

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 693**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2010** **PCT/US2010/033032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010** **WO10127158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010** **E 10770362 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 2424346**

54 Título: **Aparatos y composiciones para crioconservación de monocapas celulares**

30 Prioridad:

29.04.2009 US 173888 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

BIOLIFE SOLUTIONS, INC. (100.0%)
3303 Monte Villa Parkway, Suite 310
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

CLARKE, DOMINIC, M.;
NICOUD, IAN, B.;
MATHEW, ABY, J. y
RICE, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 743 693 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

Aparatos y composiciones para crioconservación de monocapas celulares

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La crioconservación es un procedimiento mediante el que las muestras, tales como materiales biológicos, se congelan en condiciones controladas y se almacenan a temperaturas bajas. La crioconservación se usa con frecuencia para almacenar cultivos celulares, por ejemplo, que se deben mantener a lo largo del tiempo para asegurar un suministro de células listo para nuevo crecimiento y experimentación. Las células para dichos propósitos se congelan de forma rutinaria en suspensión en crioviales industriales. Se han desarrollado procedimientos de congelación para minimizar el impacto del choque osmótico y la formación de cristales de hielo intracelulares, dos factores que contribuyen a la muerte celular durante el procedimiento de congelación y el almacenamiento congelado.

En los procedimientos actuales, sin embargo, un número significativo de células todavía se pierde por muerte celular durante el procedimiento de congelación y descongelación. La pérdida celular puede ser sustancial en suspensiones celulares homogéneas, y la pérdida celular aumenta a medida que el sistema que se somete a conservación se vuelve más complejo (por ejemplo, tejidos y órganos). Además, los procedimientos actuales son insuficientes para la crioconservación eficaz a gran escala de muestras celulares y tisulares en un formato de múltiples recipientes, por ejemplo, como células adherentes en un formato multipocillo. La variabilidad inaceptablemente alta entre pocillos, así como la viabilidad general insatisfactoria después del descongelamiento, actualmente hacen que los procedimientos a gran escala para la congelación masiva de células en placas multipocillo no sean comercialmente viables.

El documento US 2008/0247915 A1 divulga una placa de muestra para crioconservación, que contiene una serie de pocillos y una tapa de protección.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que recipientes especialmente configurados, cuando se combinan con un medio de conservación optimizado, pueden reducir significativamente la variabilidad entre pocillos, y mejorar la integridad, la viabilidad, la recuperación y la vida útil de las células crioconservadas, incluyendo monocapas celulares confluentes. Como se describe y se contempla en el presente documento, este descubrimiento permite, por primera vez, un suministro constantemente disponible de células crioconservadas fiables para una amplia variedad de aplicaciones relevantes, tales como, pero sin limitarse a, diagnóstico de enfermedades, detección de toxicidad y análisis de moléculas pequeñas/fármacos. En el presente documento se exponen modos de realización ejemplares que ilustran la manera de preparar, usar y someter a prueba la invención, o que son útiles para su comprensión.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a aparatos y composiciones para la congelación y la crioconservación de células y tejidos cultivados. En un aspecto, se proporcionan aparatos para la crioconservación a gran escala de cultivos celulares en recipientes biocompatibles, que son placas de cultivo tisular multipocillo, y un dispositivo de nucleación de hielo que facilita la nucleación de hielo constante pocillo a pocillo, una etapa necesaria para la supervivencia uniforme de las células durante el procedimiento de crioconservación.

El dispositivo de nucleación de hielo es un dispositivo mecánico (es decir, no químico), que proporciona un punto de iniciación para la nucleación de hielo. El dispositivo mecánico de nucleación de hielo puede estar ubicado, por ejemplo, en la cubierta del recipiente, en el propio recipiente o en una pieza del recipiente, de modo que el dispositivo mecánico de nucleación de hielo se sumerja en o entre en contacto con el medio de crioconservación que contiene la muestra biológica.

En algunos modos de realización, los aparatos de la invención pueden incluir un material aislante para facilitar el enfriamiento y el calentamiento eficaz. El material aislante es un componente mecánico, que proporciona un medio de aislamiento térmico al exterior (por ejemplo, periferia) o al interior del recipiente. El dispositivo aislante puede estar ubicado, por ejemplo, en el espacio exterior de un recipiente de manera que las tasas de enfriamiento y calentamiento de la parte aislada del recipiente sean similares a las otras secciones del recipiente. El material aislante se puede disponer sobre el recipiente, integrado con el recipiente o desmontable del recipiente. En algunos modos de realización, el material aislante se encuentra contiguo al recipiente, pero no en contacto con el mismo.

Los aparatos de la invención se pueden usar con un medio de bioconservación rico en nutrientes que está configurado para mantener de manera óptima el equilibrio osmótico e iónico celular, controlar la acumulación de radicales libres y reducir las respuestas de estrés en condiciones no normotérmicas. El medio de bioconservación preferente para el almacenamiento óptimo y la recuperación posterior al descongelamiento es CRYOSTOR™

(BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA), pero los aparatos se pueden usar con cualquier medio de bioconservación adecuado.

En algunos modos de realización, la combinación del material aislante, el dispositivo mecánico de nucleación de hielo y el medio de bioconservación (por ejemplo, una congelación) permite la nucleación uniforme de hielo y la descongelación, y una viabilidad mejorada después de la descongelación. Por tanto, la invención permite que las células y los tejidos se crioconserven en configuraciones listas para usar para análisis ultrarrápidos con propósitos de detección o diagnóstico. Además, la presente invención permite que los cultivos celulares se congelen y almacenen durante largos períodos de tiempo por medio de un procedimiento fácil de usar. La invención es particularmente útil para la crioconservación de monocapas celulares viables completamente intactas en formatos listos para usar para cribado ultrarrápido.

El recipiente comprende un sustrato biocompatible. El recipiente tiene un interior y un exterior. El aparato incluye el dispositivo mecánico de nucleación de hielo que está dispuesto en o sobre el interior del recipiente e inicia la formación de cristales de hielo. En un modo de realización preferente, el aparato es estéril. En algunos modos de realización, el exterior del recipiente incluye un material aislante que entra en contacto con al menos una parte del exterior del recipiente. En otros modos de realización, el material aislante se puede incluir sobre o dentro del recipiente.

De acuerdo con la invención, el recipiente es una placa de cultivo celular o tisular multipocillo (por ejemplo, 6 pocillos, 12 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos, 1536 pocillos). Se apreciará que se puede usar cualquier formato multipocillo con la presente invención.

El dispositivo mecánico de nucleación de hielo incluye una pluralidad de salientes tridimensionales que ocupan una parte del interior del vaso, y que sobresalen de una superficie de una tapa protectora, o de una superficie de una pieza de recipiente. En algunos modos de realización, el dispositivo mecánico de nucleación de hielo es un saliente de plástico u otro elemento tridimensional.

El saliente puede ser de cualquier forma (por ejemplo, como una espiga, acicular, esférica, piramidal o cónica) o construcción (por ejemplo, hueca, sólida, semipermeable) adecuada. En algunos modos de realización, el agente mecánico de nucleación de hielo es una malla extraíble o una pieza similar a una malla. En modos de realización que no forman parte de la presente invención, el dispositivo mecánico de nucleación de hielo también puede ser o incluir un recubrimiento que no es liso sobre una superficie del interior del recipiente. En modos de realización de acuerdo con la invención, el recipiente incluye una cubierta separable, y la cubierta puede incluir un dispositivo de nucleación de hielo que tiene un elemento estructural que sobresale de una superficie de la cubierta hacia el interior del recipiente. El dispositivo de nucleación de hielo se puede conectar de forma desmontable a la cubierta, o a una pieza de recipiente. De forma alternativa, el dispositivo de nucleación de hielo puede estar integrado con la cubierta o la pieza. En otros modos de realización de acuerdo con la invención, el dispositivo de nucleación de hielo puede estar presente en una pieza de recipiente (por ejemplo, un pocillo) cuya pieza de recipiente se puede separar del recipiente.

En un modo de realización, el aparato puede incluir un medio de crioconservación, CRYOSTOR™, o un equivalente funcional.

De acuerdo con la invención, el aparato comprende un recipiente, que es una placa multipocillo (por ejemplo, una placa de cultivo celular o cultivo tisular), y un dispositivo mecánico de nucleación de hielo asociado con al menos un pocillo de la placa de cultivo tisular multipocillo. El aparato puede incluir un material aislante que entra en contacto con al menos una parte del recipiente. En algunos modos de realización, el recipiente es estéril.

Se puede disponer un material aislante en todo el exterior del recipiente o una parte del mismo para ayudar a enfriar y calentar el recipiente. En algunos modos de realización, el material aislante se puede disponer en el exterior del recipiente, el interior del recipiente o tanto el exterior como el interior del recipiente. El material aislante puede ser cualquier tipo de material, pero en la forma preferente, el aislamiento sería el mismo material que el utilizado para fabricar el recipiente y ayudará a minimizar las variaciones en las tasas de enfriamiento y calentamiento entre pocillos en un recipiente multipocillo. Los tipos de aislamiento son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, masillas, espumas, aerosoles o tiras de materiales aislantes térmicamente. En el modo de realización preferente, siendo el recipiente una placa multipocillo, el material aislante se aplica en el espacio entre los pocillos exteriores (es decir, los pocillos en el perímetro de la placa) y el borde exterior de la placa. Se entiende que todos o alguno de los pocillos en una placa multipocillo se pueden aislar con un dispositivo de aislamiento como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el material aislante será parte del interior del recipiente, por ejemplo, ocupando una parte de un pocillo o pocillos. En algunos modos de realización, el dispositivo de aislamiento puede ser una parte integrada del recipiente o el dispositivo de aislamiento puede ser desmontable.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición como se define en la reivindicación 14. Un modo de realización preferente se define en la reivindicación 15. Este y otros aspectos y modos de realización son adecuados para la conservación de células, ya sean progenitoras, primarias, inmortalizadas u otras, así como tejidos.

En algunos modos de realización, el material aislante está compuesto del mismo material que el recipiente y, en algunos modos de realización, el material aislante está compuesto de un material diferente al del recipiente. El material aislante puede ser, por ejemplo, cualquier masilla, espuma, aerosol o lámina, que proporcionará un efecto aislante. En algunos modos de realización, el material aislante ocupa una parte del exterior del recipiente o cualquier espacio libre que rodee cualquier pocillo de una placa de cultivo tisular multipocillo. El material aislante puede ocupar opcionalmente todos o alguno de los recipientes, para llenar el espacio de aire por encima del nivel superior de las células y los medios crioprotectores y la superficie inferior o del fondo de la tapa o cubierta. En algunos modos de realización, el material aislante ocupa los espacios exterior e interior del recipiente. El material aislante se puede adherir al recipiente o a la tapa del recipiente directamente, y el material aislante puede ser desmontable del recipiente o la tapa del recipiente.

La placa de cultivo celular multipocillo que tiene una pluralidad de pocillos puede formar al menos un espacio libre que no está ocupado por un pocillo; un material aislante integrado con lo dispuesto en al menos una parte del al menos un espacio libre que rodea al menos un pocillo; y un dispositivo de nucleación de hielo integrado con al menos un pocillo de la placa de cultivo celular multipocillo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los aspectos, modos de realización y características de la invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos descritos a continuación. Los dibujos no están necesariamente a escala. Los dibujos se proporcionan para resaltar modos de realización específicos de la invención y no pretenden limitar la invención, cuyo alcance está limitado solo por las reivindicaciones. En los dibujos, se usan números similares para indicar partes similares en las diversas vistas.

Las figuras 1A-D muestran vistas en sección transversal de dispositivos de nucleación de hielo.

Las figuras 1E-G muestran una pieza de placa multipocillo que tiene una pluralidad de dispositivos de nucleación de hielo, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención.

Las figuras 1H y 1I muestran una pieza de placa multipocillo para recibir una pluralidad de dispositivos de nucleación de hielo, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención.

Las figuras 1J y 1K muestran un dispositivo de nucleación de hielo que tiene una única punta en forma de cono.

Las figuras 1L-1P muestran un dispositivo de nucleación de hielo que tiene una pluralidad de puntas en forma de cono.

Las figuras 1Q y 1R muestran un dispositivo de nucleación de hielo que tiene una pluralidad de puntas en forma de pirámide.

Las figuras 2A-B muestran vistas en sección transversal de un recipiente aislado, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención.

La figura 3 es un gráfico que muestra las diferencias en las tasas de enfriamiento de los pocillos interiores y exteriores de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con y sin la adición de un material aislante.

La figura 4 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células que son fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación en cualquiera de los medios con suero y DMSO al 5 %, medios con suero y DMSO al 10 %, CRYOSTOR™ CS5 (DMSO al 5 %) o CRYOSTOR™ CS10 (DMSO al 10 %). Se investigaron tres procedimientos diferentes de congelación; (1) placas sumergidas en un baño de alcohol en una nevera de Styrofoam en un congelador a -80 °C, (2) congelador a -20 °C y luego directamente en un congelador a -80 °C y (3) dispositivo automatizado de congelación de tasa controlada ajustado a -1 °C/minuto. No se usó ningún dispositivo de nucleación.

La figura 5 es un gráfico que muestra el porcentaje relativo de viabilidad de las células NHDF después de la congelación en cada una de las condiciones sometidas a prueba en la figura 4.

La figura 6 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación usando CRYOSTOR™ CS5 con y sin un dispositivo de nucleación.

La figura 7 es un gráfico que muestra la fluorescencia relativa de las células NHDF después de la congelación usando CRYOSTOR™ CS5 con y sin un dispositivo de nucleación.

La figura 8 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células de ovario de hámster chino (CHO) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación usando CRYOSTOR™ CS5 con y sin un dispositivo de nucleación.

- 5 La figura 9 es un gráfico que muestra la fluorescencia relativa de las células CHO después de la congelación usando CRYOSTOR™ CS5 con y sin un dispositivo de nucleación.

Las figuras 10A-C muestran vistas en perspectiva de dispositivos de nucleación de hielo.

- 10 La figura 11 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación usando el baño de alcohol en un procedimiento de congelación a -80 °C utilizando CRYOSTOR™ CS5 o medio de cultivo con suero y DMSO al 5 % con y sin un dispositivo de nucleación.

- 15 La figura 12 es un gráfico que muestra el porcentaje relativo de viabilidad de las células NHDF después de la congelación en cada una de las condiciones sometidas a prueba en la figura 11.

- 20 La figura 13 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación usando -20 °C directamente en un procedimiento de congelación a -80 °C usando CRYOSTOR™ CS5 o medios de cultivo con suero y DMSO al 5 % con y sin un dispositivo de nucleación.

- 25 La figura 14 es un gráfico que muestra el porcentaje relativo de viabilidad de las células NHDF después de la congelación en cada una de las condiciones sometidas a prueba en la figura 13.

- 30 La figura 15 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación utilizando el procedimiento de congelación de congelador de tasa controlada (-1 °C/minuto) utilizando CRYOSTOR™ CS5 o medios de cultivo con suero y DMSO al 5 % con y sin un dispositivo de nucleación.

- La figura 16 es un gráfico que muestra el porcentaje relativo de viabilidad de las células NHDF después de la congelación en cada una de las condiciones sometidas a prueba en la figura 15.

- 35 La figura 17 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación usando -20 °C directamente en un procedimiento de congelación a -80 °C usando CRYOSTOR™ CS5 con y sin un dispositivo de nucleación (se usaron dispositivos de un solo cono, matriz de baja densidad y espiga de matriz de alta densidad, figuras 10A-C), con y sin un dispositivo aislante.

- 40 La figura 18 es un diagrama que muestra la fluorescencia relativa de las células fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos después de la congelación utilizando el procedimiento de congelación de congelador de tasa controlada (-1 °C/minuto) utilizando CRYOSTOR™ CS5 o medios de cultivo con suero y DMSO al 5 % con y sin un dispositivo de nucleación (se usaron dispositivos de un solo cono, matriz de baja densidad y espiga de matriz de alta densidad, figuras 10A-C), y con y sin un dispositivo aislante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 50 Estos y otros aspectos, modos de realización y características de la invención están también descritos en las siguientes secciones de la solicitud, que se proporcionan para resaltar modos de realización específicos de la invención y no pretenden limitar la invención, cuyo alcance está limitado únicamente por las reivindicaciones.

