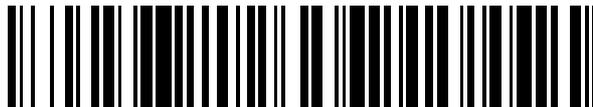


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 523**

51 Int. Cl.:

C12M 1/22 (2006.01)

C12M 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2008 PCT/DE2008/001206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09018799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008 E 08784382 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2171036**

54 Título: **Método y aparato para cultivar células vivas**

30 Prioridad:

02.08.2007 DE 102007036611

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

20.07.2018

73 Titular/es:

**DEUTSCHE DIABETES-
FORSCHUNGSGESELLSCHAFT E. V. (100.0%)
Auf'm Hennekamp 65
40225 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

**BURKART, VOLKER;
BURKART, THOMAS y
BURKART, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 676 523 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

MÉTODO Y APARATO PARA CULTIVAR CÉLULAS VIVAS

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para cultivar células vivas en un líquido, donde las células se introducen en al menos un espacio de cultivo en conexión con al menos un depósito para el líquido, donde el volumen del líquido en el al menos un espacio de cultivo se mantiene constante. La invención se refiere además a un aparato para cultivar células vivas en un líquido, que comprende al menos un espacio de cultivo en conexión con al menos un depósito para recibir el líquido a través de al menos un elemento de conexión, donde el elemento de conexión se diseña de un modo tal que el volumen del líquido en el al menos un espacio de cultivo se mantenga constante. La invención también se refiere al uso del presente dispositivo.

Antecedentes de la invención

Las células aisladas, las poblaciones celulares o los órganos hasta los individuos intactos tales como ratones y seres humanos representan sistemas biológicos complejos, cuyos componentes individuales se comunican entre sí de formas diversas. Esta comunicación tiene lugar básicamente a través de los denominados "mediadores", que también se pueden denominar "sustancias mensajeras" o "sustancias mensajeras solubles". Estas sustancias mensajeras incluyen, por ejemplo, hormonas o ciertos grupos de proteínas, tales como citoquinas o quimioquinas, que forman principalmente las células inmunológicas. En un sentido más amplio, las inmunoglobulinas (anticuerpos) también se podrían incluir en este grupo de sustancias. Las sustancias mensajeras liberadas por las células o los tejidos tienen cierto "efecto de largo alcance", es decir, no solo tienen un efecto en la proximidad inmediata de la célula, de la cual se liberan, sino que también pueden influir de forma sistémica en órganos enteros y el cuerpo entero. De ese modo, con este "efecto de largo alcance", las sustancias mensajeras contribuyen, por ejemplo, a la secuencia controlada de reacciones inmunológicas, o regulan la respuesta de las células o los sistemas orgánicos a los cambios en el estado metabólico. Dado que las sustancias mensajeras son relativamente estables (de larga vida), se pueden acumular en los sobrenadantes de cultivos celulares (o también en el suero de animales, pacientes), donde a continuación también se pueden cuantificar con los respectivos procedimientos de verificación específicos y sensibles. Con el

impacto de las sustancias farmacológicas, durante el curso de inflamaciones o en ciertas situaciones metabólicas, se puede influenciar de forma decisiva la liberación de estas sustancias mensajeras.

En grado creciente, está ganando mayor importancia el aislamiento de
5 las pequeñas y las más pequeñas poblaciones celulares parcialmente
altamente especializadas de materiales de muestras animales y humanas, por
ejemplo poblaciones de células inmunológicas y células endocrinas, y su uso
con fines de investigación. La observación *in vitro* a largo plazo de las
10 funciones de estas poblaciones celulares primarias sensibles requiere con
frecuencia múltiples extracciones de alícuotas del sobrenadante del cultivo para
la determinación de los mediadores liberados. Es decir, el cultivo a largo plazo
en diversas condiciones experimentales requiere una alta demanda de los
métodos de cultivo, que tienen que ser tan sensibles como sea posible. En la
15 actualidad, se preparan experimentos con bajos recuentos celulares,
principalmente en placas de Petri con un volumen de 2 a 5 ml o en las
cavidades de placas de múltiples pocillos, por ejemplo placas de
microvaloración de 96 pocillos de área 1/2 con un volumen de 100 µl.

Sin embargo, el cultivo en placas de Petri tiene la desventaja de que hay
una alta demanda de sustancias que se tienen que usar para la modulación de
20 las funciones celulares, lo que da como resultado costes muy elevados.
Además, los mediadores liberados por las células se diluyen mucho, de un
modo tal que la verificación de los mediadores en el sobrenadante de cultivo no
es posible o solo es posible con dificultad. El cultivo en placas de Petri tiene la
desventaja adicional de que pueden producirse fluctuaciones muy elevadas
25 entre las preparaciones en las diversas placas de Petri en una preparación, lo
que tiene un fuerte impacto en la reproducibilidad de los resultados. Además, la
pérdida o los valores bajos de los contactos célula-célula dan como resultado la
corrupción de las reacciones celulares.

Sin embargo, el cultivo en placas de microvaloración está asociado
30 además a desventajas considerables. De ese modo, la extracción repetida de
alícuotas del medio de cultivo de los pocillos para la medición de los
mediadores liberados requiere respectivamente la adición de medio reciente
para la compensación de volumen. De ese modo, por ejemplo, mediante la
adición de los errores de pipeteo durante la duración del ensayo, podrían
35 producirse grandes diferencias de volumen entre las cavidades individuales.

Además, el medio remanente sobre las células en las cavidades y las alícuotas de medio añadidas para la compensación de volumen pueden diferir considerablemente en temperatura, valor de pH, pO_2 , etc. De ese modo, con cada nueva adición de medio, existe una irritación de las células cultivadas, que altera la continuidad de las condiciones del cultivo.

5 Del documento de Patente WO-A-00 729 68 se conoce un dispositivo para tratar muestras líquidas que consiste básicamente en tres placas dispuestas una encima de la otra que están conectadas respectivamente entre sí mediante canales. La placa superior tiene cavidades que sirven como depósito para los reactivos. La placa media comprende depósitos pequeños, canales y válvulas de flujo inverso, que proporcionan la distribución de los reactivos en los espacios de reacción de la placa inferior. La placa inferior tiene una pluralidad de espacios de reacción y puede ser una placa de microvaloración de 96 pocillos o de 384 pocillos. La distribución regular de los reactivos desde la placa superior hasta los espacios de reacción de la placa inferior se consigue por medio de un sistema de alimentación impulsado por presión que permite simultáneamente la descarga o el lavado de los espacios de reacción. Esta disposición de las placas se proporciona para llenar simultánea y uniformemente, es decir, con volúmenes iguales, los espacios de reacción de la placa inferior. Al hacerlo de ese modo, los espacios de reacción de la placa inferior se llenan con los reactivos, posteriormente se lleva a cabo el análisis o la reacción deseados, y a continuación se lavan los espacios de reacción.

