

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 176**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/32 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2010 PCT/EP2010/065100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12045368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10770754 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2625261**

54 Título: **Inserto de cultivo celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

73 Titular/es:
NATURIN VISCOFAN GMBH (100.0%)
Badeniastrasse 13
69469 Weinheim, DE

72 Inventor/es:
SCHMIDT, TIMO;
JUST, LOTHAR y
BECKER, HOLGER

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 669 176 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

Inserto de cultivo celular

Campo técnico de la invención

La presente invención tiene aplicación en el campo de las técnicas de cultivo celular y tisular.

5 Antecedentes de la invención

Los insertos de cultivo celular se han convertido en una herramienta valiosa en la biología celular ya que promueven el crecimiento y la diferenciación de una diversidad de tipos celulares. Los insertos de cultivo celular pueden usarse para investigar el transporte, la difusión, la captación, la metabolización y la secreción de compuestos tanto naturales como sintéticos. Además, los insertos permiten el cultivo de tejido tridimensional complejo.

10 Aparte del valor científico del estudio del crecimiento y la organización de tejidos *in vitro* en estudios biológicos, dichos tejidos son de gran importancia para el desarrollo de ensayos *in vitro* para evaluar parámetros de toxicidad y farmacocinéticos de productos químicos, cosméticos y sustancias farmacéuticas.

15 Con esto, el número de experimentos con animales que se realizan para evaluar dichos parámetros pueden reducirse significativamente. Además, el uso de células y tejido humanos cultivados en insertos de cultivo celular produce resultados mucho más significativos y reduce la tasa de "falsos positivos", es decir, la tasa de compuestos definida como segura o positiva, pero a la que no es posible una correlación de datos de animales y seres humanos. Con frecuencia, dichos falsos positivos se identifican solo de forma tardía en el desarrollo de fármacos o incluso en ensayos clínicos provocando que tengan que darse por perdidas grandes inversiones.

20 Los insertos consisten normalmente en un cuerpo hueco, cerrado en un extremo con una membrana, sobre la que se hacen crecer las células. Las membranas o bien son permeables o bien, si son impermeables, contienen microperforaciones para garantizar el transporte de nutrientes a través de la membrana. El inserto se coloca en el pocillo de una placa de cultivo celular de manera que la membrana esté en contacto con el medio de cultivo celular, o bien sumergida o bien en la interfase medios/aire.

25 Las células por lo general se siembran en el lado de la membrana que se muestra alejado del pocillo de la placa. Para permitir la difusión libre del medio de cultivo celular, dichos insertos se colocan en la placa de pocillos descansando sobre un pequeño pie, creando de este modo un espacio entre la parte inferior del inserto y el fondo de la placa de pocillos. Como alternativa, puede usarse un dispositivo de suspensión, que tiene pestañas que sobresalen lateralmente de la parte superior de la estructura de inserto.

30 La posibilidad de cultivar células en ambos lados de la membrana del inserto ha recibido más atención en los últimos años. Pueden estudiarse la comunicación de célula a célula a través de la membrana del inserto, la quimiotaxia y otros fenómenos de migración celular. Son posibles análisis electrofisiológicos en cualquier lado de la membrana del inserto. Pueden investigarse por separado regiones apicales y basolaterales de células polarizadas. Pueden separarse células madre de células de células alimentadoras mediante cultivo en ambos lados de la membrana. Sin embargo, los tipos de insertos desarrollados específicamente para dichas aplicaciones son difíciles de usar y muestran desventajas significativas en su manipulación práctica en el laboratorio de cultivo celular.

35 Se desvela una estructura de inserto de este tipo en la Patente de los EE.UU. N.º US-5470743-A. Este documento describe un conjunto que consiste en un inserto convencional invertido sobre el que se coloca un dispositivo de soporte. Tanto el dispositivo de soporte como el inserto se conectan a través de una junta que deja un espacio interno que consiste en la superficie externa de la membrana del inserto invertido sobre la que pueden hacerse crecer células. Tras el cultivo satisfactorio, el conjunto se desmonta y el inserto con las células cultivadas sobre la superficie externa de la membrana puede suspenderse en el pocillo de una placa de cultivo celular. Posteriormente, pueden cultivarse células sobre la superficie interna de la membrana. El conjunto ha de protegerse frente a la contaminación mediante un sellado sobre su extremo superior e inferior. Además, dicho documento desvela una junta que comprende un adhesivo de doble cara para mantener el dispositivo de soporte y el inserto conectados estrechamente durante la etapa de cultivo celular inicial. Esto es una desventaja importante para el desmontaje de las partes ya que existe el riesgo de que la membrana y/o las células se dañen durante esta etapa. Además, el conjunto solo puede usarse como dispositivo autónomo, no en relación con placas de cultivo celular que alteran una manipulación eficaz especialmente cuando se realizan muchos cultivos de este tipo al mismo tiempo.

40 Se proporciona otra solución para el cultivo celular en ambos lados de la membrana de un inserto en la Patente de los EE.UU. N.º US-5759851-A. Este documento describe un armazón móvil que se sitúa en el interior de un cuerpo cilíndrico. Es posible una colocación precisa de dicho armazón móvil dentro de la estructura tubular, por ejemplo, usando un bastidor que tiene una pestaña en un extremo que supera el diámetro del cuerpo tubular. El armazón móvil lleva una membrana para el cultivo de material biológico. Es posible el cultivo en ambos lados de la membrana invirtiendo el cuerpo cilíndrico. Para evitar la fuga del medio de cultivo celular, el armazón móvil lleva un sellado alrededor de su diámetro externo. Esta solución tiene la desventaja de que es necesaria una herramienta independiente para el ajuste de la altura del armazón móvil. Otra desventaja es que es obligatorio tener un borde o

estructura de reborde firme sobre el que el bastidor ejerza su acción y que, al mismo tiempo, sirva como portador para la membrana. Si se siembran células sobre una estructura de este tipo, crecen o bien sobre la membrana no soportada, libre o bien sobre la membrana soportada por la estructura de reborde o bien, en el peor caso, sobre la propia estructura de reborde. Otra estructura que entrará en contacto directo no deseado con las células y el medio de cultivo es el sellado del armazón móvil. Es obvio que las condiciones de crecimiento sobre estas diferentes superficies se desvían sustancialmente. Tanto el armazón móvil como el anillo de sellado son materiales artificiales que influyen en el crecimiento celular, la proliferación celular y/o la diferenciación celular. Tampoco puede garantizarse que el anillo de sellado entre el armazón y la pared interna del cuerpo cilíndrico sea hermético especialmente cuando se desplaza por el bastidor. Todos estos factores hacen que sea difícil una manipulación segura y sencilla y obvian muchas aplicaciones posibles.

El documento US-5759851-A describe adicionalmente una solución para suprimir la formación de burbujas de aire en el inserto vertical. Esto se consigue formando el extremo del armazón móvil que está apuntando hacia el fondo de la placa de pocillos en un ángulo pequeño. Después, el usuario tiene que bajar cuidadosamente el dispositivo a un ángulo definido en el medio de cultivo celular y vigilar el atrapamiento de burbujas de aire. Esta forma angular requiere obviamente un armazón más ancho; la parte autoportante de la membrana que puede usarse para cultivo celular se reduce significativamente. Además, la manipulación es difícil. Por último, en la mayoría de los casos, los insertos se forman de manera que sus paredes externas encajen con una distancia mínima en la pared de la placa de cultivo celular. Es obvio que el uso de un armazón con ángulos pequeños solo es posible en una placa de pocillos que tiene un diámetro interno muy grande en comparación con el diámetro externo del inserto. Solo en este caso es posible inclinar el inserto de manera que el ángulo del armazón y el nivel del medio sean iguales y no se atrape aire.