- 55 La presente invención proporciona aparatos y composiciones para la congelación, descongelación y uso de células cultivadas (por ejemplo, monocapas celulares, células en suspensión) en formatos de recipiente multipocillo. En particular, la presente invención satisface las necesidades de proporcionar una composición y un aparato para producir monocapas de células adherentes congeladas uniformemente en placas de cultivo tisular multipocillo que, al descongelar, produzcan niveles de viabilidad celular y rendimiento funcional aceptablemente uniformes en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo tisular. Es importante destacar que estos criterios son uniformes para cada pocillo de una placa multipocillo después de la conservación, lo que permite realizar pruebas precisas e inmediatas de toda la placa. La uniformidad entre pocillos y la viabilidad y función mejoradas de las monocapas de cultivo celular permiten, por ejemplo, que las empresas farmacéuticas y los laboratorios de pruebas de toxicología utilicen las células en placa para cribado ultrarrápido de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicología (ADME/T) de compuestos farmacológicos en un modelo *in vitro*. Sin la presente invención, no se podía conseguir la densidad celular, viabilidad y rendimiento funcional uniformes entre cada uno de los pocillos después de la crioconservación y, por lo tanto, este concepto no se podría poner en práctica. La presente invención reducirá significativamente el tiempo y los costes laborales asociados con el cribado ultrarrápido de células en placa.

Para la presente invención, se siembran cultivos celulares, por ejemplo, en placas de cultivo tisular multipocillo en condiciones de cultivo estándar para obtener una monocapa de células adherentes. Una vez que se alcanza el nivel de densidad celular deseado, el medio de cultivo celular se retira y se reemplaza con medio de criopreservación CRYOSTOR™ frío (preferentemente entre 2 y 8 °C) que contiene DMSO al 5 o 10 % (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA). Si bien CRYOSTOR™ es el medio de criopreservación más óptimo y preferente, se podrían usar formulaciones alternativas. Además, la presente invención no se limita a CRYOSTOR™ con DMSO al 5 o 10 %, ya que se pueden aplicar otras formulaciones de CRYOSTOR™ con niveles variables de DMSO. La presente invención tampoco se limita al uso de DMSO como crioprotector. El volumen del medio de criopreservación añadido debe ser al menos suficiente para cubrir completamente el fondo del pocillo deseado.

Diseñado para preparar y conservar células en entornos de temperatura ultrabaja (por ejemplo, de aproximadamente -80 °C a -196 °C), CRYOSTOR™ proporciona un entorno protector atóxico para células y tejidos durante el procedimiento de congelación, almacenamiento y descongelación. CRYOSTOR™, un miembro de la plataforma HYPOTHERMOSOL® de BioLife, está formulado de manera única para abordar los aspectos biológicos moleculares de las células durante el procedimiento de criopreservación, reduciendo de este modo directamente el nivel de muerte celular inducida por la criopreservación y mejorando la viabilidad y función de las células después de la descongelación. Mediante la modulación de la respuesta bioquímica celular al procedimiento de criopreservación, CRYOSTOR™ proporciona una viabilidad celular y funcionalidad potenciadas al tiempo que elimina la necesidad de incluir suero, proteínas o niveles altos de agentes citotóxicos. Se ha demostrado que CRYOSTOR™ mejora significativamente la viabilidad celular y la función después de la criopreservación en comparación con los enfoques tradicionales de medio de cultivo + suero + DMSO. Además de mejorar la supervivencia celular y la función en general, CRYOSTOR™ también proporciona la ventaja de ser un medio de criopreservación completamente definido sin proteínas y sin suero.

En un modo de realización, el medio de criopreservación comprende un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en: una solución acuosa de electrolitos que contienen iones de potasio en un intervalo de concentración de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mM, iones de sodio en un intervalo de concentración de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 mM, iones de magnesio en un intervalo de concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, iones de cloruro en un intervalo de concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mM, e iones de calcio en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mM; un anión impermeante; manitol; un agente oncótico macromolecular; al menos un azúcar simple; un sustrato para la regeneración de ATP; un tampón de pH biológico eficaz en condiciones fisiológicas hipotérmicas, y combinaciones de los mismos. El medio de criopreservación comprende adicionalmente un crioprotector. En algunos modos de realización, el crioprotector es DMSO, y el DMSO está presente entre aproximadamente un 0 % y aproximadamente un 20 %, tal como, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 10 %, 15 % o 20 %. El medio de criopreservación puede comprender opcionalmente glutatión, un derivado de vitamina E, un antioxidante, un inhibidor de caspasa o combinaciones de los mismos.

Se entiende que, cuando se hace referencia completamente, CRYOSTOR™ se identifica y se hace referencia al mismo como una solución de criopreservación ejemplar, respectivamente, y que la presente invención contempla CRYOSTOR™ como modos de realización preferentes de soluciones de criopreservación, respectivamente, adecuadas para su uso con los tejidos, células, materiales y procedimientos expuestos en el presente documento. Se entiende además que la presente invención también contempla equivalentes funcionales de CRYOSTOR™; todo lo que se requiere es que una solución de criopreservación cumpla los requisitos funcionales expuestos en el presente documento y funcione de manera comparable cuando se use de acuerdo con las presentes enseñanzas.

En un modo de realización útil para la comprensión de la invención, el dispositivo mecánico de nucleación de hielo es un saliente acicular que se extiende en el medio líquido de cada pocillo que se va a nuclear. El dispositivo de nucleación de hielo se puede adherir o integrar con una tapa del recipiente como se muestra en las figuras 1A y 1B o una pieza de recipiente extraíble como se muestra en las figuras 1C-G y la figura 10A-C. En otro modo de realización, el dispositivo de nucleación de hielo puede ser una parte de la pared interna del recipiente. Aun en otro modo de realización, el dispositivo de nucleación de hielo se puede colocar directamente en el fluido o en el pocillo. Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar múltiples dispositivos de nucleación de hielo y alternativos en un solo recipiente.

El aparato puede ser estéril y, en modos de realización preferentes, se esteriliza el aparato. El recipiente (por ejemplo, un pocillo) puede estar hecho de plástico, tal como el plástico que comprende una placa de cultivo tisular multipocillo. El recipiente puede proporcionar un sustrato para la adhesión y el crecimiento de cultivos celulares. En modos de realización preferentes, el crecimiento y la adhesión de los cultivos celulares está en forma de una monocapa celular. El fluido añadido al recipiente puede ser cualquier fluido con el propósito de propagar, mantener o conservar el cultivo celular o la monocapa celular. En diversos modos de realización, el fluido es CRYOSTOR™, una solución de matriz de nutrientes, sin suero, sin proteínas y de compatibilidad criogénica.

En algunos modos de realización útiles para comprender la invención, el dispositivo de nucleación de hielo es una proyección físicamente en punta que tiene una aspereza (es decir, superficie que no es lisa). El dispositivo de

nucleación de hielo puede estar compuesto de cualquier material adecuado que promueva la nucleación de hielo. En modos de realización preferentes, el dispositivo de nucleación de hielo está hecho del mismo material del que está hecho el recipiente (por ejemplo, placa multipocillo).

5 Con referencia a las figuras 1A-D, se muestran vistas esquemáticas en sección transversal de un aparato 10, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo útil para comprender la invención. El aparato 10 incluye un recipiente 12 que tiene una pared interior 14 y una pared exterior 16. El recipiente 12 puede ser, por ejemplo, una placa de cultivo tisular multipocillo que tiene una pluralidad de pocillos. El aparato 10 puede incluir una tapa extraíble 18 que cubre el recipiente 12. El recipiente 12 está destinado a contener una capa de fluido 20, tal como medios de crioconservación o medios de crecimiento, que cubre una monocapa celular 22. El aparato 10 incluye además un dispositivo de nucleación de hielo 26 que se puede adherir o integrar con la tapa 18 del recipiente, como se muestra en las figuras 1A y 1B. El dispositivo de nucleación de hielo 26 o la tapa 18 están configurados de modo que todo o una parte del dispositivo de nucleación de hielo 26 entre en contacto con la capa de fluido 20 en el recipiente 12 cuando la tapa 18 se coloca en el recipiente 12.

15 Con referencia a las figuras 1C y 1D, en algunos modos de realización, el dispositivo de nucleación de hielo 26 se adhiere o está integrado con una pieza extraíble 28 que se puede separar del recipiente 12 y la tapa 18. La pieza 28 se puede configurar para que se acople de manera liberable a la parte superior 30 del recipiente 12 y/o se puede configurar para que se acople a la pared interna 14 o la pared externa 16 del recipiente 12. Las piezas de recipiente son bien conocidas y un experto en la técnica apreciará que se pueden usar muchas configuraciones de pieza diferentes de acuerdo con la invención. El dispositivo de nucleación de hielo 26 o la pieza 28 están configurados de modo que todo o una parte del dispositivo de nucleación de hielo 26 entra en contacto con la capa de fluido 20 en el recipiente 12 cuando la pieza se coloca dentro o sobre el recipiente.

25 Con referencia a la figura 1A, el dispositivo de nucleación de hielo 26 puede comprender un saliente principal en forma acicular o de espiga 32. Con referencia a las figuras 1B y 1C, el dispositivo de nucleación de hielo 26 puede incluir uno o más salientes secundarios 34 que se proyectan desde el saliente principal 32. Los salientes secundarios 34 proporcionan sitios de nucleación adicionales para la formación de cristales de hielo.

30 Con referencia a la figura 1D, el dispositivo de nucleación de hielo 26 puede comprender un vástago 36 que sostiene una superficie 38 que tiene uno o más salientes secundarios 34. En algunos modos de realización, únicamente los salientes secundarios 34 entran en contacto con la capa de fluido 20 en el recipiente 12. La superficie 38 puede tener cualquier forma adecuada y puede ser, por ejemplo, sustancialmente en forma de disco y de tamaño más pequeño que la abertura del recipiente para proporcionar muchos puntos de nucleación de hielo en todo el recipiente (por ejemplo, un pocillo).

En algunos modos de realización útiles para comprender la invención, el dispositivo de nucleación del hielo descrito en el presente documento se adhiere o integra con una superficie interior del recipiente, tal como una pared interior o el fondo.

40 En diversos modos de realización, más de un dispositivo de nucleación de hielo está dispuesto en o sobre el recipiente.

45 Independientemente de si el dispositivo de nucleación de hielo está situado en la tapa, en una pieza extraíble o en una superficie interior de la pared lateral del recipiente, el aparato está configurado de modo que uno o más salientes principales o secundarios entran en contacto con la capa de fluido que cubre la monocapa celular. En modos de realización preferentes, los salientes del dispositivo de nucleación de hielo no entran en contacto con la monocapa celular.

50 La invención es particularmente útil para el cribado ultrarrápido de placas multipocillo. Por tanto, de acuerdo con la invención, el aparato incluye una placa de cultivo tisular que comprende más de un recipiente (es decir, pocillo), tal como placas de 4 pocillos, 6 pocillos, 8 pocillos, 12 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos o 1536 pocillos. Un experto en la técnica apreciará que la invención se puede usar en relación con una placa multipocillo que tenga cualquier número de pocillos.

55 Las figuras 1E-G muestran un dispositivo de nucleación de hielo configurado como una pieza extraíble para una placa multipocillo, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención. Con referencia a la figura 1E, se muestra una vista superior de una pieza de dispositivo de nucleación de hielo 100. La pieza de dispositivo de nucleación de hielo 100 incluye una base 102 que sostiene una pluralidad de salientes 106. Los salientes 106 pueden estar integrados con la base 102 o los salientes 106 se pueden separar de la base 102 y estar configurados para su inserción en la base 102. En algunos modos de realización, los salientes 106 se pueden dividir en dos o más zonas 104, 104', 104''. Por ejemplo, cuando una pieza incluye dos o más tipos diferentes de salientes, los diferentes tipos de salientes se pueden segregar en diferentes zonas. En algunos modos de realización, cuando se usan múltiples tipos de salientes, se pueden organizar aleatoriamente o en patrones repetitivos. Además, se puede omitir uno o más salientes, de modo que cuando la pieza se coloca en la placa multipocillo, los pocillos correspondientes no tienen saliente.

La figura 1F muestra una vista lateral de una pieza de dispositivo de nucleación de hielo 100, y la figura G muestra una vista en perspectiva de una pieza de dispositivo de nucleación de hielo 100, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención.

Las figuras 1H y 1I muestran una base del dispositivo de nucleación de hielo 108 configurada como una pieza extraíble para una placa multipocillo, de acuerdo con un modo de realización ilustrativo de la invención. Con referencia a la figura 1H, la base 108 contiene una pluralidad de agujeros pasantes 110 para recibir salientes. La base de pieza 108 que se muestra en las figuras 1H y 1I está dimensionada de modo que se puede insertar de manera desmontable en una placa de 96 pocillos. Como se apreciará, el modo de realización mostrado es únicamente con propósitos ilustrativos, y las dimensiones de la pieza se pueden configurar fácilmente para su uso con placas multipocillo de cualquier tamaño. Con referencia a la figura 1I, se muestra una sección transversal a través del plano A-A de la figura 1H. En este modo de realización, la base de pieza 108 incluye agujeros pasantes 110 para recibir salientes. Los agujeros pasantes 110 tienen un primer diámetro más estrecho a través del que se ajusta el saliente, y un segundo diámetro más ancho para acoplar una base en cada saliente. Por tanto, en este modo de realización, los salientes se insertan desde el lado opuesto de la pieza desde el que se proyectan. En algunos modos de realización, se utilizan rebajes en lugar de agujeros pasantes para recibir bases de saliente.

En algunos modos de realización, la pieza está hecha del mismo material que la placa multipocillo, por ejemplo, un plástico tal como poliestireno, policarbonato o acrílico. El grosor de la base de pieza variará dependiendo del material de construcción. En algunos modos de realización, el grosor de la pieza es, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, más preferentemente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 3 mm y más preferentemente aún de aproximadamente 2 mm. Se apreciará fácilmente que las dimensiones anteriores son solo ilustrativas y que se puede usar cualquier dimensión y configuración adecuadas sin apartarse del alcance de la invención.

Además, los salientes pueden estar hechos de cualquier material adecuado, y se pueden hacer del mismo material que la base para facilitar la fabricación. En un modo de realización preferente, los salientes están hechos de un plástico tal como poliestireno.

La figura 1J muestra una vista lateral de un saliente de nucleación de hielo 120 que tiene una única punta en forma de cono 122. El saliente 120 tiene un primer extremo que forma una punta en forma de cono 122, un segundo extremo que forma una base 126 y un vástago 124 que conecta el primer extremo y el segundo extremo. El vástago 124 es lo suficientemente largo para entra en contacto con fluido en el pocillos del recipiente (por ejemplo, un pocillo de una placa multipocillo). Como se apreciará, la longitud y la anchura del vástago 124 pueden variar. En un modo de realización preferente para su uso con placas de 96 pocillos, el vástago 124 tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mm, y más preferentemente de aproximadamente 10 mm. En algunos modos de realización, el vástago 124 tiene una forma sustancialmente columnar y tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 2 mm, y más preferentemente de aproximadamente 1,5 mm, sin embargo, se puede usar cualquier forma adecuada. En algunos modos de realización, el punto 122 en forma de cono puede tener una altura de aproximadamente 0,25 mm a aproximadamente 1 mm, y más preferentemente de aproximadamente 0,67 mm, y el cono puede tener una punta afilada. La figura 1K muestra una vista superior del saliente 120. Se apreciará fácilmente que las dimensiones anteriores son únicamente ilustrativas y que se puede usar cualquier dimensión y configuración adecuadas.

Los salientes de nucleación de hielo pueden tener una base para acoplar o fijar el saliente en una pieza de base. Con referencia de nuevo a la figura 1J, el saliente 120 tiene una base 126 que es más ancha que el vástago 124. En un modo de realización preferente, la base 126 tiene un diámetro de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 7 mm, y más preferentemente de aproximadamente 4,5 mm. Por tanto, el vástago 124 pasa a través del primer diámetro más pequeño del agujero pasante 110 en la base de pieza 108 (figura 1I) y la base 126 se recibe por el segundo diámetro grande del agujero pasante 110. La base de saliente 126 se puede fijar en los agujeros pasantes 110 o rebajes mediante ajuste por presión, ajuste instantáneo, adhesivo, soldadura (por ejemplo, soldadura sónica) o cualquier otro mecanismo de fijación adecuado. En algunos modos de realización, no hay una base ensanchada 126 y el segundo extremo del saliente es sustancialmente del mismo diámetro que el vástago 124. Se apreciará fácilmente que las dimensiones anteriores son únicamente ilustrativas y que se puede usar cualquier dimensión y configuración adecuadas.

