

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 284**

51 Int. Cl.:

C12M 1/33 (2006.01)

B01F 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2007 PCT/US2007/080958**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008 WO08067044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007 E 07871147 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2076157**

54 Título: **Dispositivos de dispersión para agregados**

30 Prioridad:

11.10.2006 US 851037 P

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

31.10.2018

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg 500, Duluth
Georgia 30096, US**

72 Inventor/es:

RIGAUT, GUILLAUME

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 688 284 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivos de dispersión para agregados

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a dispositivos de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados, especialmente de suspensiones de cultivos que contienen agregados de células. La presente invención proporciona procedimientos de flujo continuo para dispersar agregados para liberar células individuales. La presente invención se refiere además a procedimientos de flujo continuo para la homogenización de suspensiones de células animales que contienen agregados de células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** Durante los últimos 100 años, los cultivos celulares han dado lugar a muchas aplicaciones en el campo de la biotecnología. El progreso en el cultivo celular, especialmente para obtener una productividad celular más elevada, ha permitido el desarrollo de nuevos procesos para la producción de proteínas y vacunas recombinantes, biomasa y nuevos usos de células como terapias celulares.

20 **[0003]** Las células se cultivan principalmente para dos aplicaciones. En primer lugar, la amplificación de células mediante subcultivo dará lugar a aumentos de producción de biomasa de células viables. Estas células viables se pueden usar para por ejemplo terapias celulares, para infecciones virales y para obtener células infectadas y similares. La segunda aplicación es para producir y aislar compuestos biológicos de interés habitualmente, pero no siempre, presentes en el interior de las células, como polinucleótidos, proteínas, patógenos animales, o fragmentos de los mismos. Estos bioproductos también se pueden incorporar en otros productos como vacunas de ADN, vacunas de subunidades, vacunas virales, composiciones para terapia génica, fármacos y similares.

30 **[0004]** Un problema importante del cultivo celular es la formación de agregados de células formados durante el cultivo. Los agregados de células, al limitar el acceso de las células a los nutrientes y por la inhibición del crecimiento por contacto, reducen el rendimiento del cultivo en términos de la producción de biomasa y de los compuestos de interés. Además, la agregación de células aumenta la muerte celular, principalmente debido a la apoptosis. Para la producción de biomasa las células recolectadas no deben estar muertas o ser moribundas para hacer posible un subcultivo óptimo.

35 **[0005]** Las células crecen adheridas a una superficie (es decir, dependientes de anclaje) o bien en suspensión (es decir, independientes de anclaje). La mayoría de los cultivos de células animales son dependientes de anclaje y crecen en capas unicelulares (monocapas) o en la superficie de microportadores, en placas o matraces. La tecnología de botellas rodantes se desarrolló para cultivar un mayor número de células animales dependientes de anclaje (Gey G. O., AM.J.Cancer, 17: 752-756 (1933)) aunque una mejora posterior surgió por el uso de microportadores en biorreactores, lo cual permite un aumento del área de crecimiento disponible para las células por unidad de volumen (van Wezel A. L., Nature, 216: 64-65 (1967)).

45 **[0006]** Estas tecnologías se han estado usando durante más de 20 años en los campos farmacéutico y médico para procesos como el crecimiento y la infección celular, la preparación de vacunas, la expresión de proteínas recombinantes, y el cultivo de células vegetales. Muchas de estas técnicas se han publicado y se usan de forma rutinaria (Véase por ejemplo Freshney, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic techniques: 3rd edition 1994).

50 **[0007]** Habitualmente durante el cultivo de células dependientes de anclaje, cuando el cultivo alcanza una confluencia, es deseable desagregar el cultivo en células individuales que conserven la viabilidad. Los cultivos de células independientes de anclaje también muestran grupos de células, y que el problema de la dispersión de los grupos de células existe, independientemente de qué tipo de anclaje tengan las células. La suspensión desagregada resultante puede entonces ser subcultivada o ser usada directamente como una fuente de un compuesto aceptable desde el punto de vista farmacéutico. La dispersión de células puede ser una solución a los problemas inherentes de la agregación de células pero también es problemática, sin embargo, debido a la fragilidad de las células que da lugar a tensiones y muertes.

[0008] Las células a menudo están tan bien adheridas a la superficie del recipiente de cultivo subyacente que

las enzimas proteolíticas (como la tripsina, la colagenasa, la pronasa), los agentes quelantes (como el ácido etilendiaminotetraacético) y las fuerzas mecánicas (como la raspadura) (Lloyd y col., J. Cell Sci. 22: 671-684 (1976); Whur y col., J. Cell Sci. 23: 193-209 (1977); Freyer y Sutherland, Cancer Res. 40: 3956-3965 (1980); Lydersen y col., Bio/Technol. 1: 63-67 (1985)). La dispersión de agregados también se testó con desoxirribonucleasa (Jordan y col. 5 Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products, editores de redacción: Spier y col., 418-420 (1992), casa editorial: Butterworth-Heinemann, Oxford; Renner y col., Biotechnol. Bioeng., 41: 188-193 (1993),) o con medio hipoosmolar (Leibovitz y col., Int. J. Cell Cloning, 1: 478-485 (1983)). Todos estos tratamientos normalmente son insuficientes por separado para obtener una dispersión de manera uniforme de células individuales viables. Normalmente se quedan algunos grupos de células visibles con el microscopio y/o a simple vista. Un
10 agregado o grupo de células es una masa de tamaño variable, a veces visible a simple vista, formada por la unión de células individuales entre sí o por la unión de células a al menos otro material (es decir, restos, matriz extracelular) presente en la suspensión de células inicial. Por definición, un agregado de células tiene un tamaño mínimo de aproximadamente 800 μm , en particular un tamaño mínimo de aproximadamente 600 μm , particularmente de aproximadamente 400 μm , preferentemente de aproximadamente 200 μm , más preferentemente de
15 aproximadamente 100 μm .

[0009] Las suspensiones de células desprendidas y dispersas también pueden necesitar someterse a diversos tratamientos aguas abajo, por ejemplo para retirar los compuestos químicos usados durante la recolección de células, como la tripsina. Estas etapas requieren mucho tiempo y aumentan el coste del producto y pueden dar
20 lugar a una reagregación no deseada. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una etapa de centrifugación para retirar los compuestos químicos no deseados. Este proceso, sin embargo, lleva a la formación de un sobrenadante que contiene los compuestos químicos y que se descartará, y un sedimento que comprende células que recolectar. Cuando se compacta en un sedimento, las células están tan próximas y apretadas entre sí que se forman agregados de células.

[0010] En comparación con los microorganismos como los virus y las bacterias, las células eucariotas, y especialmente las células animales, son muy frágiles y sensibles al cizallamiento debido a la falta de una pared celular duradera. La sensibilidad al cizallamiento también está relacionada con el tipo de célula (es decir, si son fibroblastos, células pulmonares, células renales, etc.), la edad y la historia del cultivo (los cultivos antiguos que
30 tienen un número elevado de pasos contienen células más frágiles) y las condiciones de mantenimiento (las variaciones de las condiciones del cultivo, como la temperatura, la presión osmótica, etc. generan tensiones). La infección por virus también puede llevar a un aumento de la sensibilidad al cizallamiento de las células infectadas.

[0011] En experimentos de cultivos celulares de ratones y humanos, las tensiones de cizallamiento de pared
35 de 100 N/m² durante un tiempo de permanencia de 0,5 segundos causan una tasa de mortalidad celular significativa. Los estudios acerca de las células renales embrionarias mostraron que las tensiones de cizallamiento de menos de 0,26 N/m² causaron una ligera reducción de la viabilidad y ningún cambio en la morfología celular (Harbour y col., Adv. Biochem. Eng., Vol. 29. casa editorial: Springer-Verlag (Nueva York), (1984)).

[0012] Como consideración general, por lo tanto, las fuerzas de cizallamiento aplicadas sobre una
40 suspensión de células podrían dar lugar a una disminución de la viabilidad celular. Las fuerzas de cizallamiento pueden disminuir el rendimiento de las células viables y también pueden reducir la capacidad de las células para dividirse por la inhibición de la mitosis celular.

[0013] Ya que para el uso farmacéutico se prefiere una buena viabilidad celular, se necesita un procedimiento suave de dispersar una suspensión de células que contenga agregados de células. La tecnología usada debe ser
45 eficiente para liberar células individuales en rendimientos de producción elevados, pero también tiene que ser lo suficientemente suave como para evitar una reducción significativa de la viabilidad.