Pueden encontrarse algunos ejemplos de las soluciones anteriormente referenciadas en los siguientes documentos:

El documento US-5665596-A desvela un dispositivo de cocultivo dos piezas que tiene receptáculos para contener fluido a los dos lados de una membrana porosa que incluye un inserto con un pasaje a través del mismo con un eje longitudinal. El inserto tiene un primer extremo, un segundo extremo y una pared lateral, el segundo extremo tiene un diámetro exterior y una membrana porosa con un primer lado y un segundo lado unidos sobre la misma perpendicular al eje. La membrana cierra el segundo extremo del inserto que forma un primer receptáculo para contener el fluido en el primer lado de la membrana dentro del inserto que está abierto al primer extremo. El primer extremo tiene una pestaña que se extiende hacia fuera desde una porción de la pared lateral perpendicular al eje para la suspensión del inserto en un pocillo. El dispositivo también incluye un adaptador para la formación de un segundo receptáculo para contener el fluido en el segundo lado de la membrana. El adaptador tiene un extremo abierto, un extremo de inserto y un pasaje con un eje longitudinal que se extiende a través del mismo. El paso a través del adaptador tiene un diámetro interior en el extremo de inserto dimensionado para aceptar el diámetro exterior del segundo extremo del inserto cuando el extremo de inserto del adaptador está montado coaxialmente de forma liberable sobre el segundo extremo de dicho inserto. El segundo extremo del inserto encaja dentro del adaptador para cerrar el paso y formar el segundo receptáculo en el segundo lado de la membrana que está abierto hacia el extremo abierto del adaptador.

El documento US-5409829-A desvela un sistema de cocultivo transmembrana autónomo que incluye un inserto que tiene un tubo con un eje longitudinal, una pared lateral paralela al eje que conecta un primer extremo abierto y un segundo extremo. El segundo extremo tiene una membrana microporosa unida al mismo perpendicular al eje formando un pocillo dentro del inserto. El inserto tiene una pestaña que se extiende hacia fuera desde la pared lateral en el primer extremo para la suspensión del inserto con un tapón extraíble colocado en el pocillo del inserto para evitar el flujo de fluido a través de la membrana. El inserto con el tapón está contenido en una carcasa que tiene un primer extremo, un segundo extremo y un pasaje a través de la misma. La carcasa tiene un eje longitudinal, un primer diámetro en el primer extremo, un segundo diámetro en el segundo extremo y un diámetro intermedio entre el primer y segundo diámetro. Cuando el segundo extremo del inserto se coloca coaxialmente en el primer extremo de la carcasa, el segundo extremo del inserto tiene un encaje de interferencia con el diámetro intermedio de la carcasa formando una cámara por encima de la membrana. El primer y el segundo extremo de la carcasa están sellados de manera que se pueden volver a cerrar con tapas permeables a gases que evitan el paso de microorganismos en la carcasa del sistema esterilizado siempre que las tapas estén sin abrir.

Por último, el documento US-2010190197-A1 desvela un dispositivo de soporte permeable anidado que puede utilizarse para realizar diversos experimentos para someter a ensayo entidades químicas. El dispositivo de soporte permeable anidado puede usarse para realizar un ensayo de primer paso para determinar la biodisponibilidad de una nueva entidad química tras la absorción a través del tubo digestivo y el metabolismo por el hígado.

Descripción de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo, es decir, un conjunto o estructura de inserto, que permite el cocultivo en ambos lados de una membrana de dicho conjunto o estructura de inserto y que supera las dificultades y desventajas en la manipulación de los insertos de cocultivo descritos en la técnica.

Esto se consigue por medio de la presente invención que se refiere a un dispositivo de cultivo celular multifuncional

que comprende múltiples elementos que pueden combinarse de maneras específicas, como se describe a continuación, para permitir el cocultivo seguro y eficaz de células en ambos lados de la membrana.

El dispositivo de cultivo celular de acuerdo con la presente invención comprende, en su configuración mínima, los siguientes elementos:

5 - Un cuerpo tubular externo que tiene un extremo superior y un extremo inferior. El extremo superior comprende una abertura; el extremo inferior está cerrado por una membrana que puede colonizarse con material biológico. Esta membrana tiene una superficie interna y una superficie externa, con respecto al cuerpo tubular externo.

10 - Un cuerpo tubular complementario, que tiene un extremo superior y un extremo inferior, encajando el diámetro interno de dicho cuerpo tubular complementario, total o parcialmente, sobre el diámetro externo del extremo inferior del cuerpo tubular externo.

15 - Un componente de suspensión que tiene un extremo superior y un extremo inferior. Desde el extremo superior se extiende lateralmente al menos una pestaña. El diámetro externo de este componente de suspensión encaja, total o parcialmente, en el diámetro interno del cuerpo tubular externo. Por tanto, este componente de suspensión, cuando se conecta al cuerpo tubular externo como se ha descrito anteriormente, da como resultado una estructura de inserto de suspensión. La una o más pestañas laterales sirven como elementos de soporte, fijando el extremo superior del componente de suspensión al reborde del pocillo.

20 Para una primera etapa de cultivo celular en un lado de la membrana, se invierte el cuerpo tubular externo y se conecta el cuerpo tubular complementario al extremo inferior del cuerpo tubular externo de manera que da como resultado un inserto vertical, formando el cuerpo tubular complementario una cámara de cultivo celular. Entonces pueden sembrarse células sobre la superficie externa de la membrana que se adentra en el cuerpo tubular complementario.

25 Tras un periodo de cultivo apropiado, para una segunda etapa, se le da la vuelta al conjunto del cuerpo tubular externo y el cuerpo tubular complementario. El componente de suspensión se conecta entonces al cuerpo tubular externo. Después de eso, se retira el cuerpo tubular complementario. Se sitúa el inserto de suspensión resultante en el pocillo de una placa de cultivo celular. La superficie externa de la membrana sobre la que se sembraron las células en la primera etapa está ahora orientada hacia el fondo del pocillo de cultivo celular. La segunda siembra de células se realiza ahora usando la superficie interna que sobresale hacia arriba de la membrana.

30 Se impide el desarrollo de burbujas de aire bajo la superficie externa de la membrana desconectando el cuerpo tubular complementario. El inserto de suspensión resultante no proporciona ninguna estructura que atrape dichas burbujas de aire y, por tanto, impide el problema mencionado anteriormente.

Además, tanto la estructura de inserto vertical para la primera etapa de cultivo como la estructura de inserto de suspensión para la segunda etapa de cultivo encajan en pocillos convencionales de placas de cultivo celular disponibles en el mercado. Las etapas de manipulación son fáciles de realizar y facilitan un máximo nivel de seguridad con respecto al atrapamiento de burbujas de aire, la esterilidad y la desecación del primer cultivo celular.

