

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 055**

51 Int. Cl.:

C12M 1/04 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/GB2012/052587**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12780267 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2768939**

54 Título: **Dispositivo para la expansión aséptica de células**

30 Prioridad:

21.10.2011 US 201161550246 P

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

25.01.2017

73 Titular/es:

**CELL MEDICA LIMITED (100.0%)
1 Canal Side Studios 8-14 St Pancras Way
London NW1 0QG, GB**

72 Inventor/es:

**KNAUS, RAINER, LUDWIG;
HOLMS, GAVIN;
NEWTON, KATY REBECCA;
CROMBIE, TINA, LESLEY y
PROVAN, ANDREW, ROY, MACLEOD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 598 055 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

Dispositivo para la expansión aséptica de células

La presente descripción se refiere a un sistema optimizado para cultivar asépticamente células para aplicaciones terapéuticas a una escala comercialmente viable, a métodos para fabricar dichos sistemas y a métodos para utilizar los sistemas para la preparación de células terapéuticas.

El documento WO 2005/035728 describe un sistema con una porción permeable a los gases para cultivar células. Este dispositivo está disponible en Wilson Wolf con la marca G-Rex Technology (por favor consulte el sitio web www.wilsonwolf.com/page/show/67596). La principal ventaja del sistema es que permite que sean proporcionados nutrientes y gases para que crezcan las células de modo que las células puedan crecer continuamente durante períodos de hasta 14 días sin ninguna intervención adicional, en particular: la membrana permeable a los gases permite el intercambio de CO₂ y O₂ y la disposición permite que sean empleados grandes volúmenes de medio, que proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento. La disposición se muestra en la Figura 1.

La principal limitación de la tecnología G-Rex es que es un sistema de fabricación abierto que no permite la inoculación y recolección de células ni la adición de nutrientes sin exposición al medio ambiente externo. Puesto que las células terapéuticas no se pueden esterilizar después de su producción, su fabricación tiene que realizarse en condiciones asépticas. De este modo las etapas de procesamiento "abierto" durante las cuales el producto está expuesto al medio ambiente externo se tienen que realizar bajo una campana de flujo laminar de aire que se haga funcionar en una sala blanca clasificada clase B de acuerdo con la clasificación de UE-GMP (US Fed. Std. 209e class 100,000, ISO 14644-1 class ISO7) para evitar la contaminación del producto con microbios y partículas. Las instalaciones con este tipo de tecnología de sala blanca, para un procesamiento abierto, son caras de construir, operar, mantener y controlar.

Igualmente importante es el hecho de que las etapas de la operación abierta requieren que sea manipulado un solo producto a la vez en el mismo espacio de la sala blanca para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, por tanto, el rendimiento del producto es limitado y este sistema de fabricación requiere que trabajen en paralelo múltiples salas blancas y equipos de producción para alcanzar altos volúmenes de salida de la producción. Para las empresas pequeñas y medianas, así como para los hospitales, la inversión de capital y los costes laborales son muy importantes sobre la base de unidad de producción.

Para resolver este problema los autores de la presente invención han proporcionado un sistema modificado para el cultivo de células que permite la preparación aséptica de células para uso en terapia, sin necesidad de un medio ambiente de sala blanca porque no se requieren etapas de procesamiento abierto.

Sumario de la invención

Por tanto, la presente invención proporciona un sistema cerrado adecuado para cultivar asépticamente células terapéuticas que comprende:

i) un recipiente que comprende:

una porción permeable a los gases adecuada para mantener el crecimiento celular y permitir el suministro de gases a las células durante el cultivo, y

al menos una pared adyacente a una base, en donde dicho recipiente define un volumen interno y estando adaptado dicho recipiente para contener un volumen de medio requerido para mantener las células durante el cultivo,

ii) un respiradero que comprende una conducción que define un orificio interior y un orificio exterior, distantes entre sí, en comunicación fluida uno con el otro, que permite equilibrar la presión durante el llenado del recipiente permitiendo que salgan los gases y durante el proceso de vaciado de las células permitiendo que entren los gases en el volumen interior, en donde la conducción se extiende desde el exterior del sistema cerrado a través de un elemento estructural del sistema, y se extiende en el volumen interno del recipiente y termina dentro con el orificio interior, y en donde el orificio interior está dispuesto para evitar el contacto con el medio del recipiente o en donde el orificio interior está cubierto con una membrana impermeable a los líquidos o una válvula antirretorno de líquidos, de manera que se minimice la exposición del orificio interior al líquido y, por tanto, el orificio interior no sea susceptible de ser obstruido por el líquido durante el llenado y vaciado del medio líquido, y en donde el orificio exterior puede estar unido a un filtro estéril,

iii) un conducto o conductos para la introducción aséptica de fluido y células en el recipiente,

un conducto o conductos para que salga el fluido del sistema sin exponer el sistema al medio ambiente externo, lo que permite que las células que han crecido en él salgan del sistema por gravedad cuando el sistema se orienta de forma que las células se pongan en comunicación fluida con el conducto de salida.

El sistema de acuerdo con la presente invención tiene ventajas significativas para la preparación comercial de

5 células para uso en terapia. En particular, es flexible y adaptable, requiere baja inversión de capital en el espacio de preparación y es robusto y de fácil fabricación. También elimina las etapas de procesamiento abierto y por tanto reduce aún más el riesgo de contaminación del producto con agentes patógenos y partículas. Además, se cree que el presente sistema satisface una necesidad no satisfecha actualmente y representa un verdadero avance en la reducción de la necesidad de instalaciones de salas blancas costosas para la preparación de células terapéuticas.

Ventajosamente, la presente invención permite la transformación de tecnología de sistemas abiertos existentes, tal como el sistema G-Rex, para proporcionar un sistema cerrado que permita la inoculación y recolección de células y el suministro de nutrientes sin exposición al medio ambiente externo.

10 Alternativamente, un sistema diseñado a la medida de acuerdo con la presente descripción puede ser fabricado específicamente para cultivar células terapéuticas, por ejemplo, un sistema mostrado en la Figura 7 u 8.

La presente descripción se extiende también a métodos para fabricar los sistemas descritos en la presente memoria y también al uso de los sistemas para cultivar células.

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1** muestra una representación esquemática del sistema G-Rex disponible comercialmente para el cultivo de células comercializado por Wilson Wolf.

Figura 2 es una representación esquemática de un recipiente que comprende una tapa con un respiradero y un conducto situado junto a él.

20 **Figura 3** es una representación esquemática de un recipiente de una sola pieza de acuerdo con la presente descripción que comprende un respiradero y un conducto situado junto a él en una pared de la unidad.

Figure 4 es una representación esquemática de un recipiente de una sola pieza de acuerdo con la presente descripción que comprende un respiradero y un conducto situados opuestos entre sí.

Figura 5 es una representación esquemática de un recipiente de una sola pieza de la presente descripción en donde el respiradero y el conducto están dispuestos perpendiculares uno respecto al otro.

25 **Figura 6** es una representación esquemática de un recipiente que comprende una tapa con un respiradero y un conducto situado junto a él, en donde el respiradero se extiende hacia abajo en el medio hacia la capa permeable a los gases. El orificio interior está cubierto por una membrana impermeable a los líquidos, tal como una membrana permeable a los gases que evita que el medio entre por el respiradero.

30 **Figura 7** es una representación esquemática de un recipiente de una sola pieza en forma de campana de acuerdo con la presente descripción que comprende un respiradero y un conducto situado junto a él en una pared de la unidad.

35 **Figura 8** es una representación esquemática de un recipiente de una sola pieza en forma de campana de acuerdo con la presente descripción que comprende un respiradero y un conducto situado junto a él en una pared de la unidad y orientado para permitir el acceso del medio y las células al conducto de salida.

