

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 631**

51 Int. Cl.:

C12M 1/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2009 PCT/US2009/004118**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10008566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09788926 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2304019**

54 Título: **Un sistema de cultivo celular de múltiples niveles**

30 Prioridad:

14.02.2009 US 207683 P

16.07.2008 US 134985 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2019

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)

**290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**CLARK, PHIL;
GREENIZEN, KURT;
EMERICK, MARC y
SCOTT, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 631 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

Un sistema de cultivo celular de múltiples niveles

La presente invención se refiere a un sistema de cultivo celular que tiene un dispositivo o vaso con uno o más niveles de superficies de crecimiento celular en comunicación fluida entre sí. Más particularmente, se refiere a un matraz de cultivo celular que tiene múltiples bandejas de superficies de crecimiento celular en donde se puede acceder directamente al medio de crecimiento celular en cada bandeja a través del mismo puerto que se puede volver a sellar.

Antecedentes de la invención

Los dispositivos de cultivo celular a pequeña escala han existido en forma de matraces agitadores y botellas rotativas durante años. Más recientemente, se han desarrollado botellas de matraz de una sola capa y ahora de varias capas. La tendencia actual en la investigación ha exigido más células para cumplir con las campañas de pantalla de alto rendimiento en las compañías de descubrimiento de medicamentos. Además, el uso de ensayos basados en células está aumentando rápidamente debido a la presión para desafiar a los posibles candidatos a medicamentos anteriormente en el proceso de desarrollo. Un ensayo típico basado en células o una prueba de detección de HTS puede requerir de aproximadamente 10^9 a alrededor de 10^{10} células. Un matraz de una sola capa estándar puede entregar alrededor de 10^7 células. La necesidad actual de células requiere que los investigadores mantengan y alimenten de 10 a 100 matraces estándar para alcanzar un número requerido de células para ejecutar un ensayo basado en células o un examen de HTS dado, por lo que se necesitan nuevos formatos de múltiples capas. Por lo tanto, sería deseable tener un sistema de cultivo celular que proporcione un alto número de células sin un aumento sustancial en el número de matraces estándar que hay que mantener y alimentar.

Uno de estos productos tiene dos bandejas unidas entre sí e insertadas dentro de un matraz para formar un matraz de tres capas de cultivo. El matraz es generalmente rectangular con una apertura típica de botella roscada en su pared lateral más convergente hacia delante que tiene la forma de cuello de botella (véase el documento US 5.310.676 B). Cada bandeja tiene una pared lateral alrededor de toda su periferia y las paredes laterales están selladas entre sí. Para proporcionar acceso de líquido y celular a la bandeja media e inferior, se necesita construir un túnel a lo largo de la pared final de las bandejas o matraz que interconecta de manera líquida las bandejas para que el líquido y las células puedan entrar y salir de las bandejas.

Otro producto utiliza hasta diez bandejas con cada superficie superior cubierta por una película permeable a los gases. Cada bandeja tiene una pared lateral que se extiende hacia arriba desde la superficie. Las bandejas se apilan juntas y las paredes laterales se fusionan para formar una masa integral. Una pared lateral del colector y del cuello de la botella con una apertura roscada típica de la botella se une al extremo frontal de las bandejas para completar el matraz. (Véase el documento WO 2008/069902 A3). El colector proporciona acceso al extremo abierto de las bandejas.

Los sistemas enseñados en los documentos US 5.310.676 B y WO 2008/069902 A3 tienen cada uno sus inconvenientes. Tampoco se puede acceder fácilmente con una pipeta o jeringa para agregar líquido o células, tomar muestras o retirar las células al finalizar el ciclo de crecimiento. De hecho, el uso de una pipeta o jeringa está restringido porque la apertura de la botella está colocada en la pared lateral y las bandejas están bloqueando el acceso de la pipeta a los medios y las células. Sería conveniente poder pipetear los medios y las células directamente desde un dispositivo de cultivo, utilizando herramientas estándar de pipeteo y técnicas estándar de cultivo celular.

La aplicación de células y líquidos es difícil y muchas veces incompleta. El documento US 5.310.676 B se basa en el moldeado en el túnel para ayudar en su distribución, lo que puede ser difícil y llevar mucho tiempo. El líquido debe agregarse al matraz en posición vertical, lo que puede provocar la formación de espuma y dañar las proteínas críticas en los medios. Entonces, el matraz se gira en varias direcciones para garantizar que todas las bandejas reciban una cantidad adecuada de líquido. Del mismo modo, la eliminación del líquido y/o las células requiere el paso a través del túnel para poder recuperarse. Por último, el número de bandejas es insuficiente para aumentar de forma efectiva los altos rendimientos que necesitan los científicos de hoy.

El documento WO 2008/069902 A3 utiliza un colector para distribuir el líquido y las células en un matraz agregando el líquido (que contiene células y/o medios de crecimiento) a la parte del cuello del matraz. El cuello se cierra y el matraz se agita, se sacude o se mueve para expulsar el aire que pudiera quedar atrapado dentro de las capas del sistema. Por último, como el espacio entre las bandejas es muy pequeño y la película permeable a los gases forma el límite superior de los medios en cualquier bandeja, el grosor de los medios se fija en aproximadamente 0,32 ml por cm^2 . Dependiendo de los tipos de células que se cultiven, las necesidades de los medios son diferentes. Por ejemplo, una célula madre humana o de ratón es una célula altamente metabólicamente activa y exige un alto nivel de medios, generalmente en el intervalo de 0,4 ml por cm^2 , mientras que una línea celular de metabolismo lento, como CHO, MDCK o fibroblasto, puede requerir solo 0,2 ml por cm^2 . Ya que el documento WO 2008/069902 A3 tiene un volumen de medios fijo para llenar el sistema, el investigador necesita ajustar la alimentación de la célula y mantener un programa para cada tipo de célula que se cultiva, o bien desperdiciar medios y aditivos costosos. Además, los científicos prefieren poder variar la cantidad de medios que pueden usar para optimizar las condiciones de crecimiento, un parámetro que el documento WO 2008/069902 A3 no permite a un científico optimizar. Sería conveniente proporcionar un dispositivo de cultivo que tenga capas que se llenen fácilmente con medios sin la restricción de los

túneles, o la necesidad de desalojar el aire atrapado dentro de las capas.

A medida que las células crecen, el investigador necesita acceder de manera rutinaria al estado de crecimiento del cultivo para que se puedan tomar las medidas adecuadas, como cuando las células están casi confluentes, el investigador las separará de la bandeja de cultivo para usarlas en ensayos, pantallas o similares, o para reiniciar nuevos sistemas de cultivo para continuar expandiendo la línea celular. Es importante recuperar las células antes de la confluencia del 100%. Estos sistemas generalmente requieren que el investigador mueva el sistema de cultivo a un microscopio costoso que puede o no estar en el área de cultivo, para investigar el estado del crecimiento celular. Sería conveniente poder llenar el dispositivo de cultivo con la cantidad deseada de medios y aditivos para satisfacer las necesidades del tipo de célula, así como el cronograma de trabajo del investigador. Adicionalmente, sería conveniente proporcionar un sistema de cultivo celular que permita la visualización de las células sin tener que transportar el matraz o similar que alberga las células a un microscopio costoso.

Por lo general, los laboratorios que trabajan con un gran número de células, como se describe, utilizan una variedad de equipos automatizados, como manipuladores de placas de múltiples pocillos y sistemas de dispensación de líquidos para aumentar el rendimiento y reducir la variabilidad de los datos debido al error del operador. Estos sistemas de cultivo pueden automatizarse, pero se limitan a sistemas equipados con brazos articulados que pueden agarrar el sistema y verter el líquido en un recipiente receptor. Los sistemas con estos brazos articulados complejos son caros y no están disponibles para la mayoría de los laboratorios. Por lo tanto, la mayoría de los usos para los sistemas de cultivo anteriores se limitan a un operador manual que manipula los sistemas, lo que va en contra de las prácticas de trabajo de los laboratorios de alto rendimiento. Por lo tanto, sería conveniente proporcionar un sistema de cultivo celular compatible con los sistemas automatizados actualmente en la mayoría de los laboratorios, y no requerir brazos articulados especiales para automatizar.

Los documentos US 2001/055803 A1 y US 2007/065933 A1 describen ejemplos adicionales de matraces de cultivo celular con una pluralidad de bandejas apiladas. El matraz que se muestra en el documento anterior está formado por una pluralidad de cuellos formados en un lado extremo de cada bandeja, en donde los cuellos son porciones de pared cilíndricas que rodean un orificio en la bandeja, en donde los agujeros y cuellos tienen un diámetro diferente de una bandeja a la bandeja adyacente. La bandeja inferior del matraz tiene una placa inferior plana en toda su extensión. El último documento también describe un matraz con una pila de bandejas que tiene una bandeja base con un fondo plano en toda su extensión.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un matraz de cultivo celular de una o varias capas con las características de la reivindicación 1, que es fácil de llenar, de vaciar, de fácil acceso mediante pipeta o jeringa, y proporciona capacidades de alto rendimiento deseadas por la industria.

La presente invención se basa en un matraz de cultivo celular que tiene una pared inferior y una pared superior unidas entre sí por una o más paredes laterales, típicamente tres o más, que son sustancialmente perpendiculares a las paredes superior e inferior. La parte superior tiene una apertura roscada en la cual una tapa ventilada está acoplada de manera roscada, en donde la pared superior es preferiblemente sustancialmente plana. Un espacio interior está definido por las paredes. La pared inferior tiene al menos dos porciones, preferiblemente tres; una primera porción en un plano, una segunda porción en un segundo plano por encima, y preferiblemente paralelo al plano de la primera porción y una porción de interconexión que forma un ángulo para interconectar la primera porción con la segunda porción. La porción de interconexión está incorporada en la segunda porción de manera que el área de la segunda porción adyacente a la primera porción esté en el plano de la primera porción y el área de la segunda porción más allá de eso esté en un ángulo hacia arriba desde el primer plano hasta un punto deseado o segundo plano. Las paredes inferiores se extienden desde la superficie plana inferior exterior para formar una falda perimetral. La falda perimetral forma una transición lineal a la pared final. La transición de la falda lineal crea un ángulo tal que cuando el sistema de cultivo celular está en posición, la falda de transición lineal se apoya en una superficie de trabajo de tal manera que todas las porciones del plano interno (una, dos, tres y cuatro) estén posicionadas en un ángulo positivo de modo que el líquido en esas superficies se drenará hacia el extremo del puerto de acceso del sistema de cultivo. Esta función permite la recuperación completa de los medios gastados durante los cambios en los medios y la recuperación completa de las células después del cultivo. Las bandejas se colocan en el espacio interior, preferiblemente solo en el área definida por la primera porción de la pared inferior y una porción de la porción de interconexión, si se usa.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un dispositivo de cultivo celular de múltiples niveles que permita a un usuario pipetear el medio celular y las células directamente desde el dispositivo, utilizando herramientas estándar de pipeta y técnicas estándar de cultivo celular.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un sistema de cultivo celular que proporcione un alto número de células sin un aumento en el número de matraces estándar que hay que mantener y alimentar.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un sistema de cultivo celular compatible con los sistemas automatizados que se utilizan actualmente en la mayoría de los laboratorios, y que no requieren brazos articulados especiales para automatizar.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un sistema de cultivo celular que proporciona un dispositivo de cultivo celular de múltiples niveles en el que cada nivel o bandeja se llena fácilmente con medios sin la restricción de túneles, o la necesidad de desalojar el aire atrapado dentro de los niveles separados.

- 5 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un sistema de cultivo celular de varios niveles que proporcione un dispositivo de cultivo celular que pueda llenarse o vaciarse fácilmente con la cantidad deseada de medios, aditivos y células para satisfacer las necesidades del tipo de célula, así como el horario de trabajo de un investigador.

También describió un sistema de cultivo celular que proporciona la visualización de las células dentro del dispositivo de cultivo sin tener que transportar el matraz o dispositivo que aloja las células a un microscopio costoso u otro tipo de instrumento de visualización óptica.

- 10 Las características y ventajas adicionales de la invención se expondrán en la descripción detallada que sigue.

En los dibujos

La figura 1 muestra una vista en sección transversal de una primera realización de la presente invención.

Las figuras 2a y 2b muestran vistas en sección transversal de una realización adicional de la presente invención.

- 15 La figura 3 muestra una vista en sección transversal de la primera realización de la figura 1 en la posición de descarga de la presente invención.

La figura 4 muestra una vista en sección transversal de una serie de primeras realizaciones de la presente invención en formación apilada.

Las figuras 5A-E muestran una vista en sección transversal desde arriba hacia abajo de varias realizaciones de pared lateral según la presente invención.