[0014] Los procedimientos conocidos de manipulación de cultivos celulares pueden suponer la dispersión con
50 procedimientos suaves, por ejemplo con pipeteo suave (ECACC Handbook, Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook, "Protocol 5 - Subculture of suspension cell lines", 2005, editado por Sigma-Aldrich). El pipeteo habitualmente se lleva a cabo de forma manual mediante una repetida aspiración y rechazo de la suspensión de células hasta que hayan desaparecido todos los grupos de células. Esta operación manual no es, sin
55 embargo, consistente ni reproducible. Se pueden observar diferentes resultados usando el mismo material de partida del cultivo celular de una pipeta a otra, o de un operario a otro. Además, el daño por cizallamiento es una función tanto del tiempo de cizallamiento como de las fuerzas de cizallamiento. El pipeteo demasiado enérgico y/o durante un periodo demasiado largo puede dañar las células y dar lugar a una baja viabilidad. De forma alternativa, pipetear de forma demasiado suave o inconsistente y la dificultad de determinar cuándo han desaparecido los grupos de

células puede dar lugar a un mal rendimiento de las células puesto que los agregados de células restantes se descartarán durante etapas de filtración posteriores. Además de esta falta de robustez, la técnica de pipeteo suave es tediosa y requiere fases abiertas que aumentan los riesgos de contaminación. El pipeteo no se presta al procesamiento de gran volumen. La solicitud EP-590504-A describe un dispositivo de desagregación con dos elementos de placa de corte que tienen perforaciones y una cámara tubular. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de procesos a gran escala para la dispersión de agregados de células, y preferentemente realizados en un sistema cerrado para evitar riesgos de contaminación. La presente invención aborda estos problemas proporcionando un dispositivo de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados sensibles al cizallamiento, en especial suspensiones de cultivos que contienen agregados de células, mientras se respeta la integridad de las células individuales y procedimientos de flujo continuo para dispersar agregados de células sensibles al cizallamiento para liberar células individuales.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 **[0015]** La presente invención abarca un dispositivo de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados de células, comprendiendo el dispositivo una entrada aguas arriba en una extremidad de un conducto, un obstáculo de entrada primero o aguas arriba dentro del conducto, teniendo este obstáculo de entrada aguas arriba al menos un orificio transversal que proporciona desde aproximadamente el 50 % hasta aproximadamente el 99,9 % de obstrucción de la sección transversal interna del conducto, un obstáculo de salida segundo o aguas abajo en el interior del conducto, teniendo este obstáculo de salida aguas abajo al menos un orificio transversal que proporciona desde aproximadamente el 50 % hasta aproximadamente el 99,9 % de obstrucción de la sección transversal interna del conducto, en donde el eje longitudinal de cualquier orificio a través de cualquier obstáculo no se alinea con el eje longitudinal de ningún orificio de un obstáculo anterior o posterior, y en donde la distancia entre dos obstáculos sucesivos es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces el diámetro del orificio más pequeño de cualquiera de dos obstáculos sucesivos, y una salida aguas abajo en la otra extremidad del conducto; y en donde la entrada al conducto del dispositivo y el obstáculo de entrada aguas arriba forman una primera porción del dispositivo, y la salida del conducto del dispositivo y el obstáculo de salida aguas abajo forman una segunda porción del dispositivo y en donde las porciones primera y segunda son separables, en donde el dispositivo comprende además un sello espaciador; en donde además el conducto en cada una de las porciones primera y segunda puede estar yuxtapuesto y asegurado entre sí de tal manera que una cámara de turbulencia esté definida por los al menos dos obstáculos y al menos una pared interna del sello espaciador. Las diversas realizaciones del dispositivo según la invención abarcan, pero no se limitan a, un primer obstáculo en el interior del conducto que puede ser perpendicular a la dirección del flujo que circula a través de este conducto, teniendo este primer obstáculo una pluralidad de orificios que pueden ser de cualquier configuración incluyendo, pero no limitándose a, circular, ovoide, concéntrica, rectilínea y paralela al eje longitudinal del conducto, y que proporcionan una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto, y al menos un segundo obstáculo, también en el interior del conducto y perpendicular a la dirección del flujo que circula a través de este conducto. Este segundo obstáculo también puede tener una pluralidad de orificios que pueden ser de cualquier configuración incluyendo, pero no limitándose a, circular, concéntrica, rectilínea y paralela al eje longitudinal del conducto que crean una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto. Los orificios del segundo obstáculo no están colocados en la misma alineación longitudinal que ningún orificio del primer obstáculo, y la distancia entre los obstáculos primero y segundo es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces el diámetro de un orificio.

45 **[0016]** En una realización ventajosa de la presente invención, el dispositivo puede comprender una entrada aguas arriba en una extremidad de un conducto con forma cilíndrica, un primer obstáculo y un segundo obstáculo en el interior del conducto y perpendiculares a la dirección del flujo que circula a través de este conducto, teniendo cada obstáculo 3 orificios transversales cuyos ejes longitudinales son paralelos al eje longitudinal del conducto, y que crean aproximadamente el 98 % de obstrucción de la sección del conducto, no estando los ejes longitudinales de los orificios del segundo obstáculo en la misma alineación longitudinal que el eje longitudinal de ningún orificio del primer obstáculo, en donde la distancia entre los dos obstáculos es aproximadamente el doble del diámetro del orificio más pequeño de cualquiera de los obstáculos, y una salida aguas abajo en la otra extremidad del conducto.

[0017] La presente invención proporciona además un procedimiento de flujo continuo para la dispersión de agregados, que comprende las etapas de (1) flujo de una suspensión que contiene agregados de células a través de un dispositivo de dispersión según la invención, desuniéndose de ese modo los agregados, opcionalmente repetir la etapa (1) volviendo a hacer fluir la suspensión a través del dispositivo o colocando en serie más de uno de los dispositivos de dispersión de flujo continuo según la invención, y (4) recolectar la suspensión que contiene células individuales.

[0018] Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento de cultivo celular, que comprenda las etapas de (1) introducir células que cultivar en un lote de cultivo llenado con un medio de cultivo y cultivar las células, (2) hacer fluir la suspensión que contiene agregados de células obtenida en la etapa (1) a través de al menos un dispositivo de dispersión de flujo continuo según la invención, desuniéndose de ese modo los agregados, (3) volver a introducir la suspensión obtenida en la etapa (2) y que contiene células individuales en un lote de cultivo celular, (4) opcionalmente repetir las etapas (1) a (3), y (5) recolectar la suspensión que contiene células individuales.

10 **[0019]** Éstas y otras realizaciones se describen o son obvias por y están abarcadas por, la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 **[0020]** La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, y no destinada a limitar la invención a realizaciones específicas descritas, se puede entender en conjunción con las figuras adjuntas, incorporadas en esta solicitud a modo de referencia, en las que:

La **Fig. 1A** ilustra una vista en sección longitudinal de un dispositivo de dispersión que comprende dos porciones de conducto conectadas mediante un sello, y que tiene obstáculos perforados únicos de entrada y de salida y una única cámara de turbulencia. La dirección del flujo de fluido a través del dispositivo se indica mediante la flecha gruesa.

La **Fig. 1B** ilustra una vista en sección longitudinal de un dispositivo de dispersión que comprende dos porciones de conducto conectadas mediante un sello y un medio de aseguramiento.

25 La **Fig. 2** ilustra una vista en sección longitudinal de una realización del dispositivo de dispersión de flujo continuo que comprende dos porciones de conducto conectadas mediante un sello, y que tiene obstáculos perforados únicos de entrada y de salida y una única cámara de turbulencia, en donde los obstáculos son chapas extraíbles. La dirección del flujo de fluido a través del dispositivo se indica mediante la flecha gruesa.

La **Fig. 3A** ilustra una vista frontal de un obstáculo de entrada.

La **Fig. 3B** ilustra una vista frontal de un obstáculo de salida, en donde los orificios transversales no son concéntricos.

La **Fig. 4A** ilustra una vista en sección longitudinal de una realización del dispositivo de dispersión de flujo continuo que comprende dos cámaras de turbulencia secuenciales.

La **Fig. 4B** ilustra una vista en sección longitudinal de una realización del dispositivo de dispersión de flujo continuo que comprende dos cámaras secuenciales y un medio de aseguramiento.

35 La **Fig. 4C** ilustra una vista en sección longitudinal de una realización del dispositivo de dispersión de flujo continuo que comprende una única unidad que tiene dos cámaras de turbulencia integrales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 **[0021]** Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, términos como "comprende", "comprendía", "comprendían", "que comprende", "que comprenden", "comprendiendo" y similares pueden tener el significado atribuido a ello en la ley de Patentes de los Estados Unidos; p. ej., pueden significar "incluye", "incluía", "incluían", "que incluye", "que incluyen", "incluyendo", y similares; y que términos como "que consiste esencialmente en", "que consisten esencialmente en", "consistiendo esencialmente en", y "consiste esencialmente en" tienen el significado asignado a ellos en la ley de Patentes de los Estados Unidos, p. ej., permiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen los elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

[0022] La presente invención abarca un dispositivo de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados, en especial suspensiones de cultivos que contienen agregados de células. Se contempla que el dispositivo, como se ilustra por ejemplo, en las Figs. 1A-2 y 4A-C, se coloque en serie con un flujo de salida de un medio/suspensión de células desde un sistema de cultivo celular, en el que la suspensión de células pueda ser pasada a través de un conducto **1** del dispositivo y por lo tanto a través de una cámara de turbulencia **2**. La suspensión de células se introducirá en el dispositivo de dispersión de flujo continuo a través de una entrada aguas arriba **3** del conducto **1** y saldrá del dispositivo a través de una salida aguas abajo **4** del conducto **1**.