Las figuras 1L a 1P muestran un saliente de nucleación de hielo 128 que tiene una pluralidad de puntas en forma de cono 130. Con referencia a la figura 1, que muestra una vista lateral del saliente 128, la pluralidad de puntas en forma de cono 130 puede tener una altura de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, y más preferentemente de aproximadamente 0,25 mm. Se puede incluir cualquier número de puntas en forma de cono, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 2 puntas y aproximadamente 50 puntas, y más preferentemente entre aproximadamente 5 puntas y aproximadamente 15 puntas, y más preferentemente todavía de aproximadamente 7 puntas a 9 puntas. En algunos modos de realización, uno o más conos tienen puntas afiladas. En las figuras 1M-P, se muestra un modo de realización de 8 puntas con una punta en forma de cono en el centro rodeado por 7 puntas en forma de cono. Como se muestra en la figura 1O, las puntas en forma de cono 130 están espaciadas

aproximadamente 0,48 mm entre los picos y en un arco de aproximadamente 51,43 grados entre los picos con respecto a punta central en forma de cono. Se apreciará fácilmente que las dimensiones anteriores son únicamente ilustrativas y que se puede usar cualquier dimensión y configuración adecuadas sin apartarse del alcance de la invención.

5 La figura 1M muestra una vista en perspectiva del saliente 128, y la figura 1O muestra una vista en perspectiva en primer plano del primer extremo del saliente 128. La figura 1N muestra una vista superior del saliente 128.

10 Las figuras 1Q y 1R muestran un saliente 134 que tiene una pluralidad de puntas en forma de pirámide 136. La pluralidad de puntas en forma de pirámide 136 puede tener una altura de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, y más preferentemente de aproximadamente 0,25 mm. Se puede incluir cualquier número de puntas en forma de pirámide 136, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 2 puntas y aproximadamente 50 puntas, y más preferentemente entre aproximadamente 20 puntas y aproximadamente 40 puntas. En algunos modos de realización, las pirámides tienen puntas afiladas. Con referencia a la figura 1R, en algunos modos de realización, las puntas en forma de pirámide 136 están separadas aproximadamente 0,24 mm entre picos y aproximadamente 0,24 mm entre canales. Se apreciará fácilmente que las dimensiones anteriores son únicamente ilustrativas y que se puede usar cualquier dimensión y configuración adecuadas.

20 Como se apreciará, se puede usar cualquier forma adecuada para la punta o puntas de un saliente. Cuando se usan múltiples puntas, las puntas pueden tener la misma forma o formas diferentes, y las puntas pueden estar espaciadas uniformemente o espaciadas aleatoriamente y dispuestas aleatoriamente o en un patrón.

25 En algunos modos de realización, la base o la cubierta no tiene agujeros pasantes o rebajes y los salientes de nucleación de hielo se unen directamente a la base o la cubierta. En algunos modos de realización, la base o la cubierta y los salientes de nucleación de hielo se fabrican (por ejemplo, se moldean o tornean) como una sola unidad integrada.

30 En modos de realización preferentes, el recipiente es una placa multipocillo 50 que se ha aislado para promover un enfriamiento uniforme entre los pocillos exteriores (es decir, externos) e interiores (es decir, internos) durante la crioconservación. Con referencia a la figura 2A, el material aislante 52 se aplica al espacio libre 54 entre los pocillos exteriores 56 y la pared exterior 58 de la placa multipocillo 50 de modo que una parte del espacio libre 52 en la periferia de la placa multipocillo 50 se llena con material aislante 52. En algunos modos de realización, el material aislante 52 llena sustancialmente todo el espacio libre 54 entre los pocillos exteriores 56 y la pared exterior 58 de la placa multipocillo 50. El material aislante también se puede aplicar a todo o parte del espacio libre entre dos o más pocillos exteriores 56. El material aislante también se puede aplicar a todo o parte del espacio libre 64 entre dos o más pocillos interiores 60 de la placa multipocillo. En algunos modos de realización, el material aislante 52 se aplica a la parte inferior de una placa multipocillo 50 donde el espacio libre 52 es accesible.

40 En algunos modos de realización, el material aislante se aplica de modo que llene todo o parte del espacio libre que rodea uno o más pocillos de una placa multipocillo. En otro modo de realización, el material aislante es parte u ocupa parte de cada pocillo de la placa multipocillo. Todavía en otro modo de realización, el material aislante rodea los pocillos exteriores o interiores, y/u ocupa el interior de al menos un pocillo o recipiente.

45 Con referencia a la figura 2B, el material aislante 62 se puede adherir a o está integrado con la tapa 18 del recipiente, y el material aislante se puede configurar para que ocupe parte o todo el interior del recipiente por encima de la línea de fluido 24 de la capa de fluido 20.

50 En un modo de realización preferente, el material de aislamiento es el mismo material utilizado en la placa de cultivo tisular, tal como, por ejemplo, acrílico, policarbonato y poliestireno. Usar el mismo material es ventajoso para facilitar la fabricación. En algunos modos de realización, el material aislante puede consistir en un material aislante específico tal como masilla acrílica, burletes, pegamento caliente y otras formas de material aislante que incluyen, pero no se limitan a, masilla, espumas, aerosoles o láminas. El material aislante se puede adherir a o estar integrado con el recipiente, o el material aislante puede ser desmontable del recipiente.

55 La presente descripción proporciona un aparato, procedimiento y composición para la producción de cultivos celulares congelado listos para usar para ensayos de diagnóstico, que comprenden las etapas de proporcionar células, y un sustrato seleccionado del grupo que consiste en vidrio y plástico; colocar las células sobre el sustrato en condiciones de modo que las células se adhieran al sustrato para producir una monocapa celular; y congelar la monocapa celular en condiciones de modo que la monocapa celular permanezca intacta y adherida al sustrato y sea viable tras la descongelación. El sustrato puede ser el plástico que comprende el pozo de una placa multipocillo. El sustrato puede ser vidrio. Además, aunque se prefieren monocapas celulares adheridas, la descripción no se limita a monocapas celulares.

65 La descripción proporciona un sistema de recipiente para promover e iniciar la nucleación de hielo. Para congelar con éxito materiales biológicos de manera reproducible, es una práctica común enfriar los materiales hasta una temperatura por debajo del punto de fusión de los mismos, a continuación, después de un período corto de

equilibrado térmico, nuclear hielo en el material sobreenfriado. En un modo de realización de acuerdo con la invención, el recipiente es una placa de cultivo tisular multipocillo donde una pieza desechable y extraíble que tiene un saliente acicular se suspendería en los medios dentro de cada uno de los pocillos de cultivo; la pieza contiene una pluralidad de salientes que tienen sitios de nucleación con los que el medio líquido entra en contacto con el dispositivo de nucleación de hielo. Las estructuras de nucleación de hielo (es decir, salientes) se extienden desde la tapa de la placa de cultivo tisular hasta los medios que rodean el cultivo celular. Los salientes de nucleación de hielo están hechos preferentemente de plástico, sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ningún material en particular. En otros modos de realización útiles para comprender la invención, el dispositivo de nucleación de hielo comprendería uno o más salientes de nucleación de hielo que se extienden desde los lados o el fondo de los pocillos de la placa de cultivo tisular hacia los medios que rodean el cultivo celular.

Una vez descongelada, la pieza extraíble que contiene el dispositivo de nucleación de hielo se puede quitar. Otro aspecto de la divulgación se refiere a un recipiente con una composición de medios para la crioconservación eficaz de células y tejidos. El medio de conservación es una solución nutritiva que puede estar sin proteínas y sin suero y se puede adaptar para la crioconservación celular y tisular. La solución de conservación criogénica es preferentemente CRYOSTOR™ (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA). Aunque CRYOSTOR™ es el modo de realización preferente combinado con DMSO como agente crioprotector óptimo, se pueden usar otros agentes crioprotectores que comprenden uno o más seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, lactosa, glucosa, DMSO, propilenglicol, etilenglicol, un dextrano, glicerol, hidroxietilalmidón, polivinilpirrolidina, formamida, 1-2-propanodiol, etanol, metanol y polietilenglicol.

La presente divulgación también proporciona procedimientos, que no forman parte de la presente invención, para la producción de monocapas celulares adheridas, congeladas, listos para usar que comprenden las etapas de: 1) proporcionar células y una placa de cultivo tisular multipocillo, que opcionalmente puede incluir el material aislante mencionado anteriormente que rodea el exterior de cualquier pocillo y/o que ocupa una parte del interior de cualquier pocillo; 2) colocar las células en la placa de cultivo tisular multipocillo seleccionada en condiciones de modo que las células se adhieran al sustrato para producir una monocapa celular; 3) los medios de cultivo celular se remplazan con un medio de crioconservación sin proteínas y sin suero en condiciones estériles, siendo los medios de bioconservación preferentes CRYOSTOR™; 4) el dispositivo de nucleación de hielo mencionado anteriormente presente como se incorpora en cualquiera de las descripciones mencionadas anteriormente; 5) todo el recipiente se coloca en un envase hermético al vacío sellado; 6) la placa sellada se coloca y se encierra en un recipiente de Styrofoam®, que proporciona una tasa de enfriamiento razonablemente constante y reproducible. No se pretende que el recipiente se selle al vacío. Sin embargo, tampoco se pretende que el recipiente se limite a Styrofoam®, ya que se puede utilizar cualquier recipiente que proporcione una tasa controlada de reducción de la temperatura. En algunos modos de realización, el recipiente de Styrofoam puede incluir alcohol isopropílico en el que se bañan las placas mientras se enfrían, y el baño de isopropilo se puede enfriar previamente hasta aproximadamente 0 a -10 °C antes de añadir la placa de cultivo tisular multipocillo. En procedimientos preferentes, las placas de cultivo tisular multipocillo se incuban a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 10 minutos, antes de que las placas se transfieran a -80 °C para su almacenamiento.

Una vez en el recipiente, todo el aparato se coloca directamente en un congelador preferentemente ajustado a una temperatura de -80 °C; la temperatura de la muestra se reduce a una tasa cercana a 1-2 °C/minuto, aunque se pueden usar variaciones de la tasa de enfriamiento; cuando la temperatura del medio de conservación alcanza una temperatura dentro del intervalo preferente de -5 a -10 °C, se produce una nucleación de hielo uniforme; la temperatura del cultivo sigue enfriándose hasta la temperatura indicada del congelador; la temperatura final preferente es -80 °C, pero no se pretende que el presente procedimiento se limite a esta temperatura; una vez congelados, los cultivos celulares se pueden almacenar indefinidamente, aunque el tiempo de almacenamiento preferente sería de 1 día a 1 año. Cuando es necesario para su uso, los cultivos celulares se retiran del congelador y se descongelan preferentemente sumergiendo todo el envase en un baño líquido con una temperatura de 37 °C; sin embargo, en algunos modos de realización, se puede descongelar en un aparato sin líquido. En determinados modos de realización, el aparato es una estufa de incubación de cultivo celular con una temperatura de 37 °C; aunque la temperatura preferente es 37 °C, la invención no se limita a una temperatura exacta de 37 °C; una vez descongelado, se retira el dispositivo de nucleación de hielo; el material aislante se puede quitar si es posible, pero no es necesario quitarlo; el medio de crioconservación se retira y se repone con medios de cultivo celular; con lo que, en las condiciones combinadas, da como resultado una monocapa celular que permanece adherida al sustrato con una pérdida mínima de viabilidad y función en comparación con el material de partida.

En otro modo de realización, que no forma parte de la presente invención, las placas selladas se pueden transferir a un congelador a -20 °C después de la incubación de 10 minutos a aproximadamente 4 °C. Las placas selladas se incuban a continuación durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente -20 °C y a continuación se transfieren directamente a un congelador a -80 °C. En este modo de realización del procedimiento de congelación, no se usa nevera de Styrofoam/baño de alcohol. Las placas selladas permanecen en el congelador a -80 °C para su almacenamiento. Todavía en otro modo de realización, las placas selladas se pueden transferir a un dispositivo automatizado de enfriamiento a tasa controlada. En este procedimiento, las placas se pueden transferir después de la incubación de 10 minutos a aproximadamente 4 °C a una cámara preenfriada a aproximadamente 4 °C. De forma alternativa, las placas se pueden transferir directamente a la cámara sin incubación previa a aproximadamente 4 °C.

Una vez que las placas se colocan en la cámara, se puede ejecutar una tasa de enfriamiento preestablecida para congelar las placas. Una vez que la temperatura alcanza aproximadamente -80 °C en la cámara, la placa se puede transferir a un congelador a -80 °C para su almacenamiento.

5 El procedimiento preferente incorpora la combinación de los medios de crioconservación CRYOSTOR™, el dispositivo de nucleación de hielo y, opcionalmente, el material aislante. Esta combinación única que es diferente de los procedimientos actualmente disponibles, proporciona a la monocapa celular una solución sin suero y sin proteínas optimizada para el almacenamiento de células a temperaturas bajo cero (congeladas) y un medio para controlar y promover la nucleación uniforme de hielo cerca del punto de fusión del fluido; el procedimiento
10 combinado crea una circunstancia óptima que permite la crioconservación y excede el procedimiento de crioconservación al permitir una densidad celular y viabilidad uniformes entre pocillos de una placa multipocillo después del procedimiento de crioconservación, y una viabilidad y función generales mejoradas después de la descongelación. Los niveles de viabilidad y función después de la descongelación dependen del procedimiento de congelación aplicado y del tipo de célula utilizada. Una vez que el medio de crioconservación combinado y el dispositivo de nucleación de hielo se añaden a la monocapa celular siguiendo el procedimiento preferente, el aparato se sellaría al vacío utilizando una técnica estándar para proporcionar condiciones óptimas de congelación y almacenamiento. El aparato sellado a continuación se puede colocar en un recipiente de modo que el aparato no entre en contacto directo con el elemento de congelación; el aparato puede estar completamente encerrado dentro del recipiente; el recipiente puede proporcionar determinado aislamiento de modo que la temperatura del fluido en el
20 aparato se reduzca a una tasa controlada. Un ejemplo de esto podría ser un recipiente hecho de espuma Styrofoam®. El recipiente con el aparato a continuación se puede colocar en un congelador o dispositivo de congelación; el dispositivo de congelación preferente alcanza una temperatura final entre -70 °C y -90 °C; aunque preferente, el presente procedimiento no se limita a este intervalo de temperatura. En las presentes condiciones, la nucleación de hielo dentro del aparato se produce típicamente cuando la temperatura del medio dentro de los pozos alcanza de -5 a -10 °C y la nucleación de hielo entre pocillos sobre toda la placa multipocillo será uniforme. Una vez congelada, la monocapa celular se puede mantener en ese estado hasta que se requiera para su uso. En el modo de realización preferente, la monocapa crioconservada se podría almacenar durante 1 día a 1 año.

Tas su uso, el aparato crioconservado se puede retirar del congelador o dispositivo de congelación y se sumerge en un baño líquido; en el procedimiento preferente el baño sería agua mantenida a una temperatura cercana a 37 °C; la temperatura no se limita a 37 °C, sino que para lograr una viabilidad y función óptimas después del descongelamiento, la temperatura se debe mantener entre 25 y 40 °C. Aunque este es el procedimiento preferente, se pueden aplicar procedimientos adicionales de modo que el aparato se coloque en un ambiente seco como una estufa de incubación o un bloque de calentamiento. Las tasas óptimas de descongelación se logran mejor si toda la superficie exterior del aparato se puede exponer al mecanismo de descongelación. En el modo de realización preferente, el aparato multipocillo descongelado se retiraría del recipiente sellado, se retiraría el dispositivo de nucleación de hielo mecánico y los medios de crioconservación se eliminarían y remplazarían con medio de cultivo estándar. Estas etapas se pueden realizar en condiciones estériles o no estériles. Las monocapas descongeladas se pueden usar para pruebas y evaluación en cualquier momento posterior.

La presente invención supera las limitaciones previas en el campo proporcionando un aparato y composición que dan como resultado la congelación uniforme de las monocapas celulares de forma constante por toda la placa de cultivo tisular multipocillo y potencialmente proporcionando una viabilidad celular y función mejoradas después de la descongelación que, en algunos tipos celulares pueden ser comparables a las de las monocapas no congeladas. La presente divulgación incluye tanto un material aislante para ayudar al enfriamiento y calentamiento constante entre pocillos como un dispositivo mecánico para controlar la nucleación de hielo durante el procedimiento de congelación. Además, se puede usar un medio de conservación único sin proteínas y sin suero que está diseñado específicamente para el mantenimiento, protección y almacenamiento de las células en estado congelado. Además, la combinación del material aislante y el dispositivo mecánico de nucleación de hielo junto con los medios de crioconservación CRYOSTOR™ proporcionan un entorno de conservación óptimo y una nucleación de hielo homogénea que da como resultado una viabilidad y función mejoradas de la monocapa celular. Finalmente, la presente divulgación proporciona un procedimiento específico y simplificado para la congelación, almacenamiento y descongelación de monocapas celulares para formatos listos para usar.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración, que son útiles para comprender la invención.

Ejemplo 1: Perfil de enfriamiento de pocillos interiores y exteriores de placas de 96 pocillos y los efectos de un material aislante.

