se selecciona de una proteína y polilisina.

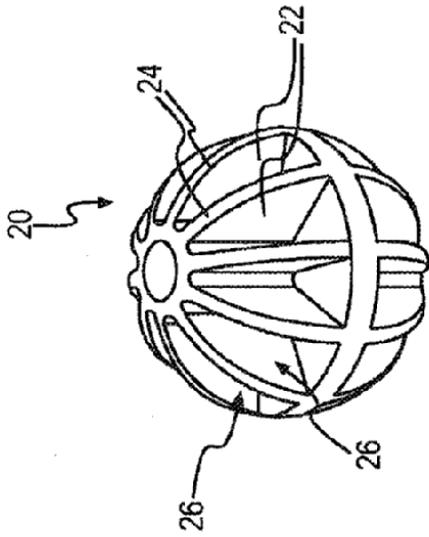
8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-7 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde las múltiples superficies bidimensionales se han sometido a un tratamiento superficial con plasma.
9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-8 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde las múltiples superficies bidimensionales comprenden un módulo y curvatura seleccionados para facilitar el crecimiento de células eucariotas.
10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-9 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde las células eucariotas comprenden al menos una de células madre, células dependientes de anclaje, células mesenquimales y células estromales.
11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-10 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde la relación entre el área superficial de las múltiples superficies bidimensionales y el volumen del cuerpo tridimensional está entre aproximadamente  $3 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y aproximadamente  $1.000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ , en donde opcionalmente la relación entre el área superficial de las múltiples superficies bidimensionales y el volumen del cuerpo tridimensional está entre  $10 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  y aproximadamente  $15 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .
12. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde el cuerpo tridimensional tiene una dimensión máxima entre 1 mm y 20 mm.
13. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-11 o el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde el cuerpo tridimensional tiene una dimensión máxima entre aproximadamente 2 mm y 10 mm, en donde opcionalmente el dispositivo es sustancialmente esférico y la dimensión máxima es un diámetro.
14. Un método de cultivar células, que comprende:  
seleccionar un grupo de células eucariotas; y  
poner en contacto las células eucariotas con, al menos, un cuerpo tridimensional definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-11 y 13.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la puesta en contacto de células eucariotas con, al menos, un cuerpo tridimensional comprende:  
(a) colocar las células y al menos un cuerpo tridimensional en un contenedor;  
(b) que comprende adicionalmente suministrar medio de cultivo a las células; y/o  
(c) que comprende adicionalmente causar movimiento de, al menos, un cuerpo tridimensional, en donde, opcionalmente, causar movimiento comprende:  
(i) girar o agitar el contenedor en el que está contenido al menos un cuerpo tridimensional; o  
(ii) proporcionar un flujo de medios en un contenedor en el que está contenido al menos un cuerpo tridimensional.
16. El método de la reivindicación 14, en donde al menos dicho cuerpo tridimensional está sumergido dentro de medio de cultivo dentro de un contenedor adecuado que está configurado para resistir la adhesión celular.