- 20 Las figuras 6A-6B muestran vistas en perspectiva de una realización adicional de la presente invención.

La figura 7 muestra una vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención.

La figura 8 muestra otra vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención.

La figura 9 muestra una vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención.

La figura 10 muestra una vista en perspectiva de los componentes individuales de la realización en la figura 10.

- 25 La figura 11 muestra una vista en despiece de una realización adicional de la presente invención representada en la figura 10.

La figura 12a muestra una vista lateral de la realización de la presente invención representada en la figura 11. La figura 12b muestra una vista en sección transversal α de la realización de la presente invención representada en la figura 11.

- 30 La figura 13 muestra una vista en perspectiva α de una realización adicional de la presente invención.

La figura 14 muestra una vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención.

La figura 15 muestra una vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención llena de medios de cultivo celular.

- 35 La figura 16a muestra una vista en perspectiva de una realización adicional de la presente invención que contiene medios de cultivo celular que llenan de igual modo las bandejas.

La figura 16b muestra una vista en perspectiva de la presente invención representada en la figura 15 en una posición inclinada con el fin de extender los medios de cultivo celular a través de las bandejas.

Descripción detallada

- 40 Para los propósitos de esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos utilizados en la especificación y las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "sobre".

- 45 En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener con la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe

interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se notifican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. Además, debe entenderse que todos los intervalos descritos en la presente memoria abarcan todos y cada uno de los sub-intervalos incluidos en el mismo. Por ejemplo, un intervalo de "1 a 10" incluye cualquiera y todos los sub-intervalos entre (e incluyendo) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10, es decir, cualquiera y todos los sub-intervalos que tengan un valor mínimo igual o mayor que 1 y un valor máximo igual o inferior a 10, por ejemplo, de 5,5 a 10.

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La figura 1 muestra una realización de la presente invención, en donde el matraz 2 comprende preferiblemente un material de vidrio o plástico transparente, translúcido o no transparente. El matraz 2 tiene una pared superior 4, una pared inferior 6 y tres o más paredes laterales 8 que se extienden sustancialmente perpendicularmente hacia y entre la pared superior 4 y la pared inferior 6 para definir un espacio interior 10. Como se muestra, la pared inferior 6 y las paredes laterales 8 se forman como una sola pieza. Si se desea, pueden estar formadas por piezas individuales si se desea. La pared superior 4 está herméticamente sellada al borde superior 12 de las paredes laterales 8, por ejemplo mediante unión por calor, unión por fusión, soldadura por vibración sónica o adhesivos. Opcionalmente, como en esta realización, el borde superior 12 de las paredes laterales tiene una característica, en este caso un reborde 14 que se acopla con una característica correspondiente en este caso, un canal 16 en la superficie inferior o interior 18 de la pared superior 4, de manera que las paredes estén correctamente alineadas y selladas juntas. Si se desea que la pared superior se retire, la pared superior 4 se puede asegurar a las paredes laterales 8 mediante otros medios bien conocidos, tales como tornillos, abrazaderas, cola de milano deslizante y similares (no mostrados).

La pared superior 4 tiene un puerto 20 que puede abrirse y cerrarse selectivamente. Uno de tales medios para abrir y cerrar selectivamente el puerto 20 es una tapa 22 que puede y preferiblemente tiene un respiradero 24 que permite la transferencia de gases dentro y fuera del interior 10 sin contaminación. Esto se puede lograr usando una frita, metal como el acero inoxidable o plástico como una frita POREX® o una membrana o filtro hidrófobo, todos los cuales tienen un tamaño de poro diseñado para evitar la entrada de bacterias, polvo y otros contaminantes similares. Un tamaño de poro típico usado en una frita o filtro o membrana de este tipo es menor que aproximadamente 0,65 micrómetros, preferiblemente menor que aproximadamente 0,4 micrómetros y más preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros.

Como se muestra, la pared inferior 6 en esta realización tiene una primera porción sustancialmente plana 24 y una segunda porción sustancialmente plana 26 conectadas entre sí por una porción de interconexión sustancialmente plana 28 que está en un ángulo para conectar las dos porciones 24 y 26 juntas. La primera porción 24 está en un plano horizontal deseado que está debajo de ese segundo plano horizontal de la segunda porción 26. Esto significa que cuando se encuentra en su posición de uso como se muestra en la figura 1, la primera porción 24 es la porción más baja del interior 10 del dispositivo 2.

Una porción del interior 10 contiene una o más bandejas para el crecimiento de células 30. Estas bandejas tienen un fondo 32 sustancialmente plano y paredes laterales 34 que se extienden alrededor de la periferia de la bandeja 30. El número de paredes laterales 34 de la(s) bandeja(s) 30 es igual en número al número de paredes laterales del matraz 2. La pared lateral frontal 36 de la(s) bandeja(s) es diferente al resto de las paredes laterales 34 de la(s) bandeja(s) 30 porque está en un ángulo hacia arriba desde la porción sustancialmente plana inferior 32 de cada bandeja 30. La pared lateral frontal 36 o el borde proporciona acceso abierto a cada bandeja para células, líquidos y gases cuando están dispuestos dentro del matraz 2. También se muestra en cada bandeja 30 una característica opcional 38 que es un pie que se extiende hacia fuera desde la pared lateral frontal 36 de cada bandeja 30.

Las paredes inferiores se extienden a una distancia de la superficie plana inferior externa para formar una falda perimetral. La falda perimetral forma una transición lineal a la pared final. La transición lineal de la falda crea un ángulo que, cuando el sistema de cultivo está en posición, la falda de transición se apoya sobre una superficie de trabajo, todas las porciones del plano interno (una, dos, tres y cuatro) se colocan en un ángulo positivo para que el líquido en esas superficies drene hacia el extremo del puerto de acceso del sistema de cultivo. La función permite la recuperación completa de los medios gastados durante los cambios en los medios y la recuperación completa de las células después del cultivo.

La(s) bandeja(s) 30 están espaciadas alrededor de la pared inferior 6 del matraz 2 de manera que la superficie interior 44 de la pared inferior actúe como una bandeja. En esta realización, la(s) bandeja(s) está(n) separada(s) de la superficie inferior 44 por los retenes formados en las paredes laterales opuestas 8. Estos retenes o apoyos se extienden hacia fuera en el interior 10 en una medida suficiente para soportar la(s) bandeja(s) en el interior 10. Típicamente, pueden extenderse hacia fuera desde las paredes laterales hacia el espacio en una distancia de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 7 mm. Alternativamente, la bandeja inferior 30 puede tener pies (no

mostrados) formados en su superficie inferior 32 para proporcionar la separación necesaria con la superficie inferior interior 44 del interior 10. En otra realización, si la superficie inferior 44 no se desea como capa de crecimiento celular, no se necesitan retenes ni pies, y la(s) bandeja(s) inferior(s) 32 puede(n) entrar en contacto con la superficie inferior 44.

- 5 Preferiblemente, la(s) bandeja(s) 30 está(n) simplemente apilada(s) una sobre la otra y retenida(s) en el matraz por consideraciones de espaciado, haciéndola(s) lo suficientemente estrecha(s) como para que la(s) bandeja(s) 30 una vez insertada(s) no pueda(n) disociarse una de la otra. Opcionalmente, pueden sellarse entre sí mediante el uso de adhesivos o uniones térmicas y similares, o pueden tener una correa como una o más envolturas de sujeción o envolturas de cable (no mostradas) colocadas alrededor de ellas, o pueden contener colas de milano deslizantes o ajustes a presión (no mostrados) entre sus superficies adyacentes para mantenerlas juntas.

10 El ángulo de la porción de interconexión 28 es igual o mayor que el ángulo de la pared lateral frontal 36 de cada bandeja 30, de modo que cuando se mueve a su posición de carga/descarga como se describe en la figura 2, el líquido y las células pueden fluir a sus ubicaciones apropiadas. Típicamente, el ángulo de la porción de interconexión 28 es de aproximadamente 10 grados a aproximadamente 60 grados, medido por el ángulo alfa 46 entre el primer plano de la primera porción 24 y la superficie inferior externa 48 de la porción de interconexión 28. Preferiblemente, el ángulo alfa 46 está entre aproximadamente 10 grados y aproximadamente 45 grados, más preferiblemente de aproximadamente 15 grados a aproximadamente 30 grados y lo más preferiblemente aproximadamente 22 grados. El ángulo de la pared lateral frontal 36 como se describe anteriormente es igual al ángulo alfa 46 o menor que el ángulo alfa 46, pero preferiblemente nunca es mayor que el ángulo alfa 46. Además, la pared superior 4 puede tener opcionalmente una tercera porción 29 similar (como se muestra) que corresponde al ángulo alfa en una posición directamente encima de la interfaz entre la primera porción 24 y la porción de interconexión 28 de la pared inferior 6. Esta es una opción preferida de modo que el espacio entre la bandeja superior y la superficie interior de la parte superior la pared 4 es el mismo que el espacio entre cualquier otra bandeja (si se usa más de una) y la superficie adyacente sobre ella (la superficie inferior de la bandeja sobre ella, por ejemplo). Alternativamente, la pared superior 4 puede ser sustancialmente plana en toda su longitud y el espacio entre la bandeja superior y la pared superior puede agrandarse adecuadamente si es necesario para proporcionar un flujo adecuado de líquidos y gases en esa bandeja (no se muestra)

La(s) bandeja(s) 30 está(n) contenida(s) dentro del interior 10 al área circunscrita por la primera porción 24 y preferiblemente al menos una porción de la porción de interconexión 28 de la pared inferior 6. Esto deja un área abierta 41 en el interior 10 alrededor y junto al puerto 20 para la entrada y salida de líquidos, células y gases. En la realización en la que la(s) bandeja(s) 30 no está(n) unida(s) o asegurada(s) de otra manera a la parte inferior o las paredes laterales 6,8 del matraz 2, el pie 38 actúa como un medio para evitar que la(s) bandeja(s) se mueva hacia el área abierta 41 cuando el matraz se inclina para descargar o, si se desea, también para cargar.

La figura 2 muestra el matraz 2 en su posición de descarga. Esta también puede ser la posición de carga según se desee. Como se muestra, el matraz 2 se levanta en su parte trasera 50 y se inclina hacia delante sobre su pie 42 que se extiende hacia abajo desde la pared lateral 8 adyacente al puerto 20. Se puede insertar una pipeta o jeringa o embudo (se muestra la pipeta 52) en el puerto 20 y tener acceso al área abierta 41 del interior 10. La segunda porción 26 cuando se encuentra en la posición de carga opcional de descarga se convierte en el punto bajo del matraz 2. Esto permite recuperar células o intercambiar medios o agregar nuevos medios o células en el área abierta 41 sin alterar la(s) bandeja(s) o requerir que uno incline el matraz verticalmente como lo requiere la técnica anterior.

La figura 3 muestra una realización alternativa del diseño de las figuras 1 y 2. En esta realización, la segunda porción se convierte en una parte de la porción de interconexión 28 de tal manera que hay una primera porción plana de la parte inferior 6 y solo una porción de interconexión 28 en ángulo que se encuentra y termina en la pared lateral frontal 54. La segunda porción 26 en efecto se convierte en el punto en el que la porción de interconexión 28 se encuentra con la pared lateral frontal 54. El dispositivo 2 se usa de la misma manera que se describe en la figura 2. Todos los elementos comunes a las figuras 1 y 3 conservan los mismos números de referencia, realizan las mismas funciones y tienen los mismos atributos que se describen en referencia a la realización de la figura 1.

La figura 4 muestra una serie de matraces 2 según la presente invención. Debido a su diseño con las porciones inferiores relativamente planas 24 y la pared superior 4, pueden apilarse alternativamente unas sobre otras para ahorrar espacio en el suelo o la campana durante la incubación y el crecimiento.

Como se describió anteriormente, el matraz puede tener tres o más paredes laterales 8. Las figuras 5A-D muestran tres ejemplos de paredes laterales diferentes del matraz 2 para ilustrar esta característica. La figura 5A muestra un matraz 2 de forma triangular que tiene tres paredes laterales 8A. La figura 5B muestra una configuración de pared lateral poligonal de cuatro paredes laterales más con las paredes laterales 8B y 8D que son paredes laterales lineales o rectas y las paredes laterales 8C que son paredes laterales en ángulo o cónicas. Las paredes laterales 8c pueden ser una extensión de las paredes laterales 8B, en cuyo caso hay 3 paredes laterales o pueden ser partes separadas de las paredes laterales en las que el matraz tiene 5 paredes laterales. La figura 5C muestra un diseño de forma rectangular con cuatro paredes laterales 8D-8G. La figura 5D muestra otro diseño con cinco paredes laterales 8I-8M. La figura 5E muestra una única pared lateral circular 8N.