25 El documento de Patente EP-A-0 282 840 divulga un dispositivo para análisis químicos o bioquímicos y la identificación de microorganismos, que incluye una pluralidad de espacios de reacción. El dispositivo comprende además una disposición de distribución para llenar los espacios de reacción y un sistema de purga a través del que puede escapar el aire que se desplaza de los espacios de reacción. Además, se proporciona un depósito fuera del cual puede fluir un líquido a través de la disposición de distribución en los espacios de reacción. En este proceso, el líquido fluye sin presión a través del dispositivo donde, debido a la posición del conducto de purga que está dispuesto sobre la superficie del líquido en el depósito, se asegura que se llenen los espacios de reacción.

35 Del documento de Patente US-A-5 578 490 se conoce, por ejemplo, una

placa de cultivo celular, en la que las cavidades de cultivo reales están separadas respectivamente de un depósito asignado a la respectiva cavidad de cultivo mediante una membrana. La membrana es permeable para sustancias disueltas en el medio de cultivo celular, pero retiene las células en la cavidad de cultivo. De ese modo, las sustancias disueltas tales como, por ejemplo, los nutrientes, se pueden difundir desde el depósito a la cavidad de cultivo, así como las sustancias disueltas tales como, por ejemplo, los metabolitos, desde la cavidad de cultivo al depósito. Por lo tanto, esta placa de cultivo celular tiene la desventaja de que los mediadores que se van a determinar también se difunden fuera de la cavidad de cultivo, de modo que la concentración de los mediadores liberados por las células disminuye en gran medida. Por consiguiente, aquí la verificación de los mediadores en el sobrenadante de cultivo no es posible o solo es posible con dificultades.

Del documento de Patente US-A-5 726 060, se conoce además un método para cultivar células epiteliales respiratorias de mamíferos, en el que las células se cultivan en una inserción que tiene una base permeable para líquidos, sobre la que se pueden hacer crecer las células de forma adherente. La inserción se sitúa en una placa de cultivo, que sirve como depósito para el medio de cultivo. De ese modo, mediante el intercambio del medio en la placa de cultivo, las células se pueden proporcionar con medio reciente, sin dañarse o irritarse al hacerlo de ese modo. Sin embargo, este método también tiene la desventaja de que los mediadores que se van a determinar se pueden difundir fuera de la inserción, de modo que la concentración de los mediadores liberados por las células disminuye en gran medida, y de ese modo la verificación de los mediadores en el sobrenadante de cultivo no es posible o solo es posible con dificultad.

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es evitar las desventajas indicadas y proporcionar un método y un aparato del tipo mencionado anteriormente, con el que también se puedan cultivar muestras de tejido pequeñas y células con recuentos celulares bajos durante un periodo prolongado de tiempo sin reducir básicamente la concentración de los mediadores liberados desde las células debido a dilución o difusión.

De acuerdo con la invención, el objetivo se soluciona mediante un método del tipo mencionado anteriormente, en el que el volumen del líquido se

mantiene constante mediante un mecanismo de tipo válvula que previene simultáneamente la transferencia de líquido y/o sustancias disueltas o suspendidas en el líquido desde el espacio de cultivo al depósito. De ese modo, de acuerdo con la invención, no se debe rellenar ni intercambiar ningún

5 líquido ni medio, respectivamente, en el espacio de cultivo, dado que siempre puede fluir suficiente líquido en el espacio de cultivo desde el depósito a través del mecanismo de tipo válvula. Con el suministro de líquido uniforme a todos los espacios de cultivo (duplicados) desde al menos un depósito, se crean las condiciones óptimas para el cultivo a largo plazo. En el método de acuerdo con

10 la invención, las células y/o los tejidos se incuban, por ejemplo, en un espacio de cultivo con medio de cultivo o fluidos nutrientes similares, preferentemente en un volumen pequeño (aproximadamente 100 μ l). El espacio de cultivo está conectado con un depósito, que contiene preferentemente un volumen mayor del medio de cultivo (> 5 ml), de un modo tal que se permita un paso continuo

15 de líquido desde el depósito al espacio de cultivo para la compensación de volumen continua, donde la compensación de volumen uniforme tiene lugar en todos los espacios de cultivo de una preparación de ensayo. Al mantener el volumen constante en el espacio de cultivo, el cultivo de pequeñas muestras de tejido o bajos recuentos celulares en un volumen pequeño se hace posible

20 durante un periodo prolongado de tiempo, que también da como resultado nuevamente una mejora de los contactos célula-célula, una mayor acumulación de los mediadores liberados y una menor demanda de sustancias para la modulación de las funciones de las células/tejidos. De ese modo, mediante el uso del método de acuerdo con la invención, la liberación de sustancias

25 mediadoras o mensajeras, respectivamente, se puede examinar de forma exacta dependiente del tiempo bajo las influencias de diversas condiciones experimentales (por ejemplo, el uso de sustancias farmacológicas). De acuerdo con la invención, se previene el paso de líquido y/o sustancias disueltas o suspendidas en el líquido desde el espacio de cultivo al depósito mediante el

30 mecanismo de tipo válvula, mediante lo cual se puede evitar la pérdida de mediadores y de ese modo la reducción de la concentración de estas sustancias mensajeras. En total, por la presente, la dilución o la corrupción de las concentraciones de los mediadores liberados por las células se previene de forma ventajosa, lo que facilita claramente el análisis posterior o solo lo hace

35 posible en su totalidad. De ese modo, por una parte, el mecanismo de tipo

válvula permite el paso de líquido o medio de cultivo, respectivamente, desde el depósito al espacio de cultivo para la compensación de volumen aunque, sin embargo, por otra parte, previene el paso de medio (y moduladores, mediadores, etc. disueltos en el mismo) desde el espacio de cultivo al depósito de una forma muy eficaz.

5 Preferentemente, en el mecanismo de tipo válvula, al menos un cuerpo de cierre cierra una abertura y/o un canal debido a su propio peso, de un modo tal que no pueda escapar ninguna cantidad de líquido del espacio de cultivo al depósito. Sin embargo, de forma simultánea, el cuerpo de cierre permite la
10 compensación de volumen en el espacio de cultivo, cuando se extrae líquido desde el mismo o se retira debido a la evaporación, dado que debido a una reducción de la presión por la columna de líquido en el espacio de cultivo, el líquido puede fluir desde el depósito al espacio de cultivo.