35 Los elementos individuales del dispositivo de cultivo de acuerdo con la presente invención pueden describirse adicionalmente en realizaciones preferidas que no limitarán en modo alguno la descripción general anterior ni la aplicabilidad general del dispositivo de cocultivo.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1.- Muestra una vista en perspectiva esquemática del dispositivo de cultivo celular de acuerdo con la presente divulgación, en la que pueden apreciarse el cuerpo tubular externo, el cuerpo tubular complementario y el componente de suspensión.

Figura 2.- Muestra una vista en perspectiva esquemática de una primera etapa de cultivo celular en un lado de la membrana, en la que se invierte el cuerpo tubular externo y se conecta el cuerpo tubular complementario al extremo inferior del cuerpo tubular externo.

45 Figura 3.- Muestra dos vistas esquemáticas de una segunda etapa de cultivo celular, mostrando la vista a el conjunto del cuerpo tubular externo y el cuerpo tubular complementario al que se le da la vuelta y el componente de suspensión que se conecta al cuerpo tubular externo; y más adelante en el presente documento, mostrando la vista b una sección transversal del cuerpo tubular complementario que se retira y el inserto de suspensión resultante que se sitúa en el pocillo de una placa de cultivo celular.

50 Figura 4.- Muestra tres vistas en perspectiva esquemáticas correspondientes a tres realizaciones del componente de suspensión, teniendo todas ellas pestañas en su extremo superior y muescas en su superficie externa, en las que dichas muescas consisten en crestas paralelas, de acuerdo con la realización mostrada en la figura 4a, que consiste a su vez en dos vistas en perspectiva; una estructura de tipo rosca, mostrada en la figura 4b; y una estructura de tipo escalón, como se muestra en la figura 4c.

Figura 5.- Muestra una vista en perspectiva esquemática del conjunto entre la realización del componente de suspensión mostrada en la figura 4c y el cuerpo tubular externo.

Figura 6.- Muestra una vista en perspectiva esquemática y una sección transversal de la misma en las que se muestra una realización del cuerpo tubular externo de acuerdo con la invención, y en las que la membrana se adhiere al fondo del cuerpo tubular externo por medio de un anillo de sujeción.

Figura 7.- Muestra una vista en perspectiva esquemática y una sección transversal del cuerpo tubular complementario que comprende en su diámetro interno y en su extremo inferior, al menos un segmento o zona de tope que es más estrecha que el diámetro externo del cuerpo tubular externo que tiene tres pies en su extremo inferior.

Figura 8.- Muestra una sección transversal del cuerpo tubular externo situado en el interior de un recipiente de crioconservación.

Realización preferida de la invención

A la vista de las figuras, una realización preferida del dispositivo de cultivo celular de la invención comprende:

- Un cuerpo tubular externo (1) que tiene un extremo superior (1a) y un extremo inferior (1b). El extremo superior (1a) comprende una abertura; el extremo inferior (1b) está cerrado por una membrana (4) que puede colonizarse por material biológico. Esta membrana (4) tiene una superficie interna (4a) y una superficie externa (4b), con respecto al cuerpo tubular externo (1).

- Un cuerpo tubular complementario (2), que tiene un extremo superior y un extremo inferior, encajando el diámetro interno de dicho cuerpo tubular complementario (2), total o parcialmente, sobre el diámetro externo del extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1).

- Un componente de suspensión (3) que tiene un extremo superior (3a) y un extremo inferior (3b). Desde el extremo superior (3a) se extienden lateralmente una o más pestañas (5). El diámetro externo de este componente de suspensión (3) encaja, total o parcialmente, en el diámetro interno del cuerpo tubular externo (1). Por tanto, este componente de suspensión (3) cuando se conecta al cuerpo tubular externo (1), como se ha descrito anteriormente, forma una estructura de inserto de suspensión.

En primer lugar, como se muestra en la figura 2, para el cultivo celular en un lado de la membrana (4), se invierte el cuerpo tubular externo (1) y se conecta el cuerpo tubular complementario (2) al extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1), de manera que da como resultado un inserto vertical, formando el cuerpo tubular complementario (2) y la membrana (4) una cámara de cultivo celular. Entonces pueden sembrarse células sobre la superficie externa (4b) de la membrana (4) que se adentra en el cuerpo tubular complementario (2).

En segundo lugar, tras un periodo de cultivo apropiado, se le da la vuelta al conjunto del cuerpo tubular externo (1) y el cuerpo tubular complementario (2), como se muestra en la figura 3a. El componente de suspensión (3) se conecta entonces al cuerpo tubular externo (1). Después de eso, se retira el cuerpo tubular complementario (2). El inserto de suspensión resultante, mostrado en la figura 3b, se sitúa en el pocillo (12) de una placa de cultivo celular. La superficie externa (4b) de la membrana (4) sobre la que se sembraron las células en la primera etapa está ahora orientada hacia el fondo del pocillo de cultivo celular (12). La segunda siembra de células se realiza ahora usando la superficie interna que sobresale hacia arriba (4a) de la membrana (4).

El desarrollo de burbujas de aire bajo la superficie externa (4b) de la membrana (4) se evita desconectando el cuerpo tubular complementario (2). El inserto de suspensión resultante no proporciona ninguna estructura que atrape dichas burbujas de aire y, por tanto, evita el problema mencionado anteriormente.

Además, tanto la estructura de inserto vertical para la primera etapa de cultivo, mostrada en la figura 2, como la estructura de inserto de suspensión para la segunda etapa de cultivo, mostrada en la figura 3b, encajan en pocillos convencionales (12) de placas de cultivo celular disponibles en el mercado. Las etapas de manipulación son fáciles de realizar y facilitan un máximo nivel de seguridad con respecto al atrapamiento de burbujas de aire, la esterilidad y la desecación del primer cultivo celular.

Los elementos individuales del dispositivo de cultivo de acuerdo con la presente invención pueden describirse adicionalmente en realizaciones preferidas que no limitarán en modo alguno la descripción general anterior ni la aplicabilidad general del dispositivo de cocultivo.

El componente de suspensión (3) en su forma preferida, como se muestra en la figura 4a, tiene un extremo superior (3a) que lleva una o más pestañas (5) que se extienden lateralmente desde el cuerpo tubular de dicho componente de suspensión (3). Dichas pestañas (5) tienen opcionalmente aberturas (5a) que permiten la inserción de herramientas puntiagudas como unas pinzas para coger fácilmente el inserto, o la punta de una pipeta para añadir, por ejemplo, sustancias al medio de cultivo, y permitir adicionalmente el intercambio gaseoso con el entorno. Además, comprenden un separador (5b) que permite la colocación central precisa del componente de suspensión

(3) en el pocillo (12) de una placa de cultivo celular. El componente de suspensión (3) puede comprender además muescas (6a, 6b, 6c) en su superficie externa. Dichas muescas pueden formar crestas paralelas (6a), muescas en forma de rosca (6b), como se muestra en la figura 4b, o, en la realización más preferida de la invención mostrada en la figura 4c, muescas en forma de escalón (6c).