Figura 9 es una representación esquemática de cómo un sistema de acuerdo con la descripción se puede llenar y recolectar.

Figura 10 es una representación esquemática de un sistema de acuerdo con la presente descripción.

40 **Figura 11** son dibujos detallados de un sistema como el mostrado en la Figura 10.

Figura 12 es una representación esquemática de cómo se orienta el sistema para recolectar las células cultivadas en él.

Descripción detallada de la invención

45 Un sistema cerrado como se emplea en la presente memoria permite la entrada y salida de materiales, incluyendo líquidos, células y gases, sin exposición al medio ambiente externo.

Un sistema cerrado de acuerdo con la presente descripción se puede emplear sin embargo como un sistema abierto si el usuario final decide no seguir los protocolos apropiados cuando introduce o extrae material del sistema. Sin embargo, los sistemas descritos en la presente memoria están dispuestos y adaptados para ser adecuados para uso como un sistema cerrado.

50 El cultivo de células como se emplea en la presente memoria se pretende que se refiera al crecimiento y/o

diferenciación de células *in vitro*.

El crecimiento de células como se emplea en la presente memoria se refiere a aumentar el número de células diana en una población de células.

5 El documento WO 2005/035728, incorporado en la presente memoria como referencia, describe cómo preparar un recipiente permeable a los gases. En una realización se emplea material de silicona permeable a los gases.

En una realización la base soporta el material permeable a los gases.

En una realización, la base consiste sustancialmente en material permeable a los gases, es decir, la capa de material permeable a los gases y la base son de hecho la misma entidad.

10 En una realización, la capa permeable a los gases está situada en una pared u otro elemento de la estructura del recipiente.

En una realización, sustancialmente todo el recipiente está fabricado de un material permeable a los gases, por ejemplo, con una resistencia estructural suficiente para retener el contenido durante el cultivo.

En una realización, la membrana permeable a los gases tiene un área superficial de, por ejemplo 5 a 200 cm², tal como 5 a 100 cm², en particular 10, 30 o 50 cm², tal como 10 cm².

15 Una base como se emplea en la presente memoria es un elemento estructural del recipiente.

Cuando las células están en el proceso de ser cultivadas, generalmente los sistemas se orientarán (o se colocaran en posición vertical) sobre la base, por ejemplo, si la base es plana o sustancialmente plana. Incluso si el sistema no está en posición vertical sobre la base, para permitir que circule el aire, entonces durante el cultivo la base puede representar la parte inferior del sistema.

20 En general, durante el proceso de cultivo las células tienden a sedimentarse y ser soportadas por la superficie interna de la capa permeable a los gases, por ejemplo en un plano que es paralelo al plano de la base.

25 La base en el contexto de la presente descripción, se puede entender por ejemplo por referencia a los dispositivos mostrados en las Figuras 5 a 8, que muestra la base (1). Evidentemente, la capa permeable a los gases en la base debe tener acceso a los gases del medio ambiente para que funcione el sistema. Por tanto, la base puede estar elevada por encima de la superficie sobre la que está dispuesto verticalmente o colocado el sistema, para garantizar el acceso al medio ambiente gaseoso externo.

El término "adyacente a él" como se emplea en la presente memoria se pretende que se refiera al hecho de que un elemento está unido a otro.

30 El recipiente empleado será generalmente rígido o sustancialmente rígido o elásticamente deformable pero no permanentemente deformable. Sin embargo, el recipiente puede comprender porciones de materiales flexibles o deformables. Estos materiales flexibles pueden incluir el tipo de materiales empleados en la fabricación de bolsas para infusión.

En una realización, el recipiente y sustancialmente todos sus elementos estructurales son rígidos.

35 Los recipientes y sistemas de la presente invención se pueden proporcionar en una amplia gama de formas y tamaños, por ejemplo en forma de cubo, caja, cilindro, cono o pirámide. Sin embargo, generalmente al menos una zona o lado de la forma estará adaptada para acomodar los respiraderos, conducto o conductos y/u otros elementos del sistema. Se pueden utilizar formas puras, pero generalmente no se emplearan debido a que la forma se adaptará generalmente para proporcionar un recipiente hecho a la medida para el fin deseado. Por ejemplo, una forma de cono se puede adaptar para proporcionar una forma troncocónica que comprenda una base y una pared curvada y
40 una pared superior o tapa. La pared superior o tapa se puede acomodar al conducto o conductos y/o respiraderos.

En una realización, el recipiente está asociado o comprende una tapa resellable, donde el recipiente y la tapa forman juntos el sistema cerrado. Una tapa resellable se puede ilustrar con referencia a la Figura 1, que muestra un dispositivo que comprende una tapa de rosca, que es un tipo de tapa resellable.

45 En una realización, la unión de la tapa al recipiente es enroscando la tapa en la rosca grabada en el recipiente permitiendo así que se cree un cierre hermético que protege el contenido del interior de la contaminación de microbios y partículas del medio ambiente externo.

50 En una realización, se puede proporcionar un sistema de acuerdo con la presente descripción modificando un sistema existente, por ejemplo se puede modificar la unidad G-Rex incorporando un respiradero y uno o dos conductos, a los cuales se pueden conectar asépticamente otros componentes del sistema de fabricación. En una realización, el respiradero y el conducto o conductos están incorporados en la tapa de un sistema G-Rex. Esto proporciona una forma rentable de producir un sistema cerrado para cultivar células terapéuticas, que puede trabajar

fuera de una cabina de flujo laminar de aire en una sala blanca clasificada de acuerdo con la clase D de la EU-GMP (US Fed. Std. 209e class 100,000, ISO 14644-1 class ISO8) ya que el producto nunca está expuesto al medio ambiente externo. Esto facilita mucho la preparación aséptica de células terapéuticas de conformidad con los requisitos reglamentarios.

- 5 En una realización, se proporciona una tapa de acuerdo con la presente invención para un sistema o recipiente de fabricación de acuerdo con la descripción, tal como un sistema G-Rex, comprendiendo dicha tapa en particular un respiradero y/o un conducto como se describe en la presente memoria o fijándola para acomodarla.

En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son unitarios, por ejemplo moldeados.

En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son del mismo material.

- 10 En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son de materiales distintos.

En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son de un material y el recipiente sobre el que se adapta la tapa para su ajuste es del mismo material.

En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son de un material y el recipiente sobre el que se adapta la tapa para su ajuste es de un material distinto.

- 15 En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son de materiales distintos y el recipiente sobre el que se adapta la tapa para su ajuste es de un material empleado en la tapa o el respiradero/ conducto.

En una realización, la tapa, el respiradero y/o los conductos son de materiales distintos y el recipiente sobre el que se adapta la tapa para su ajuste es de otro material distinto.

- 20 En una realización, el material sintético duro adecuado para uso en la fabricación aséptica como se describe en la presente memoria, tal como policarbonato, se emplea para fabricar uno o más de los componentes anteriores.

Puede ser ventajoso para las buenas prácticas de laboratorio (GLP) y la perspectiva reguladora que el recipiente, la tapa, los respiraderos y los conductos sean del mismo material.

- 25 En una realización, el recipiente es de una sola pieza porque define una unidad completa sin un elemento extraíble ni resellable, tal como una tapa. Los recipientes de una sola pieza pueden, por ejemplo, ser moldeados en una sola pieza pero tal como se emplea en la presente invención no es una referencia a cómo se hace el recipiente, sino más bien es una descripción de la función del recipiente y, en particular, que no se requieren elementos estructurales adicionales, tales como una tapa, para cerrar herméticamente el recipiente.