Es particularmente ventajoso que el depósito se disponga en la
15 proximidad inmediata del espacio de cultivo dado que, en este caso, puede tener lugar la compensación de volumen en el espacio de cultivo con líquido del depósito adyacente con un valor de pH adaptado, una temperatura igual, una presión parcial de oxígeno (pO_2) adaptada, etc. Además, de la proximidad directa del depósito resulta una protección de evaporación mejorada en el
20 espacio de cultivo. En las placas de microvaloración/múltiples pocillos convencionales, las pérdidas por evaporación son mayores en los pocillos marginales (a pesar de la tapa situada en la parte superior). Debido a la proximidad particularmente ventajosa del depósito a los espacios de cultivo, en el caso de varios espacios de cultivo situados preferentemente en el área
25 central del aparato de acuerdo con la invención, los espacios de cultivo, de acuerdo con la invención, están rodeados completamente de forma preferente por el depósito lleno con líquido. La superficie del líquido del depósito, que es muy elevada en comparación con la de los espacios de cultivo, mantiene de ese modo las pérdidas por evaporación extremadamente bajas de los espacios
30 de cultivo situados centralmente para las realizaciones con varios espacios de cultivo.

En particular, para el cultivo de células que están disponibles solo en cantidades muy bajas, es ventajoso que el espacio de cultivo se llene con un volumen bajo de líquido, preferentemente un máximo de 200 μ l, de forma
35 particularmente preferente un máximo de 100 μ l o 50 μ l.

Una realización particularmente ventajosa del método de acuerdo con la invención proporciona además que el depósito se llene con un volumen que sea al menos cinco veces, preferentemente 10 veces, de forma particularmente preferente 100 veces, el volumen del líquido en el espacio de cultivo. Debido al
5 hecho de que el volumen en el depósito es considerablemente mayor que el de un espacio de cultivo o la suma de todos los espacios de cultivo, se garantiza una compensación de volumen continua, sin que se reduzca de forma apreciable el volumen en el espacio de cultivo o en los espacios de cultivo.

De acuerdo con la invención, el objetivo se soluciona además mediante
10 un aparato del tipo mencionado anteriormente, en el que el elemento de conexión comprende un mecanismo de tipo válvula. Debido a tal diseño del elemento de conexión, se permite un suministro de líquido uniforme en el espacio de cultivo o los espacios de cultivo (duplicados), respectivamente, desde un depósito, con el fin de crear las condiciones óptimas para un cultivo a
15 largo plazo. De ese modo, el elemento de conexión permite de forma ventajosa un paso de líquido desde el depósito a al menos un espacio de cultivo para la compensación de volumen. Al mantener el volumen constante en el espacio de cultivo, se hace posible el cultivo de pequeñas muestras de tejido o bajos recuentos celulares en un volumen pequeño durante un periodo prolongado de
20 tiempo, lo que nuevamente también da como resultado una mejora de los contactos célula-célula, evitar la dilución o la corrupción de las concentraciones de los mediadores liberados por las células y una menor demanda de sustancias para la modulación de las funciones de las células/tejidos.

El mecanismo de tipo válvula permite, de forma ventajosa, el paso de
25 líquido desde el depósito a al menos un espacio de cultivo. Sin embargo, de forma simultánea, el mecanismo también previene el paso de líquido y sobre todo de moduladores, mediadores y similares disueltos en el mismo, desde el espacio de cultivo al depósito. Por lo tanto, las moléculas diana potenciales se acumulan para análisis posterior, que especialmente en el caso de bajos
30 recuentos celulares es particularmente ventajoso. Una ventaja adicional del mecanismo de tipo válvula de acuerdo con la invención en comparación con las soluciones conocidas con una membrana descansa en la "solución de válvula" que también permite el paso de sustancias altamente moleculares desde el depósito a los espacios de cultivo respectivos. Por otra parte, las membranas
35 tienen habitualmente un "límite de exclusión molecular", que previene el paso

de sustancias altamente moleculares tales como, por ejemplo, proteínas del suero. Las proteínas del suero son componentes importantes de los medios de cultivo y absolutamente necesarias para el cultivo de la mayoría de las células de los mamíferos. De ese modo, con el uso de las membranas, estos
5 importantes componentes del medio pueden no pasar desde el depósito al espacio de cultivo completamente o solo de forma retrasada, mediante lo cual se daña a las células cultivadas. Además, debido a las cargas en la superficie del material de membrana (materiales catiónicos o aniónicos), se puede prevenir que los componentes cargados del medio de cultivo (por ejemplo,
10 ciertos aminoácidos) pasen a través de la membrana. Las "válvulas" de plásticos adecuados para el cultivo de células, cuyas superficies no están normalmente cargadas, no tienen estas características negativas.

Una realización particularmente ventajosa del aparato de acuerdo con la invención proporciona un elemento de conexión que comprende al menos una
15 abertura y/o al menos un canal, de un modo tal que solo esté disponible un área limitada bien controlable disponible para el paso del líquido.

Una realización ventajosa adicional del aparato de acuerdo con la invención proporciona un mecanismo de tipo válvula que comprende al menos un cuerpo de cierre. Este cuerpo de cierre se puede diseñar, por ejemplo, en
20 forma de bola, cilindro, cono o válvula.

En una realización ventajosa de la invención, el cuerpo de cierre también puede ser una lámina. La lámina puede estar fijada, por ejemplo, en el elemento de conexión mediante pegado o soldado. Alternativamente, la lámina también puede estar fijada mediante abrazaderas a un marco o similar, donde
25 preferentemente en esta realización el marco está fijado al elemento de conexión. En cualquier caso, la lámina se fija para que se mueva libremente de un modo tal que, dependiendo de las condiciones de presión presentes, cierre o abra, respectivamente, el canal del elemento de conexión. La lámina puede consistir, por ejemplo, en plástico o un material textil impregnado. En cualquier
30 caso, el material se ha de seleccionar de un modo tal que se garantice la función correcta del cuerpo de cierre. Como tal, sobre todo el peso, la elasticidad así como la capacidad de pegado o capacidad de soldadura del material desempeñan un papel importante.