5 El cuerpo tubular externo (1), en su forma preferida, tiene un extremo superior (1a) que lleva uno o más salientes que se extienden lateralmente en el interior de este cuerpo tubular externo (1). Estos salientes son complementarios a y encajan en las muescas (6a, 6b, 6c) en la superficie externa del componente de suspensión (3). Los salientes son apropiados para engancharse o encajar con cada clase de muescas (6a, 6b, 6c). Con respecto a realizaciones particulares del componente de suspensión (3) mostrado en las figuras 4a y 4b, el correspondiente cuerpo tubular externo (1) lleva salientes que se extienden a lo largo de la totalidad del extremo superior (1a) de dicho cuerpo tubular externo (1), formando por tanto estructuras complementarias a cada una de las crestas paralelas (6a) y muescas en forma de rosca (6b).

10 De acuerdo con otra realización, mostrada en la figura 5, el extremo superior (1a) del cuerpo tubular externo (1) comprende salientes laterales (7) que se extienden lateralmente en el interior del cuerpo tubular externo (1), que coinciden y se extienden en las muescas en forma de escalón (6c) del componente de suspensión (3). El cuerpo tubular externo (1) y el componente de suspensión (3) pueden montarse por tanto fácilmente.

15 La distancia entre la membrana (4) del inserto de suspensión y el fondo de la placa del pocillo (12) puede ajustarse, por tanto, o bien de manera continua, usando el cuerpo tubular externo (1) y el componente de suspensión (3) que están diseñados de manera que puedan presionarse o enroscarse entre sí. Si no, como se muestra en la figura 5, usando muescas en forma de escalón (6c) y salientes laterales (7) apropiados del cuerpo tubular externo (1), puede ajustarse la distancia en escalones diferenciados.

20 El diámetro de la superficie externa del componente de suspensión (3) y el diámetro de la superficie interna del cuerpo tubular externo (1) pueden diseñarse de manera que la fricción entre estos elementos proporcione una conexión hermética. Esto garantiza que no existan fugas del medio de cultivo celular ni contaminación del medio en un lado de la membrana (4) por el medio del otro lado de la membrana (4).

25 La membrana (4) de la presente invención puede adherirse al extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1) mediante medios diversos que conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante termosellado. Se prefiere el uso de un anillo de sujeción (8), como se muestra en la figura 6, que encaja en la estructura de anillo del extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1), adhiriéndose suavemente a la superficie externa de dicho cuerpo tubular externo (1). El extremo inferior (1b) más preferido del cuerpo tubular externo (1) comprende un rebaje (9) configurado para alojar de manera apretada el anillo de sujeción (8), en el que la membrana (4) permanece fijada entre dicho anillo de sujeción (8) y dicho rebaje (9). En la realización más preferida, puede retirarse este anillo de sujeción (8). Esto permite la liberación de la membrana (4) con células cocultivadas unidas de la estructura de inserto. La estructura de membrana/célula puede usarse entonces para estudios adicionales, por ejemplo, para histología, microscopía o como implante.

30 Es obvio para un experto en la materia que, dependiendo del tipo de membrana (4) y sus características, especialmente su espesor de pared, han de ajustarse el diámetro interno del anillo de sujeción (8) y las dimensiones precisas del rebaje (9) para conseguir una inserción correcta y apretada de la membrana (4) en la estructura de inserto, es decir en el cuerpo tubular externo (1).

35 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el cuerpo tubular complementario (2) comprende, en su diámetro interno y en un extremo, una zona de tope (10) que es más estrecha que el diámetro externo del cuerpo tubular externo (1). Tras el montaje de un cuerpo tubular complementario (2) de este tipo y el cuerpo tubular externo (1), como se muestra en la figura 7, dicho cuerpo tubular externo (1) puede fijarse por tanto en una posición definida dentro del cuerpo tubular complementario (2). El cuerpo tubular externo (1) puede comprender adicionalmente al menos uno, preferentemente tres, salientes (11) en su extremo superior (1a) que pueden actuar como pies, separando el extremo superior (1a) del cuerpo tubular externo (1) del fondo del pocillo (12) de una placa de cultivo celular.

40 Un experto en la materia entenderá que los elementos que comprenden el cuerpo tubular externo (1), el cuerpo tubular complementario (2) y el componente de suspensión (3), y también el anillo de sujeción (8) pueden producirse mediante moldeo, preferentemente mediante moldeo por inyección, a partir de plástico de calidad médica o un material comparable que no transmita ninguna sustancia extraña perjudicial para el cultivo celular. Está disponible una diversidad de materiales para este fin, incluyendo, pero sin limitarse a, poliestireno, poli(terefalato de etileno), policarbonato, silicona, polipropileno o polietileno.

45 La membrana (4) que encaja en el cuerpo tubular externo (1), preferentemente por medio de un anillo de sujeción (8), puede estar compuesta esencialmente por cualquier material natural o sintético. Los ejemplos de dichos materiales incluyen, pero no se limitan a poli(terefalato de etileno), policarbonato, alginato, quitosano, polilactida, poliglicolida, poli(ácido láctico), colágeno o composiciones de los mismos. Dichas membranas (4) pueden caracterizarse por una estructura compacta pero permeable o pueden contener poros, preferentemente de un

tamaño definido y dispuestos en una densidad definida, para permitir el intercambio de nutrientes y señales químicas a través de la membrana. También es aplicable para usar membranas (4) que se recubren en una o en ambas superficies, por ejemplo, con una disolución de colágeno.

5 Además, la figura 8 muestra un uso particular del dispositivo, en el que el cuerpo tubular externo (1) se sitúa en el interior de un recipiente de crioconservación (13). Los salientes laterales (7) en el extremo superior (1a) del cuerpo tubular externo (1) y que apuntan al interior, mantienen un elemento de tapa de un recipiente criogénico (13) a una distancia definida con respecto al dispositivo de la invención. En combinación con espaciadores unidos al recipiente criogénico (13), esto proporciona una cubierta constante de la membrana con células unidas con medios de congelación. En esta realización de la invención, el cuerpo tubular externo (1) porta adicionalmente salientes (11) que se muestran alejados de su extremo superior (1a). Estos salientes hacia arriba (11) del cuerpo tubular externo (1) proporcionan en este dispositivo una trampa de aire para evitar que se atrape aire a nivel celular. La elasticidad de la membrana (4) permite una flexión hacia abajo forzada por la curvatura del recipiente criogénico (13). Debido a esta flexión, el aire atrapado aparte del material biológico se empuja hacia la trampa de aire. Después de la congelación, el cuerpo tubular externo (1) y el material biológico unido a la membrana (4) pueden descongelarse rápidamente debido a la cubierta delgada y constante de los medios de congelación aparte del cuerpo tubular externo (1) y la membrana (4). Se evitan grandes aglomeraciones de hielo que retardan el procedimiento de descongelación. El cuerpo tubular externo (1) puede extraerse del recipiente criogénico (13) conectándolo con el componente de suspensión (3) y transfiriéndolo a un pocillo convencional (12) de una placa de cultivo celular para liberar el material biológico de los medios de congelación y para su cultivo adicional.