[0023] Las paredes internas **10**, **11** de la entrada **3** y la salida **4** del conducto **1** pueden tener diámetros de sección transversal más pequeños que, iguales a o más grandes que el de la cámara de turbulencia **2**. Una sección transversal de una entrada **3** o salida **4** del conducto es por definición una sección perpendicular a la dirección de un

flujo de líquido que pasa a través del conducto 1.

[0024] No hay ninguna restricción en cuanto a una forma particular del conducto 1, en particular en las formas de su sección transversal. Por ejemplo la sección transversal del conducto 1 puede ser, pero no se limita a, una sección transversal circular, ovoide, cuadrada o rectangular. La sección transversal de la cámara de turbulencia 2 está configurada de forma ventajosa, pero no necesariamente, según la forma del conducto 1.

[0025] La cámara de turbulencia 2 del dispositivo de dispersión de flujo continuo está definida por las paredes internas opuestas de dos obstáculos 14, 15 respectivamente, un obstáculo de entrada aguas arriba 14 más próximo a la entrada aguas arriba 3 del conducto 1, y un obstáculo de salida aguas abajo 15 más próximo a la salida aguas abajo 4 del conducto 1, y una pared interna 16 que define la distancia que separa los obstáculos el uno del otro. Cada obstáculo 14, 15, por lo tanto, se ubica dentro del conducto 1 y está orientado de la forma más ventajosa perpendicular al eje central del dispositivo de dispersión de flujo continuo de modo que obstaculice el flujo del fluido de cultivo celular que pasa a través del conducto 1. Se contempla además que pueda haber más de dos obstáculos como se muestra, por ejemplo, en las Figs. 4A-4C, en donde cada par adyacente de obstáculos y la pared interna del conducto define cada uno una cámara de turbulencia 2, formándose de ese modo una pluralidad de cámaras 2 dispuestas en serie. Se contempla además que el obstáculo de salida 15 de una primera cámara de turbulencia 2' pueda funcionar también como el obstáculo de entrada para una segunda cámara de turbulencia 2'' ubicada en serie inmediatamente aguas abajo de la primera cámara 2' como se muestra en las Figs. 4A-4C.

[0026] Cada obstáculo de entrada aguas arriba 14 y un obstáculo de salida aguas abajo 15 está perforado con al menos un orificio transversal 16 que permite la comunicación de la entrada 3 y salida 4 del conducto con la cámara de turbulencia 2. Para el dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, un orificio transversal está definido por un diámetro equivalente de un orificio con forma cilíndrica que tiene la misma sección. Este diámetro equivalente de forma ventajosa es al menos 25 veces más grande, de forma más ventajosa 50 veces más grande, y de forma más ventajosa al menos cien veces más grande que el diámetro de una célula viva individual del cultivo.

[0027] El área de sección transversal o áreas de sección transversal combinadas del (de los) orificio(s) transversal(es) 16 de un obstáculo 14, 15 obstaculiza el flujo de fluido a través del conducto 1 de entre aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 %. La obstrucción del flujo de fluido, expresada en un porcentaje, se calcula mediante la siguiente fórmula $(X-Y)/X$, en donde X es el área de sección transversal del conducto e Y es la suma de áreas del orificio o pluralidad de orificios del obstáculo. De forma ventajosa, la obstrucción del flujo de fluido creada por un obstáculo es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 %. De forma más ventajosa, la obstrucción del flujo de fluido creada por el obstáculo puede ser de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 99,9 %, de forma más ventajosa de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99,9 %, de forma aún más ventajosa de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99,9 %, y de la forma más ventajosa de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99,9 %.

[0028] Ningún orificio transversal 16 de un obstáculo de entrada aguas arriba 14 puede ser concéntrico con respecto a ningún orificio 16 del obstáculo de salida aguas abajo inmediatamente posterior 15, es decir el eje longitudinal de un orificio 16 no es coincidente con el eje longitudinal de ningún otro orificio del dispositivo de dispersión de flujo continuo como se muestra, por ejemplo, en las Figs. 3A y 3B.

[0029] Las configuraciones del obstáculo de entrada aguas arriba 14 y los obstáculos de salida aguas abajo 15 y los orificios transversales 16 en los mismos, no están limitadas en cuanto al espesor de los obstáculos que también pueden ser, pero no limitarse a, una sección transversal circular, ovoide, cuadrada o rectangular, ni en el número, tamaños y formas de los orificios transversales 16. Los orificios transversales 16 también pueden no ser uniformes y pueden tener una variedad de secciones transversales. El dispositivo puede, por ejemplo, tener cada uno de todos sus obstáculos con un orificio. El dispositivo puede tener todos sus obstáculos 14, 15 con varios orificios 16 teniendo todos el mismo tamaño y forma. De forma alternativa, el dispositivo puede tener obstáculos 14, 15 con varios orificios 16 teniendo diferentes tamaños y formas, o cada obstáculo 14, 15 tiene el mismo tipo de orificios pero el tamaño y forma de los orificios difieren de un obstáculo al otro.

[0030] Se contempla que el dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención pueda comprender al menos dos porciones separables, una porción de entrada 3 y una porción de salida 4 con, como se muestra por ejemplo en la Fig. 1A, un sello espaciador opcional 5 para impedir la fuga de fluido de la cámara de turbulencia 2 y que contribuya a la separación entre los dos obstáculos opuestos 14, 15. De forma alternativa, como se muestra en la Fig. 2, los obstáculos 14, 15, pueden ser independientes y extraíbles del conducto 1 después de la separación de

las dos porciones **3, 4**. En otra realización el dispositivo es una única unidad integrada, como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4C. Se contempla además que el dispositivo de dispersión de flujo continuo pueda comprender además un medio de aseguramiento **6**, como se ilustra esquemáticamente en las Fig. 1B y 4B por ejemplo, para garantizar que las dos porciones **3, 4** del dispositivo y opcionalmente el sello espaciador **5** no estén conectados de manera operable con ninguna fuga de fluidos que pasen a través del dispositivo. El medio de aseguramiento puede ser, pero no estar limitado a, una abrazadera, muelles opuestos, un sello elástico y similares.

[0031] Un aspecto de la invención, por lo tanto, abarca un dispositivo de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados, comprendiendo el dispositivo una entrada aguas arriba **3** en una extremidad de un conducto **1**, un obstáculo de entrada primero o aguas arriba **14** dentro del conducto **1**, teniendo este obstáculo de entrada aguas arriba **14** al menos un orificio transversal **16** que proporcione una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección transversal interna del conducto **1**, un obstáculo de salida segundo o aguas abajo **15** en el interior del conducto **1**, teniendo este obstáculo de salida aguas abajo **15** al menos un orificio transversal **16** que proporcione una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección transversal interna del conducto **1**, en donde el eje longitudinal de cualquier orificio **16** que perfora cualquier obstáculo **14, 15** no se alinea con el eje longitudinal de ningún orificio de un obstáculo anterior o posterior, y en donde la distancia entre dos obstáculos sucesivos es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces el diámetro del orificio más pequeño de cualquiera de dos obstáculos sucesivos, y una salida aguas abajo **4** en la extremidad opuesta del conducto **1**.

[0032] En diversas realizaciones del dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, el obstáculo de entrada primero, o aguas arriba, **14** comprende una pluralidad de orificios transversales **16**, en donde las configuraciones de la sección transversal de los orificios **16** se pueden seleccionar de entre circular, concéntrica y rectilínea, y en donde el eje longitudinal de cada orificio **16** es paralelo al eje longitudinal del conducto, creándose de ese modo una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto **1**, y en donde los orificios **16** pueden ser idénticos o diferentes los unos de los otros.

[0033] En las realizaciones del dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, el obstáculo de salida segundo, o aguas abajo, **15** comprende una pluralidad de orificios transversales **16**, en donde las configuraciones de la sección transversal de los orificios **16** se seleccionan de entre circular, concéntrica y rectilínea, y en donde el eje longitudinal de cada orificio es paralelo al eje longitudinal del conducto **1**, creándose de ese modo una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto **1**, y en donde los orificios **16** pueden ser idénticos o diferentes los unos de los otros.