Una realización particular proporciona una pluralidad de espacios de
35 cultivo, preferentemente 8, 16 o 32. De ese modo, el aparato de acuerdo con la

invención también se puede diseñar como un tipo de placa de múltiples pocillos o de placa de microvaloración, respectivamente, que en una forma ventajosa permite su aplicación en ensayos seriados y métodos de alto rendimiento (identificación sistemática de alto rendimiento). Como tal, los espacios de cultivo están separados preferentemente entre sí, donde cada espacio de cultivo individual tiene un elemento de conexión separado, de un modo tal que el volumen de compensación en cada espacio de cultivo pueda tener lugar sin la posible aparición de contaminaciones cruzadas.

Si el aparato de acuerdo con la invención consiste al menos parcialmente, por ejemplo, en el área de la base, de plástico transparente, es posible la observación microscópica continua de las células/tejidos cultivados así como la evaluación de parámetros específicos de célula/tejido usando métodos colorimétricos/fotométricos (fotometría de múltiples canales). En una realización del aparato de acuerdo con la invención con varios espacios de cultivo en el formato de una placa convencional de microvaloración/múltiples pocillos, además es posible la centrifugación con varios rotores (inserciones) centrífugos especiales, que comercializan numerosos fabricantes de centrifugas de laboratorio, existen en la mayoría de los laboratorios de cultivo de células/tejidos o se usan de forma rutinaria.

El aparato de acuerdo con la invención se puede usar para el cultivo a largo plazo de células vivas o tejidos en bajas cantidades y/o bajo volumen, en particular en múltiples preparaciones para estudios cinéticos en diversas condiciones experimentales. De ese modo, el aparato, al igual que el método de acuerdo con la invención, es adecuado para el cultivo y la observación de una pluralidad de tipos de células (células primarias, líneas celulares) de seres humanos y animales (por ejemplo, ratón, rata), que solo se producen en una baja cantidad o solo se pueden aislar en bajas cantidades tales como, por ejemplo:

- Células endocrinas: células de las glándulas adrenales, células beta productoras de insulina del páncreas;
- Subpoblaciones de células inmunológicas: linfocitos T reguladores, linfocitos citolíticos naturales;
- Células endoteliales de vasos sanguíneos;
- Células precursoras para diferentes tejidos: hueso, epitelio pulmonar; o
- Células nerviosas.

El aparato de acuerdo con la invención se puede usar además para la identificación sistemática de sustancias, en particular sustancias con influencia en la supervivencia y/o la función (liberación de mediadores tales como hormonas, sustancias mensajeras inmunológicas (citoquinas)) de células y tejidos (ensayos de toxicidad, examen de inhibidores/estimuladores farmacológicos). El sistema de cultivo facilita en particular los análisis de secuencia para la determinación del punto del tiempo en el que, por ejemplo, se produce o alcanza su valor óptimo el efecto de cierta sustancia.

A continuación, la invención se explicará en lo sucesivo a modo de ejemplo con mayor detalle basándose en las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra una vista lateral esquemática (sección longitudinal) de una realización del aparato de acuerdo con la invención con un depósito con un volumen de aproximadamente 5 ml y un espacio de cultivo con un volumen de aproximadamente 100 µl.
- La Figura 2 muestra una vista lateral esquemática (sección longitudinal) de una realización adicional del aparato de acuerdo con la invención con un mecanismo de tipo válvula en el elemento de conexión.
- La Figura 3 muestra una vista en perspectiva del mecanismo de tipo válvula de acuerdo con la Figura 2.
- Las Figuras 4-8 muestran secciones a través de diversas realizaciones del elemento de conexión con vistas desde el lateral, y siguiendo una rotación de 90°, desde la parte delantera, a) vista lateral, b) vista frontal.
- La Figura 9 muestra una realización del aparato de acuerdo con la invención con 16 espacios de cultivo.

Descripción de realizaciones a modo de ejemplo y preferentes de la invención

La Figura 1 muestra una vista lateral esquemática de una realización de un aparato 1 de acuerdo con la invención con un depósito 2 y un espacio 3 de cultivo. El depósito 2 está conectado con el espacio 3 de cultivo a través de un elemento 4 de conexión. El elemento 4 de conexión tiene un dispositivo o un mecanismo, que no se muestra aquí, que previene que un líquido 5 en el espacio 3 de cultivo, que puede ser, por ejemplo, un medio de cultivo para

células vivas u otra solución de nutrientes, fluya desde el espacio 3 de cultivo al depósito 2. Sin embargo, de forma simultánea, el dispositivo permite el paso del líquido 5 desde el depósito 2 al espacio 3 de cultivo. De esta forma, puede tener lugar la compensación de volumen en el espacio 3 de cultivo, cuando se
5 extrae el líquido 5 del mismo o, por ejemplo, se retira del mismo por evaporación. Es decir, existe una adaptación automática y continua de la altura del nivel de líquido entre el depósito 2 y el espacio 3 de cultivo. Tan pronto como disminuye el nivel de líquido en el espacio 3 de cultivo, el líquido 5 fluye desde el depósito 2 al espacio 3 de cultivo, hasta que los niveles de líquido en
10 ambos compartimentos tienen de nuevo la misma altura. Dado que en la realización que se muestra aquí el volumen del líquido 5 en el depósito 2 (5 ml) es claramente mayor, es decir, aquí 50 veces mayor, que en el espacio 3 de cultivo (100 μ l), el volumen del líquido 5 en el espacio de cultivo permanece prácticamente constante. Debido al hecho de que en la realización que se
15 muestra aquí el depósito 2 está dispuesto en la proximidad inmediata del espacio 3 de cultivo, es decir, estos están conectados solo a través de un corto elemento 4 de conexión, el volumen de compensación en el espacio 3 de cultivo puede tener lugar con el líquido 5 desde el depósito 2 adyacente con un valor de pH adaptado, una temperatura igual, una presión parcial de oxígeno
20 (pO_2) adaptada, etc. Por este medio, las conducciones de cultivo se mantienen constantes, y se evita un estrés innecesario de las células 6 o los tejidos, respectivamente, en el espacio 3 de cultivo. Además, desde la proximidad directa del depósito 2 resulta una protección mejorada de la evaporación en el espacio 3 de cultivo. De acuerdo con el método de la invención, el aparato 1
25 que se muestra aquí se puede usar, por ejemplo, para el cultivo de células vivas 6 en baja cantidad y en pequeño volumen. Para este fin, las células 6 se añaden, por ejemplo, a 50 μ l de medio y a continuación se introducen en el espacio 3 de cultivo. Después de sedimentación o retirada por centrifugación de las células 6, estas se sitúan principalmente en el fondo del espacio 3 de
30 cultivo. En una realización del aparato de acuerdo con la invención con varios espacios de cultivo en el formato de una placa convencional de microvaloración/múltiples pocillos, también es posible la centrifugación con rotores (inserciones) centrifugos especiales, que comercializan numerosos fabricantes de centrífugas de laboratorio, existen en la mayoría de los
35 laboratorios de cultivo de células/tejidos y se usan de forma rutinaria. Ahora se

puede llenar un mayor volumen de medio, por ejemplo 5 o 10 ml, en el depósito 2, después de lo cual el nivel del líquido en el espacio 3 de cultivo aumenta hasta el nivel del depósito 2. Ahora, el cultivo celular se puede mantener en condiciones constantes durante un periodo prolongado de tiempo donde el
5 volumen en el espacio 3 de cultivo permanece aproximadamente constante, incluso si se retira líquido con fines de ensayo.