20

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de cultivo celular, que comprende:

- un cuerpo tubular externo (1) que tiene un extremo superior (1a) y un extremo inferior (1b), comprendiendo el extremo superior (1a) una abertura y estando cerrado el extremo inferior (1b) por una membrana (4), que tiene una superficie interna (4a) y una superficie externa (4b), que puede cultivarse con células,

comprendiendo el dispositivo de cultivo celular adicionalmente:

- un cuerpo tubular complementario (2), cuyo diámetro interno encaja, al menos parcialmente, sobre el diámetro externo del extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1), y
- un componente de suspensión (3) que tiene un extremo superior (3a) y un extremo inferior (3b); en el que se extiende desde el extremo superior (3a) lateralmente al menos una pestaña (5) y el diámetro de la superficie externa del componente de suspensión (3) y el diámetro de la superficie interna del cuerpo tubular exterior (1) se diseñan de manera que la fricción entre estos elementos (1, 3) proporcione una conexión hermética que permita el cultivo celular en ambas superficies (4a, 4b) de la membrana (4),
- en el que dicho cuerpo tubular externo (1) en una primera etapa se puede conectar al cuerpo tubular complementario (2) para formar un inserto vertical para un primer cultivo celular, y en una segunda etapa en la que el cuerpo tubular externo (1) se puede desenganchar del cuerpo tubular complementario (2) y se puede unir al componente de suspensión (3) para un segundo cultivo celular.

caracterizado porque la superficie externa del componente de suspensión (3) comprende adicionalmente muescas (6a, 6b, 6c) que son complementarias y encajan en salientes del cuerpo tubular externo (1).

2. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una pestaña (5) del componente de suspensión (3) tiene una abertura (5a), a través de la cual encaja una herramienta puntiaguda.

3. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicha al menos una pestaña (5) del componente de suspensión (3) tiene un separador (5b) que permite la colocación central precisa del componente de suspensión (3) en un pocillo (12) de una placa de cultivo celular.

4. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la superficie externa del componente de suspensión (3) comprende adicionalmente crestas paralelas (6a) que son complementarias y encajan en salientes del cuerpo tubular externo (1).

5. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la superficie externa del componente de suspensión (3) comprende muescas en forma de rosca (6b) que son complementarias y encajan en salientes del cuerpo tubular externo (1).

6. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la superficie externa del componente de suspensión (3) comprende adicionalmente muescas en forma de escalón (6c) que son complementarias y encajan en salientes del cuerpo tubular externo (1).

7. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el extremo superior (1a) del cuerpo tubular externo (1) comprende salientes laterales (7) que coinciden y se extienden en las muescas del componente de suspensión (3), permitiendo de este modo que se ajuste la distancia entre la membrana (4) y el fondo de un pocillo (12) de una placa de cultivo celular.

8. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un anillo de sujeción (8) que encaja en el extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1), adhiriéndose suavemente a la superficie externa de dicho cuerpo tubular externo (1), y en el que el extremo inferior (1b) del cuerpo tubular externo (1) comprende un rebaje (9) configurado para alojar de manera apretada el anillo de sujeción (8), en el que la membrana (4) permanece fijada entre dicho anillo de sujeción (8) y dicho rebaje (9), permitiendo de este modo una fácil liberación de la membrana (4).

9. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un extremo del cuerpo tubular complementario (2) comprende, en su diámetro interno, al menos una zona de tope (10) que es más estrecha que el diámetro externo del cuerpo tubular externo (1).

10. Dispositivo de cultivo celular, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cuerpo tubular externo (1) comprende al menos un saliente (11) en su extremo superior (1a) que puede actuar como pie.