- 30 En una realización, se proporciona una disposición de campana (Figuras 7 y 8) en donde un elemento estructural opuesto a la base proporciona una superficie cóncava en el volumen interior. Formas tales como campanas son ventajosas debido a que se minimiza el número de esquinas internas en el volumen interno lo que puede maximizar la posible recuperación de células. La presente descripción también abarca formas alternativas que sean adecuadas para realizar esta función, en particular cuando se minimizan los lugares capaces de atrapar células usando "superficies redondeadas".

- 35 Por tanto, en una realización, el recipiente está dispuesto para canalizar las células al conducto de salida cuando el sistema está situado en la orientación apropiada. En una realización, la forma interna está adaptada para facilitar el drenaje desde un conducto de salida cuando está orientado adecuadamente.

- 40 Los sistemas de acuerdo con la presente descripción están dispuestos de forma que permitan la retirada del líquido y las células por gravedad, cuando están dispuestos en la orientación requerida. La retirada de las células por gravedad es ventajosa debido a que es sencilla, eficaz y rentable. Sin embargo, este proceso se puede aumentar empleando vacío, aumentando la presión interna del sistema (denominado en la presente memoria sobrepresión) o bombeando (tal como con una bomba peristáltica). Estas tecnologías son bien conocidas y se pueden emplear en combinación con el sistema por unión de la entrada de la bomba, el vacío o los gases para crear una sobrepresión en un conducto o respiradero correspondiente, según proceda.

- 45 Si se desea, el líquido y las células se pueden retirar por bombeo, vacío o sobrepresión sin la ayuda de la gravedad, incluso aunque el sistema esté diseñado para ser adecuado para la retirada del líquido o las células por gravedad.

Un elemento estructural, tal como se emplea en la presente memoria se pretende que se refiera a una base, pared, tapa u otro elemento estructural del recipiente que realice una función como soporte, forma y volumen de retención, mantenimiento o similares. Un elemento estructural no se refiere a los apéndices del recipiente, tales como accesorios, en particular, conductos, respiraderos, juntas y similares.

- 50 A menos que el contexto indique otra cosa, en la presente memoria los términos interior e interno se emplean indistintamente.

A menos que el contexto indique otra cosa, en la presente memoria los términos exterior y externo se emplean indistintamente.

En la presente memoria los términos volumen interior y espacio interior se emplean indistintamente.

5 En una realización, el volumen requerido de medio para el que está adaptado el recipiente es una cantidad que no obstruya el respiradero durante el cultivo de las células y la retirada del líquido y las células. En una realización, el volumen del medio es el 50% o menos del volumen interno, tal como el 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o menos. Cuando el recipiente está lleno hasta este nivel, entonces puede ser apropiado retirar el contenido por gravedad.

10 En una realización, el volumen máximo requerido del medio es de 15 a 30 mL, tal como aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 mL.

La expresión "no susceptible de obstrucción por el medio y las células" como se emplea en la presente memoria pretende referirse al hecho de que los elementos estén dispuestos para minimizar el acceso de las células y/o el medio al elemento, de manera que tenga una propensión reducida a ser obstruido de modo que no pueda realizar su función.

15 En una realización, el volumen del medio es el 50% o más del volumen interno, tal como el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%. En esta realización, el volumen máximo requerido del medio en un sistema, tal como el G-Rex 10, es de 30 a 40 mL, tal como aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 mL. Cuando el recipiente está lleno hasta este nivel, entonces puede ser apropiado emplear una "bomba" u otro sistema descrito anteriormente para ayudar a retirar el contenido. El respiradero puede ser liberado de cualquier medio o células situados en él por el "bombeo"/proceso de extracción forzada y por lo tanto el respiradero puede llegar a "obstruirse" si este sistema se vacía sólo por la fuerzas de la gravedad.

20

En una realización, la relación entre los valores numéricos de la zona permeable a los gases y el volumen del medio empleado en los sistemas está en el intervalo de 1:1 a 1:5, respectivamente, por ejemplo 1:2, 1:3 o 1:4, tal como una zona permeable a los gases de 10 cm² para un volumen de 20 mL, que da una relación de 1:2.

25 El respiradero que comprende un conducto que define un orificio interior y otro orificio exterior es esencialmente un tubo que conecta el interior del sistema con el exterior. Este respiradero permite equilibrar la presión durante el llenado del recipiente, dejando que salgan los gases. Durante el proceso de vaciado de las células, el respiradero permite que los gases entren en el volumen interno para llenar el vacío que se crearía por la retirada del líquido y las células, permitiendo así la comunicación fluida libre del líquido y las células con el conducto externo usando sistemas de gravedad o presurizados.

30

La expresión "el respiradero termina en el volumen interno" pretende referirse al hecho de que el respiradero tiene acceso al volumen interno y el orificio interior puede estar situado en un elemento estructural del recipiente, tal como una pared, siempre que el respiradero esté en comunicación fluida con el volumen interno y que el respiradero esté dispuesto de tal manera que generalmente no sea susceptible de obstrucción durante la recolección de las células, cuando el medio y las células sean menos del 50% del volumen del recipiente.

35

La expresión "se extiende en el volumen interno" pretende referirse a una parte del conducto del respiradero que penetra en el espacio interno.

En una realización preferida, al menos parte del respiradero se extiende físicamente y penetra en el volumen interno como un apéndice anclado en el elemento estructural.

40 En una realización, la porción del respiradero que termina en el orificio interno no termina en el mismo plano que el elemento estructural a través del cual esta soportado, es decir, el conducto pasará generalmente a través de un elemento estructural en el que está soportado y se extiende en el espacio definido por el volumen interno, por ejemplo terminando en el centro del volumen, como se muestra en una cualquiera de las Figuras 2, 3, 5, 6, 7 y 10 a 12.

45 La expresión "situado en el centro" como se emplea en la presente memoria pretende referirse al hecho de que parte del respiradero se extiende en el elemento estructural del recipiente en el que se aloja y en el espacio del volumen interno y no se pretende que sea una referencia absoluta al centro del espacio *per se*. Esto tiene la ventaja de que durante el llenado del recipiente con el medio o durante la recolección de las células (en particular si el respiradero está situado junto con el conducto de entrada/salida) se minimice con ello la exposición del orificio interno al líquido.

50 En una realización, el respiradero está dispuesto para terminar en el centro volumétrico del volumen interno del recipiente.

La expresión "centro volumétrico" como se emplea en la presente memoria pretende referirse a aproximadamente el centro del espacio tridimensional definido por el volumen interno.

En una realización, el conducto del respiradero se extiende entre 5 y 35 mm, tal como aproximadamente 30 mm,

desde la parte inferior de la tapa u otro elemento estructural del recipiente o, alternativamente, desde la base.

5 En una realización, el orificio interior del respiradero está dispuesto para que no esté en contacto con el medio contenido en el recipiente durante el uso, en particular cuando el medio y las células ocupan menos del 50% del volumen del recipiente, de manera que el orificio y el respiradero no sean susceptibles de ser obstruidos por el líquido o las células.

Sin embargo, el respiradero puede estar dispuesto de manera que se extienda en el medio contenido en el recipiente durante el uso. La función del respiradero puede ser facilitada empleando una membrana impermeable a los líquidos, tal como una membrana permeable a los gases, sobre el orificio interno y/o empleando una válvula antirretorno de líquidos en el respiradero.

10 En una realización, el respiradero puede comprender una válvula antirretorno de líquidos.

En una realización, el orificio interno puede estar protegido por una membrana impermeable a los líquidos, tal como una membrana permeable a los gases.

Opcionalmente, el respiradero puede comprender una válvula para controlar el seguimiento de los gases, si se desea.

15 El respiradero está dispuesto para que sea capaz de ser conectado con un filtro estéril, tal como un filtro de 0,2 micrómetros, que impida que los microbios y las partículas transportados por el aire entren en el volumen interno del recipiente y contaminen el sistema. Generalmente, el dispositivo o elemento filtrante puede estar conectado al orificio externo del conducto que forma el respiradero, como se muestra en las Figuras 2 a 6 y 9.