En esta realización, el aparato 1 de acuerdo con la invención está cubierto con una tapa 7 que se puede retirar de plástico transparente al igual que para una placa convencional de microvaloración/múltiples pocillos. Esta
10 tapa 7 es importante ante todo para garantizar la esterilidad del sistema a lo largo de la duración del cultivo. No descansa al mismo nivel contra el aparato 1 de forma sellada, sino que permite, tal como la tapa de una placa de Petri, con pequeños espacios (no se muestra aquí), el importante intercambio de gas para la estabilización del valor de pH entre el sistema de cultivo y el interior de
15 una incubadora.

En las placas convencionales de microvaloración/múltiples pocillos, las pérdidas por evaporación son mayores en los pocillos marginales (a pesar de la tapa situada en la parte superior). Debido a la proximidad particularmente
20 ventajosa del depósito con respecto a los espacios de cultivo, en el caso de varios espacios de cultivo dispuestos preferentemente en el área central del aparato de acuerdo con la invención, los espacios de cultivo están rodeados completamente de forma ideal por el depósito lleno con líquido. La superficie de líquido del depósito, que en comparación con la de los espacios de cultivo es muy grande, mantiene de ese modo extremadamente bajas las pérdidas por
25 evaporación de los espacios de cultivo situados centralmente en las realizaciones con varios espacios de cultivo.

La Figura 2 muestra una vista lateral esquemática de una realización adicional de un aparato 10 de acuerdo con la invención con un mecanismo de tipo válvula en un elemento 11 de conexión. El mecanismo de tipo válvula
30 comprende un cuerpo 12 de cierre en forma de cilindro dispuesto en el canal 13, que conecta el depósito 2 con el espacio 3 de cultivo. El mecanismo de tipo válvula en esta realización se basa en el principio técnico de "válvulas de control (comprobación) del propio peso" y permite un flujo dirigido del líquido 5 desde el depósito 2 al espacio 3 de cultivo.

35 Como tal, el mecanismo de tipo válvula de acuerdo con la invención

tiene las siguientes ventajas:

- alta fiabilidad funcional,
 - fabricación sencilla a la menor escala posible,
 - posible uso de plásticos compatibles con cultivos de células/tejidos,
- 5 - no se perjudica la función durante el transporte o el almacenamiento de los sistemas de cultivo.

El cuerpo 12 de cierre cierra la abertura 14 en el canal 13 con su propio peso, de un modo tal que no pueda fluir ninguna cantidad de líquido (incluyendo las sustancias disueltas en el mismo) desde el espacio 3 de cultivo

10 al depósito 2. Sin embargo, tan pronto como la presión de la columna de líquido en el depósito 2 se hace mayor que la presión de la columna de líquido en el espacio 3 de cultivo, por ejemplo tras la extracción de líquido del espacio 3 de cultivo, el cuerpo 12 de cierre se presiona hacia arriba, de un modo tal que se abra la abertura 14. A continuación, el líquido 5 puede fluir desde el depósito 2

15 al espacio de cultivo, hasta que se hayan adaptado de nuevo los niveles de líquido en ambos compartimentos. A continuación, debido a su propio peso, el cuerpo 12 de cierre se hunde de nuevo hacia abajo y cierra la abertura 14, de un modo tal que no pueda fluir ninguna cantidad del líquido 5 de vuelta desde el espacio 3 de cultivo al depósito 2. El mecanismo de acuerdo con la invención

20 es muy eficaz y garantiza una compensación de volumen continua en el espacio 3 de cultivo, sin que se diluyan o puedan escapar las sustancias producidas por las células 6 y que se van a verificar en el sobrenadante de cultivo. En la presente realización, el canal 13 del elemento 11 de conexión se dispone de un modo tal que el puerto 15 de entrada, a través del que fluye el

25 líquido 5 desde el depósito 2 al canal 13, se sitúe en la proximidad de la parte inferior del depósito 2, mientras que el puerto 16 de salida, a través del cual fluye el líquido 5 fuera del canal 13 al espacio 3 de cultivo, se sitúa en la sección superior del espacio 3 de cultivo. Esta disposición tiene la ventaja de que las células 6 no se irritan por el flujo en el líquido 5. De ese modo, en el

30 aparato 10 de acuerdo con la invención, las células 6 se pueden cultivar en un bajo volumen y sin alteraciones a lo largo de un periodo prolongado de tiempo.

La Figura 3 muestra una vista en perspectiva del elemento 11 de conexión del aparato 10 de acuerdo con la Figura 2. Aquí, se hace evidente que el cuerpo 12 de cierre tiene la forma de un cilindro plano y cierra la

35 abertura 14 mediante un ajuste apretado de la pared 17 del canal 13, que se

estrecha en esta área hacia el puerto 15 de entrada. Aquí, las flechas 18 simbolizan la dirección de flujo del líquido o el medio de cultivo, respectivamente, en el canal 13.

Las Figuras 4 a 8, respectivamente, muestran secciones a través de
5 diversas realizaciones alternativas de elementos de conexión de acuerdo con la invención en vistas lateral y frontal. Con fines de claridad, los componentes individuales de los elementos de conexión y el mecanismo de tipo válvula se proporcionan con los mismos numerales de referencia en las Figuras 4 a 8 que los componentes respectivos en las Figuras 2 y 3. Como tal, la superficie 19 de
10 contacto para el cuerpo 12 de cierre se muestra respectivamente resaltada en color gris.