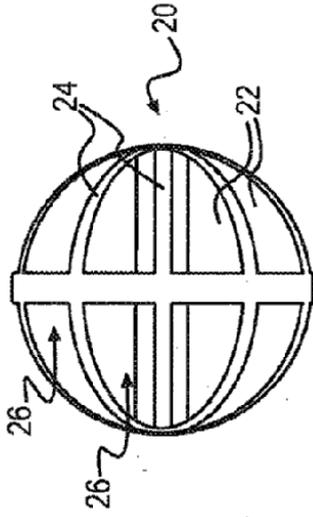
**FIG. 1B**



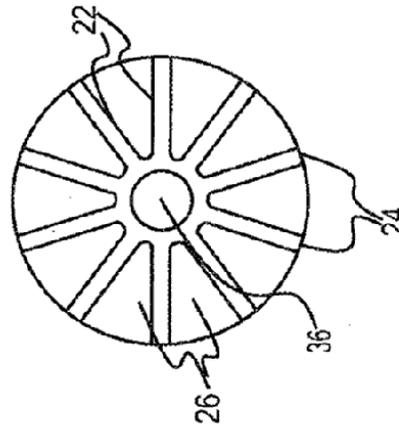
**FIG. 1A**



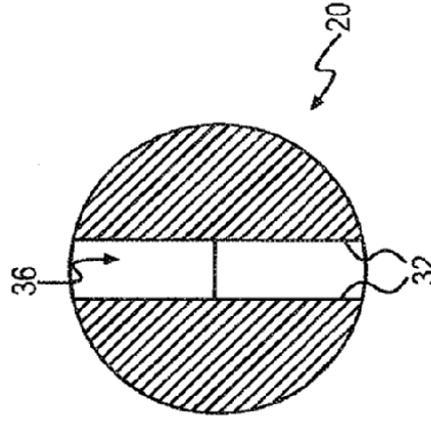
**FIG. 2A**



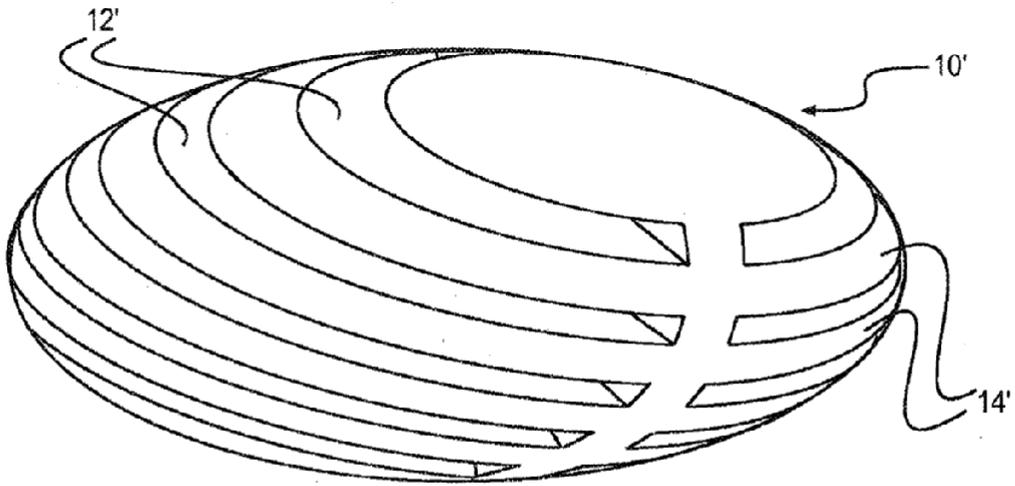
**FIG. 2B**



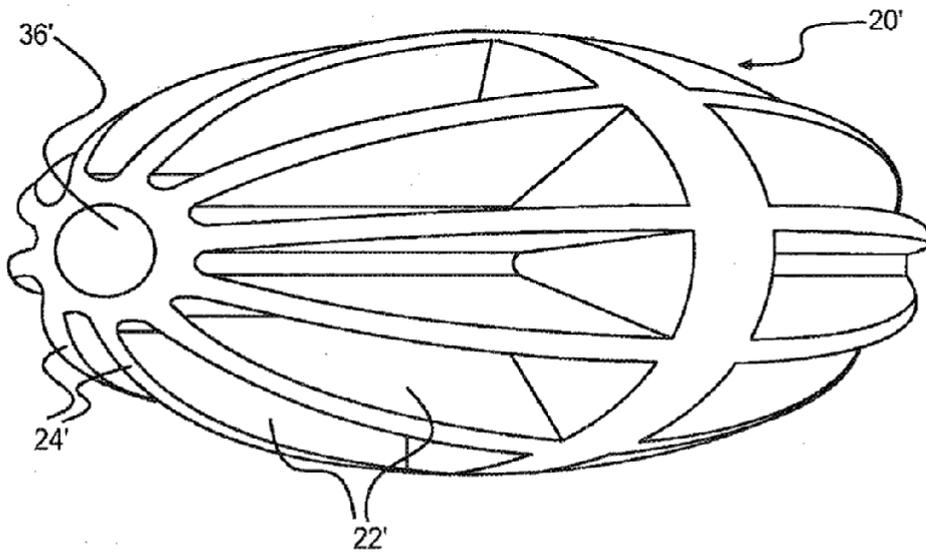
**FIG. 2C**



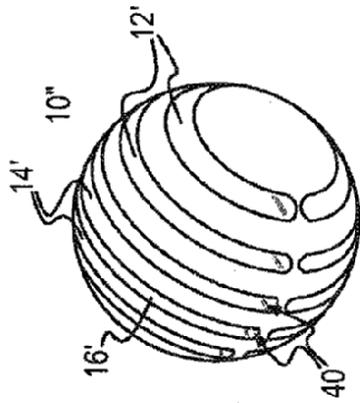