En este ejemplo, se usaron placas de cultivo tisular de 96 pocillos para investigar las diferencias en la tasa de enfriamiento entre los pocillos interiores y exteriores y la eficacia de incluir un material aislante. Para este ejemplo, el material aislante se aplicó al borde inferior exterior de los pocillos exteriores como se demuestra en la figura 2A. Para aislar las placas, se aplicó masilla de látex acrílico transparente estándar más silicona a los pocillos exteriores inferiores de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos descritas previamente. Se aplicó masilla al espacio exterior que se encuentra entre los pocillos exteriores y el borde de la placa exterior de las placas de cultivo tisular (véase la figura 2A). Se aplicó masilla con una pistola de masilla estándar. La masilla se añadió a los huecos de los pocillos

exteriores hasta que se llenó cualquier espacio de aire obvio. El exceso de masilla se limpió y se niveló para que la capa aislante de masilla quedara al ras con los fondos de los pocillos de la placa. A continuación las placas se dejaron durante la noche para que la masilla pudiera fraguar. Una vez preparadas, las placas se sometieron a prueba como se describe para determinar la eficacia del aislamiento.

Las placas sin un material aislante se sometieron a prueba para comparar los resultados y la eficacia del material aislante. Después de añadir el material aislante, se añadieron 80 µl de medio de cultivo a cada pocillo. Se conectó un termopar al interior de un pocillo interior ubicado en el centro y se conectó otro termopar al interior de un pocillo exterior. Las puntas de los termopares se sumergieron en los medios de cultivo líquidos, pero no tocaban la superficie del pocillo. La tapa se colocó sobre las placas y las placas a continuación se colocaron en un congelador a -80 °C. Las lecturas de temperatura se recogieron durante un período de tiempo de 0-30 minutos.

Como se muestra en la figura 3, la inclusión de un material aislante reduce eficazmente la variabilidad en las tasas de enfriamiento observadas entre los pocillos de cultivo interiores y exteriores de la placa de 96 pocillos. Sin la inclusión de un material aislante, los pocillos exteriores se enfriaban a una tasa mucho más rápida en comparación con los pocillos interiores. Usando el procedimiento de enfriamiento, los pocillos exteriores que no tienen un material aislante alcanzaban una temperatura de -8,5 °C después de 20 minutos, mientras que el pocillo interior alcanzaba únicamente -3,8 °C. Este intervalo de diferencias de temperatura podría afectar significativamente a los eventos de nucleación de hielo entre pocillos. Los pocillos exteriores típicamente tienen eventos de nucleación de hielo en un momento anterior en comparación con los pocillos interiores. Las diferencias significativas en la temperatura entre pocillos están relacionadas directamente con las diferencias observadas en la recuperación y viabilidad de las células después de la descongelación. Cuando los pocillos exteriores se rodearon con la adición de un material aislante, las tasas de enfriamiento se parecían mucho más a la tasa de enfriamiento de los pocillos interiores. Después de 20 minutos, la temperatura del pocillo exterior con un material aislante era de -4,3 °C, mientras que la temperatura del pocillo interior era de -3,8 °C. Los resultados de esta serie de experimentos demuestran la viabilidad y la eficacia del uso de un material aislante para ayudar a mejorar la refrigeración constante entre pocillos y la nucleación de hielo final.

Ejemplo 2: Congelación de monocapas de células NHDF en placa de 96 pocillos que somete a prueba diferentes medios de crioconservación y procedimientos de congelación

En este ejemplo, se investigaron diferentes medios de crioconservación como modelos para crioconservar monocapas de células NHDF, fibroblastos dérmicos humanos normales, en placas multipocillo siguiendo tres procedimientos de congelación distintos. Las células NHDF se cultivaron y posteriormente se sembraron en placas en un número igual de células/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (BD Falcon). Los cultivos se dejaron sin perturbar durante un día para lograr monocapas celulares adheridas confluentes. Antes de preparar los cultivos para su conservación, se realizó una evaluación inicial de la actividad metabólica para determinar la viabilidad celular antes de la congelación. Se utilizó alamarBlue® (TREK Diagnostic Systems) para evaluar la viabilidad celular.

El alamarBlue® es soluble, estable en medio de cultivo y es atóxico. Por lo tanto, se permite la supervisión continua de células en cultivo. Específicamente, el alamarBlue® no altera la viabilidad de las células cultivadas durante diversos tiempos en comparación con la evaluación por exclusión de azul tripano. Debido a que alamarBlue® es atóxico, las células en estudio se pueden devolver al cultivo o usar para otros propósitos, incluyendo estudios histológicos. Las mediciones de proliferación con alamarBlue® se pueden realizar usando espectrofotometría o fluorimetría para supervisar la absorción de los medios de cultivo celular complementados con alamarBlue® en dos longitudes de onda.

Para realizar el ensayo, se usó alamarBlue® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se retiraron los medios de cultivo celular de los pocillos y se añadió alamarBlue® (100 µl/pocillo) a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se analizaron con un lector de microplacas fluorescente (Tecan; modelo Infinite 200) con una excitación a 530-560 nm y una emisión a 590 nm. El programa informático Magellan™ (Tecan, Suiza) se usa en combinación con el lector de microplacas fluorescente Infinite 200 para la adquisición de datos fluorescentes. Las unidades fluorescentes relativas para monocapas celulares antes de la congelación se ajustaron al 100 % (control) y las condiciones experimentales se comparan con el control antes de la congelación.

A fin de evaluar los datos y la eficacia de cada experimento, se recogieron valores de fluorescencia sin procesar por medio de un lector de placas fluorescente. Los valores fluorescentes sin procesar o las unidades fluorescentes relativas se recogieron para cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Para cada estudio/experimento, las unidades fluorescentes relativas se usaron para determinar la viabilidad celular relativa (según los materiales del producto del fabricante (TREK Diagnostic Systems)). Para los estudios actuales, las unidades fluorescentes relativas recogidas para las diversas condiciones experimentales sometidas a prueba se compararon con células en placa no congeladas (control a 37 °C). Típicamente, se determinó una fluorescencia relativa promedio de al menos 6 pocillos de una placa de 96 pocillos (más dependiendo de la condición sometida a prueba). Los números promedio de las condiciones experimentales se compararon a continuación con el promedio de control no congelado y se determinó

un porcentaje. La variabilidad observada entre cada uno de los pocillos sometidos a prueba para cada experimento se expresó como el porcentaje de error o la desviación estándar (realizada con el programa informático Excel).

Después de la evaluación de la viabilidad antes de la congelación, el alamarBlue® se eliminó y se añadieron los diversos medios de crioconservación. Se sometieron a prueba cuatro condiciones diferentes de medios de crioconservación: medio de cultivo celular completo de NHDF + DMSO al 5 % (medio al 5 %), medio de cultivo celular completo de NHDF + DMSO al 10 % (medio al 10 %), CRYOSTOR™ + DMSO 5 % (CS5) y CRYOSTOR™ + DMSO 10 % (CS10). La placa de 96 pocillos se dividió en 4 cuadrantes que consistían en 24 pocillos en cada uno. Se añadieron 80 µl/pocillo de los medios de crioconservación respectivos a cada cuadrante de 24 pocillos. No se usó ningún dispositivo de nucleación de hielo. A continuación se colocó la placa de 96 pocillos en una bolsa Ziploc® y se selló. La placa sellada a continuación se colocó a 2-8 °C durante 10 minutos antes de la congelación. Después de 10 minutos, las placas se sometieron a congelación mediante tres procedimientos distintos: (1) Procedimiento de baño con alcohol - La placa sellada se colocó a continuación en una caja de Styrofoam y el recipiente completo se puso a continuación en un congelador a -80 °C. Los pocillos a continuación se visualizaron para los eventos de siembra (nucleación de hielo). Con este procedimiento, los eventos de siembra se observaron tan pronto como 20 minutos, mientras que el evento de siembra final se produjo alrededor de 60 minutos después del almacenamiento; (2) Procedimiento de congelador a -80 °C - La placa sellada se transfirió a un congelador a -20 °C y se almacenó durante 15 minutos y a continuación se transfirió directamente a un congelador a -80 °C y continuó la congelación. Con este procedimiento, los eventos de siembra se observaron tan pronto como 10 minutos, mientras que el evento de siembra final se produjo alrededor de 40 minutos después del almacenamiento; (3) Procedimiento de congelador a tasa controlada - La placa sellada se transfirió a un dispositivo de congelación automatizado de tasa de controlada (Cryomed) con la temperatura de la cámara ajustada a 4 °C. Una vez que la placa se colocó en la cámara, la temperatura de la cámara se redujo 1 °C/minuto hasta una temperatura final de -80 °C. Cuando se completó el programa, la placa se transfirió al congelador a -80 °C para su almacenamiento. Con este procedimiento, no se visualizaron eventos de siembra ya que la placa estaba dentro de la cámara. Las placas se mantuvieron a -80 °C durante 24 horas. A continuación se retiraron las placas y se sumergieron completamente en un baño de agua a 37 °C. En 5 minutos, todos los pocillos se habían descongelado. Los medios de crioconservación se retiraron de la placa, se repusieron con 100 µl/pocillo de medio de cultivo fresco, y la placa completa se colocó en una estufa de incubación a 37 °C para recuperarla. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después de la descongelación como se describe previamente para los controles antes de la congelación.

La figura 4 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 5. Las unidades fluorescentes relativas para monocapas celulares antes de la congelación se ajustaron al 100 % (control) y las condiciones experimentales se comparan con el control antes de la congelación. Usando este formato, un pocillo representado como rojo tiene una alta intensidad fluorescente y una alta viabilidad relativa, mientras que un pocillo representado como azul tiene una viabilidad relativa asociada muy baja. La escala general se determina por el pocillo que tiene la intensidad fluorescente más alta (color rojo más oscuro) y el pocillo con la intensidad fluorescente global más baja (color azul más oscuro). Los pocillos que tienen colores similares tienen intensidades fluorescentes similares y una viabilidad relativa similar.

Como se muestra en la figura 4, los resultados de este experimento indican que con cada procedimiento de congelación sometido a prueba, las soluciones de CRYOSTOR™ dan como resultado la recuperación más alta de las células NHDF en comparación con las soluciones tradicionales de medios + DMSO. De las soluciones de CRYOSTOR™, la CS5 da como resultado la mejor recuperación y estas tendencias generales de recuperación son coherentes con los resultados obtenidos con células NHDF crioconservadas en formatos tradicionales de criovial (células suspendidas). Además, los resultados indican que el procedimiento de baño de alcohol proporciona el procedimiento de congelación más óptimo, mientras que el procedimiento de congelación a tasa controlada puede ser el menos óptimo con el modelo de células NHDF. Es evidente un nivel alto de variabilidad entre pocillos con cada una de las soluciones en cada uno de los procedimientos de congelación.

Como se muestra en la figura 5, los resultados de este experimento demuestran que las monocapas celulares crioconservadas en los medios de CRYOSTOR™ funcionaron significativamente mejor que las monocapas crioconservadas con los medios tradicionales y DMSO (CS10 y CS5 en comparación con los medios al 10 % y los medios al 5 %). Las monocapas celulares crioconservadas en la CS5 obtuvieron el mejor rendimiento con un 70 %, 40 % y 20 % de viabilidad después de la descongelación, respectivamente, para cada uno de los procedimientos de congelación en comparación con el control, mientras que las monocapas celulares crioconservadas en medios y DMSO al 5 % dieron como resultado menos de un 10 % de viabilidad después de la descongelación en cada uno de los procedimientos de congelación. Se experimentó un nivel alto de variabilidad en la viabilidad entre pocillos en cada una de las condiciones usando CRYOSTOR™, debido al nivel de nucleación de hielo aleatoria observada durante el procedimiento de congelación. Esencialmente, no se observa variabilidad con las condiciones de medios y DMSO, pero esto se debe a que no se recuperaron células de ninguno de los procedimientos de congelación. Los medios CRYOSTOR™ mostraron la mayor viabilidad después de descongelación para crioconservar monocapas celulares en comparación con los medios de crioconservación estándar.

Ejemplo 3: Congelación de monocapas de células NHDF en placa de 96 pocillos que somete a prueba la eficacia y variabilidad de medios de crioconservación CRYOSTOR™ CS5 combinados con o sin un dispositivo de nucleación de hielo

En este ejemplo, se desarrolló un dispositivo de nucleación de hielo como se describe en la figura 1 y se utilizó para determinar la utilidad y la eficacia del dispositivo en comparación con no tener ningún dispositivo de nucleación de hielo. Para los ejemplos proporcionados demostrados en las figuras 6-9, el dispositivo de nucleación de hielo es esencialmente como se describe en la figura 1. El dispositivo de nucleación de hielo se preparó a partir del mismo material que las placas de cultivo tisular de 96 pocillos (BD Biosciences, Billerica, MA). Cada dispositivo se cortó del material de la placa de cultivo usando una cuchilla de afeitar a una longitud de aproximadamente 8 cm y una anchura de aproximadamente 1 cm (la anchura y la longitud exactas variaron ligeramente para cada dispositivo). Los dispositivos tenían forma rectangular y no tenían un solo extremo puntiagudo. Los bordes eran rugosos, parecidos a múltiples puntas de nucleación de hielo. Una vez que se prepararon los dispositivos de nucleación de hielo individuales, se usó un dispositivo de soldadura para fundir un extremo del dispositivo y permitir que se adhiriera a la tapa de una placa de cultivo tisular. Una vez enfriado, el dispositivo estaba adherido firmemente a la tapa y sobresalía por la parte inferior de la tapa como se representa en las figuras 1A y 1B. En total, se prepararon 48 dispositivos de nucleación de hielo y se adhirieron (1/pocillo) constituyendo la mitad de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se confirmó que cada dispositivo penetraba en el nivel de llenado de líquido del pocillo de cultivo tisular sin tocar la superficie del fondo del pocillo.

Para este estudio, se utilizaron monocapas de células NHDF, y las monocapas celulares se prepararon y se formaron como se describe en los ejemplos previos. Las monocapas de células NHDF se prepararon para la crioconservación esencialmente como se describe en el ejemplo 2. En resumen, se añadió CRYOSTOR CS5 a todos los pocillos, excepto a los 4 pocillos en el centro de la placa. Estos pocillos recibieron medios de cultivo celular estándar con DMSO al 5 % como solución de crioconservación. Después de la adición de la solución de crioconservación enfriada, se colocó en la placa un prototipo de tapa del dispositivo de nucleación de hielo, descrita anteriormente, que contenía espigas de nucleación de hielo que sobresalían de la parte inferior de la tapa. La tapa contenía un único dispositivo de nucleación de hielo para cada pocillo. La mitad de la tapa de la placa se diseñó para que contuviera un dispositivo de nucleación de hielo, mientras que la otra mitad no, lo que permitió la comparación intraexperimental. Cada dispositivo de nucleación de hielo se adhirió directamente a la superficie de la tapa de la placa y un dispositivo de nucleación de hielo se extendía al centro de cada pocillo de cultivo celular cuando la tapa se colocó en la placa de cultivo tisular. Los dispositivos de nucleación de hielo eran lo suficientemente largos para penetrar en el medio líquido, pero no tocaban la superficie del pocillo ni la monocapa celular.

Después añadir la tapa que contiene el dispositivo de nucleación de hielo a las placas, la placa se colocó en una bolsa de plástico apta para el congelador y se selló al vacío. Las placas a continuación se sometieron a una tasa de congelación controlada. Las placas se almacenaron en primer lugar a 2-8 °C durante 10 minutos y a continuación se colocaron en una cámara de enfriamiento de espuma Styrofoam a -80 °C. La cámara de enfriamiento de espuma Styrofoam contenía suficiente alcohol isopropílico de modo que la placa, cuando se colocara en la cámara, quedaría completamente cubierta. La cámara de enfriamiento de espuma Styrofoam se enfrió previamente de modo que la temperatura del baño fuera de aproximadamente 0 °C cuando las placas se colocaron en la cámara. Se logró una tasa de enfriamiento de 1-2 °C por minuto. Las placas permanecieron en la cámara de enfriamiento de espuma Styrofoam durante 3 horas. Después de 3 horas, las placas se retiraron y se almacenaron a -80 °C durante 24 horas, que fue tiempo suficiente para asegurar que los medios en cada pocillo se congelaran. Las placas se descongelaron usando un baño de agua a 37 °C como se describe previamente en el ejemplo 2. Una vez descongeladas, las placas se retiraron de la bolsa de plástico apta para el congelador. El dispositivo de nucleación de hielo se retiró de los pocillos junto con la solución de crioconservación, y se añadió medio de cultivo celular fresco. Las placas se evaluaron a continuación como en experimentos previos. Los datos mostrados son representativos de múltiples experimentos. Las placas se evaluaron usando un lector de placas como se describe en el ejemplo 2.