La conexión puede ser directa o por un medio de acoplamiento, tal como un tramo de tubo.

20 En una realización, el filtro estéril está fijado al respiradero por un medio de fijación, tal como un dispositivo de cierre.

El respiradero se puede preparar a partir de cualquier material adecuado y puede estar moldeado en el elemento estructural que lo soporta, es decir, integrado en él.

En una realización, el respiradero puede comprender simplemente un tubo flexible que se extiende a través del elemento estructural que lo soporta.

25 En una realización, el respiradero comprende una porción exterior que se extiende fuera del sistema cerrado que es adecuada para la conexión a un tubo flexible. Un tubo flexible adecuado está disponible en muchas formas diferentes, por ejemplo:

- un tubo translúcido que no contiene plastificantes, látex ni acetato de vinilo y también está exento de productos de origen animal, o

30 • un tubo de transfusión, por ejemplo, tubos de PVC de calidad de transfusión, tales como tubos de PVC de calidad de transfusión de 4 mm de diámetro externo.

En una realización, el tubo es de silicona.

El tubo empleado es tal que se pueda conectar asépticamente a los componentes que contienen también un tubo que utiliza un soldador de tubos estéril, por ejemplo comercializado por Terumo Medical Corporation.

35 El respiradero puede estar situado en cualquier lugar adecuado del recipiente incluyendo, por ejemplo, un elemento estructural tal como una pared, la base, una tapa, por ejemplo, en una realización el respiradero se extiende a través de la capa permeable a los gases, como se ha descrito antes con detalle y puede estar situado en la base del recipiente.

40 En una realización, el respiradero está situado en el centro en un elemento estructural del recipiente, es decir, no próximo a un borde de una pared, base o tapa.

En una realización, el respiradero está situado aproximadamente a lo largo de un eje central del recipiente, por ejemplo, a través del centro de una tapa o pared y se puede extender hacia el centro del volumen interno. "Centro" como se emplea en la presente memoria pretende referirse a aproximadamente el punto medio del espacio o elemento.

45 El material adecuado para el conducto o los conductos cuando se moldean incluyen, por ejemplo, los mismos materiales que el recipiente (tales como termoplásticos, en particular, policarbonato). En una realización, un conducto o conductos moldeados es/están diseñados de tal manera que el conducto o conductos sean adecuados para ser conectados a un tubo, por ejemplo como se muestra en la Figura 6, donde el tubo se desliza sobre la porción del respiradero o conducto que está moldeada.

50 En una realización, el conducto o conductos se proporcionan como tubos, tal como un tubo flexible, que se extienden

a través de un elemento estructural del recipiente y/o sistema. En esta realización puede ser necesario que el tubo flexible esté sellado al elemento estructural por una junta.

5 Los tubos para uso con o como un conducto incluyen tubos como los descritos anteriormente que se pueden utilizar en dispositivos de conexión estériles para la conexión aséptica de componentes externos como, por ejemplo, bolsas estériles para infusión.

El conducto o conductos pueden estar situados en cualquier lugar adecuado en el recipiente incluyendo, por ejemplo, los elementos estructurales, tales como una pared, la base, una tapa.

En una realización, se proporciona un conducto de entrada independiente y un conducto de salida independiente.

En una realización, se proporciona un conducto que funciona como un conducto de entrada y salida.

10 En una realización, el respiradero está situado junto al conducto o conductos, por ejemplo, en una pared o tapa.

15 La ventaja de estar situados juntos el respiradero y el conducto o conductos en un elemento estructural opuesto a la base, tal como una tapa o pared, es que no se requieren modificaciones en la pared lateral del recipiente. Esto es ventajoso debido a que los recipientes sin elementos en las paredes laterales pueden ser colocados muy próximos entre sí ocupando un espacio mínimo. Esto también permite la fabricación eficaz del respiradero y del conducto o conductos dentro de un solo componente del recipiente.

La ventaja de estar situados juntos el respiradero y el conducto o conductos en la tapa significa que no se requiere ninguna modificación adicional del recipiente comercialmente disponible para convertirlo de un sistema abierto en uno cerrado.

20 En una realización, el conducto empleado para que salgan las células está situado próximo a un elemento estructural, tal como la pared, el borde de una tapa o similar. Los inventores han encontrado que situando el conducto de salida en un borde, una pared o elemento estructural del recipiente se obtiene entonces una recuperación más eficaz de las células. Un ejemplo del conducto situado próximo a un elemento estructural se muestra en las Figuras 2 a 12.

25 Situando el conducto o conductos al lado de la tapa u otro elemento estructural se asegura que se consigue la máxima recuperación del líquido y las células. Los prototipos anteriores tenían el conducto en el centro de la tapa y debido a la tensión superficial del líquido, se determinó que se retenían en el recipiente 0,5 mL-0,8 mL de líquido. Cuando el conducto se trasladó a un lado, y se alineó con una junta, la retención se redujo hasta 0,1 mL.

Además, situando el conducto o conductos descentrados permite que el respiradero esté situado en el centro, que en al menos algunas realizaciones puede minimizar la exposición del respiradero a la obstrucción por el líquido.

30 Por tanto, en una realización, el conducto o conductos, en particular, el conducto de salida no es coaxial con un eje central del volumen interno del recipiente.

35 En las figuras de la sección transversal mostradas en la presente memoria, una línea doble representa una pared o barrera o similar, que está cerrada. Sin embargo, una sola línea no es un cierre sino que está presente para mostrar la forma del elemento. Por tanto, cuando se muestra una sola línea al final de un respiradero o conducto, indica que este está abierto.

40 La **Figura 2** muestra una capa permeable a los gases (2), que forma la base (1) del recipiente (4), que comprende una tapa (8) en la que están situados juntos un respiradero (6) y un conducto (5), en donde dicho respiradero comprende una conducción que define un orificio exterior capaz de soportar un filtro estéril, extendiéndose dicha conducción a través de la tapa hasta el centro del volumen interior definido por el recipiente y terminando en el orificio interior. En uso, el recipiente contiene un medio y células que se depositan sobre la superficie interior de la capa permeable a los gases.

45 La **Figura 3** muestra una disposición similar a la de la Figura 2, pero se caracteriza porque el recipiente es de una sola pieza sin tapa resellable. El conducto (5) y el respiradero (6) están situados juntos en una pared (un elemento estructural) del recipiente. La conducción del respiradero se extiende como un saliente en el volumen interno del recipiente.

La **Figura 4** muestra una disposición similar a la de la Figura 3 pero en ella el conducto (5) y el respiradero (6) están dispuestos en posiciones opuestas entre sí.

La **Figura 5** muestra una disposición similar a las de las Figuras 3 y 4, pero en ellas el conducto (5) y el respiradero (6) están dispuestos perpendiculares entre sí.

50 La **Figura 6** muestra una capa permeable a los gases (2), que forma la base (1) del recipiente (4), que comprende una tapa (8) en la que están situados un respiradero (6) y un conducto (5), en donde dicho respiradero comprende una conducción que define un orificio exterior capaz de soportar un filtro estéril, extendiéndose dicha conducción a

través de la tapa hasta el centro del volumen interior definido por el recipiente, hacia la base e introduciéndose en el medio (3). El orificio interior está protegido por una membrana permeable a los gases (9) que evita la obstrucción del respiradero por el líquido.

5 La **Figura 7** muestra un recipiente en forma de campana de una sola pieza (4) provisto del conducto (5) (que tiene una función doble de conducto de entrada y salida) y el respiradero (6) situado junto a él en un elemento estructural del recipiente opuesto a la base que comprende una capa permeable a los gases. En esta Figura el respiradero (6) y el conducto (5) se muestran con las porciones exteriores conectadas a un tubo flexible.