El sistema de cultivo de la invención, cuando está en uso, incluye un matraz lleno y/o vaciado por una pipeta, jeringa o dispositivo similar, que tiene el sistema de cultivo colocado sobre una superficie de trabajo y que tiene la apertura roscada en una posición hacia arriba. El investigador dispensa los medios y las células en el sistema. La cantidad de medios puede variar según el tipo de célula que se cultiva, es decir, más medios para células altamente metabólicas como las células madre. El investigador sella el sistema con un cierre permeable a los gases, como una tapa roscada con una matriz microporosa retentiva bacteriana hidrófoba que permite el intercambio libre de gas desde el exterior del sistema hacia el interior. El sistema de cultivo está inclinado hacia un lado, de modo que el medio llena libremente las capas asegurando una cantidad uniforme entre cada bandeja. El sistema se inclina hacia la pared lateral opuesta al cierre y, a continuación, se inclina hacia adelante, lo que da como resultado que el sistema de cultivo se asiente con las superficies de la primera y la tercera porción sustancialmente planas a la superficie de trabajo. En esta posición, los medios y las células se distribuyen uniformemente a través de cada capa de cultivo y la superficie de la primera porción. Este sistema de cultivo preparado se coloca normalmente en una cámara de control ambiental, incubación, para la fase de crecimiento celular.

El investigador debe investigar periódicamente el estado del cultivo durante la fase de crecimiento. Esta actividad generalmente consiste en que el sistema de cultivo se retira de la incubadora y se transporta a un microscopio que puede o no estar cerca. Como se muestra en las figuras 6A y 6B, el matraz 2 incluye adicionalmente una lente 54 que puede moldearse en la pared superior o en las paredes inferiores (no mostradas), siendo la superficie focal la primera capa de cultivo adyacente. Idealmente, la ampliación de esta lente es de 10x a 40x para una visualización de bajo nivel del cultivo celular. Preferiblemente, el aumento es de 25x a 40x para que la visualización del estado de crecimiento celular y el desprendimiento de células durante la recuperación celular sea visible a simple vista. Además, un sistema de cámara 56 como el sistema Dino-Lite (BigC.com Corp., Torrance, Ca) se puede asegurar mediante un mecanismo de acoplamiento o sistema de montaje 52 a la pared superior 4 o la pared inferior (no se muestra) para proporcionar captura de imagen. Idealmente, esta configuración se mantiene dentro de la incubadora, de modo que el monitoreo puede ocurrir sin que un investigador tenga que entrar en la incubadora e interrumpir la fase de crecimiento de las células. Además, el uso de una conexión inalámbrica permite el monitoreo remoto del cultivo celular (no se muestra).

Como se muestra en la figura 7, el matraz 2 puede incluir también una o más de las siguientes características a) un sello de plástico 57 sellado sobremoldeado alrededor del perímetro del matraz; b) un botón antideslizante, preferiblemente plástico, para asegurar que el matraz 2 se resbale durante la recuperación de medios gastados, post-cultivos celulares o similares cuando el matraz está inclinado; c) nervaduras de plástico sobremoldeadas u otra característica similar que proporciona al usuario una superficie de agarre o manejo antideslizante. En una realización preferida, el plástico usado para hacer estas características comprende un elastómero termoplástico (TPE) con un durómetro duro mayor que 49 Shore A para proporcionar al usuario una sensación táctil apropiada para agarrar o manejar el matraz.

Como se muestra en la figura 8, el matraz 2 puede incluir también un elemento 60 desmontable fácil de abrir o similar en una de las paredes laterales 8, en donde el elemento desmontable fácil de abrir 60 es preferiblemente un componente del sello sobremoldeado 57.

Como se muestra en las figuras 9 y 10, un matraz de múltiples niveles de cultivo celular 100 que comprende una cubierta 94 que incluye una placa superior 98, paredes laterales 96 y un puerto que se puede volver a sellar 20; una bandeja intermedia 92 para las células receptoras y un medio de cultivo celular 105, teniendo la bandeja intermedia una placa inferior 95, paredes laterales 97, y una región de separación 89 formada entre un labio interior en ángulo hacia arriba 78 que tiene un borde interior curvilíneo de inclinación 99 situado en una porción interior de la placa inferior y una pared lateral adyacente en ángulo hacia fuera 87 de la placa inferior; y una bandeja de base 90 para recibir células y un medio de cultivo celular, que incluye una placa inferior 93 y paredes laterales 91, en la que la bandeja está colocada entre la cubierta y la bandeja de base, de manera que la región de separación de la placa inferior de la bandeja está en alineación con el puerto ubicado en la cubierta, lo que resulta en la cubierta, la bandeja y la bandeja base en comunicación fluida entre sí, lo que permite al usuario acceder directamente a cada uno de los medios celulares ubicados en la bandeja y la bandeja base.

Como se representa en las figuras 9 a 16, un matraz de cultivo celular 100 incluye una cubierta 94 que tiene una placa superior 98, una o más paredes laterales 96 y un puerto que se puede volver a sellar 20; una pluralidad de bandejas intermedias 92 para recibir células y un medio de cultivo celular 105, teniendo cada bandeja intermedia 92 una placa inferior 95, una o más paredes laterales 97, y una región de separación 89 formada entre un labio 78 interior en ángulo hacia arriba que tiene un borde interior curvilíneo de inclinación 99 situado en una porción interior de la placa inferior y una pared lateral adyacente en ángulo hacia fuera 87 de la placa inferior; y una bandeja de base 90 para recibir células y un medio de cultivo celular, que tiene una placa inferior 93 y una o más paredes laterales 91. La pluralidad de bandejas intermedias 92 se coloca entre la cubierta 94 y la bandeja de base 90, de modo que la pluralidad de las bandejas intermedias se apilan una encima de la otra, y las regiones de separación de las placas inferiores 95 de cada bandeja intermedia están alineadas entre sí y con el puerto ubicado en la cubierta, lo que da como resultado el puerto, la pluralidad de bandejas intermedias y la bandeja de base en comunicación fluida entre sí, lo que permite al usuario acceder directamente a cada uno de los medios celulares ubicados en la pluralidad de bandejas intermedias y bandeja de base, con un dispositivo estándar de pipeteo y similares.

5 Como se muestra en la figura 13, las paredes laterales 97 en cada bandeja intermedia 92 apiladas una encima de la otra preferiblemente se fusionan para formar un sello hermético a los líquidos 135, hacia la parte inferior de las paredes laterales 97 en la siguiente bandeja intermedia adyacente. Las paredes laterales de cada bandeja intermedia apiladas una encima de la otra están soldadas por ultrasonidos 135 a la parte inferior de las paredes laterales de la siguiente bandeja intermedia adyacente 92; la pared lateral de la bandeja intermedia adyacente 92 a la cubierta 94 está soldada por ultrasonidos 145 a la parte inferior de la pared lateral de la cubierta 94, y la pared lateral de la bandeja de base 90 está soldada por ultrasonidos 155 a la parte inferior de la pared lateral de la bandeja intermedia adyacente 92.

10 El puerto 20 que se puede volver a sellar se puede abrir y cerrar selectivamente. Uno de estos medios para abrir y cerrar selectivamente el puerto 20 es una tapa 22, que puede ser roscada y preferiblemente tiene un orificio de ventilación 24 que permite la transferencia de gases hacia y desde el interior 10 sin contaminación. Esto se puede lograr usando una frita, metal como el acero inoxidable o plástico como una frita POREX® o una membrana o filtro hidrófobo, todos los cuales tienen un tamaño de poro diseñado para evitar la entrada de bacterias, polvo y otros contaminantes similares. Un tamaño de poro típico usado en una frita o filtro o membrana de este tipo es menor que aproximadamente 0,65 micrómetros, preferiblemente menor que aproximadamente 0,4 micrómetros y más
15 preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros.

Como se muestra en las figuras 9 a 16, un matraz de cultivo celular de varios niveles 100, 110, 115 incluye una pared inferior 88 de una bandeja de base 90 que tiene una primera porción sustancialmente plana 86 y una segunda porción sustancialmente plana 84 conectadas entre sí por una porción de interconexión sustancialmente plana 81 que está en un ángulo para conectar las porciones 84 y 86 juntas.

20 Como se representa en las figuras 12a y 12b, la bandeja de base 90 incluye la primera porción 86 configurada como un plano sustancialmente horizontal que está debajo del segundo plano sustancialmente horizontal de la segunda porción 84, de manera que los medios, las células y similares 105 se dispersarán uniformemente a lo largo de la superficie superior de la bandeja de base 90 porque la porción en ángulo 81 evita que las células y los medios 105 se acumulen en la porción 84. Cuando el matraz 110 está en uso como se representa en las figuras 12a, 12b y 15, la
25 primera porción 86 de la bandeja de base 90 es la porción más inferior del interior 120 del dispositivo 110.

Como se representa en las figuras 16a y 16b, cuando el matraz 110 se coloca en un lado, como se muestra en la figura 16a, cada bandeja se llena igualmente con el medio 105. Alternativamente, cuando el matraz 110 se coloca en posición vertical como se muestra en la figura 16b, cada bandeja se llena igualmente con el medio 105 de nuevo.

30 Como se muestra en las figuras 10, 12a y 12b, una porción del interior 120 contiene una o más bandejas de crecimiento celular 92. Estas bandejas tienen una porción inferior sustancialmente plana 76, una porción de labio 78 sustancialmente plana que está en un ángulo hacia arriba desde la parte inferior sustancialmente plana 76 de cada bandeja 92, y las paredes laterales 97 que se extienden alrededor de la periferia de la bandeja 92. La porción de labio 78 tiene una parte de borde interior 99. El número de paredes laterales 97 de la(s) bandeja(s) 92 es igual en número a la cantidad de paredes laterales del matraz 110. La pared lateral frontal 87 de la(s) bandeja(s) es diferente al resto
35 de las paredes laterales 97 de la(s) bandeja(s) 92 en que está inclinada hacia fuera y alejada del borde curvilíneo de inclinación interior 99 del labio 78 de la porción inferior de las bandejas. La pared lateral frontal 87 y el borde curvilíneo interior 99 de la porción de labio 78 proporcionan acceso abierto o una región de separación 89 a cada bandeja para células, líquidos y gases 105 cuando están dispuestos dentro del matraz 110.