[0034] En una realización ventajosa del dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, el obstáculo de entrada primero, o aguas arriba, **14**, como se muestra en la Fig. 3A comprende tres orificios transversales **16**, en donde las configuraciones de la sección transversal de los orificios **16** se pueden seleccionar de entre circular, concéntrica y rectilínea, y en donde el eje longitudinal de cada orificio es paralelo al eje longitudinal del conducto, creándose de ese modo una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto, y en donde los orificios **16** pueden ser idénticos o diferentes los unos de los otros, y el obstáculo de salida segundo, o aguas abajo **15** como se muestra en la Fig. 3B comprende tres orificios transversales **16**, en donde las configuraciones de la sección transversal de los orificios se seleccionan de entre circular, concéntrica y rectilínea, y en donde el eje longitudinal de cada orificio es paralelo al eje longitudinal del conducto, creándose de ese modo una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección del conducto, y en donde los orificios pueden ser idénticos o diferentes los unos de los otros y en donde el eje longitudinal de cualquier orificio **16** a través del primer obstáculo **14** no se alinea con el eje longitudinal de ningún orificio del segundo obstáculo **15**.

[0035] En las diversas realizaciones del dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, el obstáculo de entrada aguas arriba **14** y los obstáculos de salida aguas abajo **15** son de forma ventajosa, pero no necesariamente, perpendiculares a la dirección del flujo que pasa a través del conducto **1**.

[0036] En diversas realizaciones del dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención, los orificios que atraviesan el obstáculo de entrada **14** y el obstáculo de salida aguas abajo **15** pueden ser de forma cilíndrica, concéntricos, o rectilíneos, en donde los ejes longitudinales de los orificios son paralelos al eje longitudinal del conducto. Un dispositivo según la invención, como se muestra en la sección longitudinal en la Fig. 1B, comprende una porción primera **3** y una segunda **4**, en donde cada una de dichas porciones primera **3** y segunda **4** comprende un conducto **1** que tiene una luz longitudinal **7** y un obstáculo **14, 15** ubicado en la misma y perpendicular al eje longitudinal de la luz **7** del conducto **1** y un sello espaciador **5**, en el que las porciones primera **3** y segunda **4** pueden

estar yuxtapuestas y aseguradas entre sí de tal manera que una cámara de turbulencia esté definida por los dos obstáculos **14**, **15**, y al menos la pared interna **17** del sello espaciador **5**. (Véase el Ejemplo 1, más adelante, y la Fig. 1B).

5 **[0037]** Otro aspecto de la presente invención abarca un procedimiento de usar el dispositivo de dispersión de flujo continuo según la presente invención. En particular, la presente invención abarca el uso del dispositivo según la presente invención para dispersar agregados, especialmente suspensiones de cultivos que contienen agregados de células. El procedimiento para la dispersión de agregados según la invención comprende las etapas de (1) hacer fluir una suspensión que contiene agregados de células a través de al menos un dispositivo de dispersión de flujo
10 continuo según la invención, (2) desunir los agregados, (3) opcionalmente repetir la etapa (1) volviendo a pasar la suspensión de células a través del dispositivo, y (4) recolectar la suspensión que contiene células individuales. Un procedimiento para la dispersión de agregados comprende las etapas de (1) flujo de una suspensión que contiene agregados de células a través de al menos un dispositivo de dispersión, comprendiendo dicho dispositivo una entrada aguas arriba en una extremidad de un conducto con forma cilíndrica; un primer obstáculo en el interior del
15 conducto y perpendicular a la dirección del flujo que circula a través de este conducto, teniendo este primer obstáculo tres orificios transversales, paralelos al eje longitudinal del conducto, y en donde el área de sección transversal combinada de los orificios es aproximadamente el 2 % del área de sección transversal total del conducto; un segundo obstáculo aguas abajo en el interior del conducto de salida y perpendicular a la dirección del flujo que circula a través de este conducto, teniendo este segundo obstáculo 3 orificios transversales paralelos al eje
20 longitudinal del conducto, y en donde el área de sección transversal combinada de los orificios es aproximadamente el 2 % del área de sección transversal total del conducto, y en donde los orificios del obstáculo de salida aguas abajo se posicionan con relación a los orificios del obstáculo aguas arriba de modo que no tengan la misma alineación longitudinal que ningún orificio del obstáculo aguas arriba, y en donde la distancia entre estos dos obstáculos es aproximadamente dos veces el diámetro de un orificio, y una salida aguas abajo en la otra extremidad del conducto,
25 (2) desunir los agregados, (3) opcionalmente repetir la etapa (1) volviendo a hacer fluir la suspensión a través del (de los) dispositivo(s), (4) recolectar la suspensión que contiene células individuales.

[0038] También se contempla que en una realización del procedimiento de la invención se pueda usar una pluralidad de los dispositivos de dispersión de flujo continuo de la invención para la dispersión de agregados,
30 estando los dispositivos colocados en serie y fluyendo la suspensión que contiene agregados de células a través de todos los dispositivos colocados en serie. Por ejemplo, se pueden colocar en serie de dos a siete dispositivos o se puede emplear un único dispositivo con múltiples cámaras de turbulencia sucesivas. Se puede usar un dispositivo de dispersión en un modo de recirculación. El envase de suspensión de células se conecta a la entrada aguas arriba del conducto y a la salida aguas abajo del conducto. La suspensión de células fluye de manera sucesiva y continua
35 a través de la entrada aguas arriba del conducto, la cámara de turbulencia, la salida aguas abajo del conducto y se recicla en el interior del envase de suspensión de células. Conociendo la tasa de flujo de procesamiento en litros por hora a través del dispositivo de dispersión, el volumen de la suspensión de células en litros, y el tiempo de procesamiento total, es posible obtener un número medio de pasos multiplicando la tasa de flujo por el tiempo de procesamiento total y después dividir el valor resultante entre el volumen de la suspensión de células. Se pueden
40 colocar en serie de tres a cinco dispositivos de dispersión, y en una realización más ventajosa, se colocan en serie cinco dispositivos de dispersión. Otro aspecto de la invención es un procedimiento de cultivo celular, que comprende las etapas de (1) introducir células que cultivar en un medio de cultivo y cultivar las células, (2) desplazar o suspender las células cultivadas en un medio, en donde la suspensión comprende agregados de células, (3) pasar la suspensión de células que contiene agregados de células a través de un dispositivo de dispersión de flujo continuo
45 según la invención o a través de una disposición en serie de tales dispositivos, desuniéndose de ese modo los agregados de células y liberándose células individuales de los mismos, (4) opcionalmente repetir las etapas (1) a (3) se repiten tantas veces como sea necesario, y (5) volver a introducir al menos una porción de la suspensión de células desunidas de la etapa (3) al lote de cultivo y volver a cultivar las células.

50 **[0039]** En una realización de este aspecto de la invención, el medio de cultivo puede comprender microportadores.

[0040] En las realizaciones de este aspecto de la invención, se contempla que el dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención se pueda usar en un bucle continuo, en el que se hace circular el medio de cultivo a
55 través del dispositivo para desunir los grupos de células a medida que se forman.

[0041] Los dispositivos y procedimientos de la presente invención permiten de un modo de flujo continuo someter una suspensión de células que contenga agregados de células a turbulencias de fluido para dispersar y desunir los agregados liberándose de ese modo las células vivas individuales. El dispositivo es un dispositivo pasivo

y no contiene ninguna pieza que se mueva, como un rotor o pistón, permitiéndose de ese modo una fácil limpieza y reduciéndose la probabilidad de daño a las células.

5 **[0042]** Las fuerzas de turbulencia se aplican a los agregados durante la aceleración del fluido a través del (de los) orificio(s) de obstáculo que atraviesan los obstáculos y durante la reorientación del flujo entre dos obstáculos sucesivos. La distancia entre dos obstáculos sucesivos y el hecho de que el (los) orificio(s) del primer obstáculo no está colocado en la misma alineación longitudinal que ningún orificio del siguiente obstáculo crea turbulencias. Además los agregados, y más específicamente los agregados macroscópicos, son susceptibles de colisionar con los obstáculos, lo cual también podría favorecer la dispersión de los agregados.

10 **[0043]** El modo de flujo continuo de la presente invención en comparación con un modo de lote (es decir el procedimiento de pipeteo) tiene la ventaja de evitar espacios muertos en el interior del sistema de turbulencia. Todas las células pasan a través de la cámara de turbulencia para una dispersión eficiente de los agregados, y como consecuencia el modo de flujo continuo de la presente invención da lugar a una dispersión mejorada de los agregados. El dispositivo de la presente invención también permite reducir las fases abiertas operando en modo de flujo continuo, lo cual da lugar a una disminución del riesgo de contaminación.