10 La **Figura 8** muestra un sistema de la Figura 7 orientado para poner el medio líquido y las células en comunicación con el conducto de salida (5), por el que las células pueden salir por gravedad. Las dimensiones de la Figura en la presente invención se dan solamente a modo de ejemplo y no pretenden ser limitantes.

Envases estériles, tales como bolsas para infusión, que contienen materiales tales como un medio y/o células se pueden soldar a un conducto o tubo de entrada conectado a ellos utilizando tecnología conocida para introducir asépticamente el medio en el sistema. Esto se ilustra esquemáticamente en la Figura 9. Técnicas y tecnología de soldadura estéril son bien conocidas en la industria y no se explicarán más en la presente memoria.

15 De manera similar, los envases vacíos, tales como bolsas estériles para infusión, se pueden soldar a un conducto de salida, o a un tubo conectado a él, para retirar asépticamente las células del recipiente, también ilustrado en la Figura 9.

Ambos métodos de introducción y retirada de materiales del sistema asépticamente son muy convenientes, robustos y prácticos.

20 Permitir que las células sean retiradas (recolectadas) por gravedad cambiando la orientación del recipiente de 10 a 350 grados, por ejemplo 45 grados o más, tal como 90 o 180 grados, es muy fácil y eficaz, debido a que no requiere equipo especializado ni necesita espacio ni experiencia mínimos.

En una realización, el conducto de salida no se extiende por encima de un elemento estructural en el que se encuentra en el volumen interno más de 0,15 mm. Esto asegura la recuperación máxima de células.

25 El conducto o conductos pueden estar equipados con una válvula y/o membrana o similar para controlar el flujo de materiales a través de los mismos.

Se pueden requerir juntas y cierres herméticos adecuados dependiendo de la construcción exacta del sistema.

30 En general, se requerirá un material adecuado para la fabricación del recipiente y sus elementos estructurales que cumplan una o más de las siguientes normas: Aprobación alimentaria de la UE: Directiva de la UE 2002/72/EC; USP <88>, biological reactivity test in vivo, class VI; USP <87>, biological reactivity test in vitro; USP <661>, physicochemical test - plastics; monografía 3.2.2 de la Farmacopea europea (EP), Envases y cierres de plástico para uso farmacéutico; ensayos biológicos de acuerdo con la norma ISO 10993 - dispositivos de comunicación externos; para contacto indirecto con sangre durante un periodo prolongado.

35 En una realización, los elementos del recipiente y/o estructurales de los sistemas se fabrican con un termoplástico adecuado, tal como policarbonato.

Los conductos y respiraderos se pueden incorporar al sistema por soldadura térmica, especialmente cuando se crea un sistema cerrado a partir de un producto comercialmente disponible, tal como G-Rex.

En una realización, se moldeará una tapa modificada en una sola pieza con las conexiones apropiadas para tubos y/o filtro, que se unirán después.

40 En una realización, los elementos y la funcionalidad estructural, tales como conductos y respiraderos, se crearán cuando se moldea el recipiente.

El término "funcionalidad estructural" como se emplea en la presente memoria pretende referirse a los elementos que realizan una función, por ejemplo, como un respiradero o conducto y/o que es adecuada para fijar accesorios, tales como tubos o similares.

45 Los sistemas de acuerdo con la descripción pueden ser irradiados por rayos gamma para su esterilización.

En general, el sistema será entregado a los usuarios finales en una bolsa herméticamente cerrada de forma estéril, por ejemplo junto con un certificado de esterilidad. Un sistema de esta forma tendrá generalmente un periodo de validez de aproximadamente 1 año o más.

50 Se proporciona también un procedimiento para fabricar un sistema de acuerdo con la presente descripción que comprende la etapa de moldear el recipiente y fijarle opcionalmente los conductos y los respiraderos.

En una realización, los agujeros para acomodar un respiradero y/o conductos son creados por sondas térmicas en lugar de por perforación, minimizando así la cantidad de contaminación generada y garantizando que el producto final sea adecuado para uso en la preparación de un producto terapéutico.

En una realización, en el proceso de fabricación se fijan otros componentes, tales como juntas y/o válvulas y/o filtros.

- 5 En una realización, el proceso de fabricación comprende la etapa adicional de esterilización del sistema, por ejemplo, utilizando irradiación con rayos gamma y cerrando herméticamente de modo aséptico la unidad en una o varias bolsas o envases.

- 10 En una realización, una o más etapas del proceso de fabricación se realizan en una habitación blanca que cumpla las normas de EU-GMP clase D (US Fed. Std. 209e class 100,000, ISO 14644-1 class ISO8). En una realización, cada sistema junto con filtros, juntas, tubos y conexiones y antes de la esterilización del sistema ensamblado se someterá a un ensayo de mantenimiento de la presión con aire comprimido de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, el ensayo de presión de 0,5 bar \pm 0,05 bar durante más de 2 minutos. Durante este tiempo, la presión no descenderá de su valor inicial registrado menos de 0,05 bar.

- 15 En una realización, se proporciona un método para modificar un sistema de cultivo celular existente para obtener un sistema cerrado de acuerdo con la invención. La modificación puede emplear una o más de las etapas de fabricación definidas anteriormente.

- 20 En una realización, un recipiente de acuerdo con la descripción, tal como un recipiente G-Rex modificado y/o un recipiente con una membrana permeable a los gases de aproximadamente 10 cm², se llenará típicamente hasta un volumen final de 10 a 25 mL con células y medio de cultivo, y se incubará a 37°C hasta que las células estén listas para la recolección. Teniendo esto en cuenta, el recipiente se puede llenar hasta 40 mL como se indicó anteriormente.

Por tanto, se proporciona un método para introducir asépticamente células a un sistema cerrado de acuerdo con la descripción, seguido por incubación de las células a una temperatura apropiada y durante un período adecuado.

- 25 En un aspecto adicional, se proporciona un método para recolectar asépticamente células terapéuticas de un sistema cerrado de acuerdo con la descripción uniendo asépticamente un receptáculo a un conducto de salida del sistema y recolectando las células en el receptáculo por gravedad.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para recolectar asépticamente células terapéuticas de un sistema cerrado de acuerdo con la descripción uniendo asépticamente un receptáculo a un conducto de salida del sistema y recolectando las células en un receptáculo empleando una bomba.

- 30 En una realización, el receptáculo al que se transfieren las células recolectadas es una bolsa de 600 mL, denominada algunas veces en la técnica un "paquete de transferencia".

En una realización, después de la recolección las células se lavan, por ejemplo, con una solución que comprende seroalbúmina humana, solución salina o similar.

En una realización, las células se lavan manualmente.

- 35 En una realización, las células se lavan empleando un sistema automatizado, por ejemplo un sistema Sepax[®] comercializado por Biosafe.

En una realización, por ejemplo, después del lavado, se cuentan las células.

En una realización, por ejemplo después del recuento, se selecciona una cantidad terapéutica de células (es decir, una o más dosis de células).

- 40 En un aspecto, las células recolectadas se encierran en un envase adecuado, por ejemplo una bolsa para infusión, opcionalmente junto con uno o más conservantes o excipientes farmacéuticamente aceptables, para su almacenamiento.

Excipientes adecuados incluyen DMSO, por ejemplo DMSO al 10%.

En una realización, el envase se transporta a la ubicación de un paciente.

- 45 En una realización, el contenido del envase se administra a un paciente por vía parenteral, particularmente por vía intravenosa.

En el contexto de esta memoria, el término "que comprende" debe interpretarse como "que incluye".