REIVINDICACIONES

1. Un matraz de cultivo celular (2; 100; 110; 115) que comprende:
una cubierta (94) que incluye una placa superior (98), una pared lateral (96) y un puerto que se puede volver a sellar (20);
- 5 una o más bandejas intermedias (30; 92) para recibir células y medios celulares, teniendo cada bandeja intermedia (30; 92) una placa inferior (95), un lado inferior, un lado superior, una pared lateral (97), y una región de separación (89) formada entre un labio interior en ángulo hacia arriba (36; 78) que tiene un borde (99) situado en una porción interior de la placa inferior (95) y una porción de pared lateral adyacente (87) de la placa inferior (95); y
- 10 una bandeja base (90) para recibir células y medios celulares, incluyendo la bandeja base (90) una placa inferior (93), un lado superior y una pared lateral (91), en donde la placa inferior (93) tiene una primera porción sustancialmente plana (24; 86), una segunda porción sustancialmente plana (26; 84) situada sobre el plano de la primera porción plana (24; 86) y conectada a la primera porción plana (24; 86) por una porción de interconexión (28; 81) que forma un ángulo para conectar la primera y la segunda porciones planas (24, 26; 86, 84) juntas,
- 15 en donde la(s) bandeja(s) intermedia (30; 92) se colocan entre la cubierta (94) y la bandeja de base (90), y la(s) región (es) de separación (89) de la(s) bandeja(s) intermedia (30; 92) y la segunda porción plana (26; 84) de la bandeja de base (90) están alineadas con el puerto (20) en la cubierta (94), lo que resulta en el puerto (20), la(s) bandeja(s) intermedia(s) (30; 92) y la bandeja de base (90) en comunicación fluida entre sí, proporcionando acceso directo a las células y los medios celulares cuando se sitúan en cada una de las bandejas intermedia y de base (30; 92, 90).
- 20 2. El matraz (2; 110) de la reivindicación 1, en donde una pluralidad de bandejas intermedias (30; 92) se apilan una encima de la otra, y las regiones de separación (89) de cada bandeja intermedia (30; 92) están alineadas entre sí, y con el puerto (20) en la cubierta (94).
3. El matraz (110) de la reivindicación 2, en donde la pared lateral (97) en cada bandeja intermedia (92) apiladas una encima de otra se fusiona mediante una adherencia o sellado hermético a los líquidos (135) a la parte inferior de la siguiente bandeja intermedia adyacente (92).
- 25 4. El matraz (110) de la reivindicación 3, en donde la pared lateral (97) de la bandeja intermedia adyacente (92) a la cubierta (94) está fusionada mediante una adherencia o sello hermético a los líquidos (145) en la parte inferior de la cubierta (94) y la pared lateral (91) de la bandeja de base (90) está fusionada mediante una adherencia o sello hermético a los líquidos (155) en la parte inferior de la bandeja intermedia adyacente (92).
- 30 5. El matraz (110) de la reivindicación 3 ó 4, en donde el sello hermético a los líquidos (135, 145, 155) está formado por una soldadura ultrasónica.
6. El matraz (2; 100; 110; 115) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el puerto que se puede volver a sellar (20) comprende una tapa roscada (22).
7. El matraz (2; 100; 110; 115) de la reivindicación 6, en donde la tapa roscada (22) incluye un orificio de ventilación (24), preferiblemente en forma de un tejido permeable al aire, en comunicación con un espacio interior del matraz (2; 100; 110; 115).
- 35 8. El matraz (2; 100; 110; 115) de la reivindicación 7, en donde la ventilación (24) es una frita o filtro de membrana con un tamaño de poro inferior a aproximadamente 0,65 micrómetros, preferiblemente inferior a aproximadamente 0,4 micrómetros, preferiblemente inferior a aproximadamente 0,22 micrómetros, preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros.
- 40 9. El matraz (2; 100; 110; 115) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se puede usar un dispositivo o jeringa similar a una pipeta para agregar o eliminar células y medios de cultivo celular desde las bandejas intermedias o de base a través del puerto (20).
10. El matraz (2; 100; 110; 115) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el matraz (100; 110; 115) está hecho de un material seleccionado del grupo que consiste en un polímero, vidrio o una combinación de los mismos.
- 45 11. El matraz (2; 100; 110; 115) de la reivindicación 10, en donde el material es transparente, translúcido, opaco, de un solo color, multicolor o combinaciones de los mismos.
12. El matraz (2; 100; 110; 115) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el ángulo de la porción de interconexión (28; 81) es igual o mayor que el ángulo del labio inclinado hacia arriba (36; 78) de la placa inferior (95) de la(s) bandeja(s) intermedia(s) (30; 92).
- 50 13. El matraz (2; 100; 110; 115) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el ángulo de la porción de interconexión (28; 81) es de aproximadamente 10 grados a aproximadamente 60 grados, preferiblemente de aproximadamente 10 grados a aproximadamente 45 grados, preferiblemente de aproximadamente 15 grados a

aproximadamente 30 grados, preferiblemente de 22 grados.

14. Un método de uso de un matraz de cultivo celular de varios niveles que comprende:

a) suministro de un matraz de cultivo celular (2; 100; 110; 115) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;

b) suministro de células y medios celulares (105);

5 c) adición de las células y los medios celulares (105) al matraz (100; 110; 115) a través del puerto (20) mediante un dispositivo similar a una pipeta o una jeringa;

d) crecimiento de las células en el matraz (100; 110; 115) durante un tiempo deseado y en las condiciones deseadas, y

10 e) retirada de las células y/o los medios del matraz (100; 110; 115) a través del puerto (20) a través de un dispositivo similar a una pipeta o una jeringa.