La Figura 4 muestra el elemento 11 de conexión con el cuerpo 12 de cierre de acuerdo con las Figuras 2 y 3. La Figura 5 muestra un elemento 11 de conexión con un cuerpo 12 de cierre con forma de bola, mientras que la Figura
15 6 muestra un elemento 11 de conexión con un cuerpo 12 de cierre con forma de cono. Las realizaciones que se muestran en las Figuras 2 a 6 tienen en común que el canal 13 se estrecha en el área de la abertura 14 hacia el puerto 15 de entrada, de un modo tal que se forme una superficie 19 de contacto, contra la que pueda descansar al mismo nivel el cuerpo 12 de cierre con el fin
20 de cerrar la abertura 14. La Figura 7 muestra una realización alternativa adicional del elemento 11 de conexión, en la que el cuerpo 12 de cierre tiene la forma de una válvula. En esta realización, el canal 13 tiene un borde 20 en la proximidad del puerto 16 de salida, contra el que la válvula puede descansar al mismo nivel, de un modo tal que se mantenga en una posición en la que esté
25 cerrada la abertura 14. La válvula se puede girar hacia el puerto 16 de salida alrededor del eje 21.

La Figura 8 muestra el elemento 11 de conexión con un cuerpo 12 de cierre plano, donde el cuerpo 12 de cierre es una lámina. La lámina está fijada al elemento 11 de conexión en el área 22 de fijación, donde el área 22 de
30 fijación, por ejemplo, puede ser un sello de pegamento o soldadura. Excepto por el área 22 de fijación, la lámina se puede mover libremente y de ese modo se puede mover en las direcciones indicadas por la flecha doble. En su estado cerrado, la lámina descansa al mismo nivel contra las superficies 19 de contacto y de ese modo cierra el canal 13. Sin embargo, en el caso de un
35 exceso de presión en el canal 13, se puede mover alejándose de las

superficies 19 de contacto y de ese modo abrir el canal 13.

La Figura 9 muestra una realización del aparato 30 de acuerdo con la invención con 16 espacios 31 de cultivo. En este ejemplo, los espacios 31 de cultivo están dispuestos en dos filas paralelas con ocho espacios 31 de cultivo cada una. Cada espacio 31 de cultivo individual está conectado con un depósito 32, que rodea la disposición de los espacios 31 de cultivo, a través de un elemento 33 de conexión separado. En los elementos 33 de conexión con forma de canal están dispuestos mecanismos de tipo válvula, respectivamente, que se simbolizan mediante las flechas 34. El modo de operación de estos mecanismos de tipo válvula se corresponde con el que se ya ha descrito anteriormente con respecto a las Figuras 1 a 8.

Lista de referencias:

	1	Aparato
	2	Depósito
15	3	Espacio de cultivo
	4	Elemento de conexión
	5	Líquido
	6	Células
	7	Tapa
20	8	
	9	
	10	Aparato
	11	Elemento de conexión
	12	Cuerpo de cierre
25	13	Canal
	14	Abertura
	15	Puerto de entrada
	16	Puerto de salida
	17	Pared
30	18	Flechas
	19	Superficie de contacto
	20	Borde
	21	Eje
	22	Área de fijación
35	30	Aparato

- 31 Espacios de cultivo
- 32 Depósito
- 33 Elemento de conexión
- 34 Flechas

5

REIVINDICACIONES

1. Método para cultivar células vivas en un líquido, donde las células se introducen en al menos un espacio de cultivo que está conectado con al menos un depósito para el líquido, donde el volumen del líquido (5) en al menos un espacio de cultivo (3, 31) se mantiene constante, **caracterizado por que** el volumen del líquido (5) se mantiene constante mediante un mecanismo de tipo válvula que previene simultáneamente la transferencia de líquido (5) y/o sustancias disueltas o suspendidas en el líquido (5) desde el espacio de cultivo (3, 31) al depósito (2, 32).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en el mecanismo de tipo válvula al menos un miembro (12) de sellado sella una abertura (14) y/o un canal (13) debido a su propio peso.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el depósito (2, 32) está dispuesto en proximidad inmediata al espacio (3, 31) de cultivo.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el espacio (3, 31) de cultivo está lleno con un volumen bajo de líquido (5), preferentemente como máximo 200 µl, de forma particularmente preferente como máximo 100 µl o 50 µl.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el depósito (2, 32) está lleno con un volumen que es al menos 5 veces, preferentemente 10 veces, de forma particularmente preferente 100 veces, el volumen del líquido (5) en el espacio (3, 31) de cultivo.
6. Dispositivo (1, 10, 30) para cultivar células vivas en un líquido, que comprende al menos un espacio de cultivo que está conectado con al menos un depósito para recibir el líquido a través de al menos un elemento de conexión, donde el elemento (4, 11, 33) de conexión está diseñado de un modo tal que el volumen del líquido (5) en al menos un espacio (3, 31) de cultivo se mantenga constante, **caracterizado por que** el elemento (4, 11, 33) de

conexión comprende un mecanismo de tipo válvula.

5 7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el elemento (4, 11, 33) de conexión comprende al menos una abertura (14) y/o al menos un canal (13).

10 8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que el mecanismo de tipo válvula comprende al menos un miembro (12) de sellado.

9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el miembro (12) de sellado se construye de tipo bola, cilindro, cono u obturador.

15 10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el miembro (12) de sellado es una lámina metálica delgada.

20 11. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que se proporciona una pluralidad de espacios (31) de cultivo, preferentemente 8, 16 o 32.

12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que los espacios (31) de cultivo están separados entre sí, donde cada espacio (31) de cultivo individual incluye un elemento (33) de conexión específico.

25 13. Uso del dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para el cultivo a largo plazo de células o tejidos vivos en pequeñas cantidades y/o bajo volumen.

30 14. Uso del dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para la identificación sistemática de sustancias.