20 **[0044]** En comparación con un agitador de rotor/estator y la condición de cizallamiento elevado, el modo de flujo continuo de la presente invención limita los agregados a un paso único y rápido en el interior del dispositivo. Debido al flujo, no hay posibilidad de que el agregado pase dos veces a través de los orificios de los obstáculos, y como consecuencia las células están menos sometidas a tensión y la viabilidad celular es mejor. La tasa de flujo de procesamiento se ajustará a la geometría del dispositivo y al tipo de célula ya que la sensibilidad al cizallamiento de las células está relacionada con el tipo de célula, la edad y la historia del cultivo y las condiciones de mantenimiento. La infección por virus normalmente lleva a un aumento de la sensibilidad al cizallamiento.

25 **[0045]** Usando un hemocitómetro y un microscopio, la densidad de una suspensión de células se puede establecer fácilmente y con rapidez así como determinar la presencia o no de agregados de células. El hemocitómetro también se puede usar para distinguir las células vivas de las células muertas con el fin de determinar el porcentaje de células viables. Para este fin es posible usar indicadores de tinciones vitales, que solo tiñen tejidos y células no vitales. Las células son permeables a tales indicadores pero las células vivas son capaces de excluirlos. Las células muertas o moribundas no pueden excluir los indicadores y por lo tanto presentan tinción. El indicador de tinción vital más común es azul de tripano (Hoffmeister E.R., Stain Technol., 28(6): 309-310 (1953); Boedijn K.B., Stain Technol., 31(3): 115-116 (1956); Allison D.C. y col., J. Histochem. Cytochem., 28(7): 700-703 (1980)). Combinando tal coloración y las técnicas de conteo de células es posible evaluar fácilmente el porcentaje de células viables en una suspensión de células, calculado como el número de células vivas / (número de células muertas + número de células vivas) X 100. También es posible obtener la misma información mediante citometría de flujo usando agentes que se intercalen entre los ácidos nucleicos como yoduro de propidio o 7-a aminoactinomicina D (7-AAD) (Wattre P., Ann. Biol. Clin. (Paris), 51(1): 1-6 (1993); Lecoeur H. y col., J. Immunol. Methods, 265(1-2): 81-96 (2002)).

40 **[0046]** Conociendo el porcentaje de células viables en una suspensión de células, es fácil determinar las condiciones óptimas que permiten obtener una dispersión celular efectiva mientras se respeta la viabilidad de las células individuales. Alguien experto en la técnica será capaz de determinar la tasa de flujo óptima y de determinar el número óptimo de obstáculos en el dispositivo o el número óptimo de dispositivos que colocar en serie para obtener el resultado deseado, es decir una dispersión efectiva mientras se mantiene la integridad y viabilidad de las células individuales. Idealmente, la velocidad media de la suspensión que contiene agregados de células a través de los orificios del dispositivo según la presente invención debería ser de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 m/s, preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 m/s y más preferentemente de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 m/s. Los procedimientos de cultivo celular pueden comprender las etapas de (1) introducir células que cultivar en un lote de cultivo llenado con un medio de cultivo y cultivar las células, (2) flujo de la suspensión obtenida en la etapa (1) y que contiene agregados de células a través de al menos un dispositivo según la invención y desunir los agregados, (3) volver a introducir la suspensión obtenida en la etapa (2) y que contiene células individuales en el lote de cultivo, (4) opcionalmente repetir las etapas (1) a (3), y (5) recolectar la suspensión que contiene células individuales obtenida después de la etapa (2) o de la etapa (4).

55 **[0047]** Esto también se puede hacer con cultivo en microportadores, es decir que la suspensión de cultivo que contiene agregados de células/microportadores pase a través de al menos un dispositivo según la invención. Durante la dispersión de agregados de células/microportadores, el uso del dispositivo de dispersión según la invención puede permitir una reducción del tiempo necesario para la dispersión y/o reducir la cantidad añadida de

agentes quelantes o encimas proteolíticas, en especial tripsina. Durante la etapa de dispersión química o proteolítica, el dispositivo de dispersión según la invención se podría usar de manera continua en recirculación o en un modo de flujo continuo. Otra ventaja es que el uso del dispositivo de dispersión según la invención durante la etapa de dispersión química o proteolítica da lugar a una mejor liberación de las células de los microportadores. Este uso aumenta el rendimiento de las células recolectadas después del descarte de los microportadores mediante clarificación. Se puede usar al menos un dispositivo de dispersión de manera continua en recirculación durante el cultivo celular. Dependiendo del tipo de célula, la historia del cultivo y las condiciones de mantenimiento, se pueden producir agregados de células durante el cultivo. Sería beneficioso dispersar estos agregados en células individuales (es decir para el aumento de la superficie de contacto entre las células y el medio de cultivo, para evitar los fenómenos de apoptosis). En esta situación particular, el dispositivo de dispersión de la presente invención se puede usar en recirculación puesto que permite operar en circuito cerrado.

[0048] Los dispositivos y procedimientos de la invención son adecuados para el uso con una variedad de células incluyendo, pero no limitándose a, las células procariotas como las bacterias y particularmente la *Escherichia coli* (*E. coli*), y las células eucariotas como, pero no limitándose a, la levadura, las células vegetales, y las células animales incluyendo las células de insecto y las células de mamífero. Los compuestos biológicos de interés son ARNs, ADNs, virus o fagos, proteínas. Células animales particularmente adecuadas para el uso de la presente invención incluyen células de humano, primate, roedor, de origen porcino, bovino, canino, felino, ovino, aviar y derivados de los mismos. En general, las células animales incluyen las células epiteliales, que pueden ser células primarias derivadas de una muestra de tejido embrionario o una muestra de tejido adulto, como los queratinocitos, las células epiteliales cervicales, las células epiteliales bronquiales, las células epiteliales traqueales, las células epiteliales renales o las células epiteliales retinales, o células transformadas o líneas celulares establecidas (p. ej., 293 células renales embrionarias humanas, células epiteliales cervicales HeLa o derivadas de las mismas (p. ej., la HeLaS3), células retinales humanas PER.C6 y queratinocitos humanos HCAT), o derivados de las mismas. Las células pueden ser células normales, o pueden ser alteradas genéticamente. Otras células animales, como las células CHO, las células COS, las células VERO, las células BHK (incluyendo las células BHK-21), las células CLDK, las células CRFK, las células PK15, las células MDBK, las células MDCK, las células TCF, las células TDF, las células CEF y derivadas de las mismas, también son adecuadas para la aplicación de la presente invención.

[0049] Las células son recolectadas por cualquier medio conocido por las personas expertas en la técnica, incluyendo el asentamiento o la centrifugación. Las células se pueden recolectar y concentrar mediante centrifugación, en particular mediante centrifugación en cubeta. Además las células se pueden almacenar de forma refrigerada o de forma congelada.

[0050] La invención se describirá ahora más a fondo por medio de los siguientes ejemplos no limitadores.

Ejemplo 1:

[0051] La preparación, propagación e infección de células de embrión de gallina con el virus de la enfermedad de Marek (MDV) se llevaron a cabo en botellas rodantes de 1700 cm². Las células de embrión de gallina infectadas de todas las botellas rodantes se disociaron mediante tripsinización después de lograr un ECP (efecto citopático) del 50 al 70 %, después se recolectaron mediante centrifugación en 500g durante 12 minutos.

[0052] Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadieron medios de congelación al sedimento para obtener una suspensión de células, pero que contenía muchos agregados visibles claramente a simple vista.

[0053] Para la dispersión de los agregados, se usaron dos procedimientos. En un primer procedimiento, la suspensión de células de 406 botellas rodantes se homogenizó mediante pipeteo manual con una pipeta de 50 ml. La suspensión resultante se filtró de manera improvisada en una bolsa de nailon de 800 µm, se ajustó en volumen con algunos medios de congelación y después se analizó.

[0054] En paralelo, la suspensión de células equivalente a 48 botellas rodantes se procesó 8 veces de manera consecutiva a través de un dispositivo de dispersión de flujo continuo según la invención y como se ilustra en la Fig. 1.

[0055] El dispositivo de dispersión constituía dos porciones, teniendo cada una un conducto (con forma cilíndrica, 34 mm de longitud y un diámetro interno de 36,5 mm) que terminaba con un obstáculo (una chapa perpendicular al eje del conducto) (véase la Fig. 1). Cada chapa incluía tres orificios rectilíneos con forma cilíndrica

teniendo cada uno un diámetro de 3 mm, y equidistantes y paralelos al eje del conducto.

[0056] Con una porción, la distancia entre un orificio y el eje del conducto era de 31 mm (véase la Fig. 2A). Con la otra porción, esta distancia era igual a 10 mm (véase el modelo de la Fig. 2B).

5

[0057] Los dos conductos se juntaban oponiendo los extremos del conducto que tenían el obstáculo en los mismos a una distancia entre los dos obstáculos de aproximadamente 6 mm).