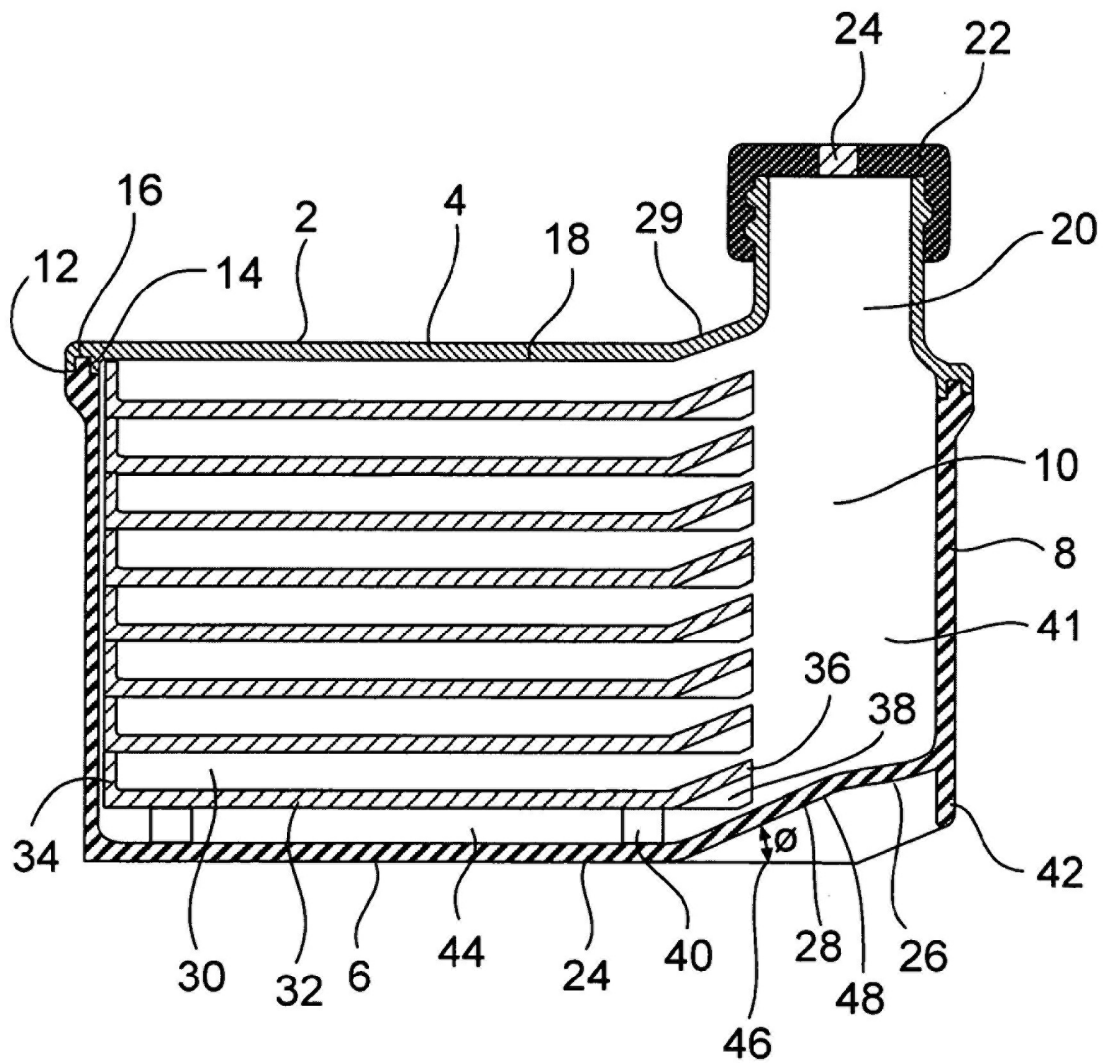


Figura 1

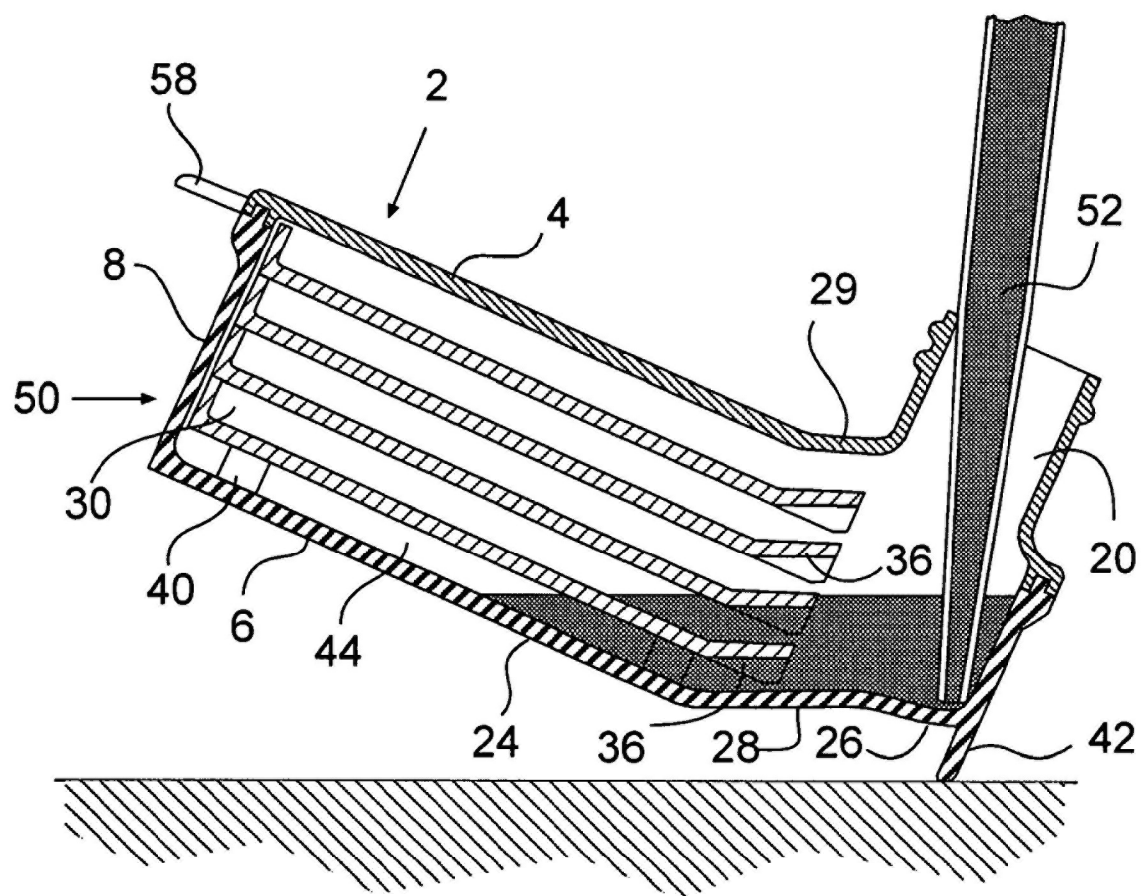


Figura 2a

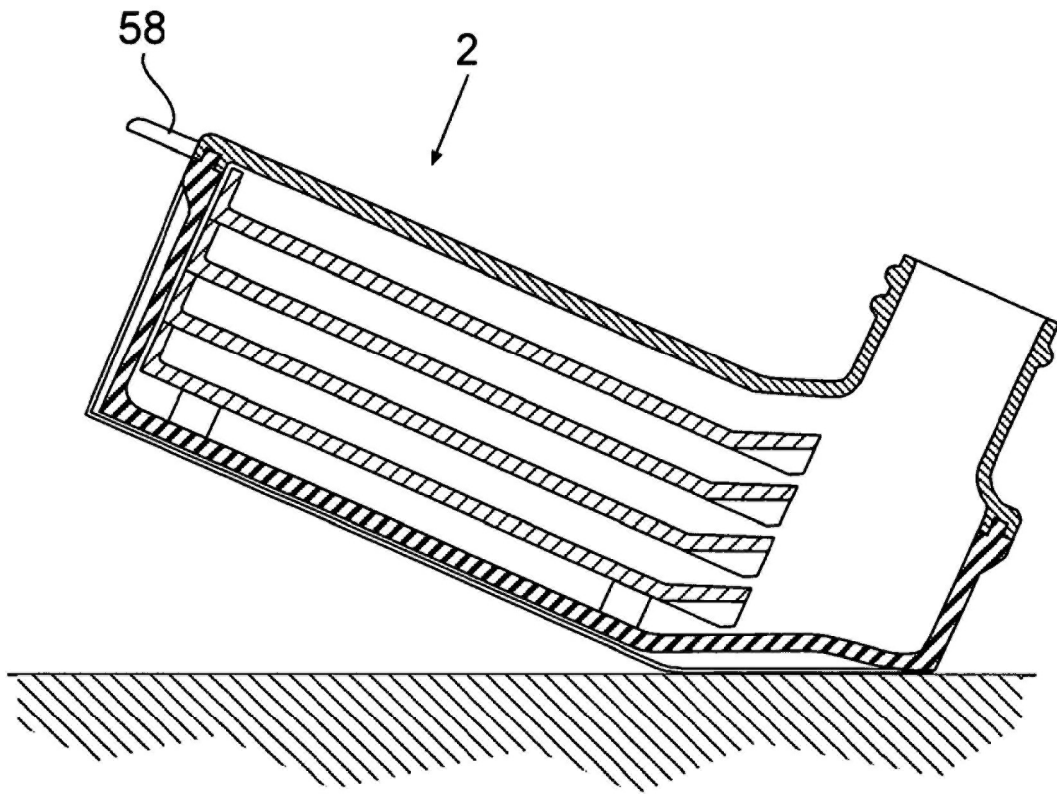


Figura 2b

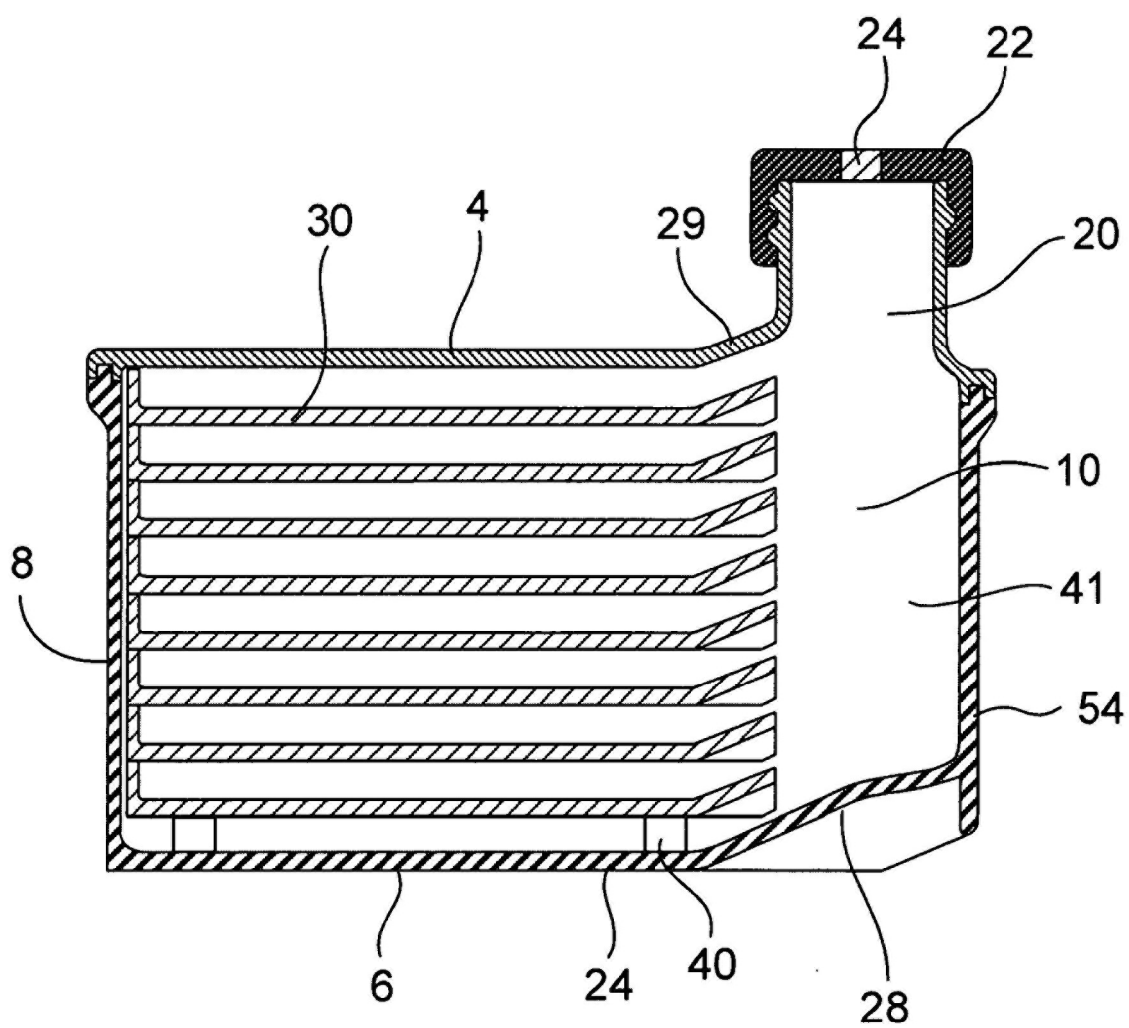


Figura 3

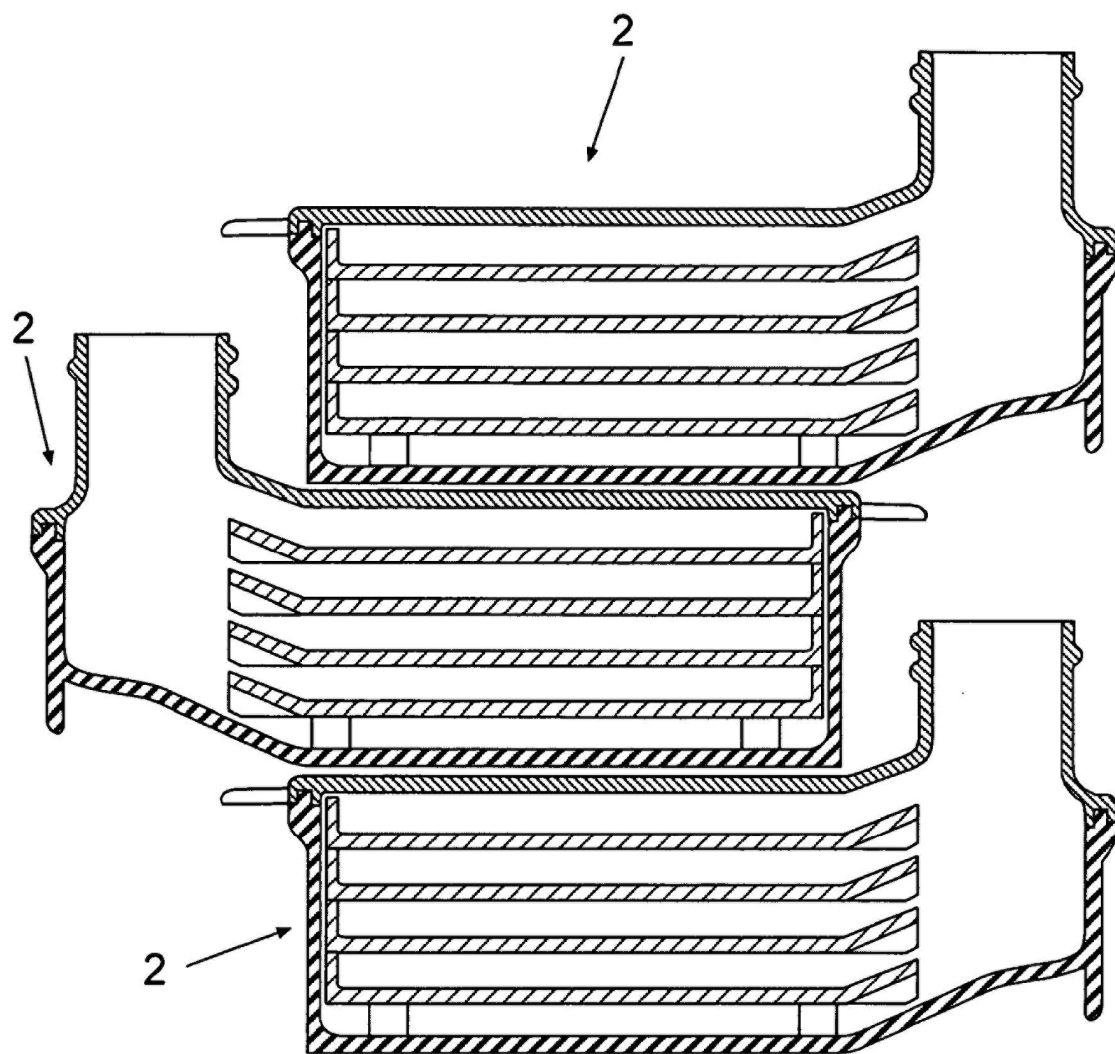


Figura 4

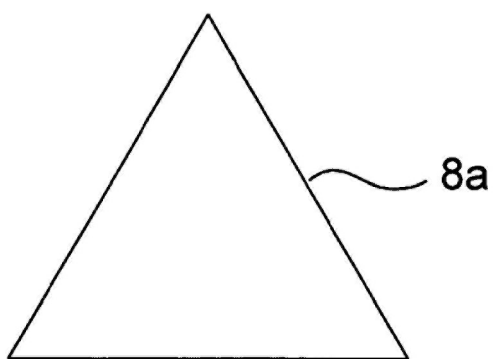