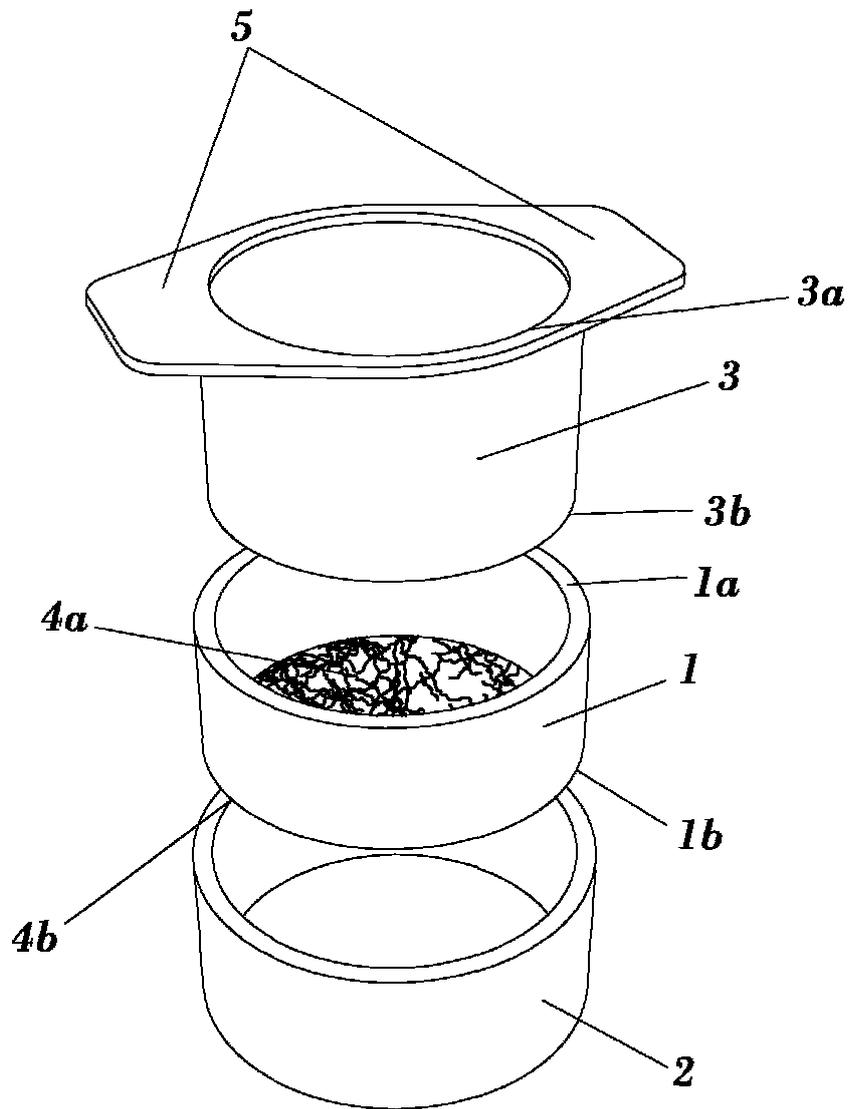


FIG. 1

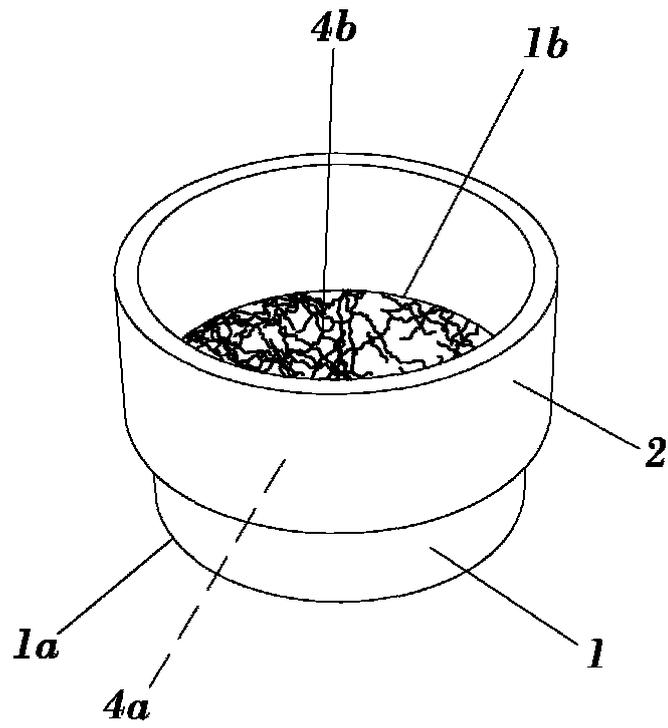


FIG. 2

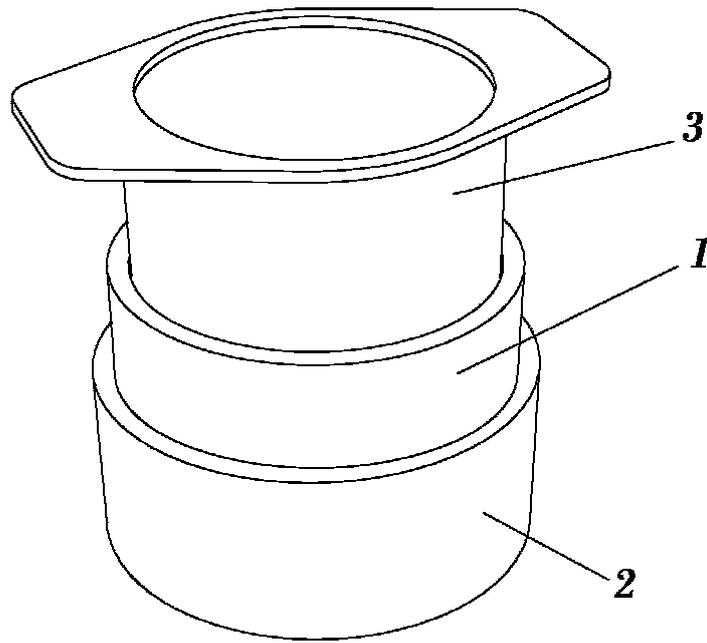


FIG. 3a

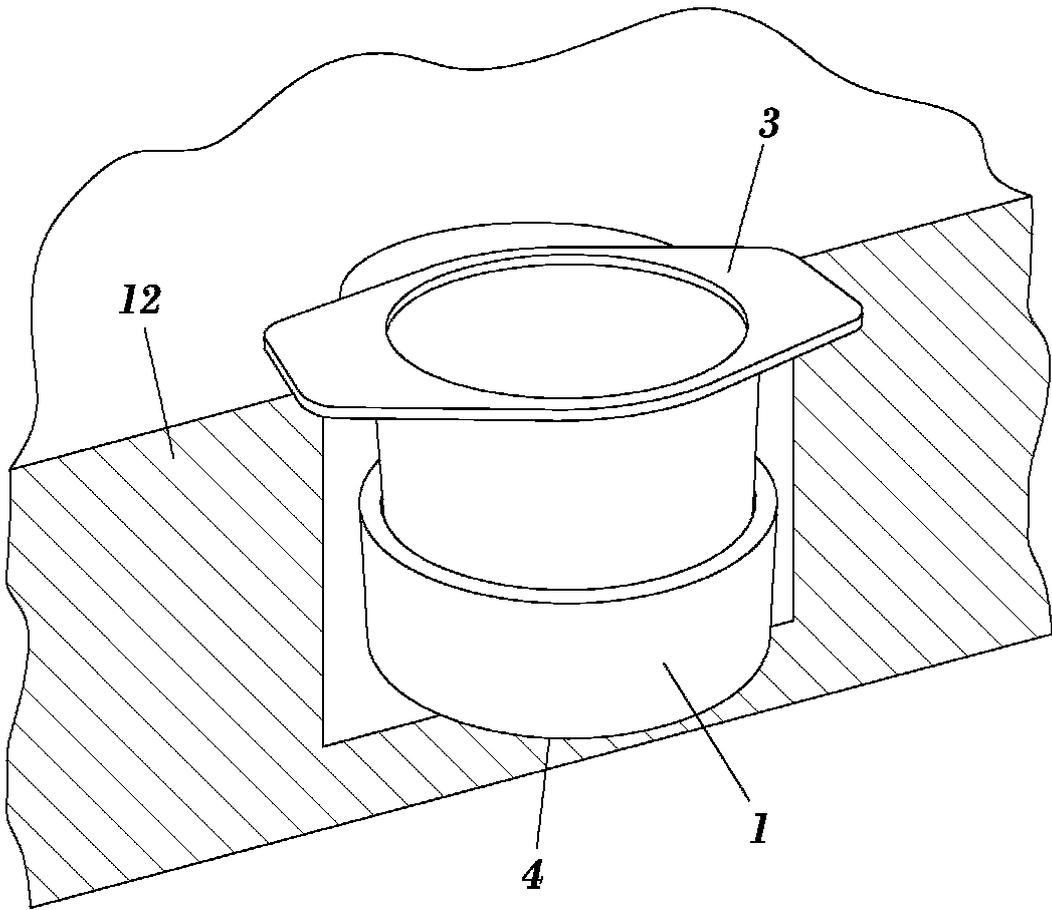


FIG. 3b

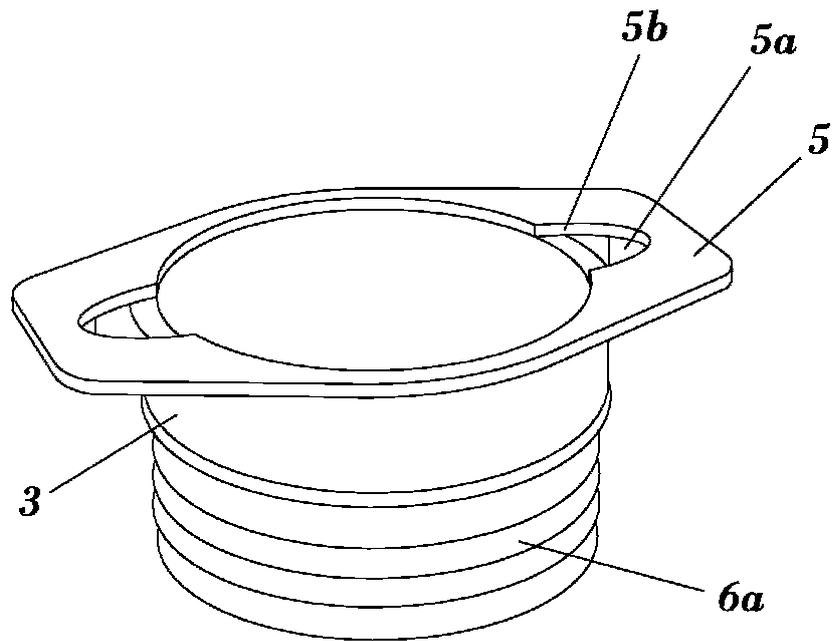
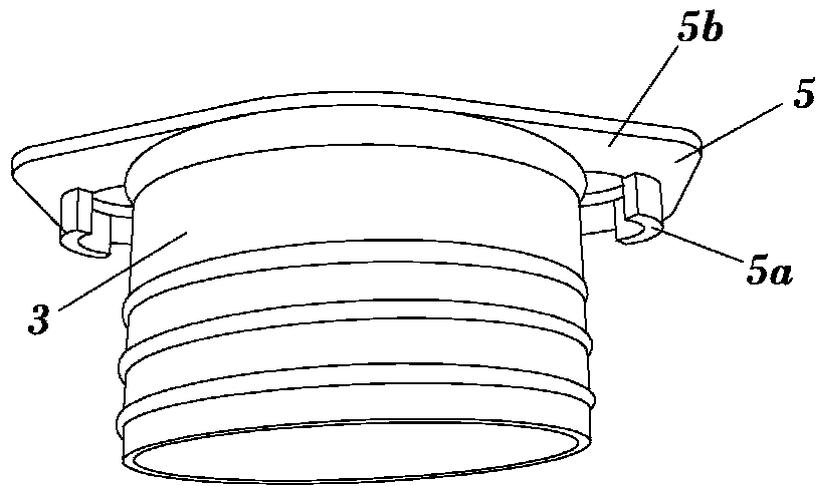