**FIG. 2D**



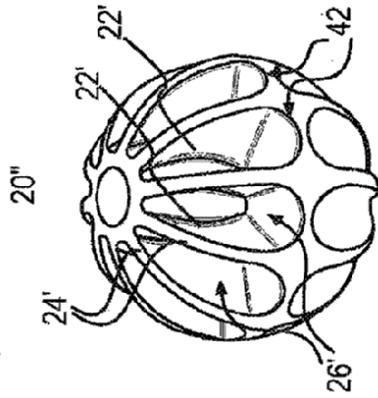
**FIG. 3A**



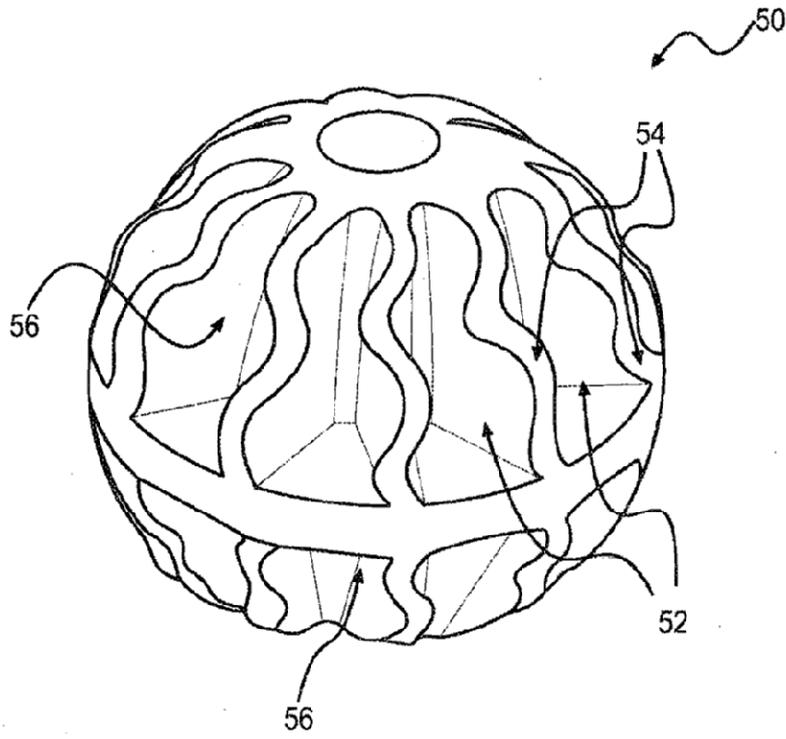
**FIG. 3B**



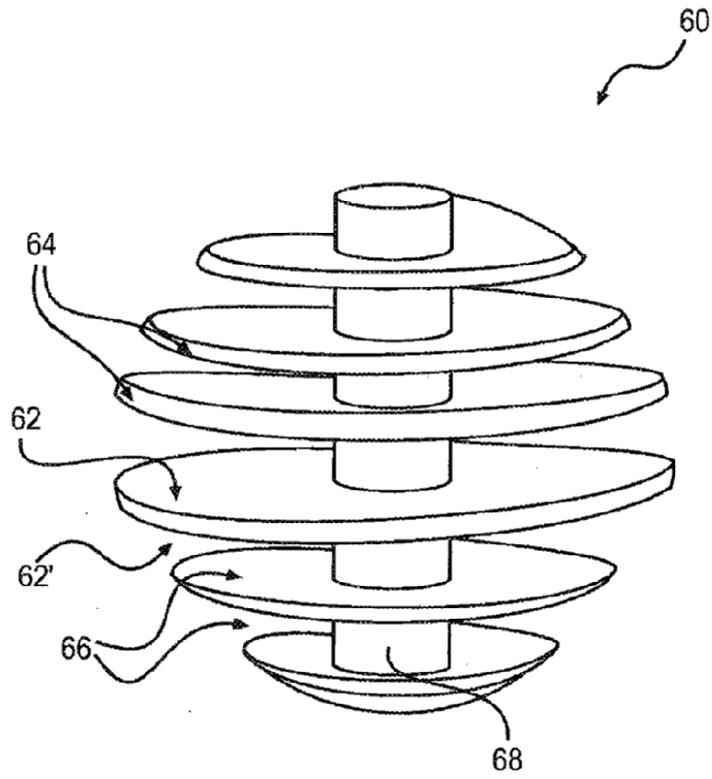
**FIG. 4A**



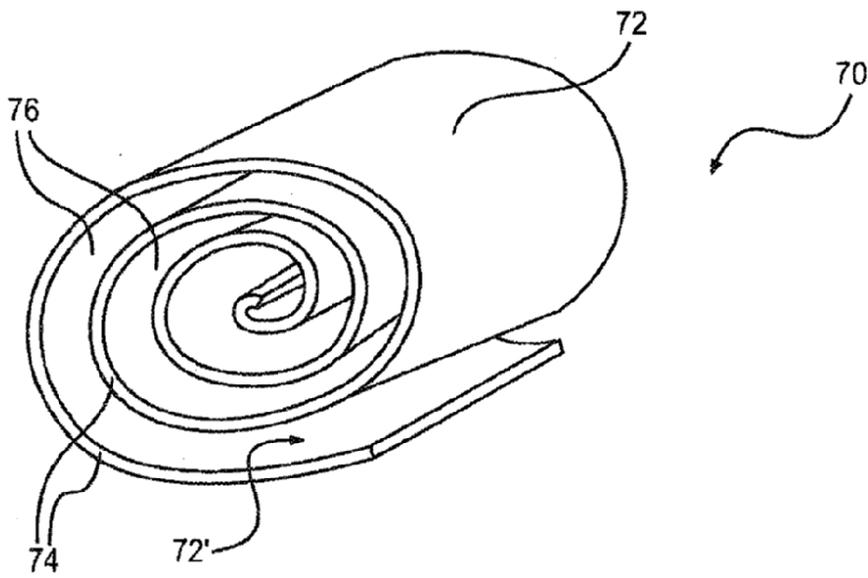
**FIG. 4B**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