Se pretende también que los aspectos de la invención que comprenden ciertos elementos también se extiendan a realizaciones alternativas "que consisten" o "que consisten esencialmente" en elementos pertinentes.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema cerrado adecuado para cultivar asépticamente células terapéuticas, que comprende:
- i) un recipiente que comprende:
- 5 una porción permeable a los gases adecuada para soportar el crecimiento celular y permitir el suministro de gases a las células durante el cultivo, y al menos una pared adyacente a una base,
- en donde dicho recipiente define un volumen interno para contener un volumen de medio requerido para soportar un cultivo celular,
- ii) un respiradero que comprende una conducción que define un orificio interior y un orificio exterior, distantes entre sí, en comunicación fluida uno con otro, que permite equilibrar la presión durante el llenado del recipiente, permitiendo que salgan los gases y durante el proceso de vaciado de las células permitiendo que los gases entren en el volumen interior,
- 10 en donde la conducción se extiende desde el exterior del sistema cerrado por un elemento estructural del recipiente y se extiende en el volumen interno del recipiente y termina en él con el orificio interior, y en donde el orificio interior está dispuesto para no estar en contacto con el medio en el recipiente o en donde el orificio interior está cubierto con una membrana impermeable a los líquidos o una válvula antirretorno de líquidos, de manera que se minimice la exposición del orificio interno al líquido y, por tanto, el orificio interior no sea susceptible de ser obstruido por el líquido durante el llenado y vaciado del medio líquido, y
- 15 en donde el orificio exterior puede estar unido a un filtro estéril,
- iii) un conducto o conductos para la introducción aséptica de fluidos y células en el recipiente,
- 20 un conducto o conductos para que salgan los fluidos del sistema sin exponer el sistema al medio ambiente externo lo que permite que las células que han crecido en él salgan del sistema por gravedad cuando el sistema se orienta de forma que las células se encuentren en comunicación fluida con el conducto de salida.
2. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el recipiente es de una sola pieza.
3. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el elemento estructural del recipiente a través del cual se extiende la conducción es una pared del recipiente.
- 25 4. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que parte del recipiente está dispuesta para canalizar las células al conducto de salida cuando el recipiente está en una orientación apropiada.
5. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho respiradero y dichos conductos están situados en el mismo elemento estructural del recipiente, por ejemplo están situados opuestos a la base.
- 30 6. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el conducto de salida no es coaxial con un eje central del volumen interno del recipiente.
7. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conducto de salida está situado en un elemento estructural y el conducto se extiende 0,15 mm o menos en el volumen interno.
- 35 8. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el orificio exterior está unido a un filtro estéril.
9. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la conducción del respiradero se extiende entre 5 y 35 mm en el volumen interno del recipiente, tal como 30 mm desde el elemento estructural del recipiente.
- 40 10. Un método para el cultivo aséptico de células terapéuticas que comprende las etapas de:
- a. añadir asépticamente a un sistema cerrado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una población de células para su cultivo,
- b. añadir asépticamente a dicho sistema un nutriente o nutrientes para cultivar las células, en donde la etapa a se puede realizar antes, después o simultáneamente con la etapa b,
- 45 c. cultivar las células para aumentar la población de linfocitos T diana, y
- d. recolectar asépticamente los linfocitos en un envase adecuado.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la etapa adicional de lavar la población

aumentada de células después de la recolección.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende una etapa adicional de contar la población aumentada de células después de la recolección.

5 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende una etapa adicional de separar una dosis terapéutica de las células en un envase adecuado.

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde se añade un excipiente, tal como DMSO, a las células recolectadas.

15. Uso del sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para cultivar asépticamente células terapéuticas.

10

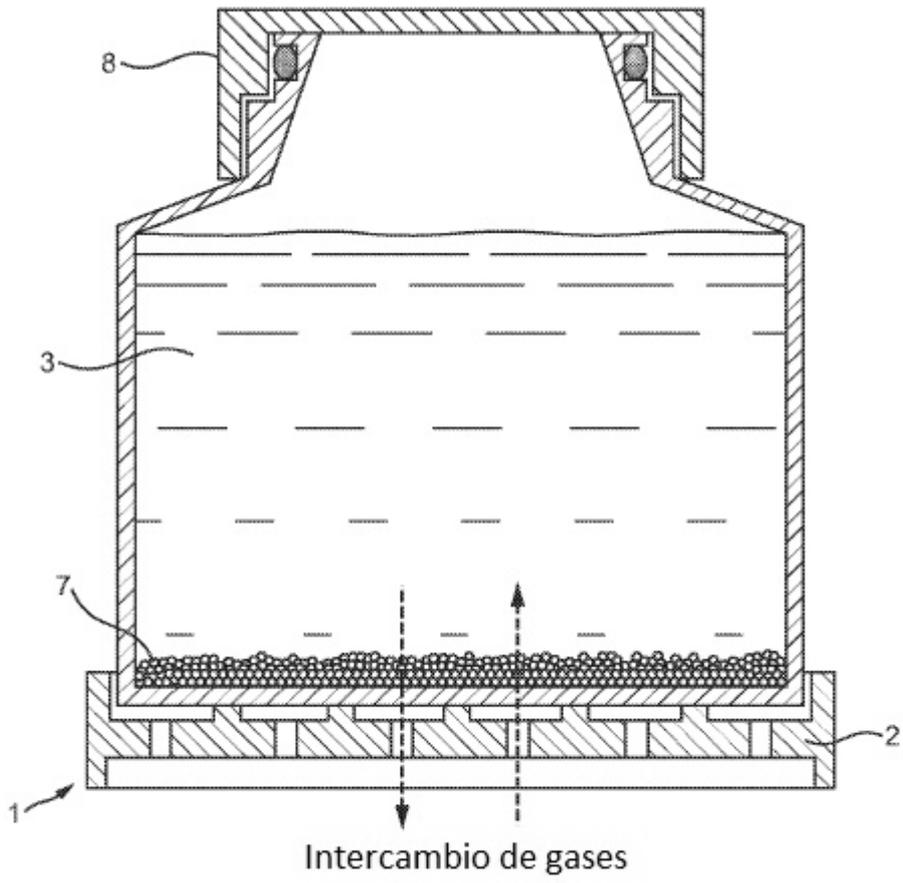
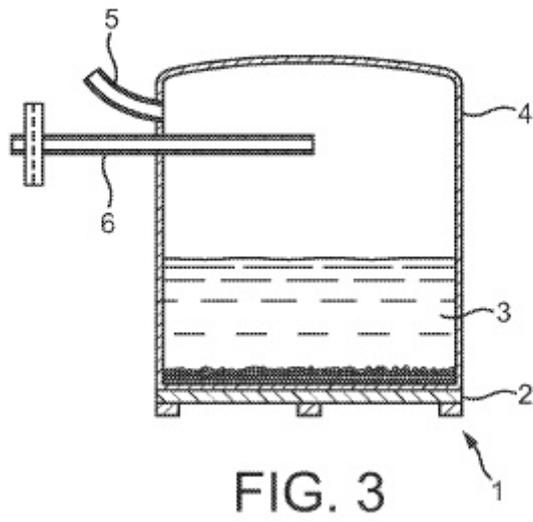
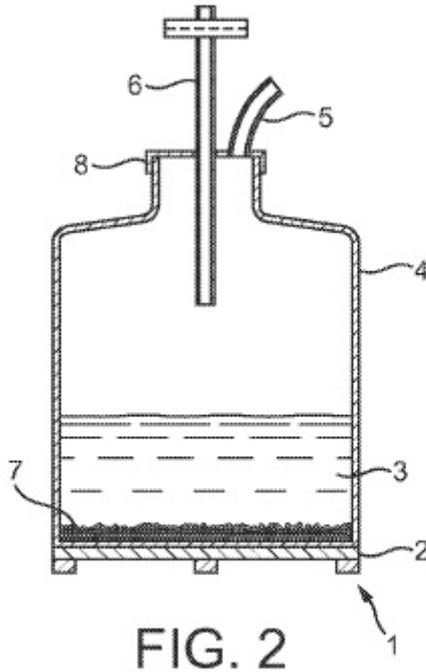
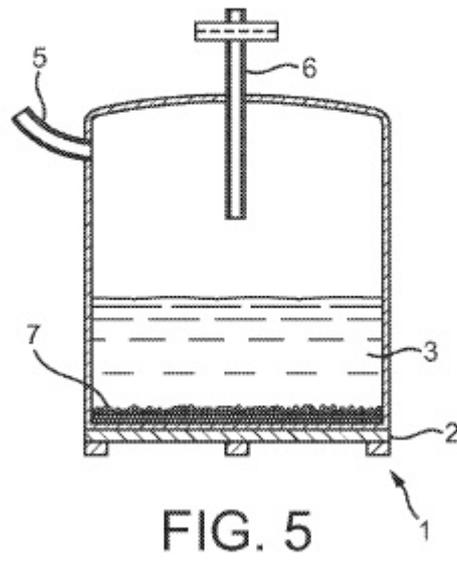
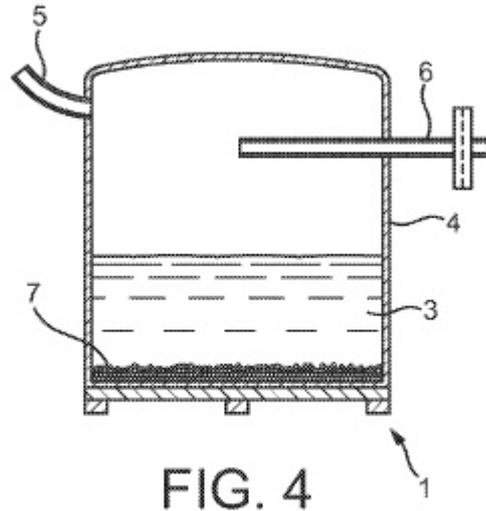