[0058] La suspensión de células recuperada después de la centrifugación se inyectó a través del dispositivo de dispersión con una tasa de flujo de aproximadamente 150 l/h usando una bomba peristáltica. Se tomaron muestras antes y después de cada paso a través del dispositivo y se analizaron después de una filtración con nailon de 800 µm. La inyección a través del dispositivo de dispersión y el muestreo y análisis se reprodujeron 7 veces.

10

[0059] Las muestras se analizaron para las cantidades de células individuales mediante conteo de células visual con una célula de Thomas, para el porcentaje de viabilidad mediante FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia), y para la presencia de agregados mediante observación visual de los residuos de la filtración. Estos resultados se presentan en la tabla 1.

15

Tabla 1:

Muestreo	Conteo de células individual (células / ml)	Viabilidad (%)	Observaciones visuales	Título viral (Log10ufp/ml)
1.º paso Antes de la filtración	3.0E07	80	Muy espeso Grumos muy grandes	6,99
1.º paso Después de la filtración	4.4E07	84	Muchos grumos Muchos residuos en el filtro	7,05
2.º paso Después de la filtración	3.8E07	77	Muchos grumos Muchos residuos en el filtro	7,16
3.º paso Después de la filtración	4.3E07	75	Algunos grumos Menos residuos en el filtro	6,83
4.º paso Después de la filtración	5.2E07	71	Menos grumoso pocos residuos en el filtro	7,14
5.º paso Después de la filtración	5.8E07	70	Muy pocos grumos pocos residuos en el filtro	6,95
6.º paso Después de la filtración	4.9E07	68	Muy pocos grumos pocos residuos en el filtro	7,17
7.º paso Después de la filtración	4.8E07	66	Muy pocos grumos pocos residuos en el filtro	7,1
8.º paso Antes de la filtración	4.4E07	68	Pocos grumos	6,9
8.º paso Después de la filtración	6.2E07	69	Muy pocos grumos pocos residuos en el filtro	6,95
División manual Después de la filtración	4.1E07	63	Muy pocos grumos Pocos residuos en el filtro	7,02

20

[0060] Estos resultados muestran que cada paso de la suspensión de cultivo que contiene agregados de células a través del dispositivo de dispersión de flujo continuo según la presente invención tuvo un efecto sobre los agregados de células. La viabilidad evaluada por los análisis de FACS disminuyó con el número de pasos, mientras que el número de grumos visibles a simple vista disminuyó y el título viral permaneció estable. Con este tipo de cultivo celular (con células de embrión de gallina infectadas con MDV) hubo un resultado óptimo para el uso del dispositivo para la dispersión de agregados con cinco pasos.

25

[0061] Estos resultados además muestran que la dispersión en línea de células infectadas a través de un dispositivo de dispersión de flujo continuo de la invención da lugar a la dispersión de muchos agregados, al rendimiento aumentado de las células individuales, y a la conservación de más viabilidad en comparación a cuando se usa el pipeteo manual.

30

Ejemplo 2:

[0062] La preparación, propagación e infección de células de embrión de gallina con el virus de la enfermedad de Marek (MDV) se llevaron a cabo en botellas rodantes de 1700 cm². Las células de embrión de gallina infectadas de todas las botellas rodantes se disociaron mediante tripsinización después del cumplimiento de un ECP (efecto citopático) del 50 al 70 %, después se recolectaron mediante centrifugación en 500g durante 10 minutos. Se procesaron alrededor de 2300 botellas rodantes.

[0063] Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadieron medios de congelación a la cubeta de centrifugación que contenía el sedimento. Se dio vueltas a mano a la cubeta para obtener una suspensión de células gruesas, pero que seguía conteniendo muchos agregados visibles a simple vista. La suspensión de células se removió durante 10 minutos y se dividió por igual en seis envases.

[0064] Un envase se procesó como estándar sin división de células. La suspensión de células se filtró directamente en una estopilla. El filtrado además se diluyó con medios de congelación antes del llenado.

15 **[0065]** Los cinco envases restantes se dividieron de un modo continuo antes de la filtración con estopilla y la dilución con medios de congelación. Para la división, el número de dispositivos de dispersión (dispositivos de dispersión como se describe en el Ejemplo 1) y la tasa de flujo de procesamiento se cambiaron de una disposición en serie a la otra. Los productos finales se analizaron para el conteo de células expresado en el número de células por botellas rodantes para una comparación de pruebas. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

20

Tabla 2:

Condiciones de división	Número de botellas rodantes procesadas	Conteo de células individuales (millones de células / botellas rodantes)
Estándar	388	423
3 dispositivos de dispersión en serie 50 l/h	388	466
7 dispositivos de dispersión en serie 50 l/h	388	452
5 dispositivos de dispersión en serie 150 l/h	388	466
3 dispositivos de dispersión en serie 250 l/h	367	431
7 dispositivos de dispersión en serie 250 l/h	388	436

[0066] Estos resultados muestran que el procesamiento de la suspensión de cultivo que contiene agregados de células a través de diversos dispositivos según la presente invención en serie tuvo un efecto sobre las cantidades de células individuales recuperadas al final del proceso.

25

[0067] Estos resultados muestran también que el número de elementos de dispositivo de dispersión de flujo continuo en serie y la tasa de flujo de procesamiento tuvieron un impacto. Se obtuvieron resultados óptimos para una tasa de flujo de procesamiento de 50 l/h y 3 dispositivos de dispersión en serie, y para una tasa de flujo de procesamiento de 150 l/h y 5 dispositivos de dispersión en serie.

30

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de dispersión de flujo continuo para la dispersión de agregados, comprendiendo el dispositivo una entrada aguas arriba en una extremidad de un conducto, al menos dos obstáculos que tienen superficies opuestas, siendo dichos obstáculos un obstáculo de entrada primero o aguas arriba dispuesto dentro del conducto, estando dicho obstáculo de entrada aguas arriba perforado por al menos un orificio transversal y obstruyendo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % del área de sección transversal interna del conducto, un obstáculo de salida segundo o aguas abajo dispuesto dentro del conducto y estando un obstáculo de salida aguas abajo perforado por al menos un orificio transversal y obstruyendo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % del área de sección transversal interna del conducto, en donde el eje longitudinal de cualquier orificio transversal de cualquiera de los obstáculos no se alinea con el eje longitudinal de ningún otro orificio de un obstáculo anterior o posterior, una cámara de turbulencia definida por las superficies opuestas de los obstáculos primero y segundo y la pared interna del conducto entre dichos obstáculos, y en donde la distancia entre dos obstáculos sucesivos es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces el diámetro del orificio más pequeño de cualquiera de dos obstáculos sucesivos, y una salida aguas abajo en la extremidad opuesta del conducto; y en donde la entrada al conducto del dispositivo y el obstáculo de entrada aguas arriba forman una primera porción del dispositivo, y la salida del conducto del dispositivo y el obstáculo de salida aguas abajo forman una segunda porción del dispositivo y en donde las porciones primera y segunda son separables, en donde el dispositivo comprende además un sello espaciador; en donde además el conducto en cada una de las porciones primera y segunda comprende una luz longitudinal, en el que las porciones primera y segunda pueden estar yuxtapuestas y aseguradas entre sí de tal manera que una cámara de turbulencia esté definida por los al menos dos obstáculos y al menos una pared interna del sello espaciador.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que los obstáculos de entrada y de salida son extraíbles del dispositivo o porciones de los mismos.
3. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el obstáculo de entrada aguas arriba y el obstáculo de salida aguas abajo son perpendiculares a la dirección del flujo de fluido a través del conducto.
4. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que un orificio u orificios que atraviesan el obstáculo de entrada aguas arriba y el obstáculo de salida aguas abajo son paralelos al eje longitudinal del conducto.
5. El dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además un medio de aseguramiento para mantener la integridad del dispositivo.
6. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el conducto de entrada, los obstáculos de entrada y de salida, la cámara de turbulencia y el conducto de salida están formados como una única unidad integral.
7. El dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además al menos un obstáculo adicional definiéndose de ese modo al menos dos cámaras de turbulencia.
8. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que cada uno de los obstáculos de entrada aguas arriba y de salida aguas abajo comprende tres orificios transversales, en donde las configuraciones de la sección transversal de los orificios se seleccionan de entre circular, ovoide, concéntrica y rectilínea, creando cada una de ese modo una obstrucción de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % de la sección transversal del conducto, y en donde los orificios pueden ser idénticos o diferentes los unos de los otros, y en donde el eje longitudinal de cualquier orificio a través del primer obstáculo no se alinea con el eje longitudinal de ningún orificio del segundo obstáculo.
9. El dispositivo según la reivindicación 1 que comprende una entrada aguas arriba en una extremidad de un conducto, al menos dos obstáculos que tienen superficies opuestas, siendo dichos obstáculos un obstáculo de entrada primero o aguas arriba dentro del conducto, estando el obstáculo de entrada aguas arriba perforado por al menos un orificio transversal y obstruyendo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % del área de sección transversal interna del conducto, un obstáculo de salida segundo o aguas abajo en el interior del conducto, y estando el obstáculo de salida aguas abajo perforado por al menos un orificio transversal y obstruyendo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,9 % del área de sección transversal interna del conducto, en donde el obstáculo de entrada aguas arriba y el obstáculo de salida aguas abajo son perpendiculares a la dirección del flujo de fluido a través del conducto y los orificios que atraviesan el obstáculo de entrada y el obstáculo de salida aguas abajo son paralelos al eje longitudinal del conducto, y en donde el eje longitudinal de cualquier orificio