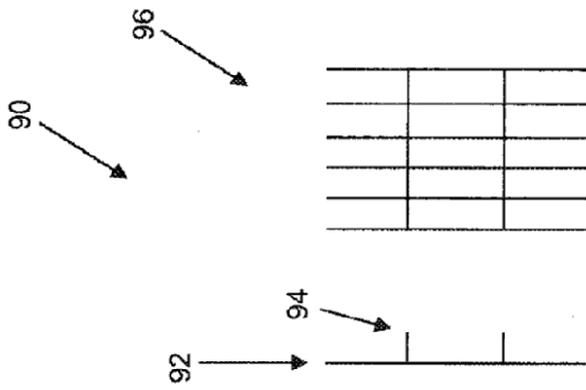


FIG. 8B

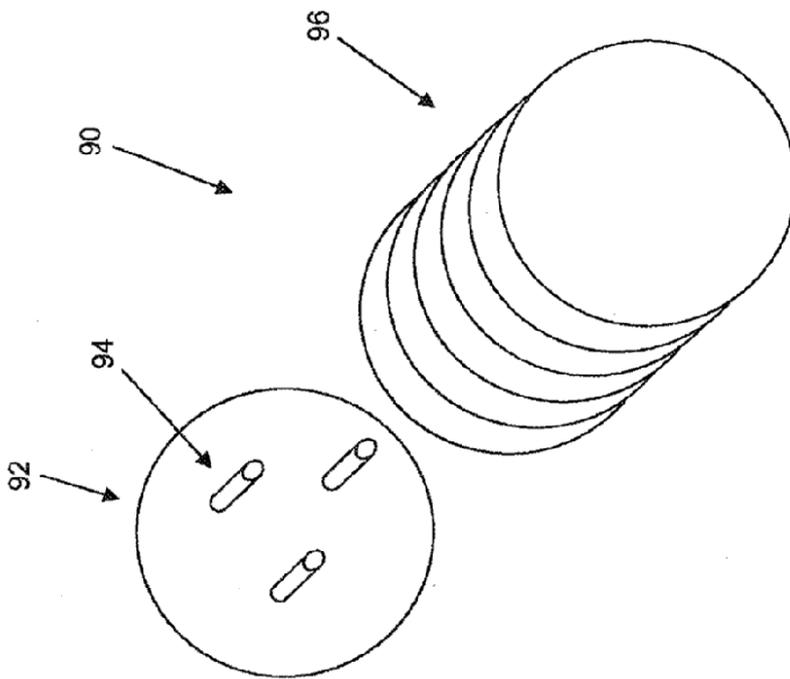
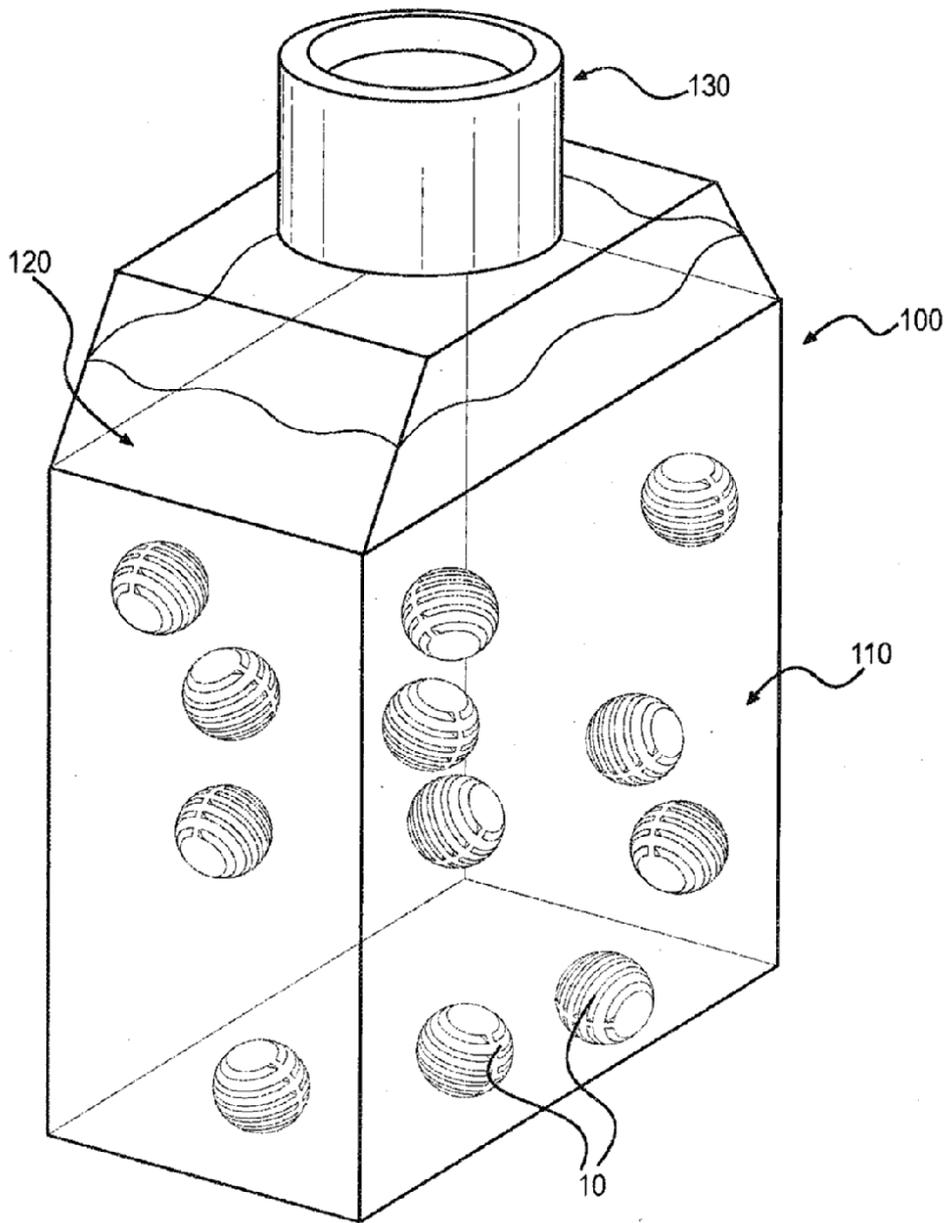
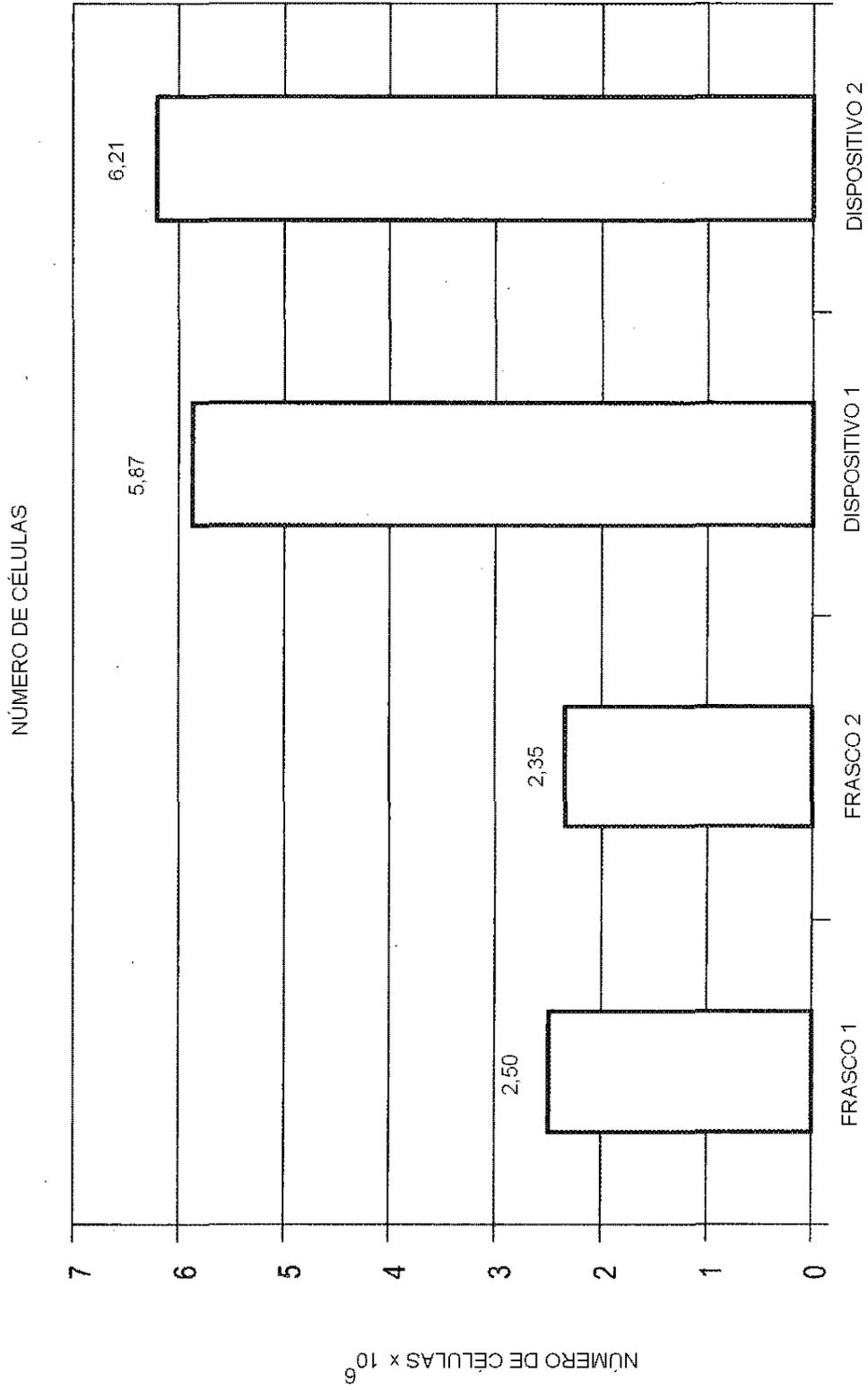