FIG. 1





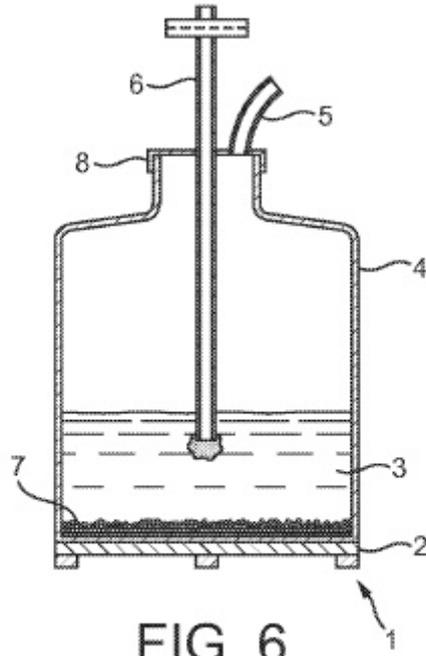


FIG. 6

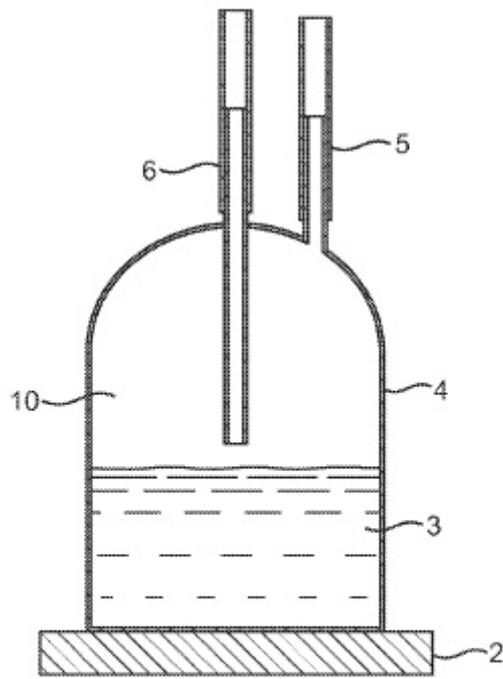
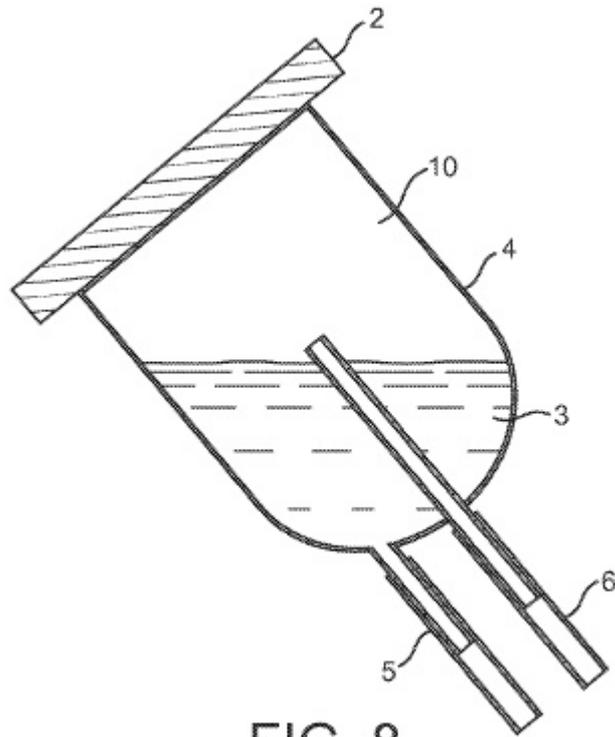