transversal de cualquiera de los obstáculos no se alinea con el eje longitudinal de ningún otro orificio de un obstáculo anterior o posterior, y una cámara de turbulencia definida por las superficies opuestas de los obstáculos primero y segundo y la pared interna del conducto entre dichos obstáculos, y en donde la distancia entre dos obstáculos sucesivos es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces el diámetro del orificio más pequeño de cualquiera de dos obstáculos sucesivos, y una salida aguas abajo en la extremidad opuesta del conducto, en donde la entrada al conducto del dispositivo y el obstáculo de entrada aguas arriba forman una primera porción del dispositivo, y la salida del conducto del dispositivo y el obstáculo de salida aguas abajo forman una segunda porción del dispositivo y en donde las porciones primera y segunda son separables, y un sello espaciador, en donde la cámara de turbulencia está definida por las superficies opuestas de los dos obstáculos y la pared interna del dispositivo entre los obstáculos.

10. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que el conducto tiene forma cilíndrica, el obstáculo de entrada tiene 3 orificios que crean una obstrucción de aproximadamente el 98 % de la sección transversal del conducto; el obstáculo de salida tiene 3 orificios que crean una obstrucción de aproximadamente el 98 % de la sección transversal del conducto, en donde los orificios del obstáculo de salida no tienen la misma alineación longitudinal con respecto a ningún orificio del obstáculo de entrada, y en donde la distancia que separa estos dos obstáculos es aproximadamente dos veces el diámetro de cualquier orificio.

11. Un procedimiento para la dispersión de agregados, que comprende las etapas de:

- (1) pasar una suspensión de células que contiene agregados de células a través de al menos un dispositivo según la Reivindicación 1;
- (2) desunir los agregados de células dentro de la suspensión de células,
- (3) opcionalmente repetir la etapa (1) volviendo a pasar la suspensión a través del dispositivo; y
- (4) recolectar la suspensión de células que contiene los agregados de células desunidos.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la suspensión de células se pasa a través de una disposición en serie de una pluralidad de dispositivos según la Reivindicación 1.

13. Un procedimiento de cultivo celular, que comprende las etapas de:

- (1) introducir células que cultivar en un medio de cultivo y cultivar las células;
- (2) desplazar o suspender las células cultivadas en un medio, en donde la suspensión comprende agregados de células;
- (3) pasar la suspensión de células que contiene agregados de células a través de un dispositivo de dispersión de flujo continuo según la reivindicación 1 o a través de una disposición en serie de tales dispositivos, desuniéndose de ese modo los agregados de células y liberándose células individuales de los mismos;
- (4) opcionalmente repetir las etapas de (1) a (3) se repiten tantas veces como sea necesario, y
- (5) volver a introducir al menos una porción de la suspensión de células desunidas de la etapa (3) al lote de cultivo y volver a cultivar las células.

14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que el medio de cultivo comprende microportadores.

15. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la etapa (3) es continuo durante el periodo de cultivo.