Figura 5a

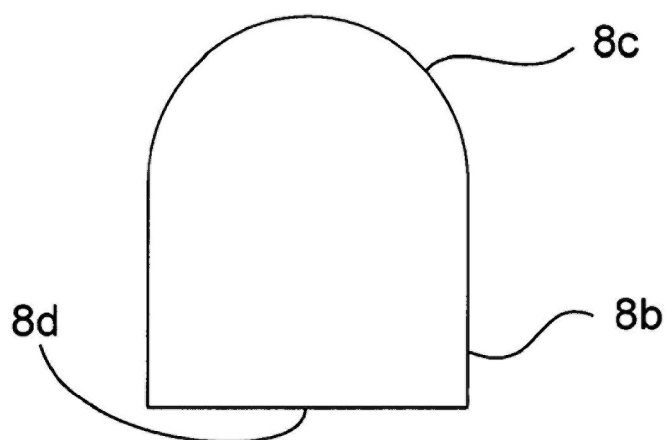


Figura 5b

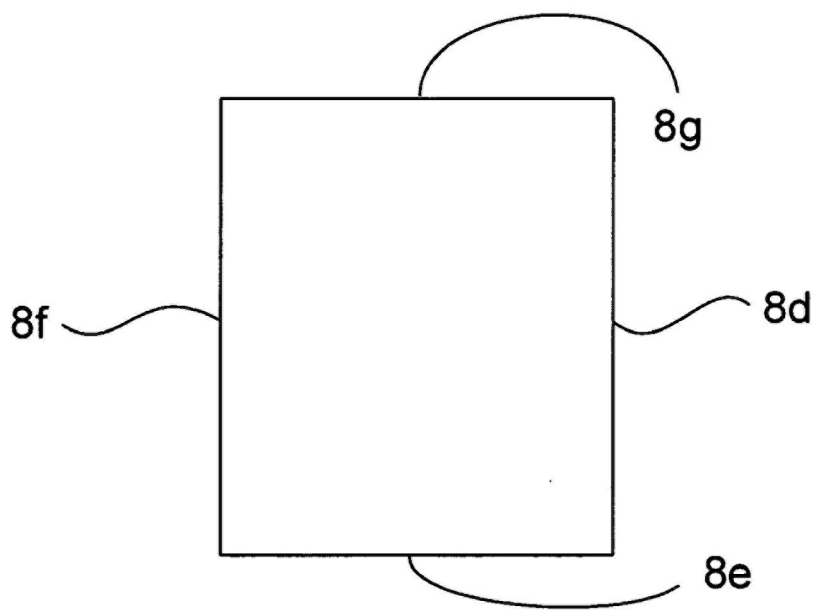


Figura 5c

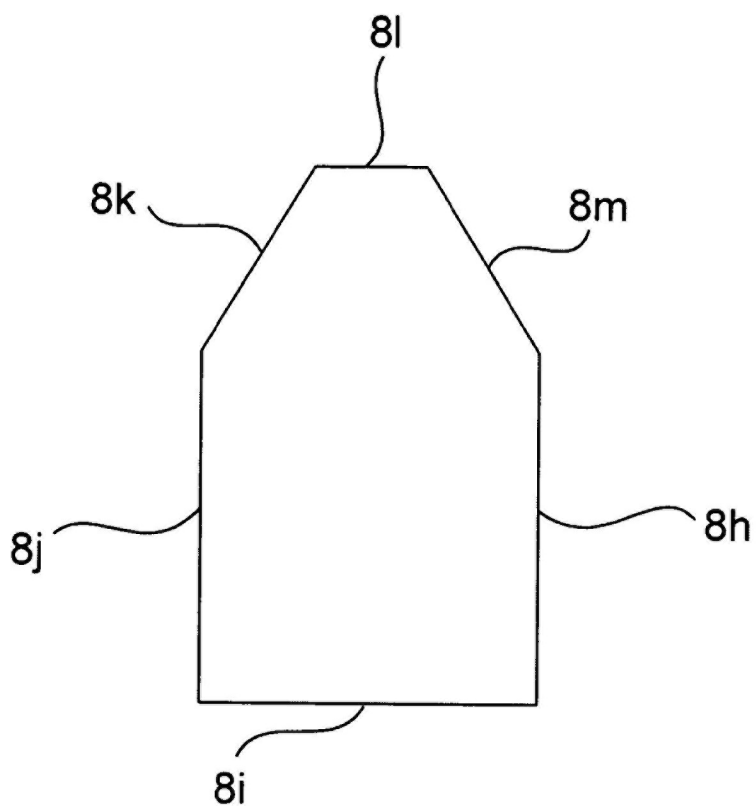


Figura 5d

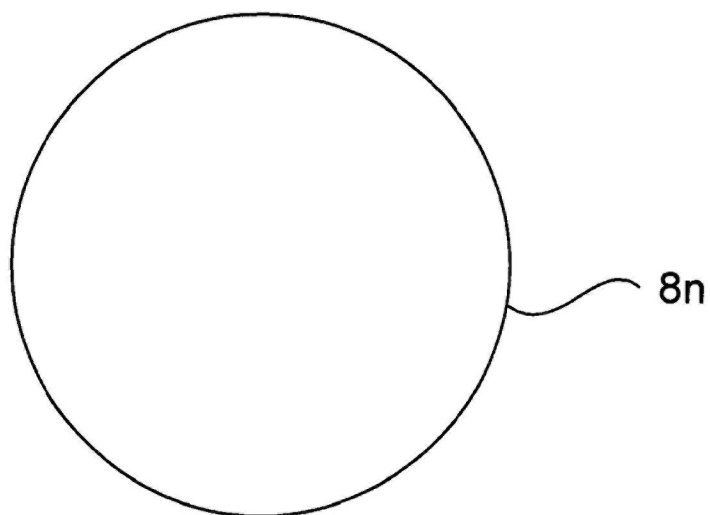


Figura 5e

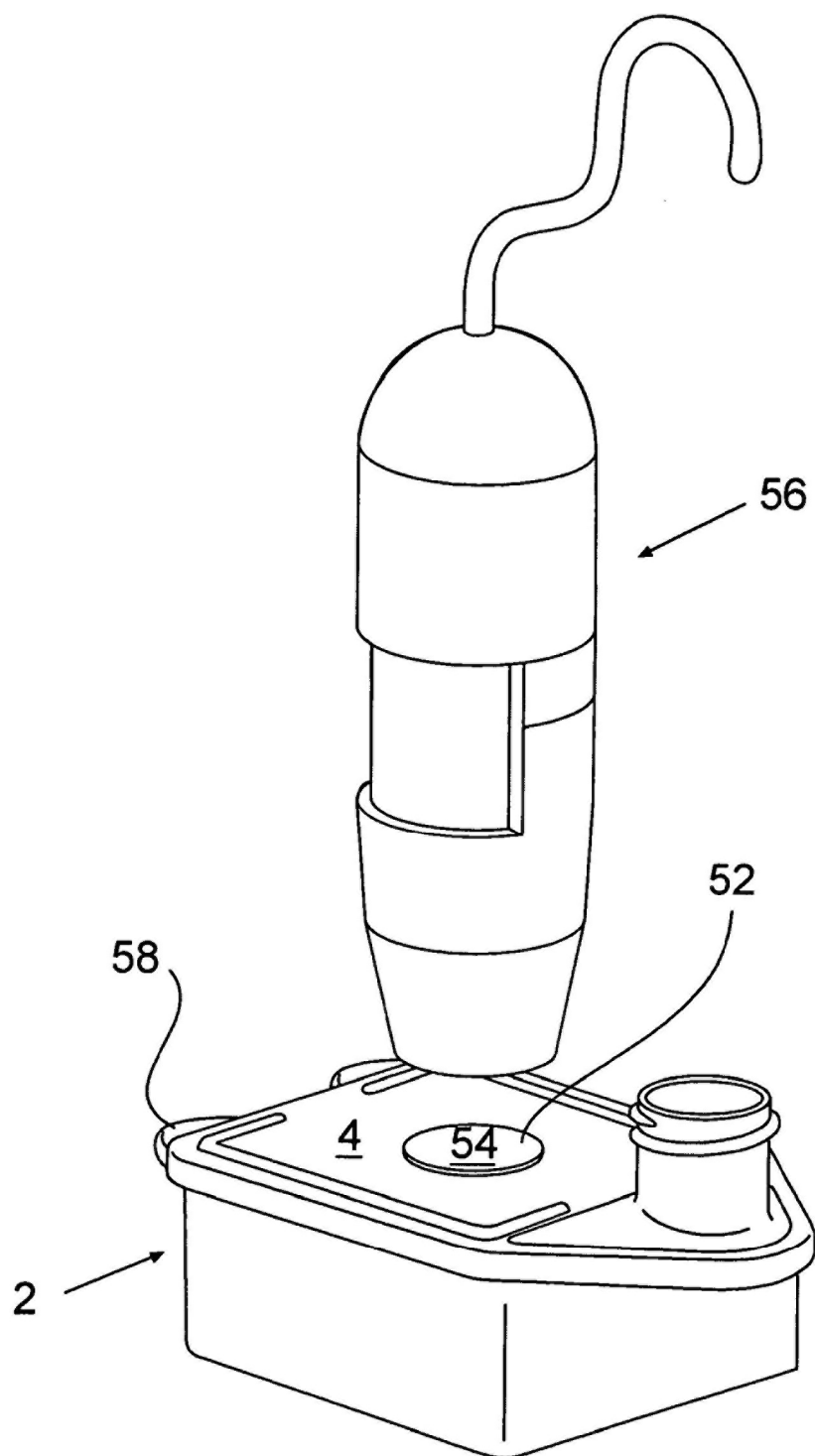


Figura 6a