FIG. 4a

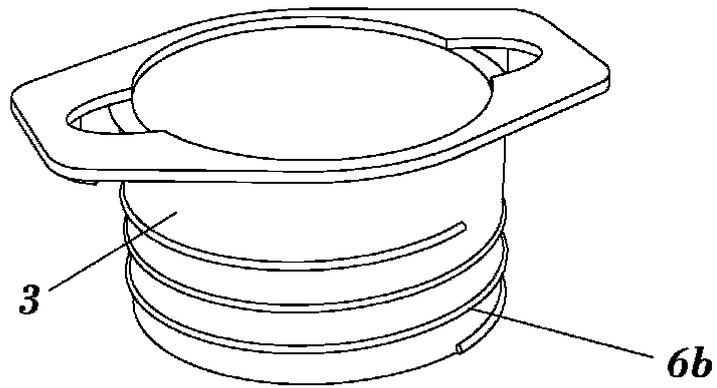


FIG. 4b

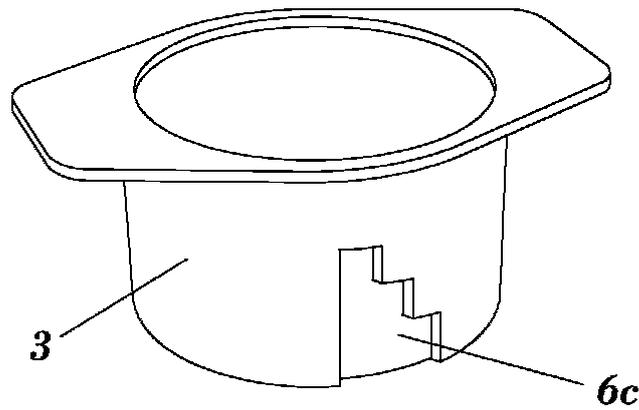


FIG. 4c

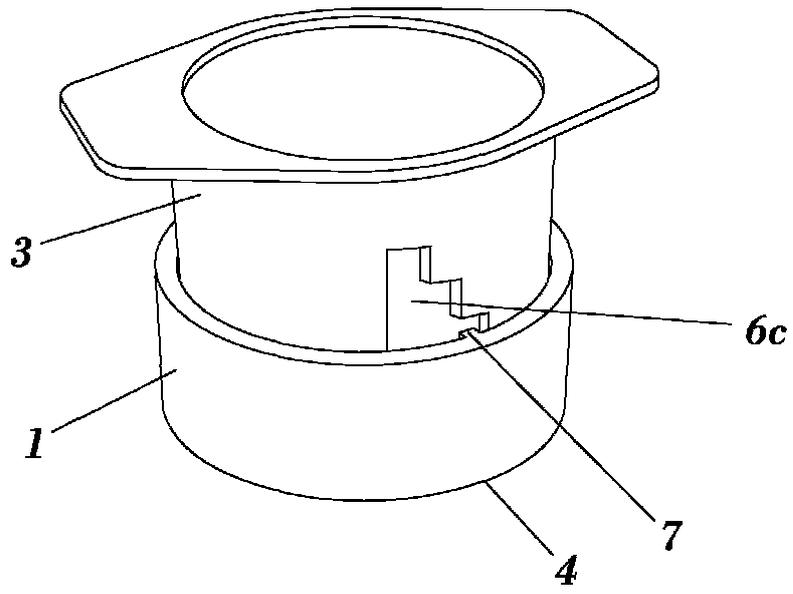


FIG. 5

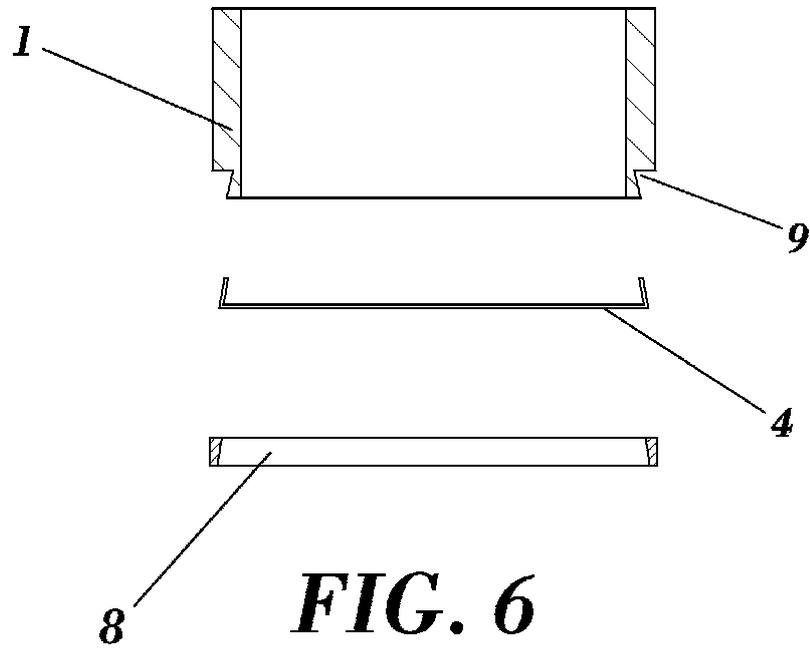
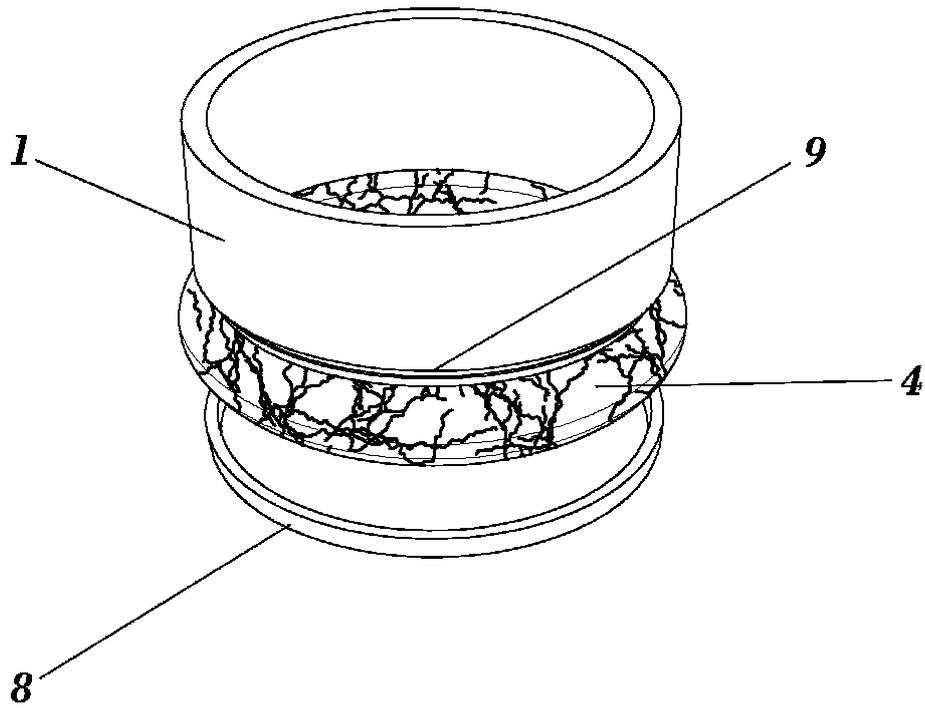