La figura 6 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 8. Las unidades fluorescentes relativas para monocapas celulares antes de la congelación se ajustaron al 100 % (control) y las condiciones experimentales se comparan con el control antes de la congelación. Usando este formato, un pocillo representado como rojo tiene una alta intensidad fluorescente y una alta viabilidad relativa, mientras que un pocillo representado como azul tiene una viabilidad relativa asociada muy baja. La escala general se determina por el pocillo que tiene la intensidad fluorescente más alta (color rojo más oscuro) y el pocillo con la intensidad fluorescente global más baja (color azul más oscuro). Los pocillos que tienen colores similares tienen intensidades fluorescentes similares y una viabilidad relativa similar.

Como se muestra en la figura 6, la adición del dispositivo de nucleación de hielo reduce eficazmente la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos que tienen el dispositivo de nucleación de hielo tienen una gran cantidad de pocillos con una gama de color muy similar,

mientras que los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo tienen una gama de color mucho más amplio entre pocillos. La gran variación en el color que se observa entre pocillos se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos sin la presencia de un dispositivo de nucleación de hielo. Cabe destacar que la intensidad fluorescente fue muy baja en todos los pocillos con medios y DMSO al 5 % como agente crioprotector. Cuando la intensidad fluorescente relativa para cada uno de los pocillos se traza en un gráfico como se muestra en la figura 7, la disminución drástica en la variabilidad entre pocillos usando un dispositivo de nucleación de hielo se observa fácilmente a partir de la desviación estándar más baja. En la figura 7, se muestran las unidades fluorescentes relativas promedio para los pocillos respectivos. Para demostrar el intervalo en la variabilidad entre pocillos, se representa la desviación estándar para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo y aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. La desviación estándar es significativamente menor para los pocillos de muestra que contienen el dispositivo de nucleación de hielo en comparación con la desviación estándar de los pocillos de muestra sin un dispositivo de nucleación de hielo. Además, las unidades fluorescentes relativas obtenidas de las muestras de control no congeladas se promedian y se muestran en la figura 7. Notablemente, la desviación estándar de los pocillos con el dispositivo de nucleación de hielo es comparable a la del control no congelado. Además, la intensidad fluorescente relativa promedio general para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo es mayor que la de aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. En comparación con el control no conservado, esto se correlaciona con un promedio de viabilidad de un 60 % para pocillos con un dispositivo de nucleación de hielo y un 40 % para pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo después de 1 día de recuperación después de la descongelación. Cabe destacar que la viabilidad global obtenida depende del tipo de célula. La consistencia entre pocillos es de gran importancia para la utilidad de las monocapas celulares congeladas para análisis ultrarrápido.

Ejemplo 4: Congelación de monocapas de células CHO en placa de 96 pocillos que somete a prueba la eficacia y variabilidad de medios de crioconservación CRYOSTOR™ CS5 combinados con o sin un dispositivo de nucleación de hielo (procedimiento de congelación de baño de alcohol y dispositivo de nucleación de hielo)

En este ejemplo, se utilizó un dispositivo de nucleación de hielo como se describe en el ejemplo 3 para determinar la utilidad y la eficacia del dispositivo en comparación con no tener ningún dispositivo de nucleación de hielo. Para este estudio, se utilizaron monocapas de células de ovario de hámster chino (CHO), y se prepararon y formaron como se describe en el ejemplo 2. Las placas se congelaron y descongelaron como se describe en el ejemplo 2. Las figuras mostradas son representativas de múltiples experimentos. Las placas se evaluaron usando un lector de placas como se describe en el ejemplo 2.

La figura 8 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente como se describe en el ejemplo 3. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de CHO para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 7.

Como se muestra en la figura 9, la adición del dispositivo de nucleación de hielo reduce eficazmente la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos que tienen el dispositivo de nucleación de hielo tienen una gran cantidad de pocillos con una gama de color muy similar, mientras que los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo tienen una gama de color mucho más amplia entre pocillos. La gran variación en el color que se observa en los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos. Cuando la intensidad fluorescente relativa para cada uno de los pocillos se traza en un gráfico como se muestra en la figura 9, la gran disminución en la variabilidad entre pocillos usando un dispositivo de nucleación de hielo se observa fácilmente a partir de la desviación estándar más baja. En la figura 9, se muestran las unidades fluorescentes relativas promedio para los pocillos respectivos. Para demostrar el intervalo en la variabilidad entre pocillos, se representa la desviación estándar para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo y aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. La desviación estándar es significativamente menor para los pocillos de muestra que contienen el dispositivo de nucleación de hielo en comparación con la desviación estándar de los pocillos de muestra sin un dispositivo de nucleación de hielo. Además, las unidades fluorescentes relativas obtenidas de las muestras de control no congeladas se promedian y se muestran en la figura 9. Es importante apreciar que la desviación estándar de los pocillos con el dispositivo de nucleación de hielo es comparable a la del control no congelado. Además, la intensidad fluorescente relativa promedio general para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo es mayor que la de aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. En comparación con el control no conservado, esto se correlaciona con un promedio de viabilidad de un 110 % para pocillos con un dispositivo de nucleación de hielo y un 100 % para pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo después de 1 día de recuperación después de la descongelación. Los resultados de este ejemplo son coherentes con los resultados descritos en el ejemplo 3. La adición de un dispositivo de nucleación de hielo puede reducir significativamente la variabilidad entre pocillos en comparación con la recuperación celular en pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo.

Ejemplo 5: Congelación de monocapas de células NHDF en placa de 96 pocillos que somete a prueba la eficacia y variabilidad de medios de crioconservación CRYOSTOR™ CS5 o medios y DMSO combinados con o sin un dispositivo de nucleación de hielo

En este ejemplo, se diseñaron tres piezas de dispositivo de nucleación de hielo como se describe en la figura 10 y se desarrollaron y utilizaron para determinar la utilidad y la eficacia del dispositivo en comparación con no tener ningún dispositivo de nucleación de hielo. Para los ejemplos proporcionados demostrados en las figuras 11-16, el dispositivo de nucleación de hielo es esencialmente como se describe en las figuras 1E-1R y 1O. Los dispositivos de nucleación de hielo se prepararon a partir del mismo material de poliestireno que las placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Cada dispositivo de inserción se preparó a partir de un diseño de molde. Los dispositivos tienen forma rectangular y se fabricaron con un diseño específico de espiga de nucleación de hielo como se describe en la figura 10A-C; diseño A de espiga: espiga de un solo cono, diseño B de espiga: matriz de baja densidad, diseño C de espiga: matriz de alta densidad. Se fabricaron espigas de nucleación de hielo para cada uno de los diseños de modo que cada uno de los salientes específicos tuviera la misma longitud y anchura. En total, se prepararon 48 dispositivos de nucleación de hielo que constituyen la mitad de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos para cada diseño, mientras que la otra mitad no tenía espigas y actuó como un control interno (sin dispositivo de nucleación de hielo) para cada experimento. Se confirmó que cada dispositivo penetraba en el nivel de llenado de líquido del pocillo de cultivo tisular sin tocar la superficie del fondo del pocillo. Cada uno de los dispositivos de inserción se fabricó de modo que se pudieran usar en formatos de placa estándar de 96 pocillos típicos. Los dispositivos representados en la figura 10 representan dispositivos potenciales que podrían fabricarse en cantidades masivas.

Para este estudio, se utilizaron monocapas de células NHDF, y las monocapas celulares se prepararon y se formaron como se describe en los ejemplos previos. Las monocapas de células NHDF se prepararon para la crioconservación esencialmente como se describe en el ejemplo 2. En resumen, se añadió CRYOSTOR CS5 a todos los pocillos de la mitad inferior de la placa, mientras que se añadieron medios + DMSO al 5 % a todos los pocillos en la mitad superior de la placa. Después de la adición de la solución de crioconservación enfriada, las piezas de dispositivo de nucleación de hielo fabricadas, descritas anteriormente, se colocaron en las placas. La mitad izquierda de la pieza de nucleación de hielo contenía dispositivos de nucleación de hielo, mientras que la mitad derecha no, lo que permitió la comparación intraexperimental. Una vez que la pieza se colocó en la placa, la tapa de la placa se colocó en la parte superior. Las placas se sellaron a continuación y se almacenaron durante 10 minutos a 2-8 °C como se describe en el ejemplo 3.

A continuación las placas se congelan usando cada uno de los tres procedimientos de congelación descritos en el ejemplo 2. Las figuras 11-12 se obtuvieron usando el procedimiento de congelación en baño de alcohol, las figuras 13-14 se obtuvieron usando el procedimiento de congelación a -80 °C, mientras que las figuras 15-16 se obtuvieron usando el procedimiento de congelación a tasa controlada. Las placas se descongelaron usando un baño de agua a 37 °C como se describe previamente en el ejemplo 2. Una vez descongeladas, las placas se retiraron de la bolsa de plástico apta para el congelador. El dispositivo de nucleación de hielo se retiró de los pocillos junto con la solución de crioconservación, y se añadió medio de cultivo celular fresco. Las placas se evaluaron a continuación como en experimentos previos. Los datos mostrados son representativos de múltiples experimentos. Las placas se evaluaron usando un lector de placas como se describe en el ejemplo 2.

La figura 11 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente como se describe en el ejemplo 2. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 12.

Como se muestra en la figura 11, la adición del dispositivo de nucleación de hielo usando el procedimiento de congelación de baño de alcohol reduce eficazmente la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos que tienen el dispositivo de nucleación de hielo tienen una gran cantidad de pocillos con una gama de color muy similar, mientras que los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo tienen una gama de color mucho más amplia entre pocillos. Esto es constante para cada uno de los diseños de dispositivo sometido a prueba. La gran variación en el color que se observa en los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos. Se observa poca o ninguna recuperación en cualquiera de los pocillos que tienen medios y DMSO con cualquiera de los diseños de dispositivo sometido a prueba. Cuando la intensidad fluorescente relativa para cada uno de los pocillos se traza en un gráfico como se muestra en la figura 12, la gran disminución en la variabilidad entre pocillos usando un dispositivo de nucleación de hielo se observa fácilmente a partir de la desviación estándar más baja para cada uno de los diseños de espiga sometido a prueba. En la figura 12, se muestran las unidades fluorescentes relativas promedio para las condiciones de pocillo respectivas. Para demostrar el intervalo en la variabilidad entre pocillos, se representa la desviación estándar para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo y aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. La desviación estándar es significativamente menor para los pocillos de muestra que contienen los dispositivos de nucleación de hielo en comparación con la desviación estándar de los pocillos de muestra sin un dispositivo de nucleación de hielo. Además, las unidades fluorescentes relativas obtenidas de las muestras de control no congeladas se promedian y se

muestran en la figura 12. Es importante apreciar que la desviación estándar de los pocillos con el dispositivo de nucleación de hielo es comparable a la del control no congelado. Los resultados de este ejemplo son coherentes con los resultados descritos en el ejemplo 3. La adición de un dispositivo de nucleación de hielo puede reducir significativamente la variabilidad entre pocillos en comparación con la recuperación celular en pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo.

La figura 13 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente como se describe en el ejemplo 2. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 14.

Como se muestra en la figura 13, la adición del dispositivo de nucleación de hielo usando el procedimiento de congelación a -80°C reduce eficazmente la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos que tienen el dispositivo de nucleación de hielo tienen una gran cantidad de pocillos con una gama de color muy similar, mientras que los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo tienen una gama de color mucho más amplio entre pocillos. Esto es constante para cada uno de los diseños de dispositivo sometido a prueba, aunque se debe apreciar que el dispositivo de espiga de matriz de baja densidad parece ser menos eficaz en comparación con los otros dos diseños de dispositivo (espiga de un solo cono, matriz de alta densidad). La gran variación en el color que se observa en los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos. Se observa poca o ninguna recuperación en cualquiera de los pocillos que tienen medios y DMSO con cualquiera de los diseños de dispositivo sometido a prueba. Cuando la intensidad fluorescente relativa para cada uno de los pocillos se traza en un gráfico como se muestra en la figura 14, la gran disminución en la variabilidad entre pocillos usando un dispositivo de nucleación de hielo se observa fácilmente a partir de la desviación estándar más baja para cada uno de los diseños de espiga sometido a prueba. En la figura 14, se muestran las unidades fluorescentes relativas promedio para las condiciones de pocillo respectivas. Para demostrar el intervalo en la variabilidad entre pocillos, se representa la desviación estándar para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo y aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. La desviación estándar es significativamente menor para los pocillos de muestra que contienen los dispositivos de nucleación de hielo en comparación con la desviación estándar de los pocillos de muestra sin un dispositivo de nucleación de hielo. Además, las unidades fluorescentes relativas obtenidas de las muestras de control no congeladas se promedian y se muestran en la figura 14. Es importante apreciar que la desviación estándar de los pocillos con el dispositivo de nucleación de hielo es comparable a la del control no congelado. Los resultados de este ejemplo son coherentes con los resultados descritos en el ejemplo 3. La adición de un dispositivo de nucleación de hielo puede reducir significativamente la variabilidad entre pocillos en comparación con la recuperación celular en pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo.

La figura 15 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente como se describe en el ejemplo 2. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba. El color asociado con la intensidad fluorescente también se puede correlacionar con la viabilidad como se muestra en la figura 16.

Como se muestra en la figura 15, la adición del dispositivo de nucleación de hielo usando el procedimiento de congelación a tasa controlada reduce eficazmente la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos que tienen el dispositivo de nucleación de hielo tienen una gran cantidad de pocillos con una gama de color muy similar, mientras que los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo tienen una gama de color mucho más amplio entre pocillos. Esto es constante para cada uno de los diseños de dispositivo sometido a prueba. La gran variación en el color que se observa en los pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos. Se observa poca o ninguna recuperación en cualquiera de los pocillos que tienen medios y DMSO con cualquiera de los diseños de dispositivo sometido a prueba. Cuando la intensidad fluorescente relativa para cada uno de los pocillos se traza en un gráfico como se muestra en la figura 16, la gran disminución en la variabilidad entre pocillos usando un dispositivo de nucleación de hielo se observa fácilmente a partir de la desviación estándar más baja para cada uno de los diseños de espiga sometido a prueba. En la figura 16, se muestran las unidades fluorescentes relativas promedio para las condiciones de pocillo respectivas. Para demostrar el intervalo en la variabilidad entre pocillos, se representa la desviación estándar para los pocillos que tienen un dispositivo de nucleación de hielo y aquellos sin un dispositivo de nucleación de hielo. La desviación estándar es significativamente menor para los pocillos de muestra que contienen los dispositivos de nucleación de hielo en comparación con la desviación estándar de los pocillos de muestra sin un dispositivo de nucleación de hielo. Además, las unidades fluorescentes relativas obtenidas de las muestras de control no congeladas se promedian y se muestran en la figura 16. Es importante apreciar que la desviación estándar de los pocillos con el dispositivo de nucleación de hielo es comparable a la del control no congelado. Los resultados de este ejemplo son coherentes con los resultados descritos en el ejemplo 3. La adición de un dispositivo de nucleación de hielo puede reducir significativamente la variabilidad entre pocillos en comparación con la recuperación celular en pocillos sin un dispositivo de nucleación de hielo.

Ejemplo 6: Congelación de monocapas de células NHDF en placa de 96 pocillos que somete a prueba la eficacia y variabilidad de medios de crioconservación CRYOSTOR™ CS5 combinados con o sin un dispositivo de nucleación de hielo y con o sin un dispositivo aislante

Se insertó un dispositivo aislante como se describe en la figura 2A alrededor del borde exterior de una placa de 96 pocillos y se utilizó para determinar la utilidad y la eficacia del dispositivo en comparación con no tener un dispositivo aislante. Para los ejemplos proporcionados demostrados en las figuras 17-18, el dispositivo de nucleación de hielo es esencialmente como se describe en la figura 10. Los dispositivos aislantes se prepararon aplicando una masilla aislante estándar (masilla de látex acrílico más silicona) en el borde exterior inferior de una placa de 96 pocillos. El dispositivo aislante estaba nivelado con la parte del fondo de la placa consecuentemente con el fondo de cada uno de los pocillos. El dispositivo se añadió a la mitad de cada placa, mientras que la mitad derecha sirvió como control experimental interno. El dispositivo aislante y la placa se mantuvieron durante la noche a temperatura ambiente antes de su uso.

Para este estudio, se utilizaron monocapas de células NHDF, y las monocapas celulares se prepararon y se formaron como se describe en los ejemplos previos. Las monocapas de células NHDF se prepararon para la crioconservación esencialmente como se describe en el ejemplo 2. En resumen, se añadió CRYOSTOR CS5 a todos los pocillos de la placa. Después de la adición de la solución de crioconservación enfriada, las piezas de dispositivo de nucleación de hielo fabricadas, descritas en la figura 10, se colocaron en las placas. La mitad izquierda de la pieza de nucleación de hielo contenía dispositivos de nucleación de hielo, mientras que la mitad derecha no, lo que permitió la comparación intraexperimental. Una vez que la pieza se colocó en la placa, la tapa de la placa se colocó en la parte superior. Las placas se sellaron a continuación y se almacenaron durante 10 minutos a 2-8 °C como se describe en el ejemplo 3.