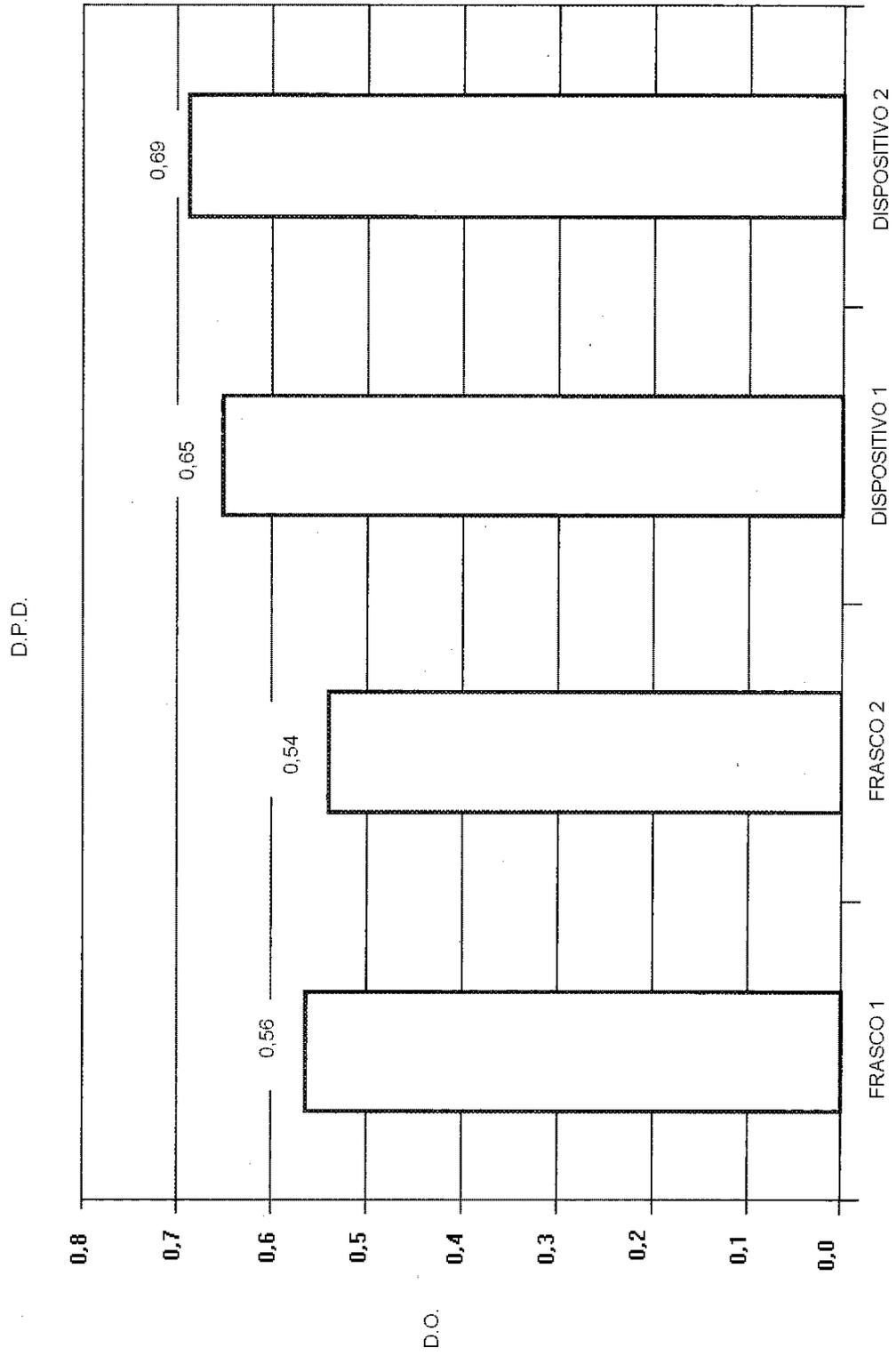
FIG. 8A



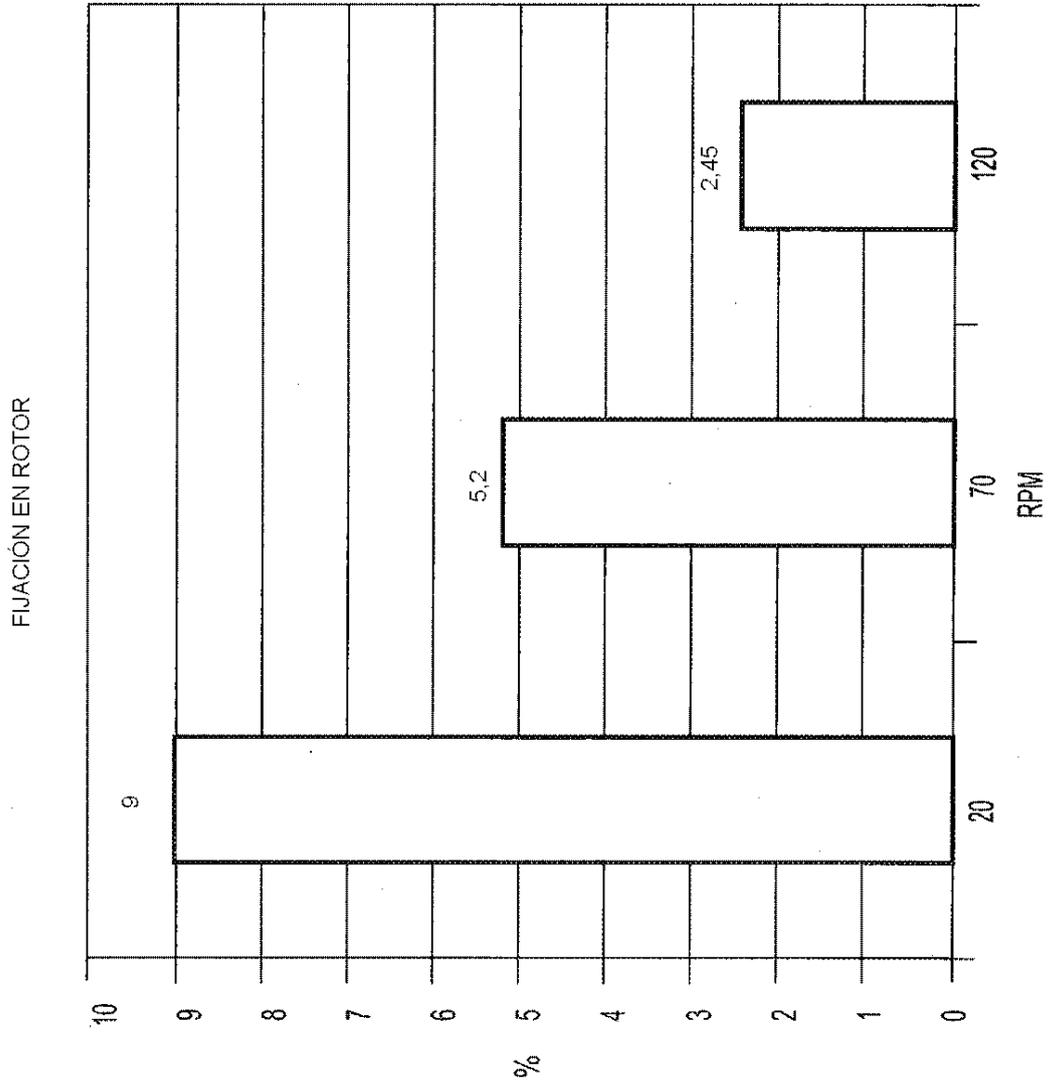
**FIG. 9**