FIG. 6

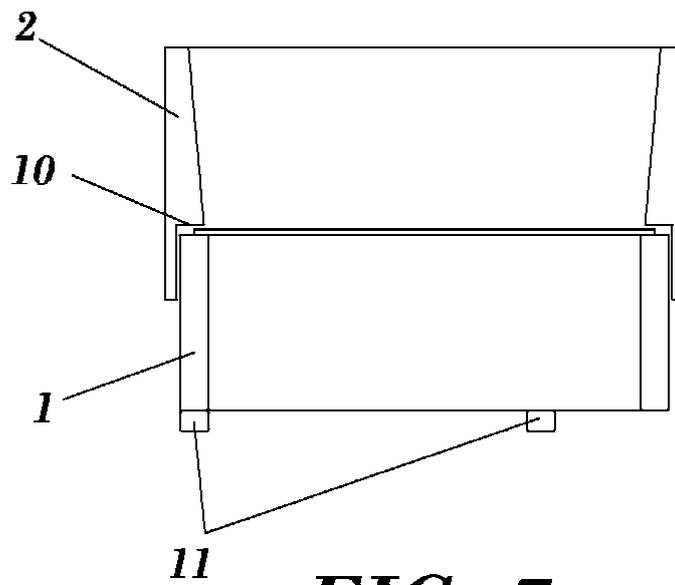
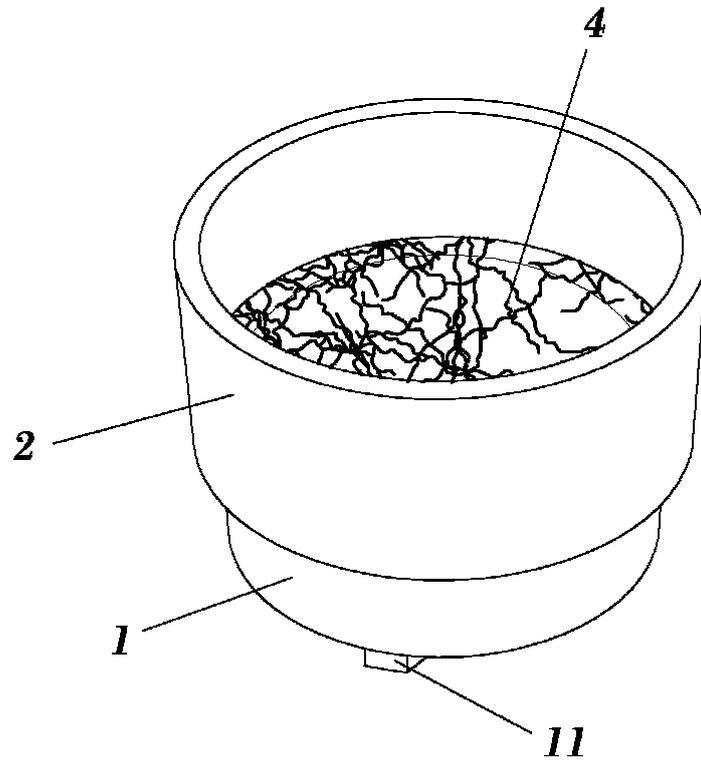


FIG. 7

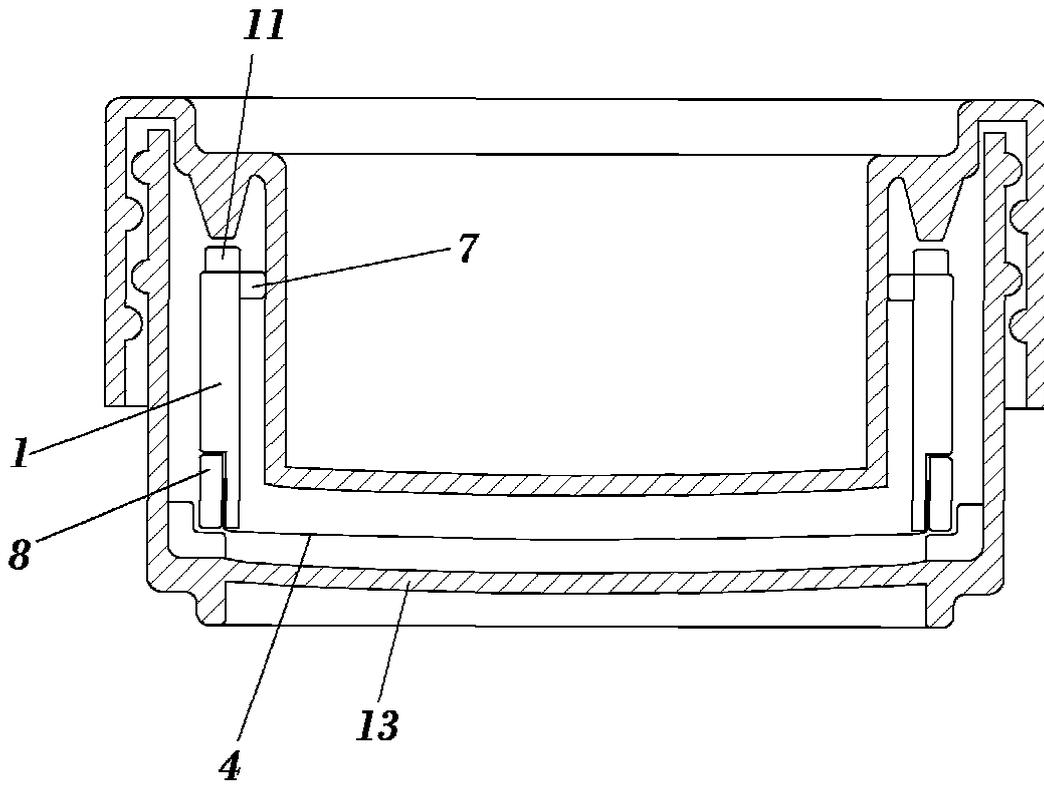


FIG. 8