A continuación las placas se congelan usando los procedimientos de congelación descritos en el ejemplo 2. La figura 17 se obtuvo usando el procedimiento de congelación a -80 °C, mientras que la figura 18 se obtuvo usando el procedimiento de congelación a tasa controlada. Las placas se descongelaron usando un baño de agua a 37 °C como se describe previamente en el ejemplo 2. Una vez descongeladas, las placas se retiraron de la bolsa de plástico apta para el congelador. El dispositivo de nucleación de hielo se retiró de los pocillos junto con la solución de crioconservación, y se añadió medio de cultivo celular fresco. Las placas se evaluaron a continuación como en experimentos previos. Los datos mostrados son representativos de múltiples experimentos. Las placas se evaluaron usando un lector de placas como se describe en el ejemplo 2.

La figura 17 es una imagen obtenida del programa informático Magellan™ usado en combinación con el lector de microplacas fluorescente como se describe en el ejemplo 2. La imagen retrata la intensidad fluorescente relativa basada en la densidad celular y la actividad metabólica de NHDF para cada pocillo como un color para todos los pocillos de la placa de prueba.

Como se muestra en la figura 17 y 18, la adición del dispositivo aislante alrededor de los pocillos de la placa exteriores de la placa de 96 pocillos reduce la variabilidad entre pocillos en comparación con los pocillos que no tienen un dispositivo aislante. La mejora es apreciable solamente en los pocillos que tienen presente también el dispositivo de nucleación de hielo. Los pocillos exteriores que tienen el dispositivo aislante y el dispositivo de nucleación de hielo tienen un número mayor de pocillos con una gama de color muy similar en comparación con los pocillos que solamente tienen el dispositivo de nucleación de hielo. La variación ligeramente mayor en el color que se observa en los pocillos sin un dispositivo aislante se correlaciona directamente con la variabilidad incrementada en la densidad celular y la viabilidad entre pocillos. La adición de un dispositivo aislante puede ayudar a reducir la variabilidad entre pocillos en comparación con la recuperación celular en pocillos sin un dispositivo aislante.

Ejemplo 7: Congelación de monocapas celulares de hepatocitos humanos en una placa de 96 pocillos en medios de crioconservación CRYOSTOR™ CS10 con y sin un dispositivo de nucleación de hielo

Se congelan monocapas celulares de hepatocitos humanos con y sin dispositivo de nucleación del hielo de un solo cono, matriz de baja densidad o matriz de alta densidad, como se describe en las figuras 10A-C para evaluar la utilidad y la eficacia del dispositivo. Las monocapas celulares de hepatocitos humanos se preparan y forman según las instrucciones del fabricante en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y las monocapas celulares se preparan para la crioconservación esencialmente como se describe en el ejemplo 2. En resumen, se añade CRYOSTOR™ CS10 a todos los pocillos de la placa. Después de la adición de la solución de crioconservación enfriada, una pieza de dispositivo de nucleación de hielo, descrita anteriormente, se coloca en las placas. Una mitad de la pieza de dispositivo de nucleación de hielo contiene dispositivos de nucleación de hielo, mientras que la otra mitad no tiene dispositivos. Esto permite la comparación intraexperimental. La pieza de dispositivo de nucleación de hielo se coloca sobre la placa y la tapa de la placa se coloca en la parte superior. Las placas se sellan a continuación y se almacenan durante 10 minutos a 2-8 °C como se describe en el ejemplo 3.

A continuación, las placas se congelan usando los procedimientos de congelación a -80 °C y los procedimientos de congelación a tasa controlada descritos en el ejemplo 2. Posteriormente, las placas se descongelan usando un baño

de agua a 37 °C como se describe previamente en el ejemplo 2. Una vez descongeladas, las placas se retiran de la bolsa de plástico apta para el congelador. El dispositivo de nucleación de hielo se retira de los pocillos junto con la solución de criopreservación, y se añade medio de cultivo celular de hepatocitos fresco. A continuación, las placas se evalúan para la recuperación y viabilidad de los hepatocitos para la viabilidad inicial y la variabilidad general entre pocillos.

Además, se evalúa la función celular de los hepatocitos para evaluar y comparar la eficacia del dispositivo de nucleación en comparación con los pocillos donde no se usa ningún dispositivo de nucleación. Se usará el procedimiento de congelación óptimo determinado a partir del estudio inicial de hepatocitos anterior. Las placas se preparan y congelan como se describe anteriormente. Se someten a prueba tres placas de al menos 3 lotes diferentes de hepatocitos. Una vez descongeladas, se evalúan la viabilidad celular y la función celular. La función de los hepatocitos se evalúa mediante secreción de albúmina, análisis de citocromo P450 y/o síntesis de urea (se usarán 2 de los 3 ensayos). La función general y la viabilidad se comparan con los cultivos de control no congelados. La variabilidad general entre pocillos se evalúa como una medida final de la eficacia del dispositivo.

Se debe entender el uso de los términos “incluyen”, “incluye”, “incluyendo”, “tienen”, “tiene” o “teniendo” en general como indefinidos y no limitantes salvo que se indique específicamente de otro modo.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para crioconservar células, comprendiendo el aparato:
 - 5 una placa multipocillo que comprende un sustrato biocompatible, en el que la placa multipocillo comprende además un interior y un exterior;

un dispositivo mecánico de nucleación de hielo dispuesto en el interior de la placa multipocillo para iniciar la formación de cristales de hielo; y
 - 10 una cubierta separable para la placa multipocillo, en el que el dispositivo mecánico de nucleación de hielo comprende una pluralidad de salientes tridimensionales que se proyectan desde una superficie de la cubierta hacia el interior de la placa multipocillo, o
 - 15 una pieza separable para la placa multipocillo, en el que el dispositivo mecánico de nucleación de hielo comprende una pluralidad de salientes tridimensionales que se proyectan desde una superficie de la pieza hacia el interior de la placa multipocillo.
2. El aparato de la reivindicación 1, en el que al menos un saliente tridimensional está conectado de forma desmontable a la cubierta o pieza.
3. El aparato de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un saliente tridimensional es hueco, sólido o semipermeable y tiene forma acicular, esférica, piramidal o cónica.
- 25 4. El aparato de la reivindicación 1, en el que el dispositivo mecánico de nucleación de hielo es una pieza extraíble similar a una malla.
5. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un medio de crioconservación.
- 30 6. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además:

un material aislante que se añade al espacio libre que rodea los pocillos exteriores o interiores y/o que ocupa el espacio interior de al menos un pocillo de la placa multipocillo para ayudar en el enfriamiento y calentamiento constante de todos los pocillo; y
- 35 en el que el aparato es estéril.
7. El aparato de la reivindicación 6, en el que el material aislante está compuesto del mismo material que la placa multipocillo, o en el que el material aislante está compuesto de un material diferente al de la placa multipocillo, que consiste en una masilla, espuma, aerosol o lámina, que proporcionará un efecto aislante.
- 40 8. El aparato de la reivindicación 6, en el que el material aislante se aplica en el espacio entre los pocillos exteriores y el borde exterior de la placa multipocillo, o en el que el material aislante ocupa cualquier espacio libre que rodee cualquier pocillo de la placa multipocillo.
- 45 9. El aparato de la reivindicación 8, en el que el material aislante ocupa todos o alguno de los pocillos en la placa multipocillo, de modo que se usa para llenar el espacio de aire por encima del nivel superior de las células y los medios crioprotectores y la superficie inferior o del fondo de la tapa o cubierta.
- 50 10. El aparato de la reivindicación 8, en el que el material aislante ocupa los espacios exteriores e interiores de los pocillos en la placa multipocillo.
11. El aparato de la reivindicación 6, en el que el material aislante está adherido directamente a la placa multipocillo.
- 55 12. El aparato de la reivindicación 6, en el que el material aislante es desmontable.
13. El aparato de la reivindicación 5, en el que el medio de crioconservación es CRYOSTOR™ o un equivalente funcional.
- 60 14. Una composición, comprendiendo la composición un aparato de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la placa multipocillo es estéril, un medio de crioconservación y células dispuestas en, o en contacto con, el medio de crioconservación dentro del interior de la placa multipocillo.
- 65 15. La composición de la reivindicación 14, en la que las células son monocapas o células en suspensión.