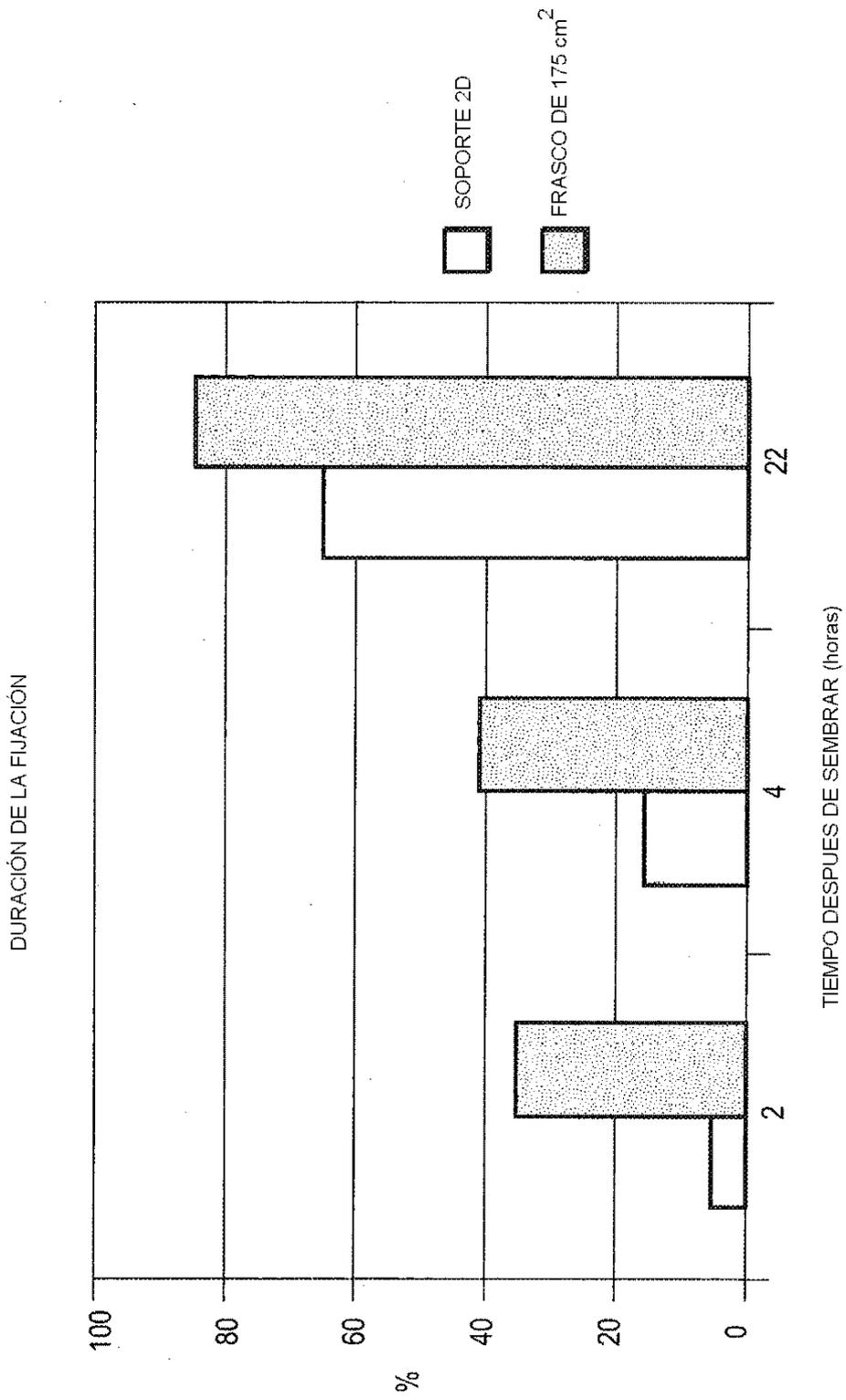
**FIG. 10**



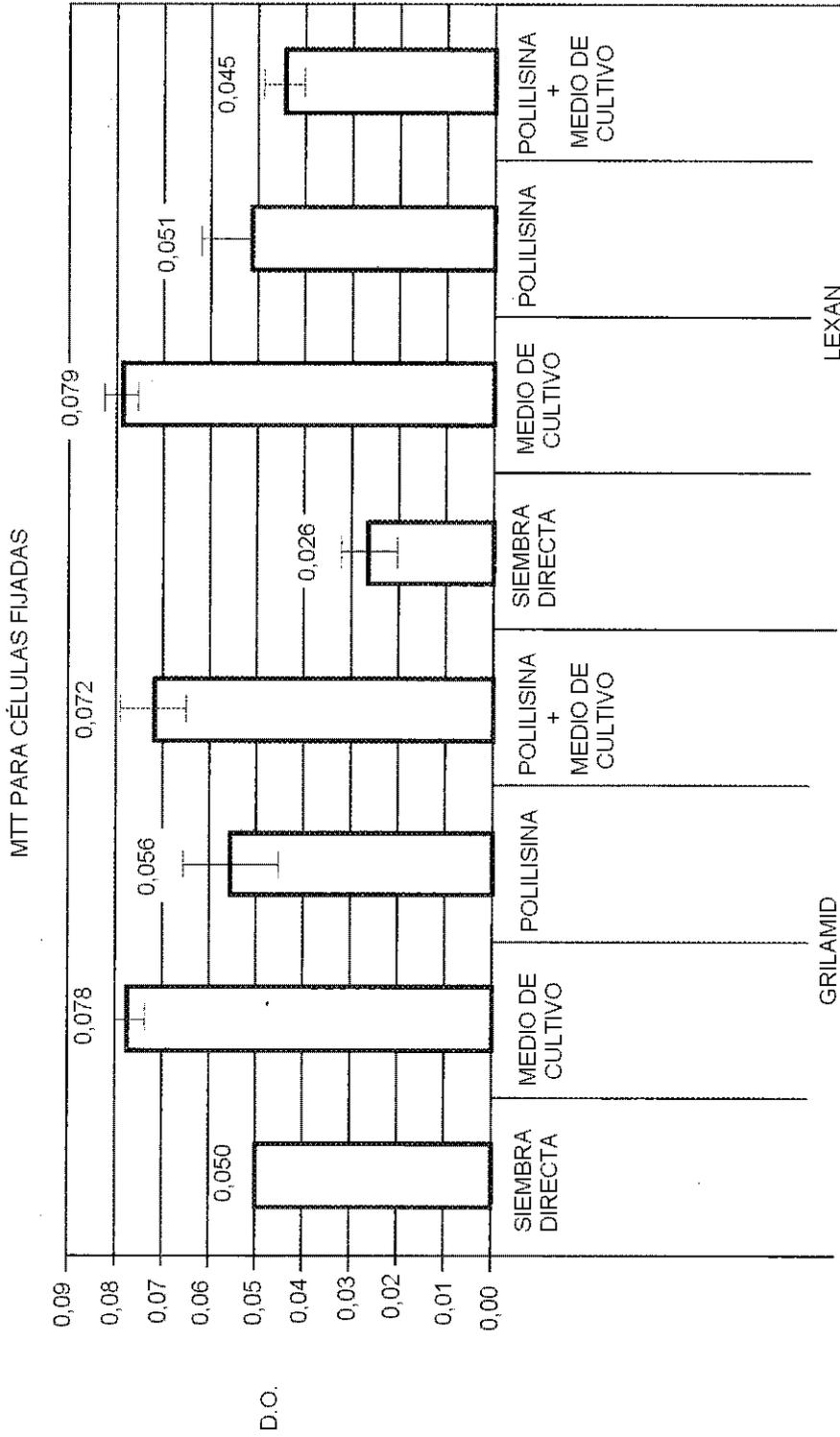