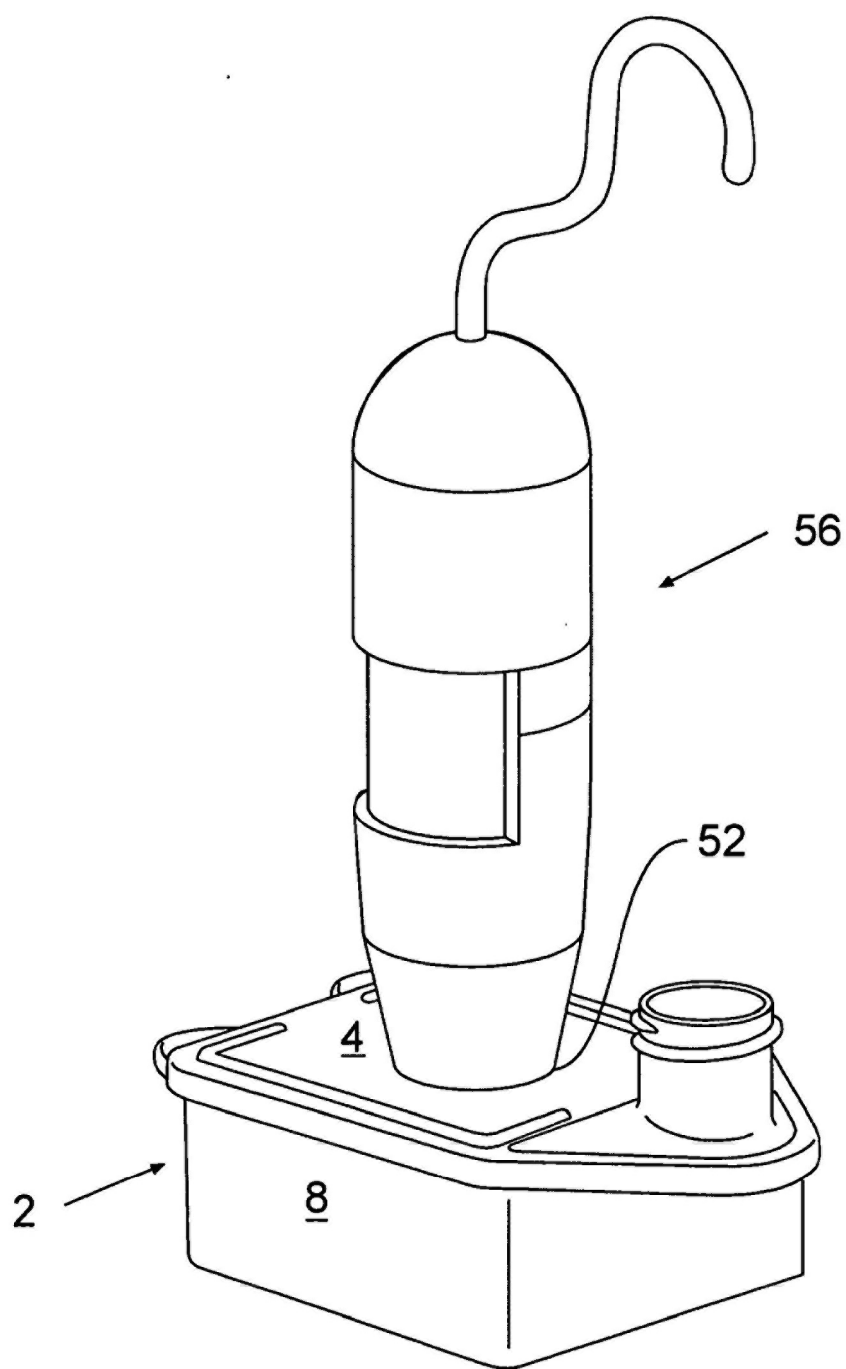


Figura 6b

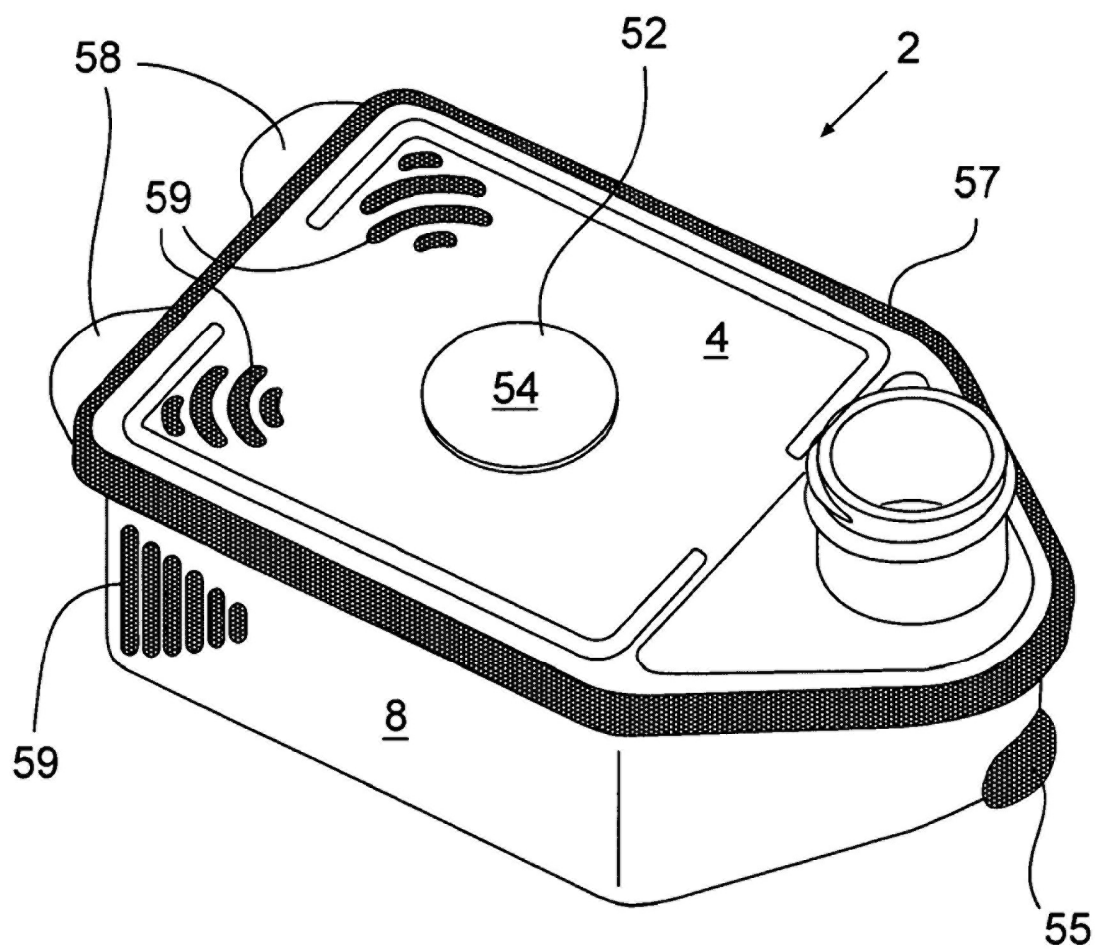


Figura 7

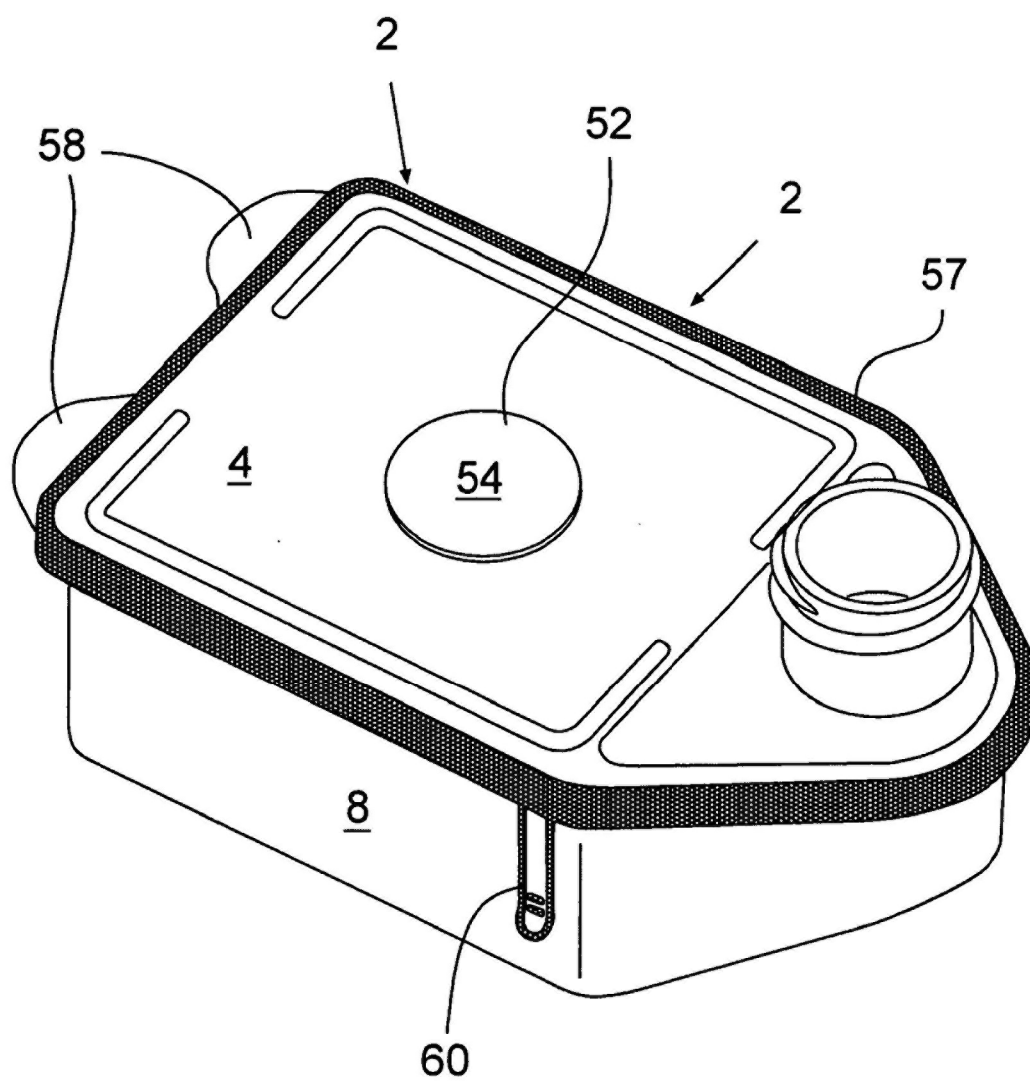


Figura 8

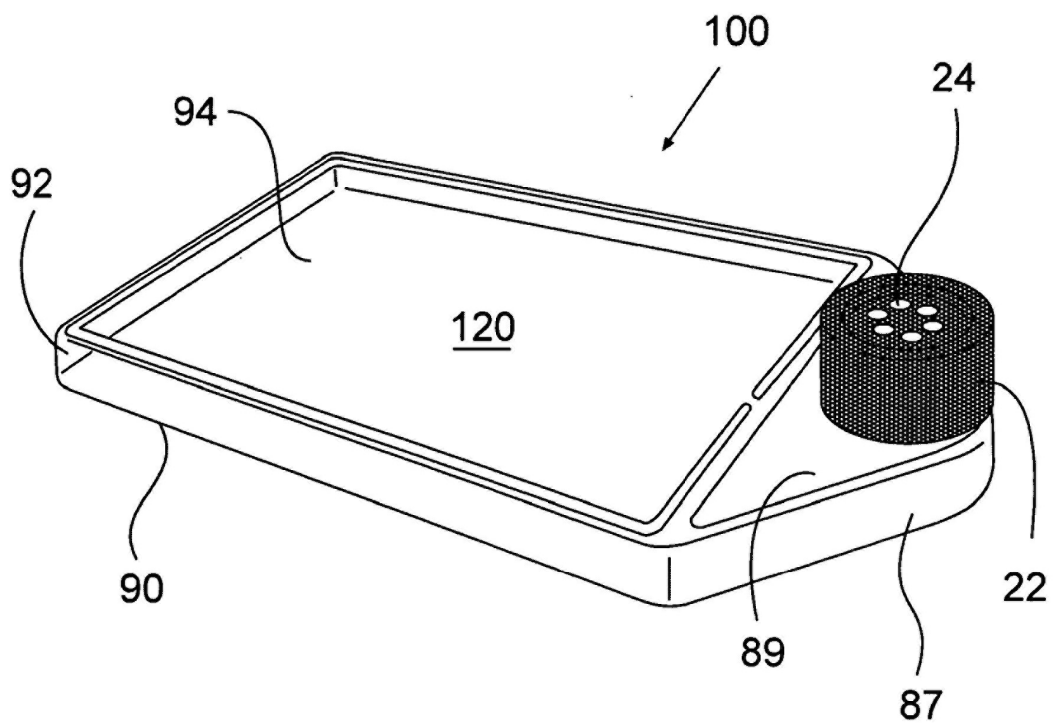


Figura 9

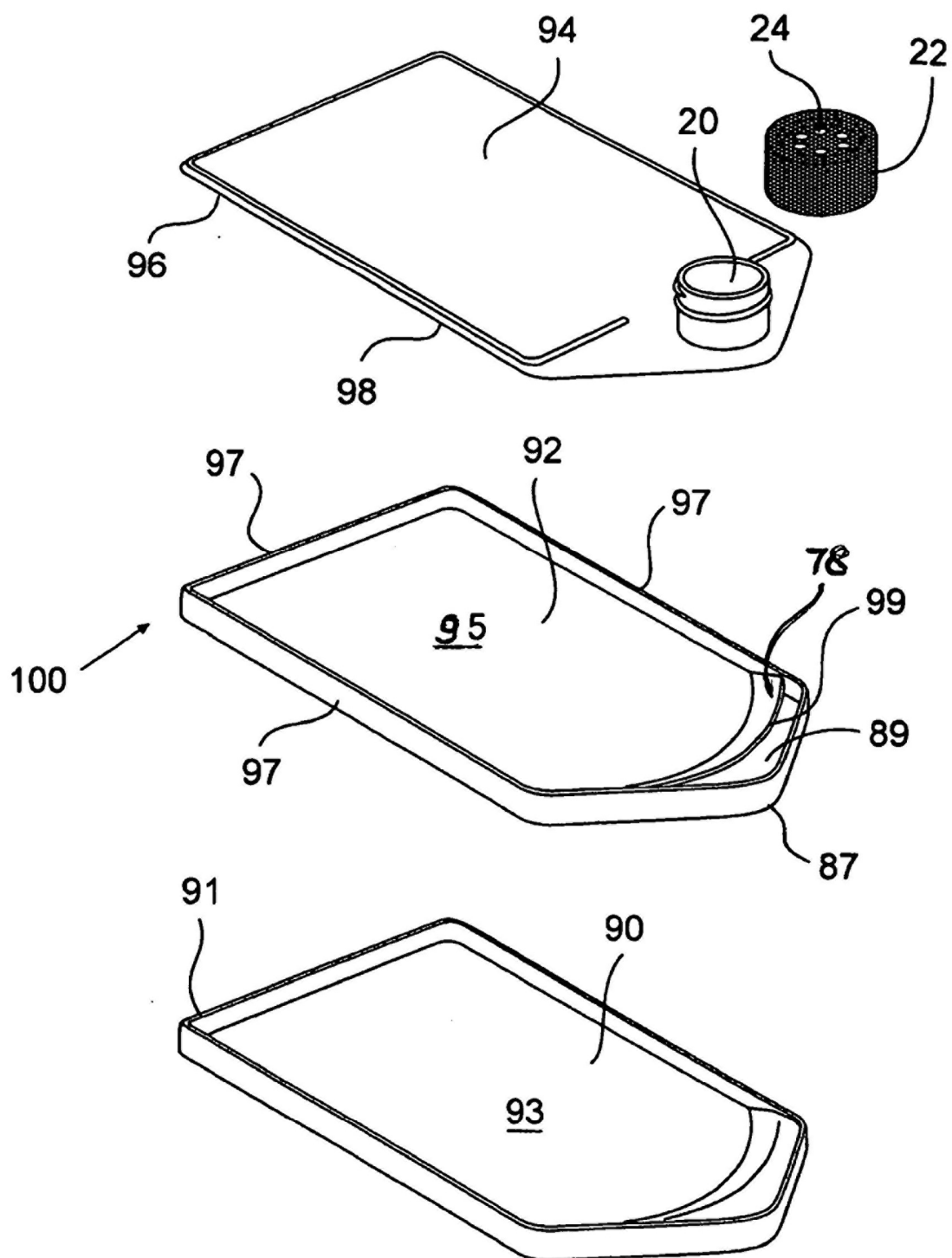


Figura 10

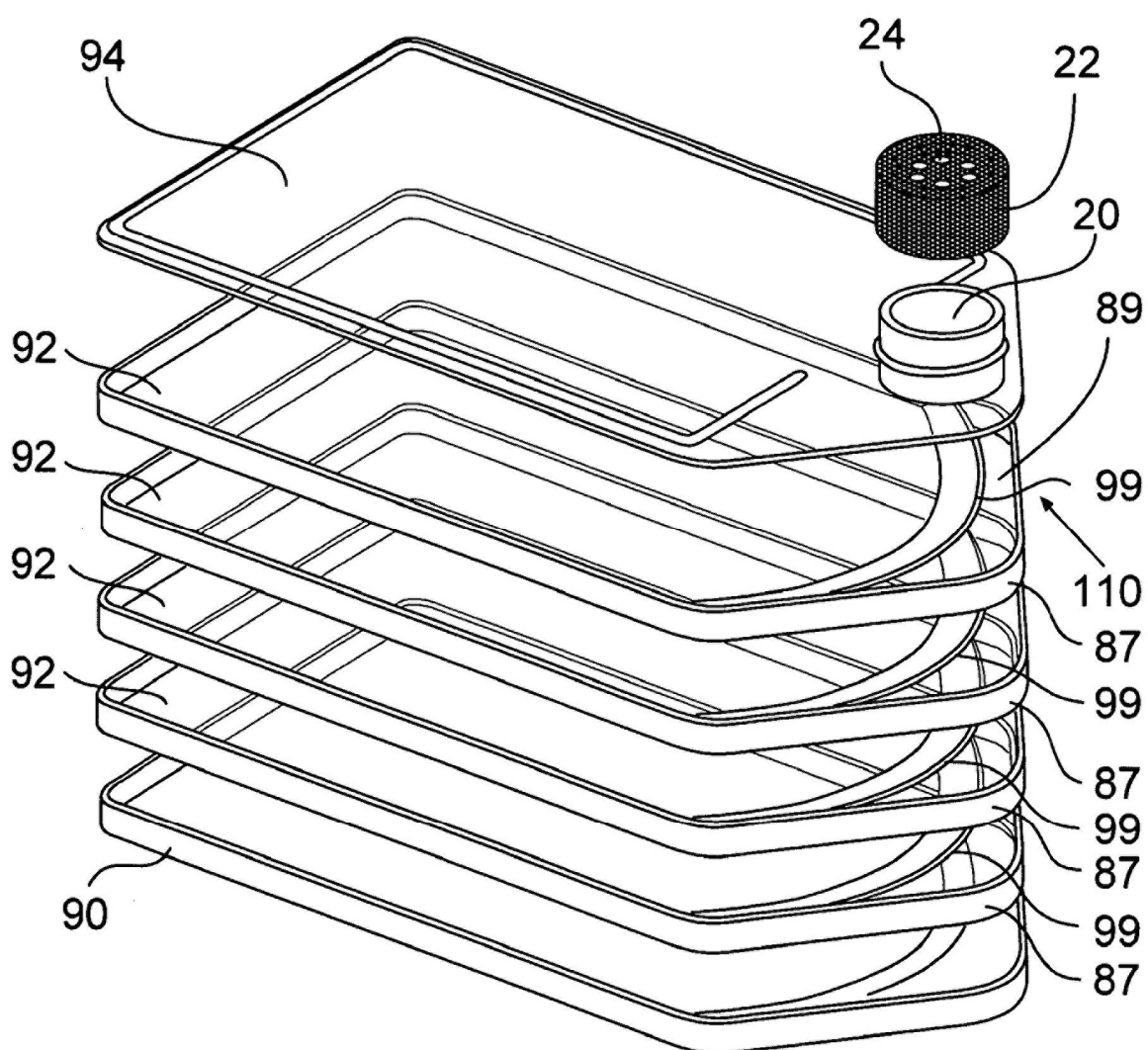