FIG. 1A

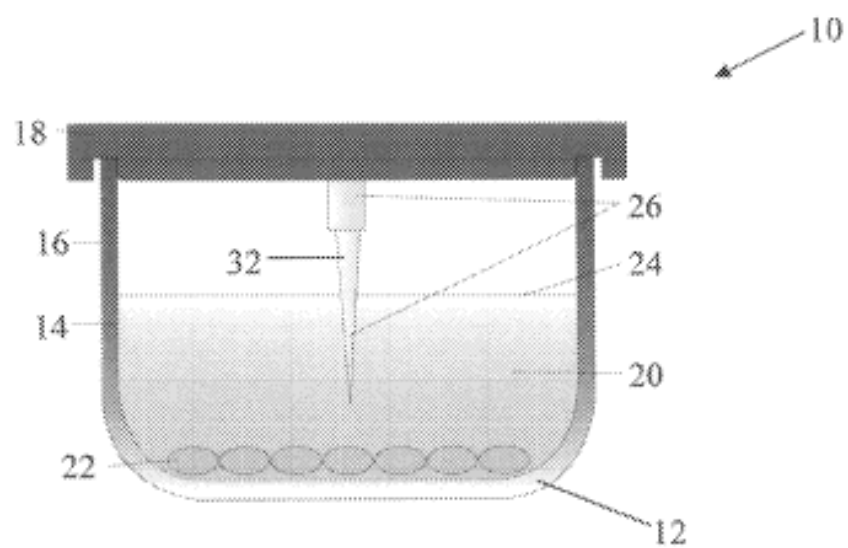


FIG. 1B

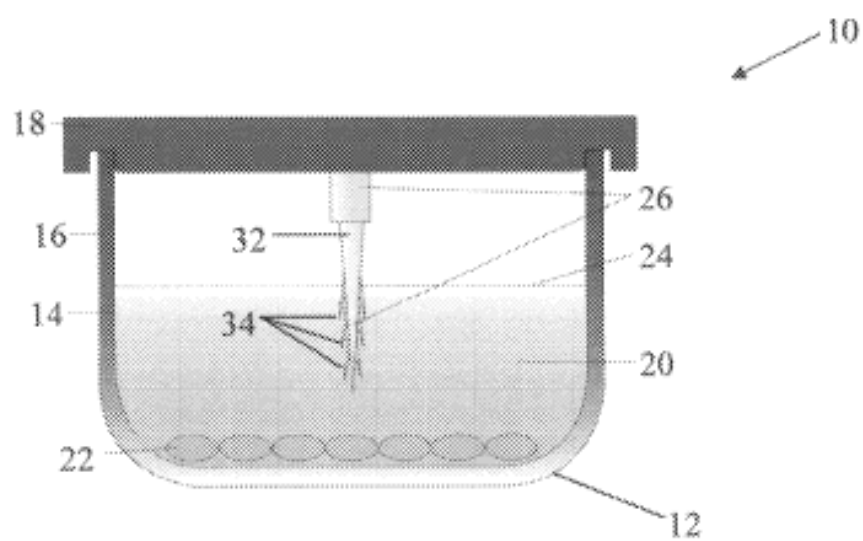


FIG. 1C

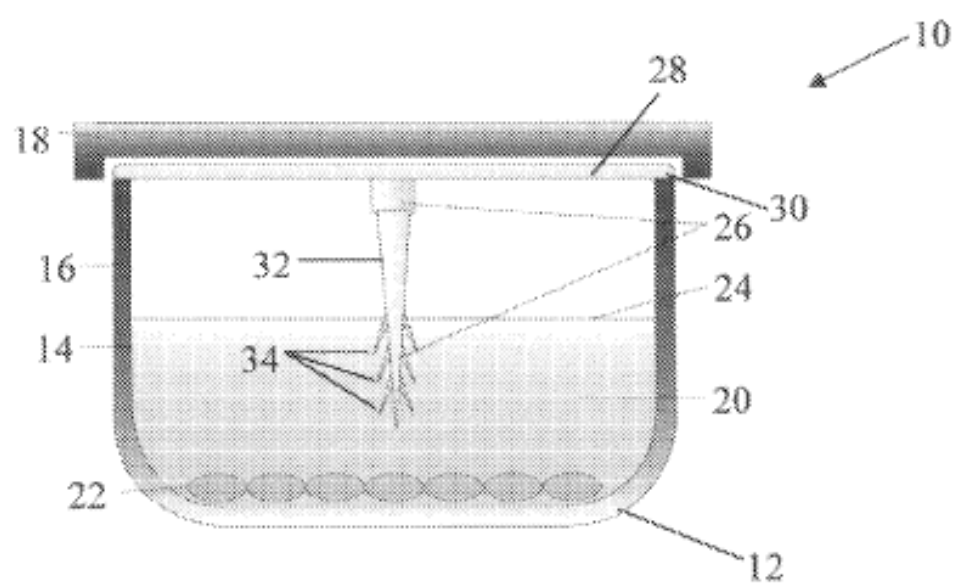


FIG. 1D

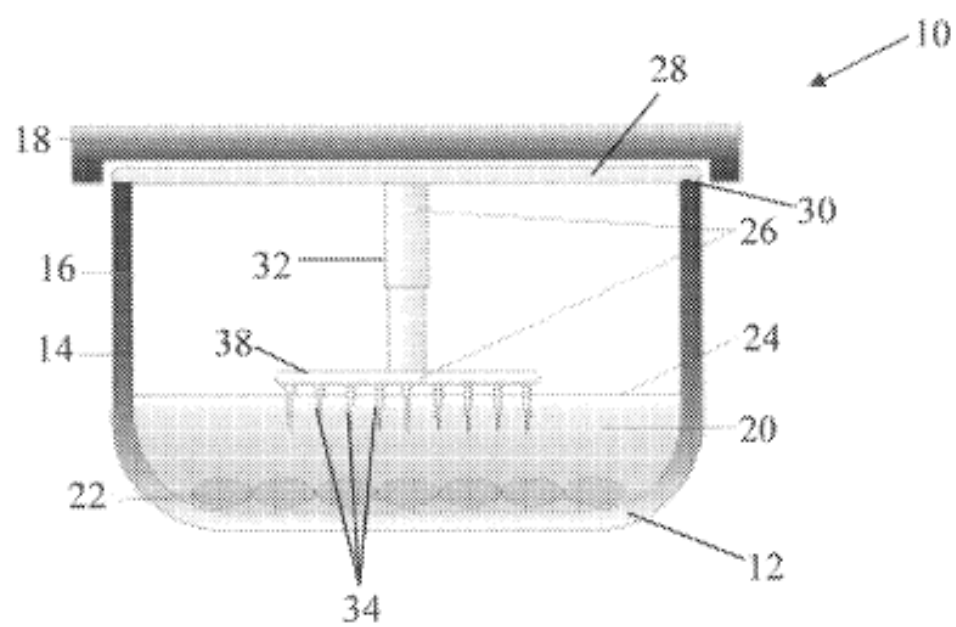


FIG. 1E

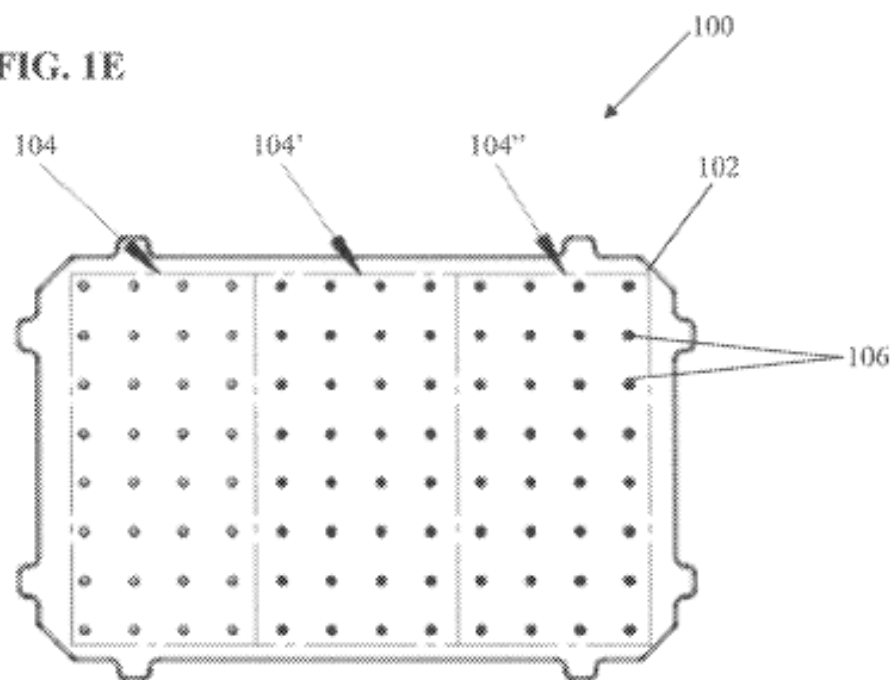


FIG. 1F

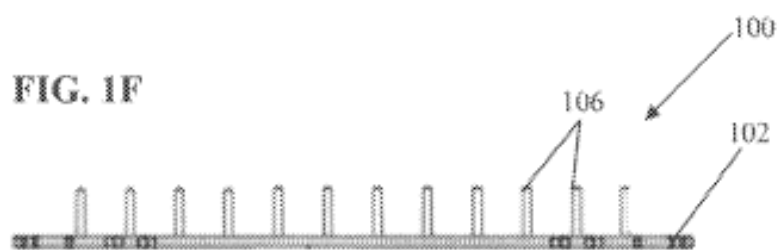


FIG. 1G

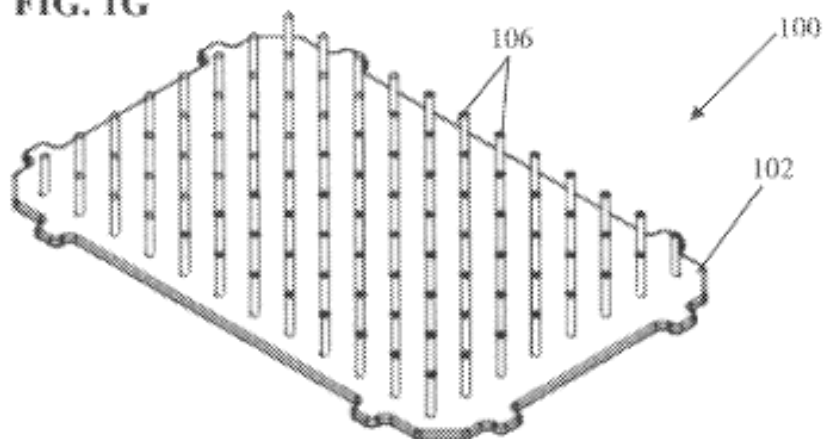


FIG. 1H

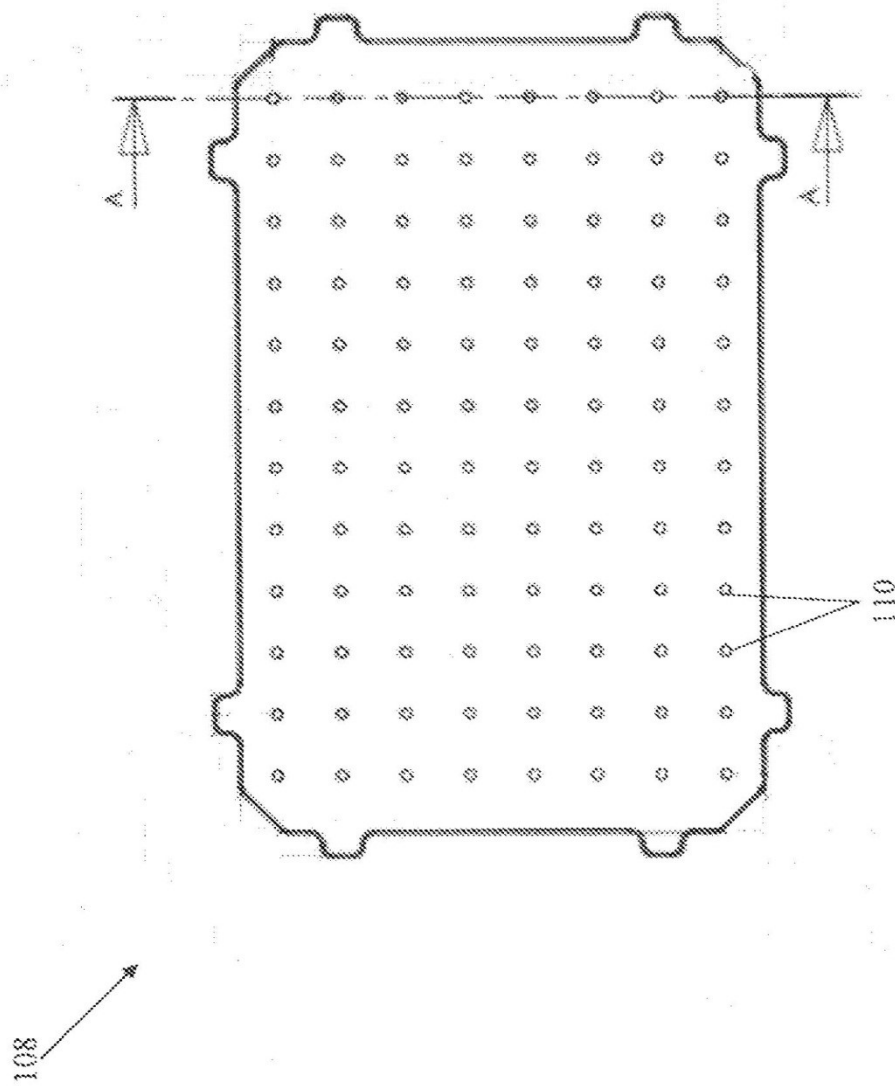
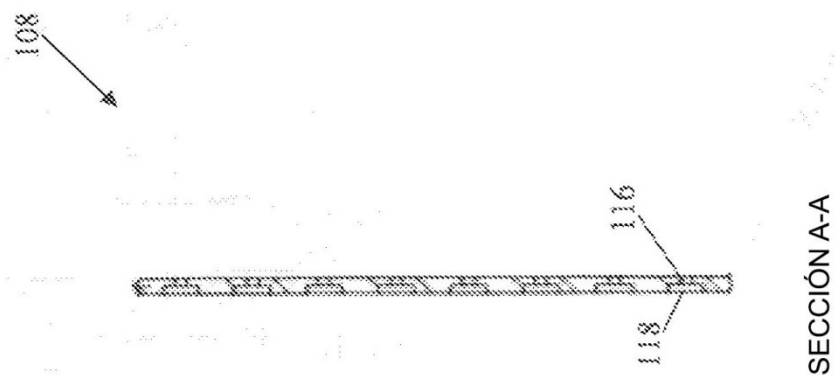


FIG. 1I



SECCIÓN A-A

FIG. 1J

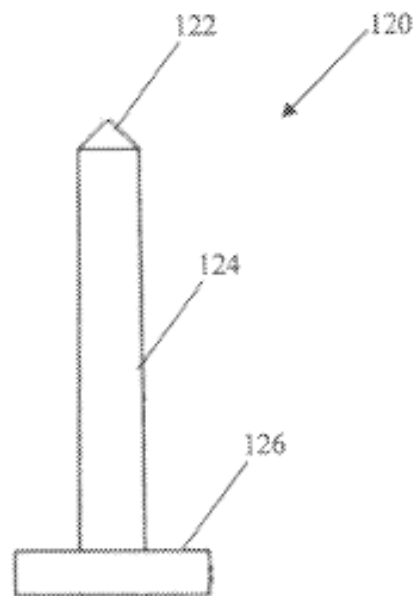


FIG. 1K

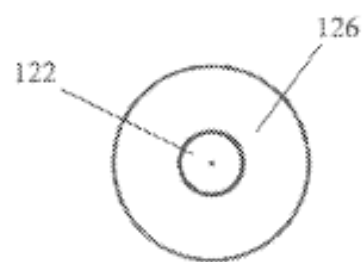


FIG. 1L

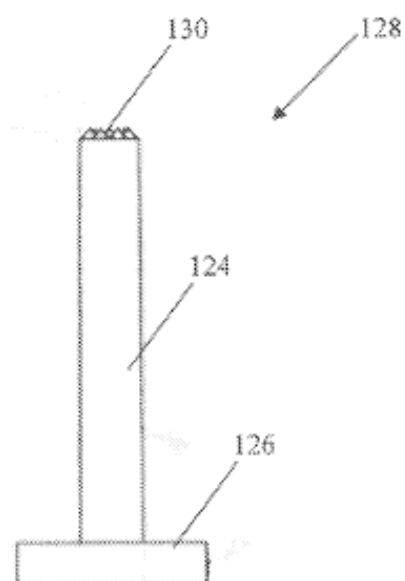


FIG. 1M

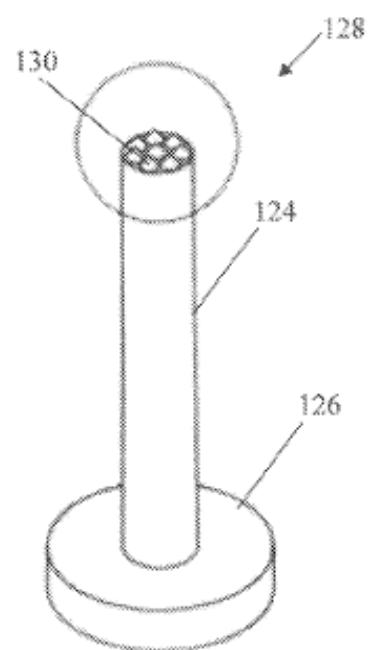


FIG. 1N

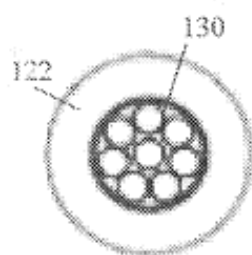


FIG. 1P

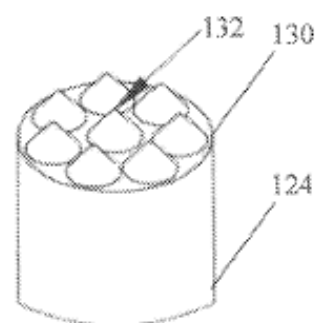


FIG. 10

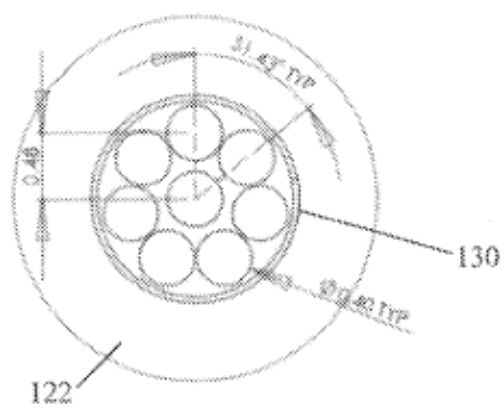


FIG. 1Q

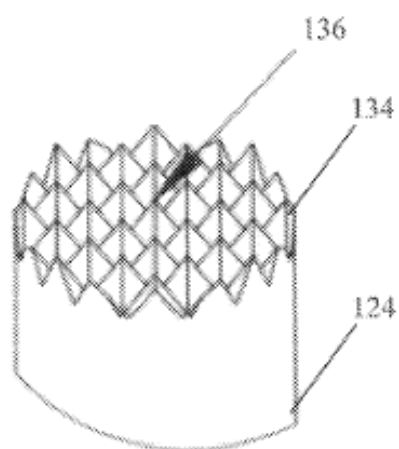


FIG. 1R

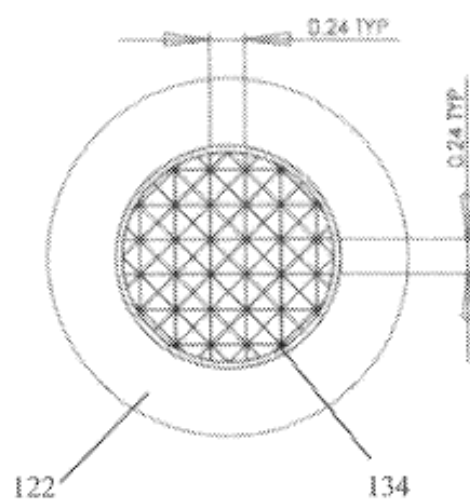


FIG. 2A

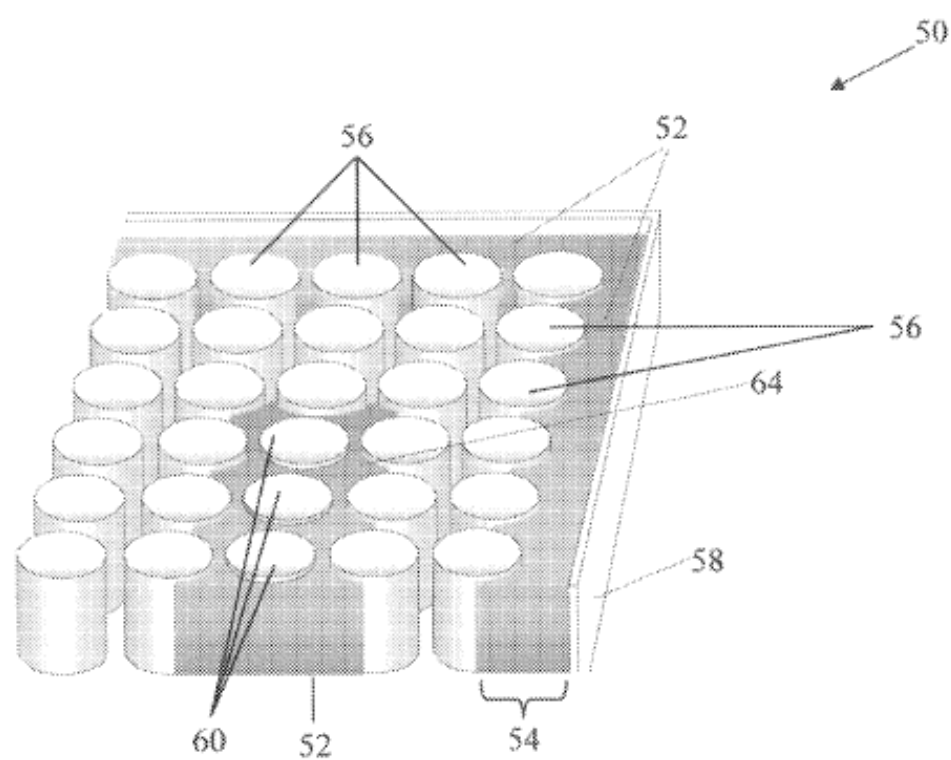


FIG. 2B

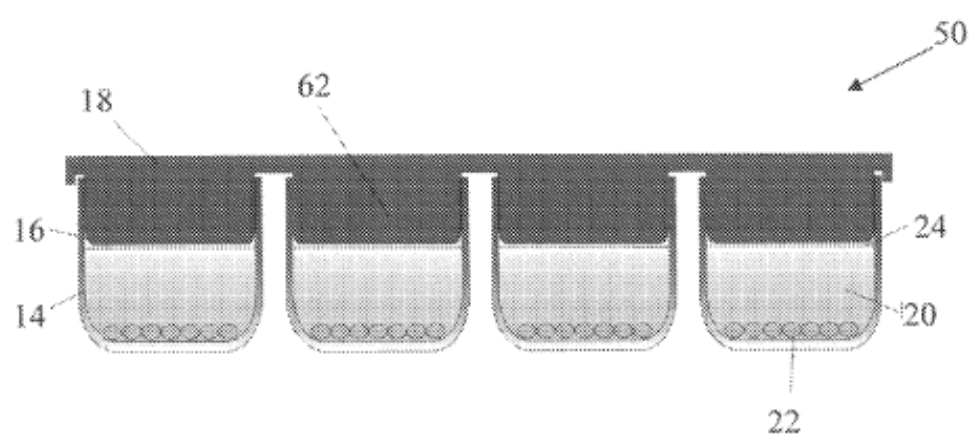


FIG. 3

Perfil de enfriamiento de los pocillos de placa de cultivo celular de 96 pocillos