FIG. 1

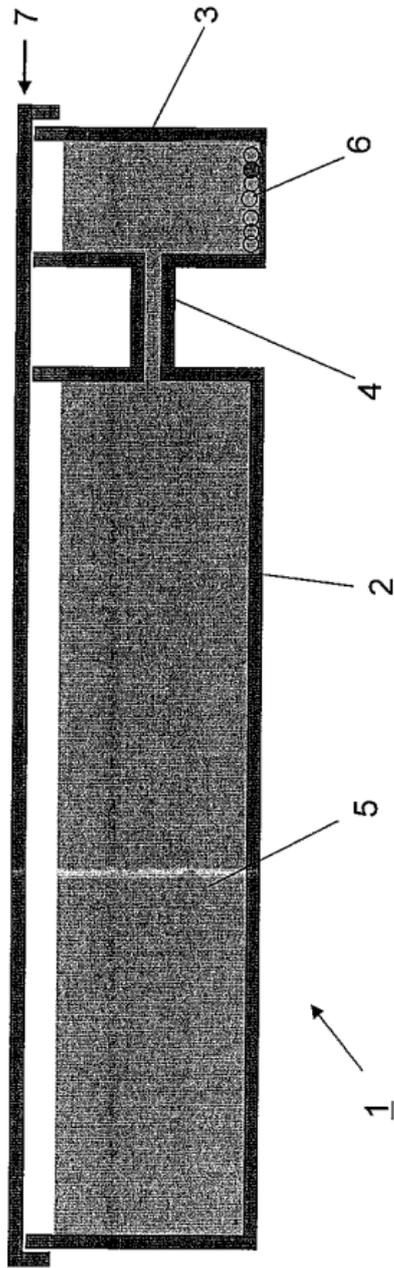
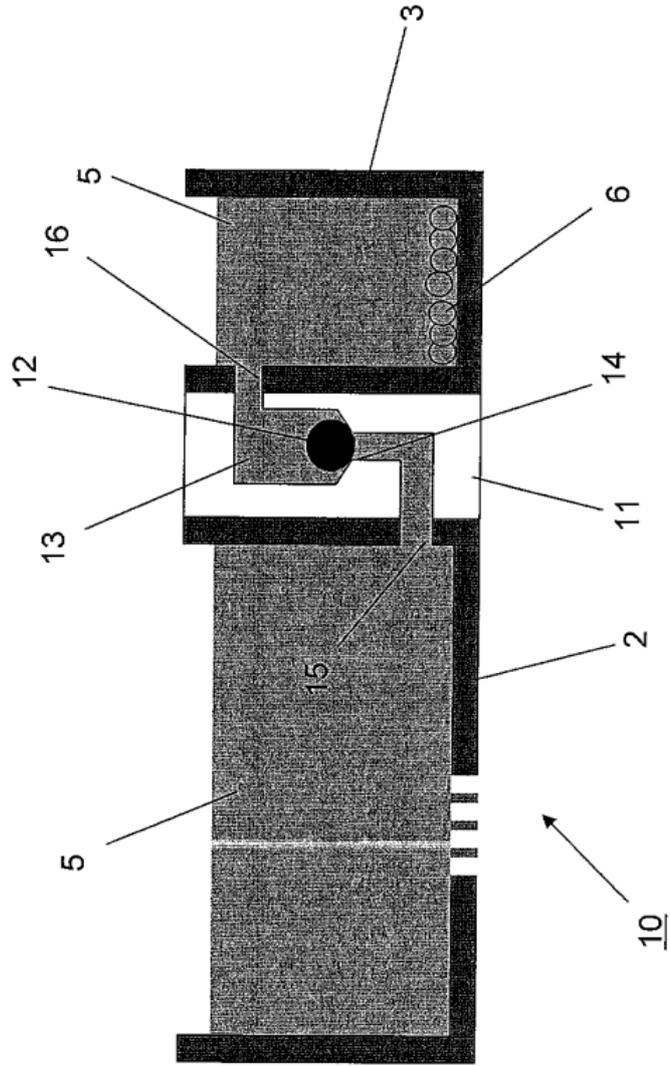
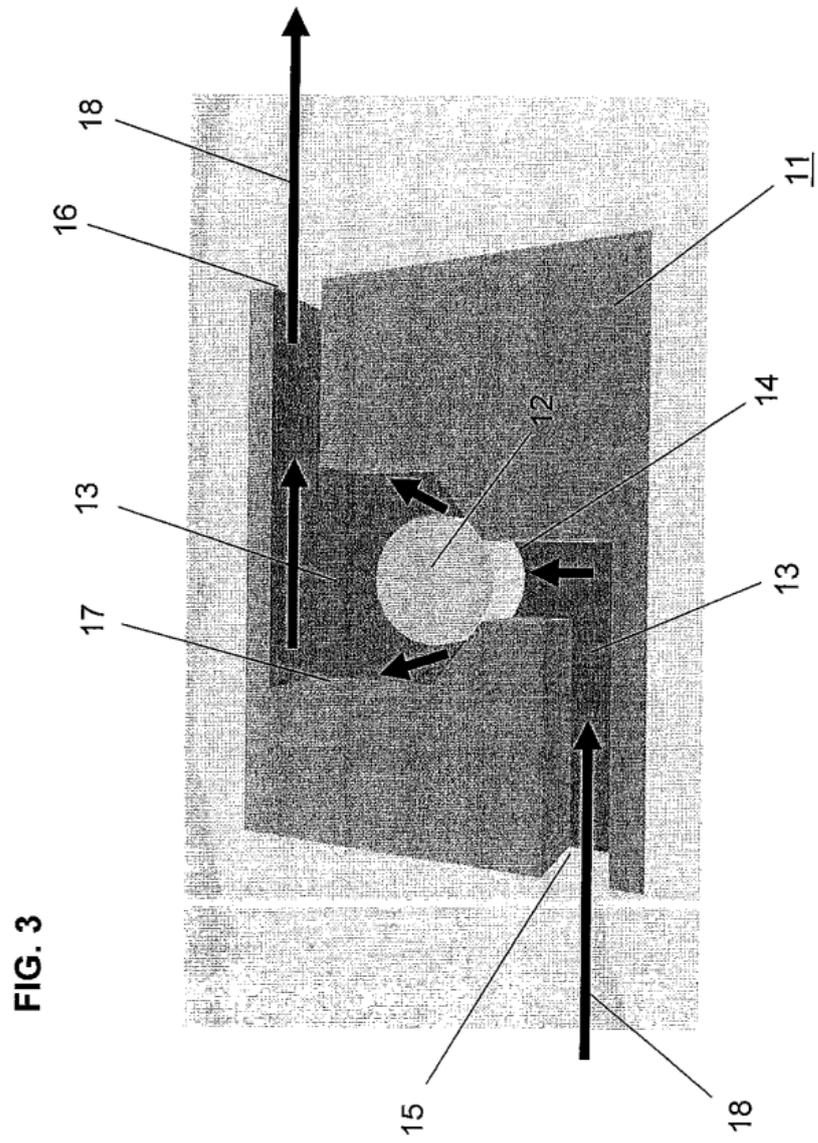
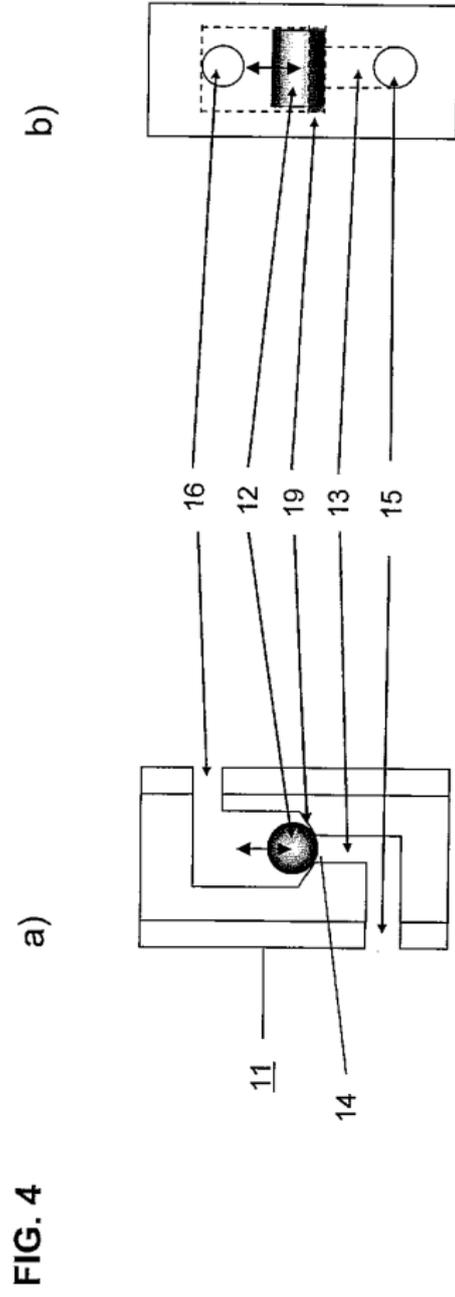
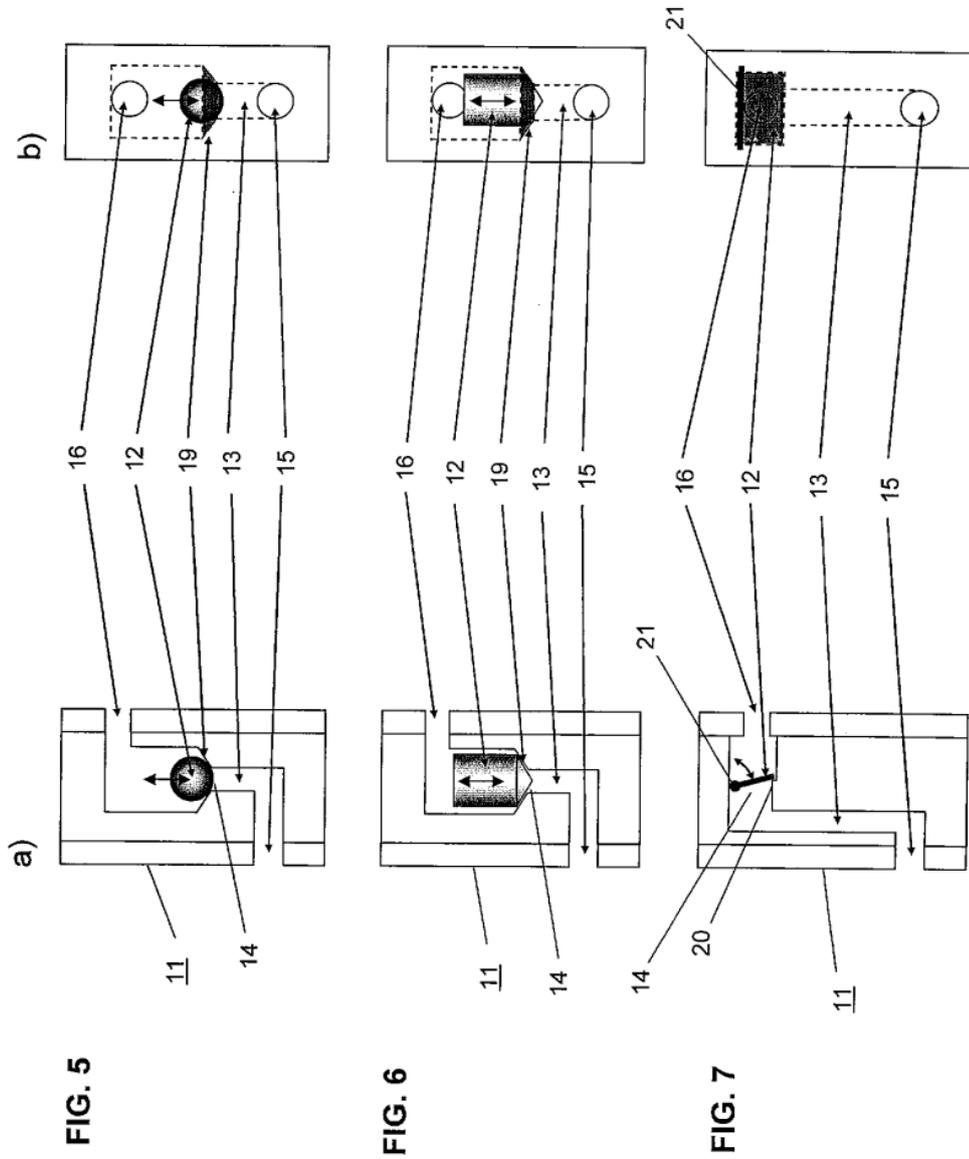