Figura 11

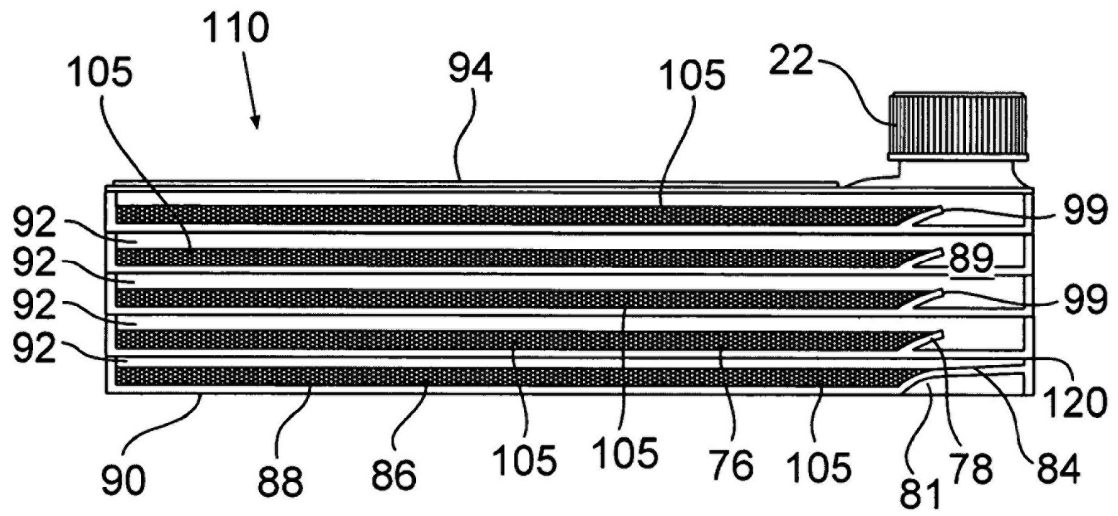


Figura 12a

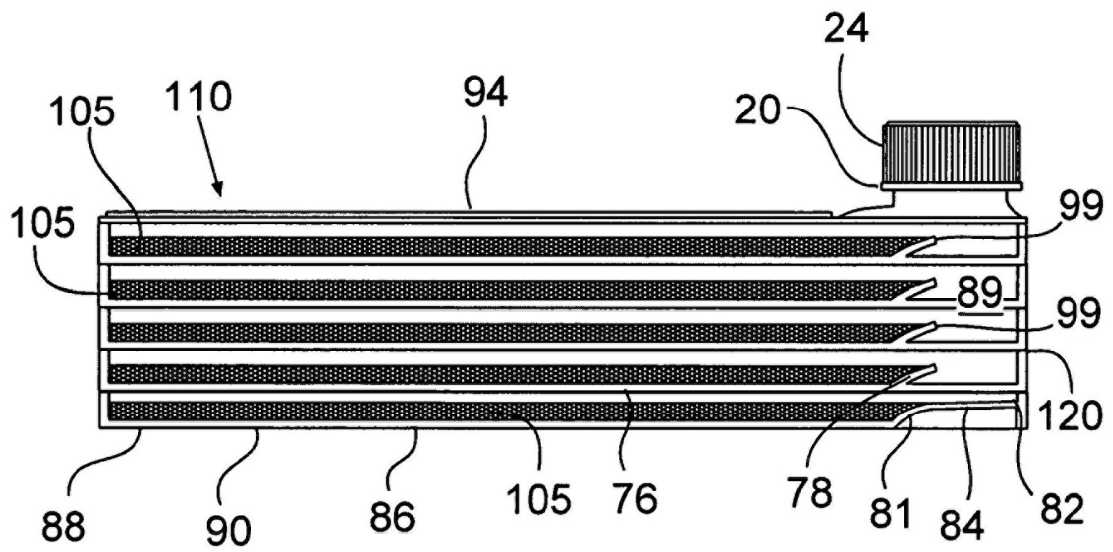


Figura 12b

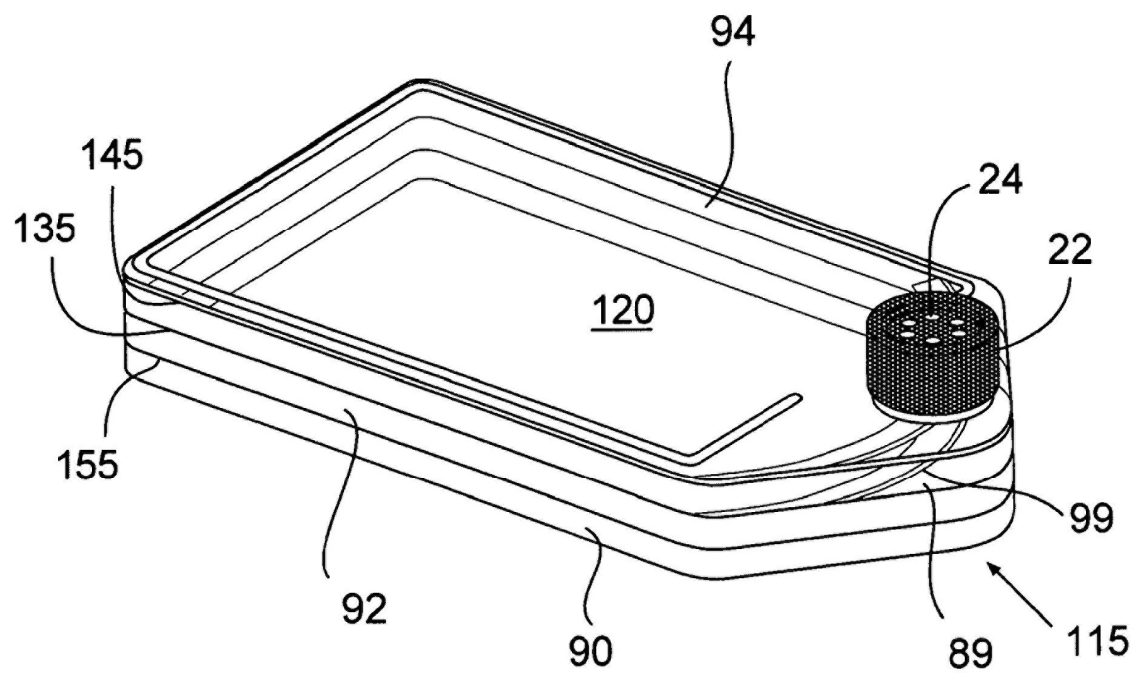


Figura 13

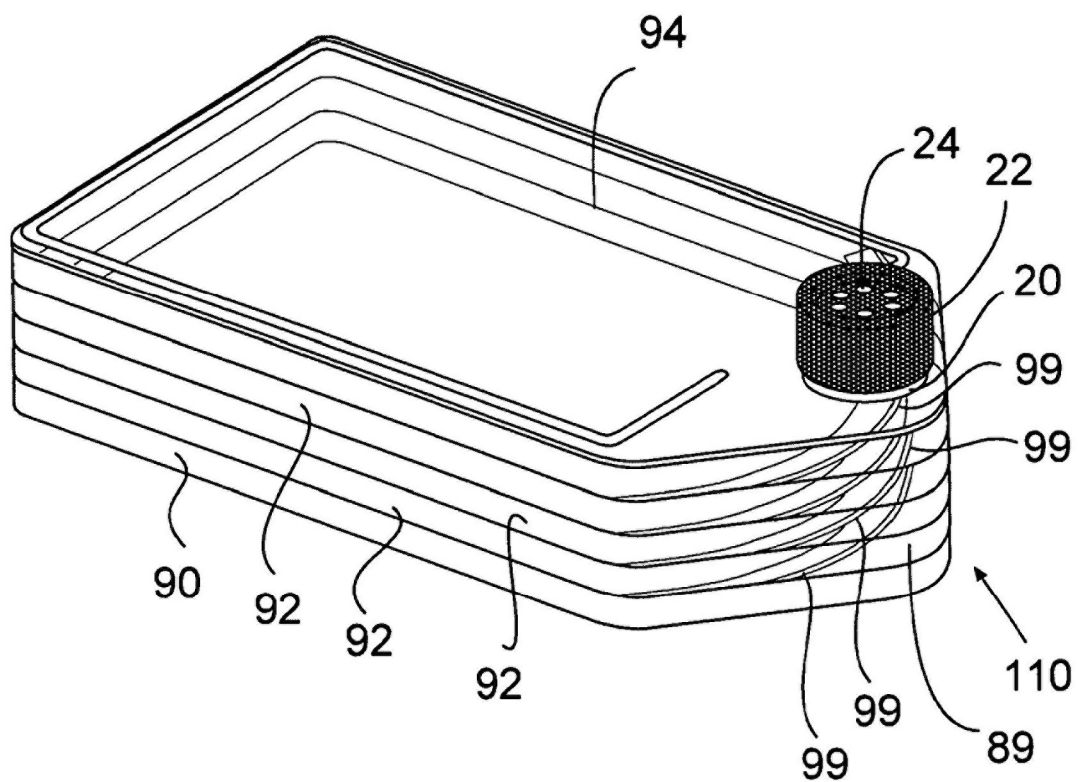


Figura 14

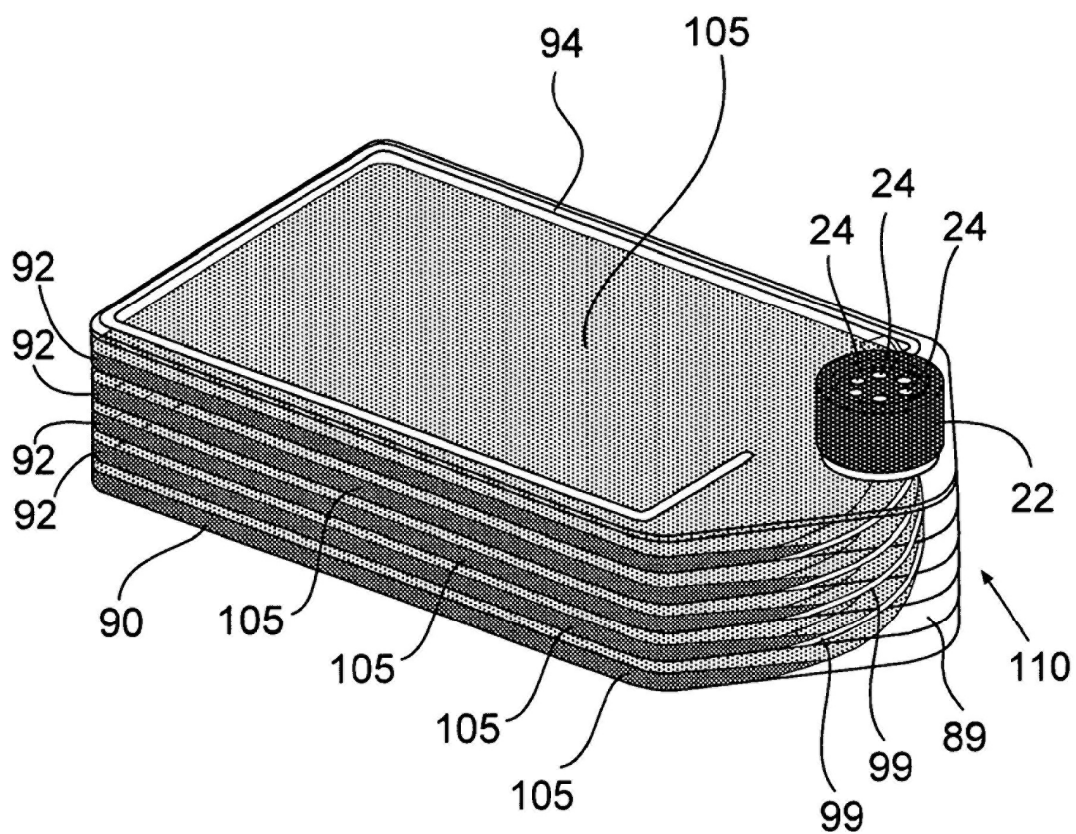


Figura 15