FIG. 7



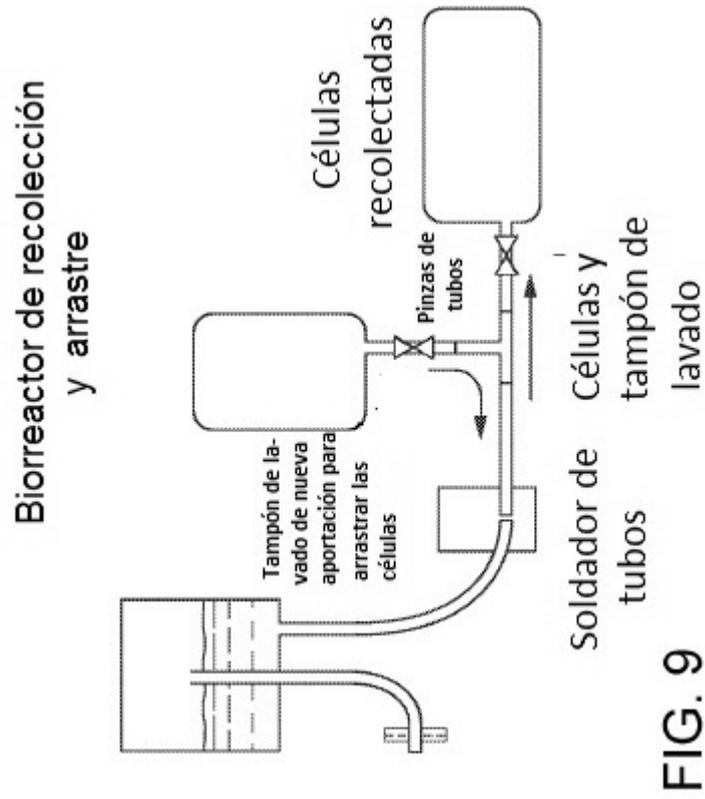


FIG. 9

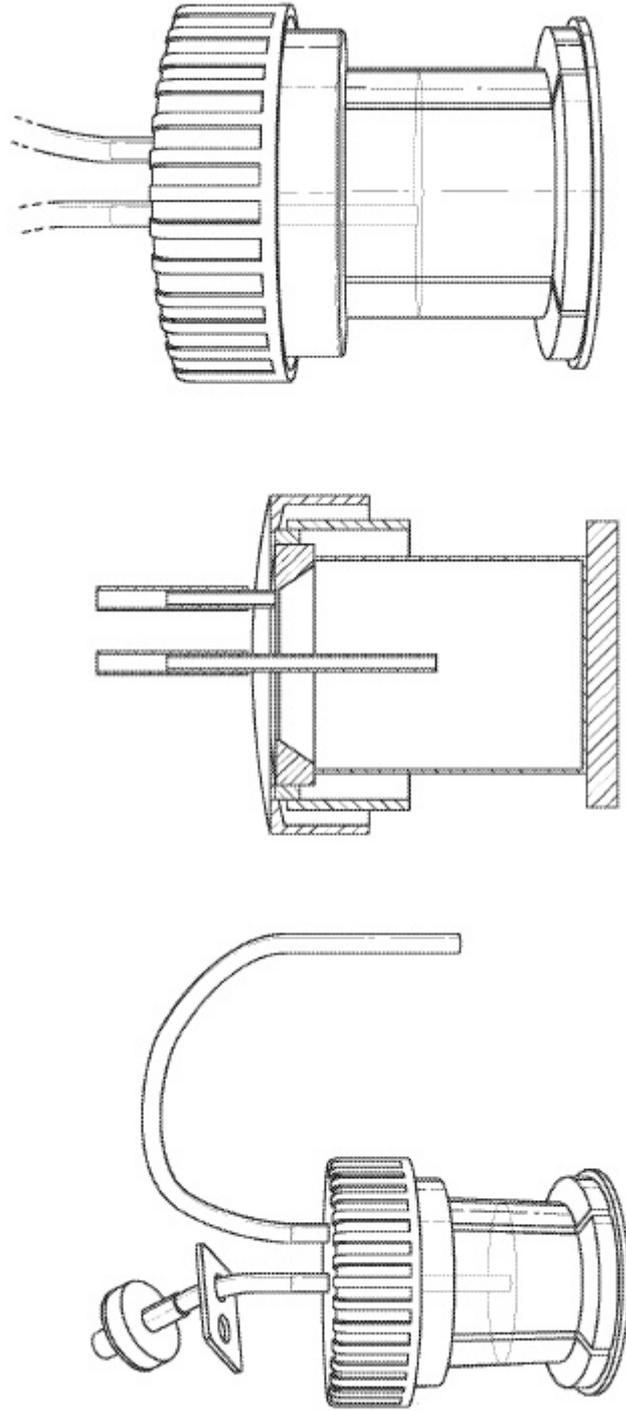


FIG. 10

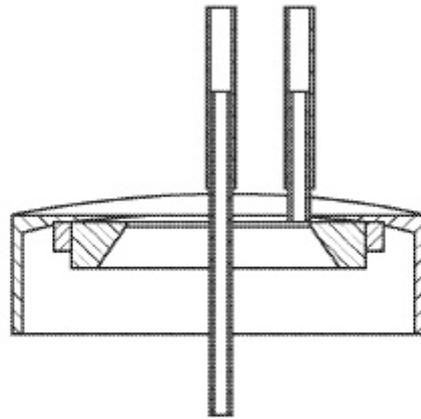
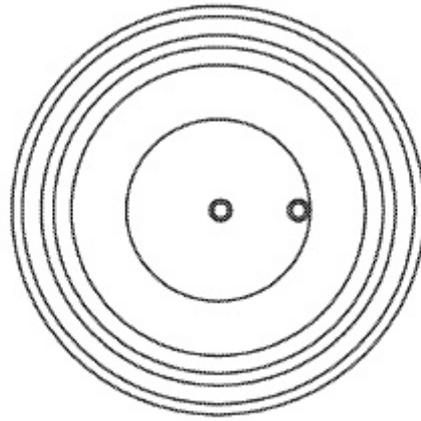


FIG. 11

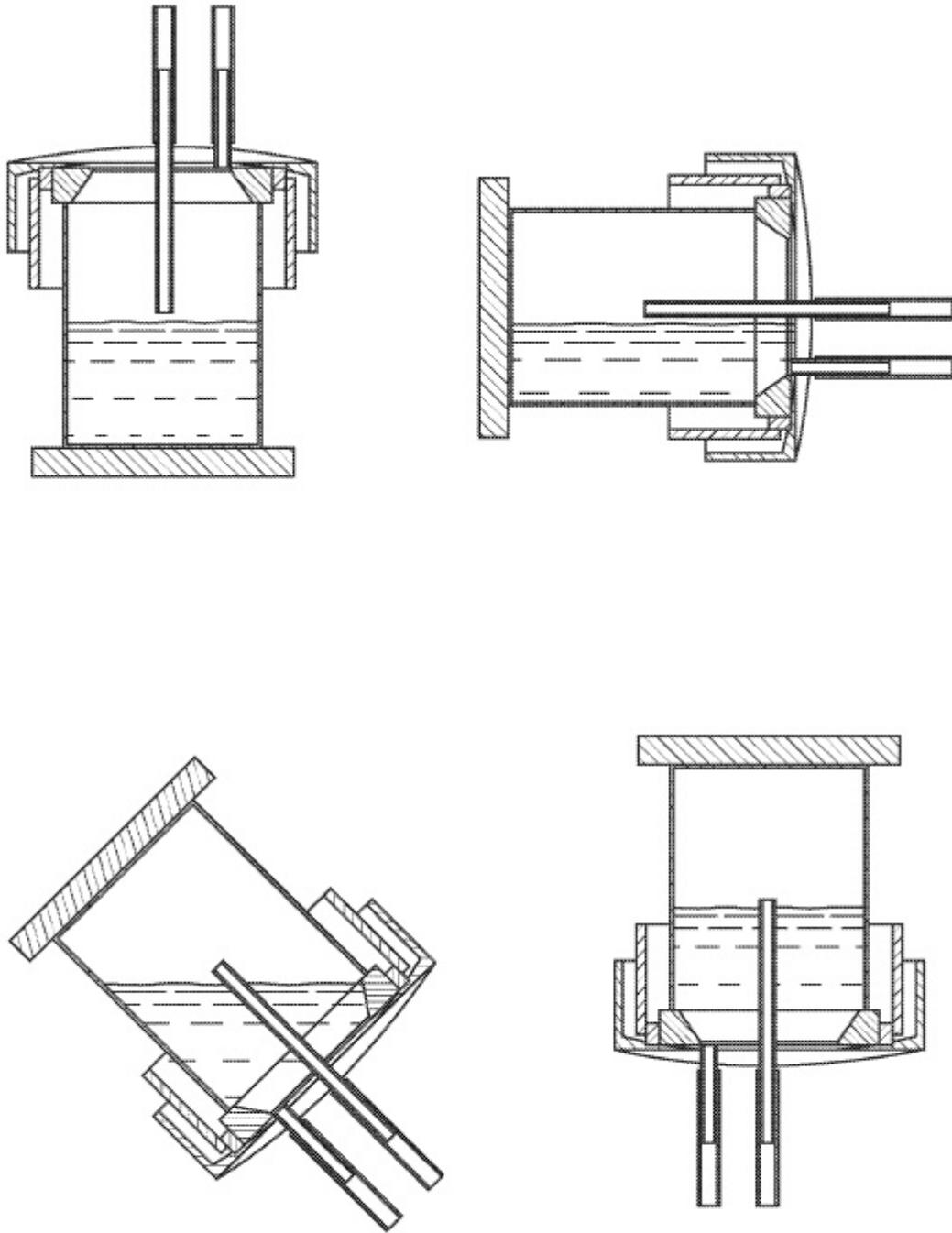


FIG. 12