FIG. 2









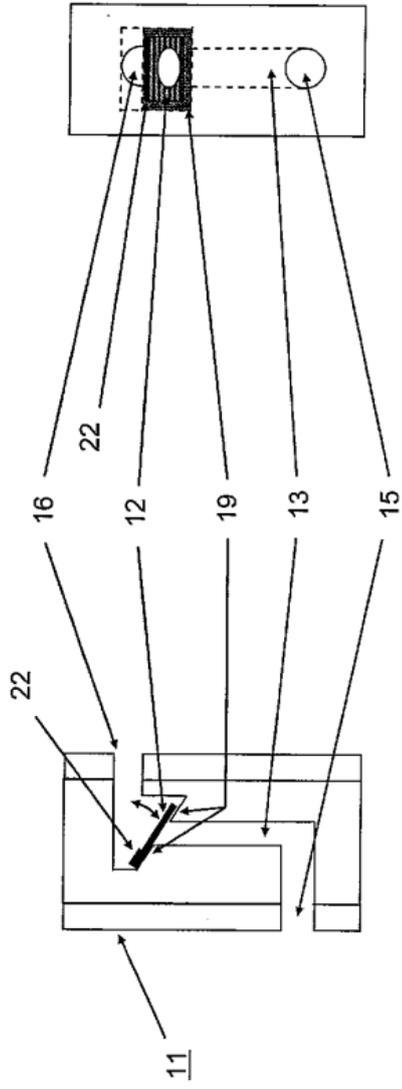


FIG. 8