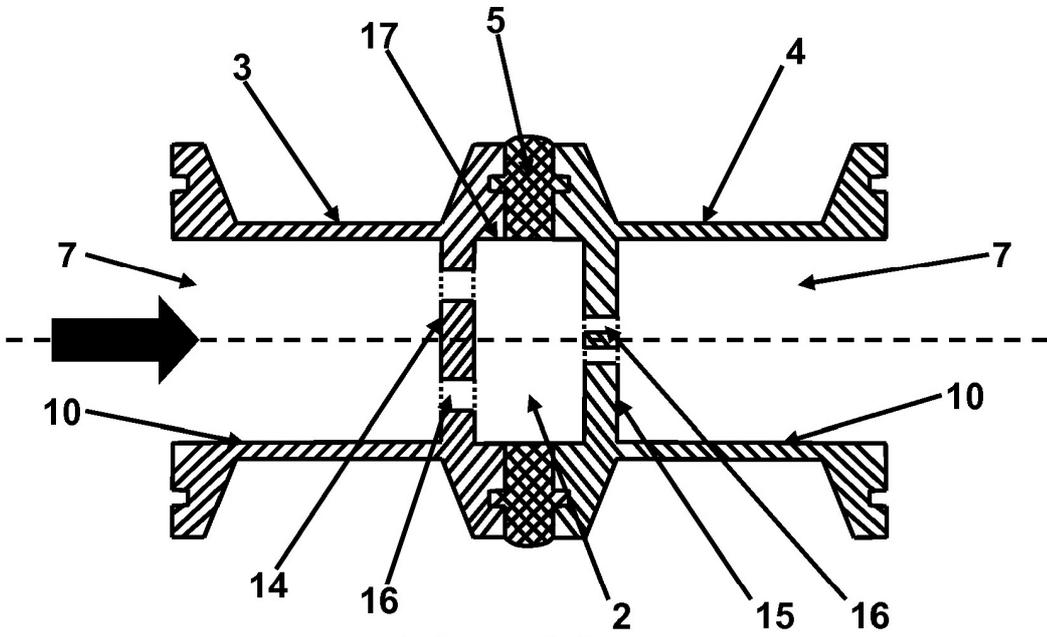


Fig. 1A

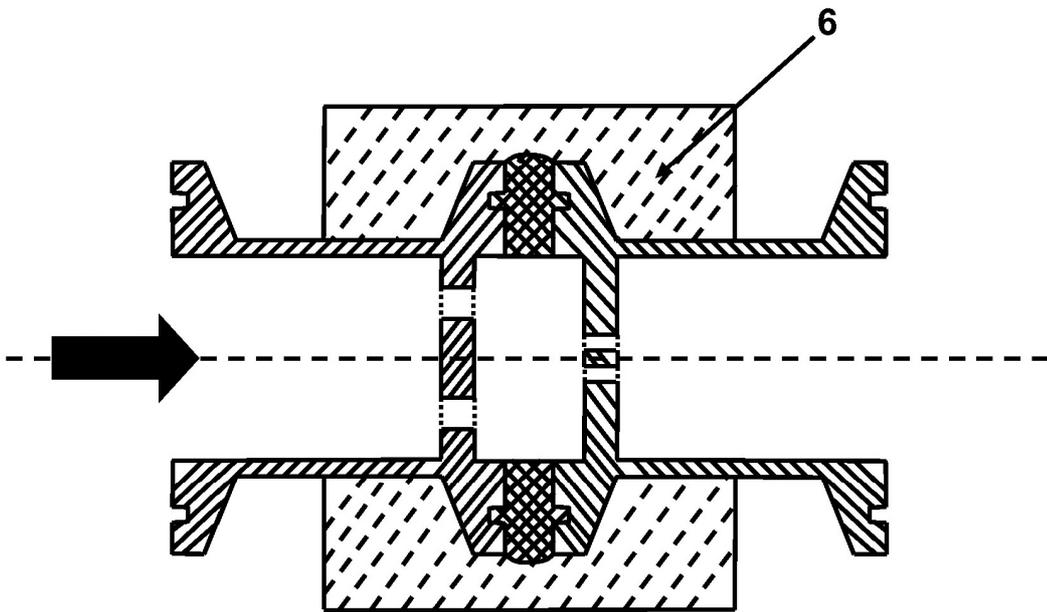


Fig. 1B

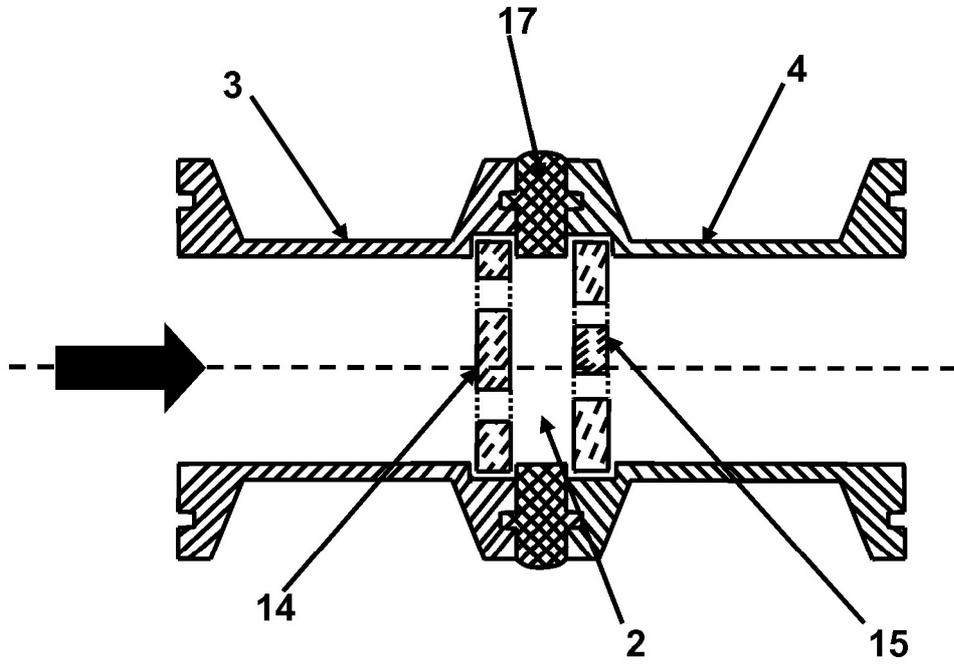
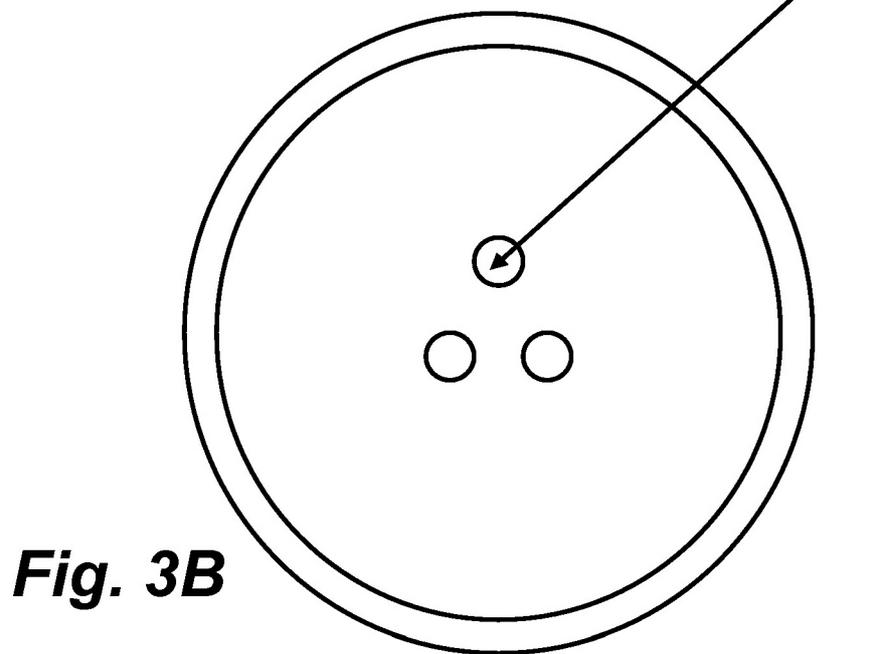
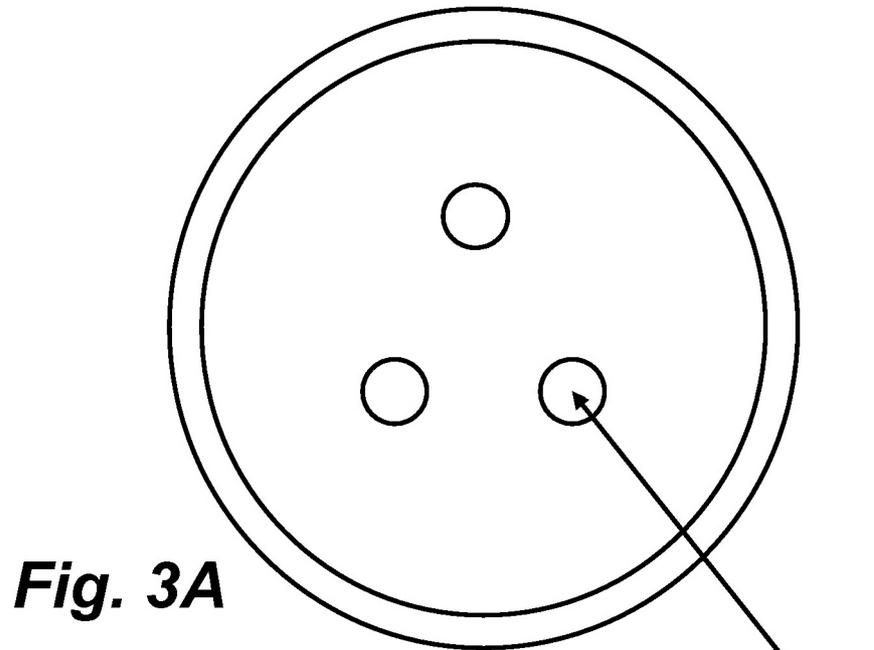


Fig. 2



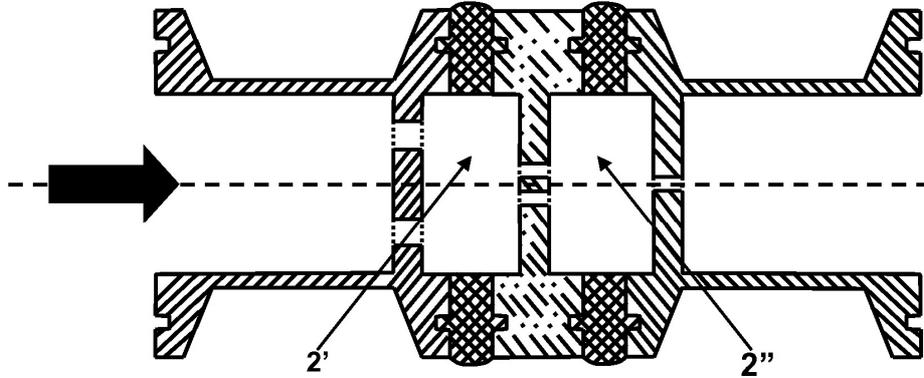


Fig. 4A

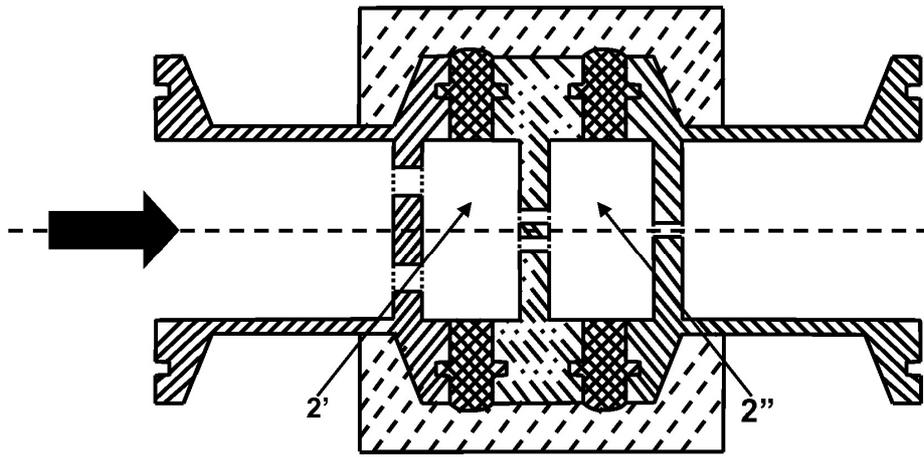


Fig. 4B

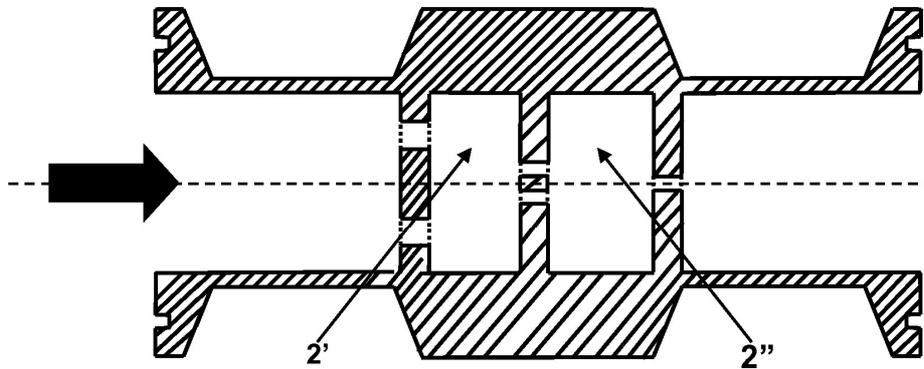


Fig. 4C