**FIG. 11**



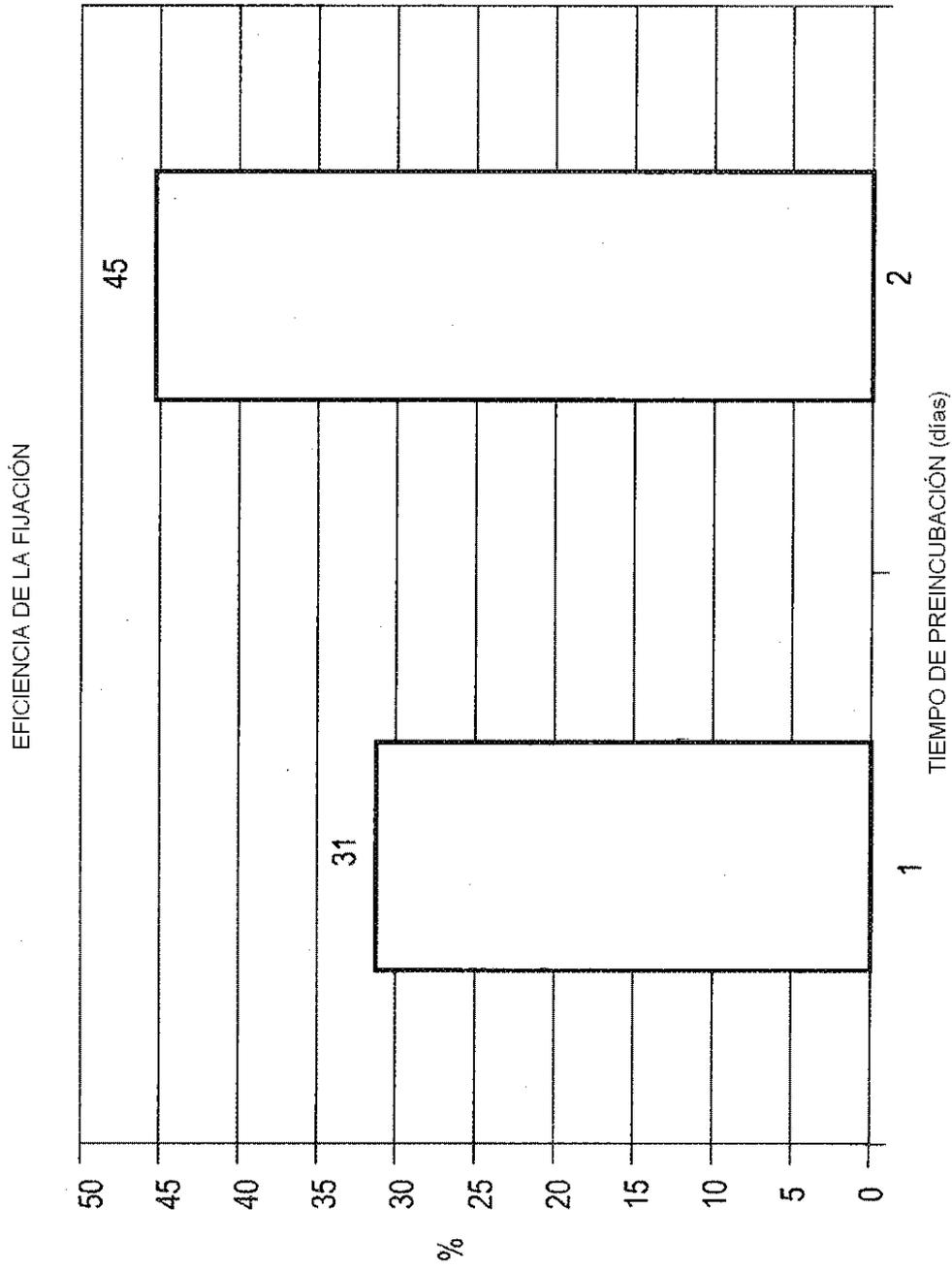
**FIG. 12**



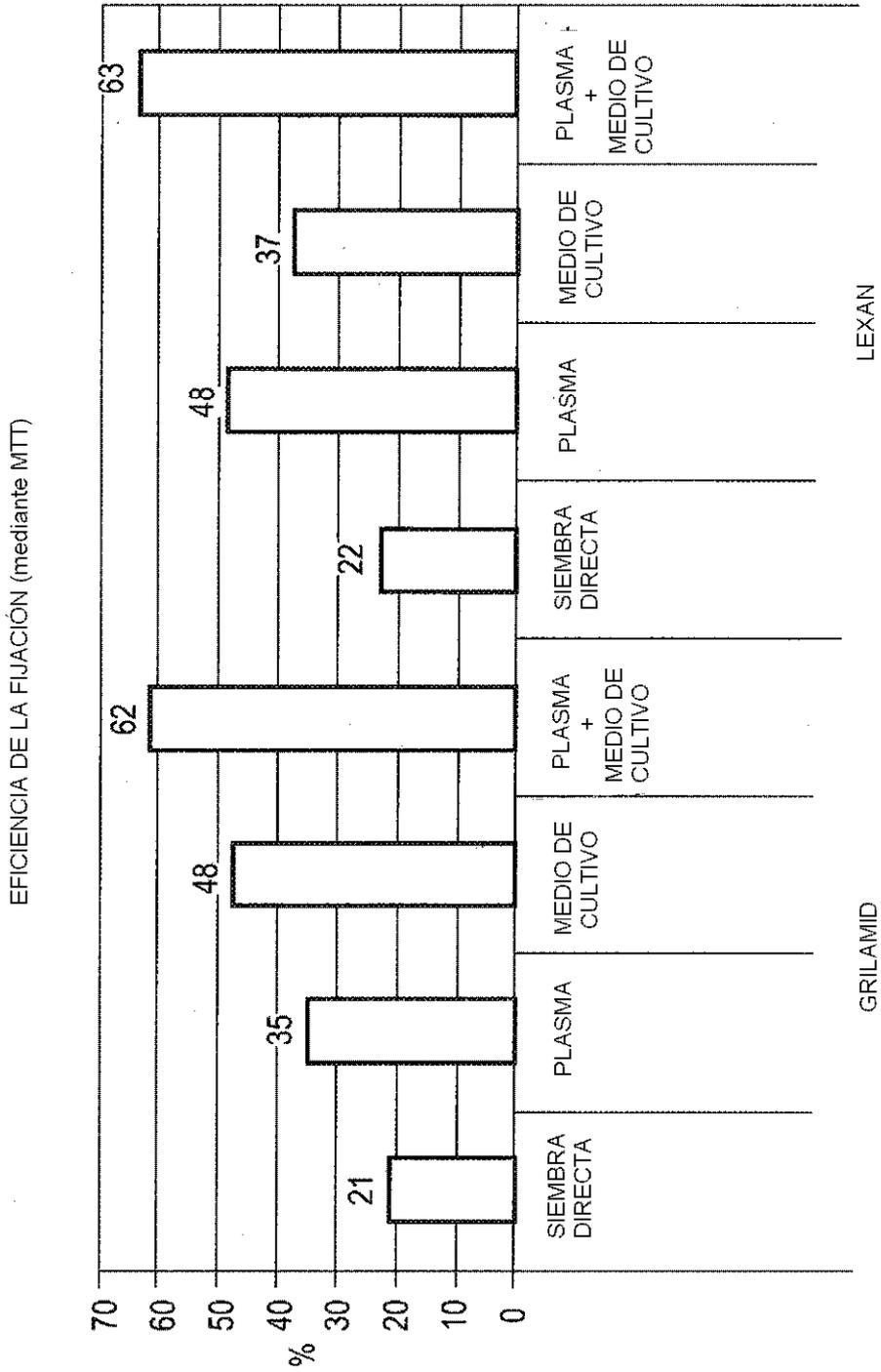
**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**



**FIG. 16**

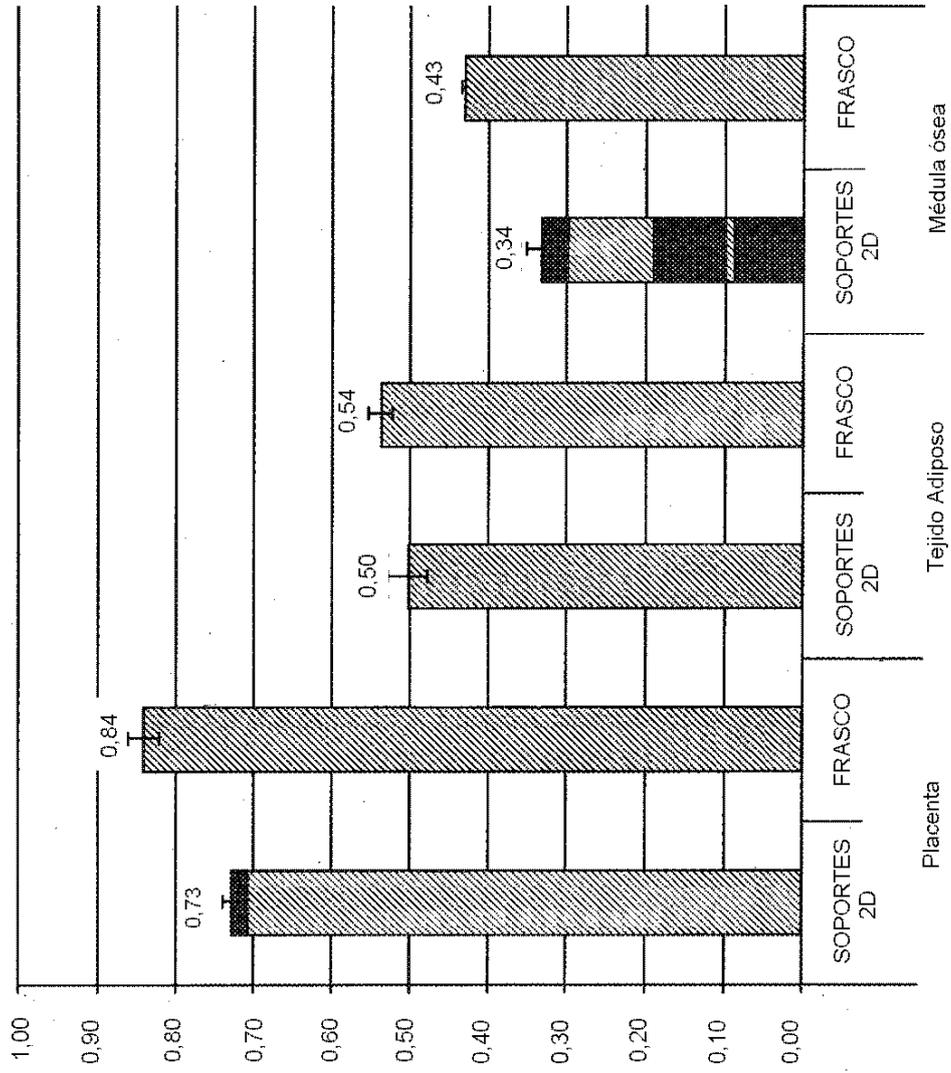


FIG. 17