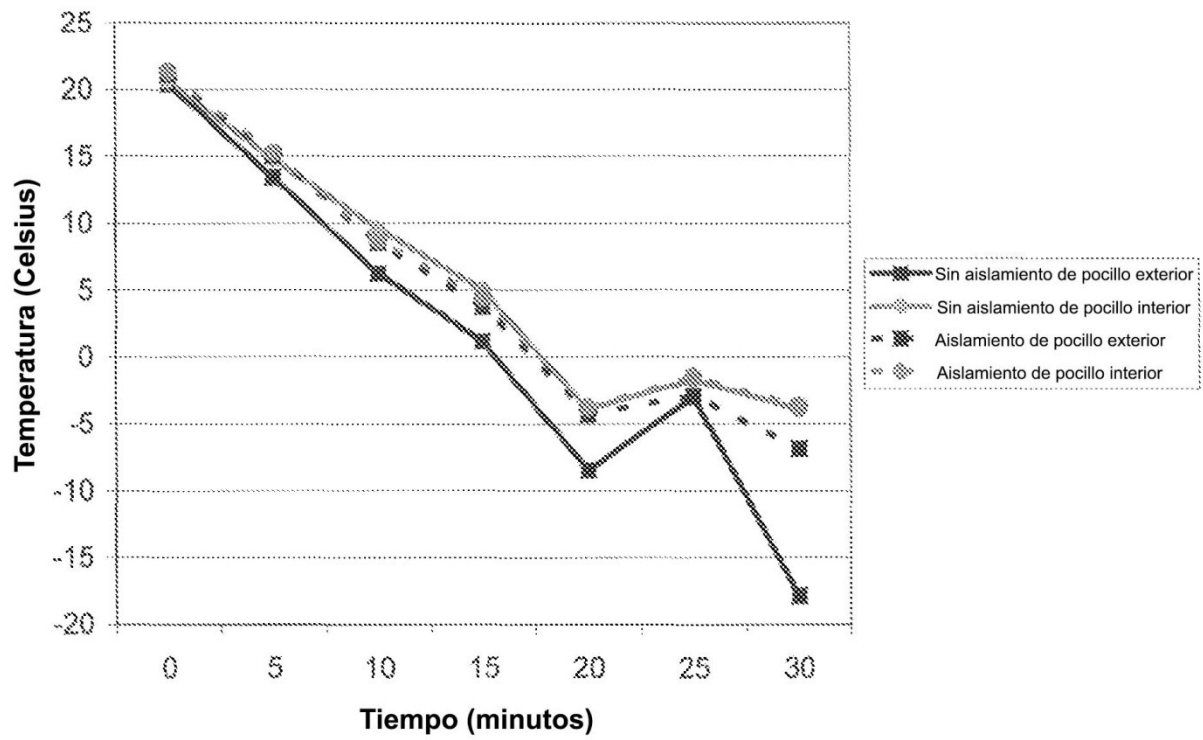


FIG. 4

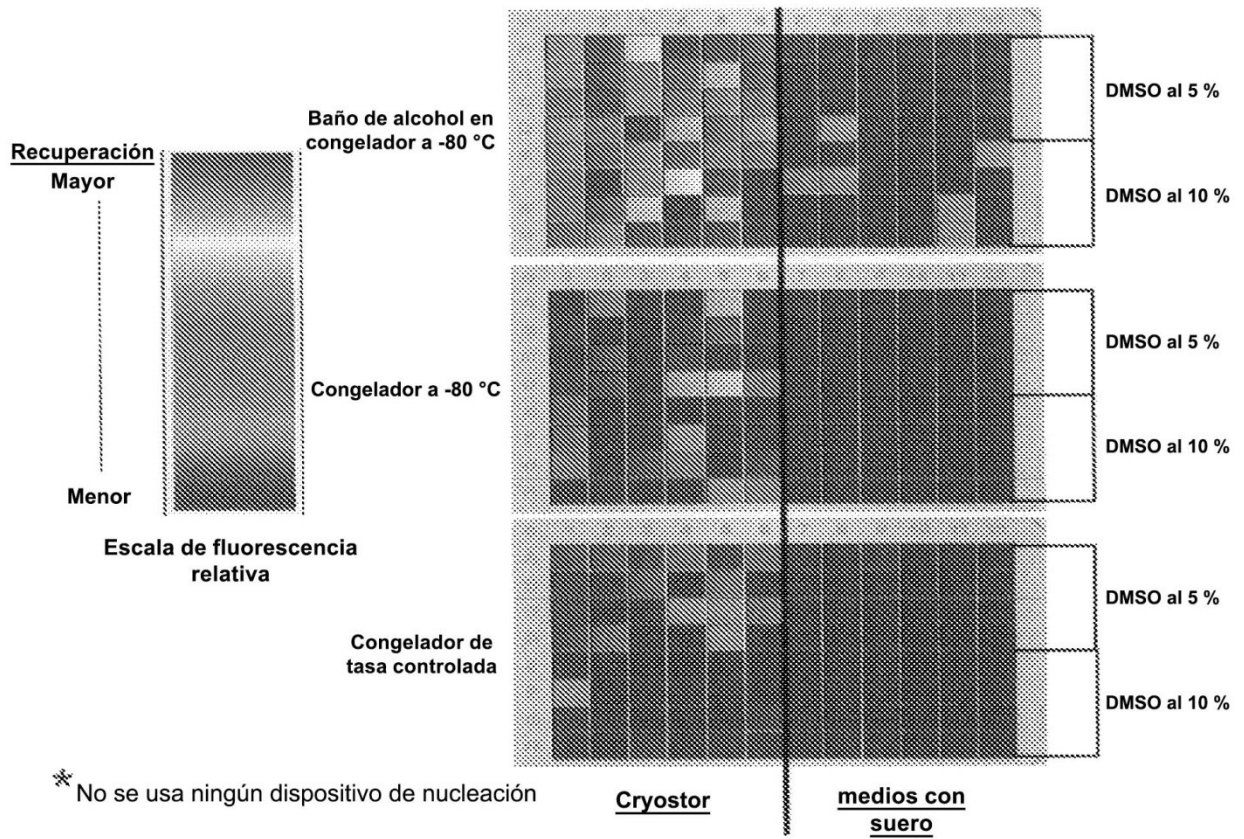


FIG. 5

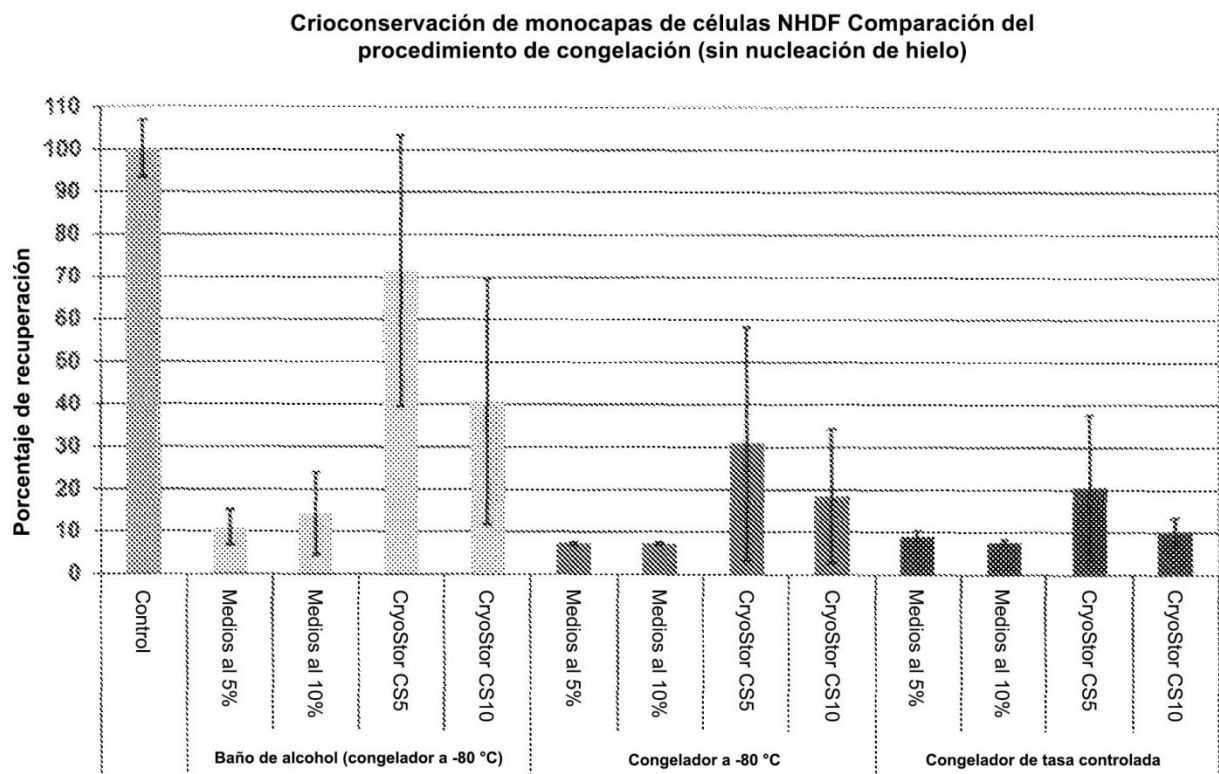


FIG. 6

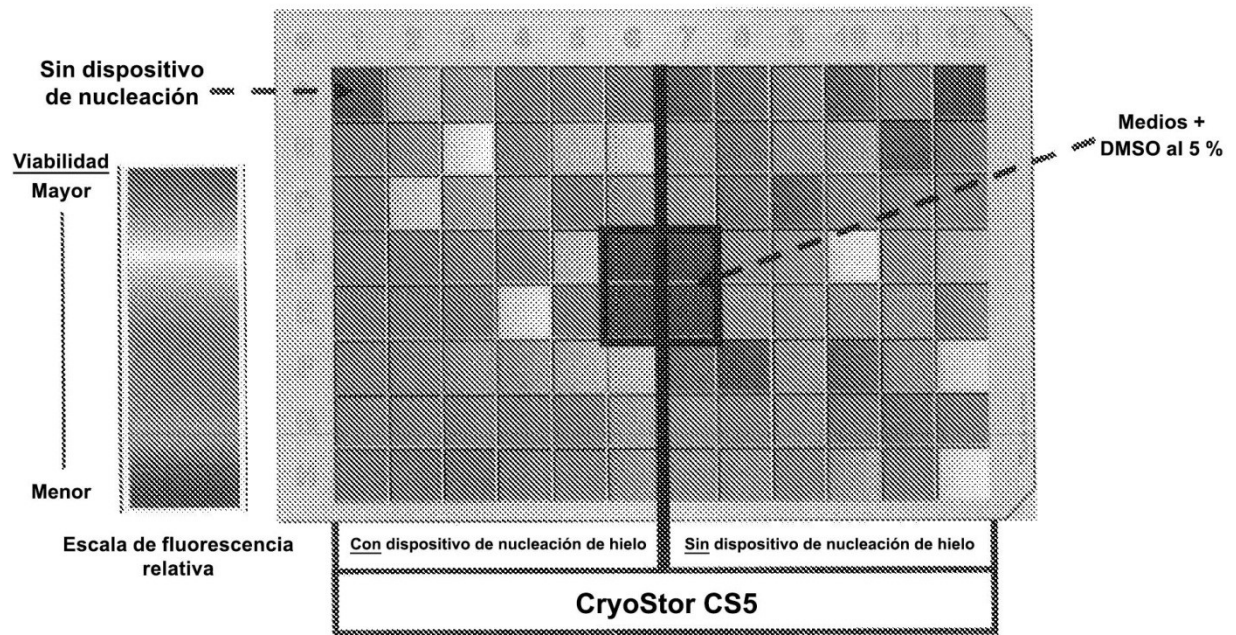


FIG. 7

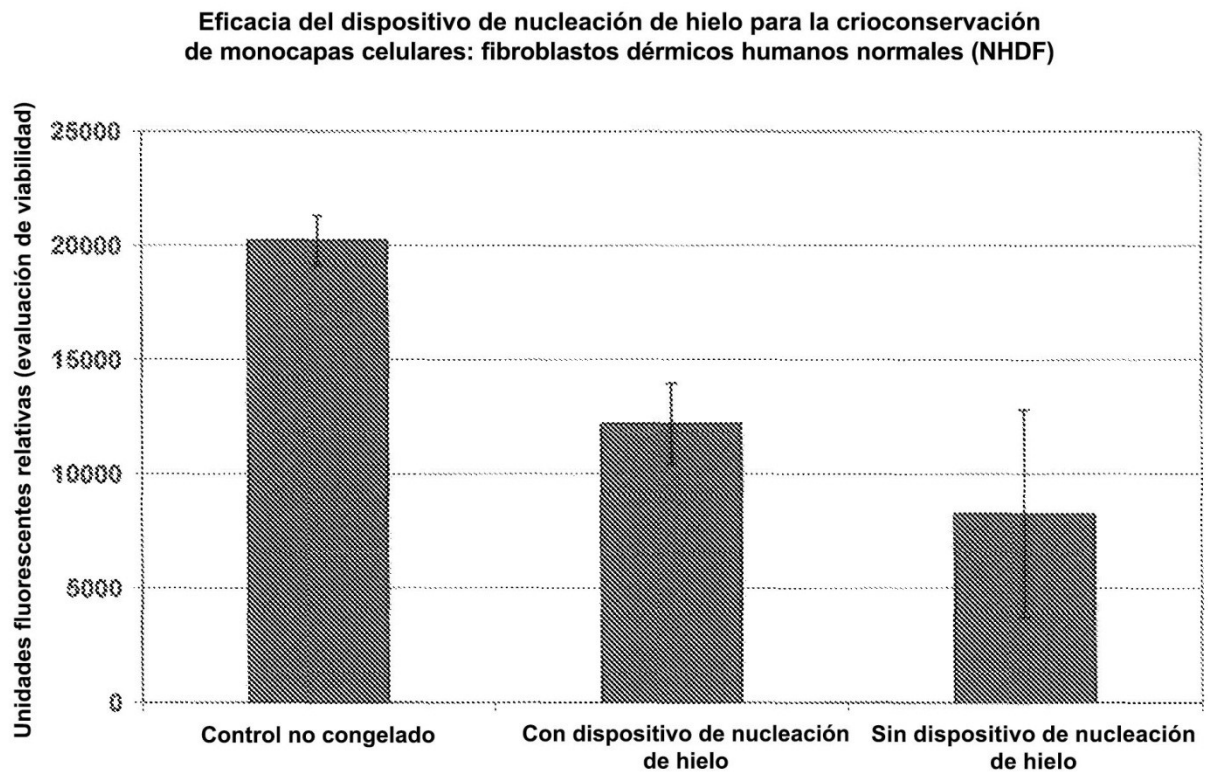


FIG. 8

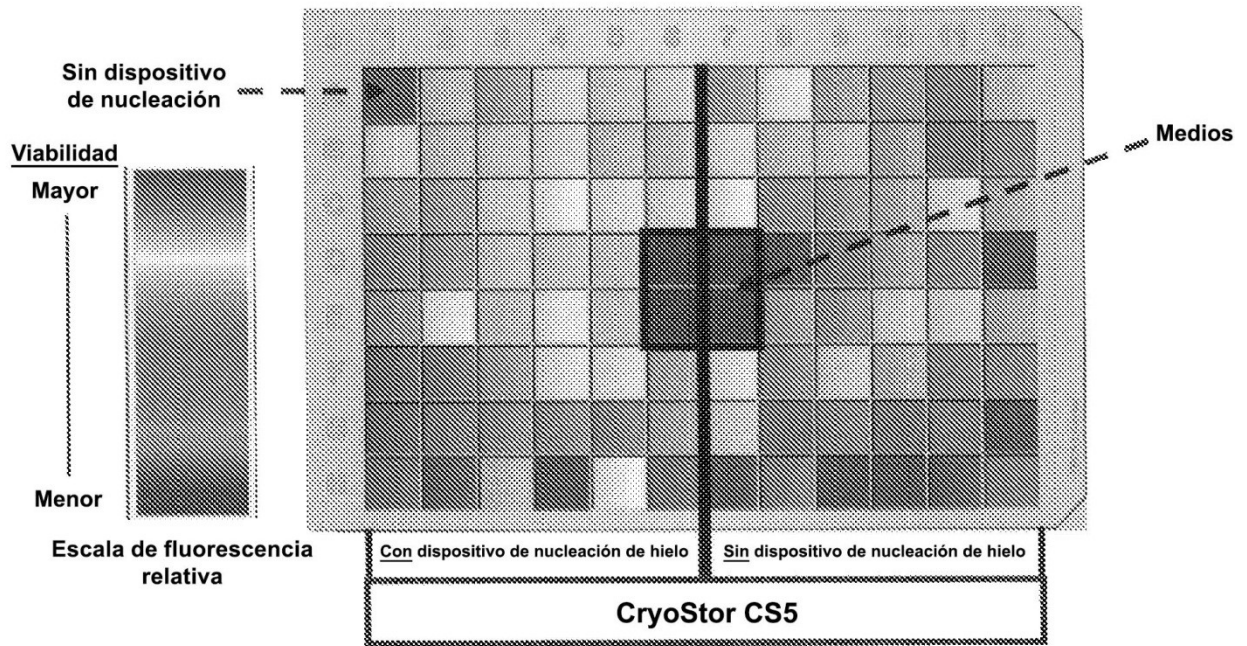


FIG. 9

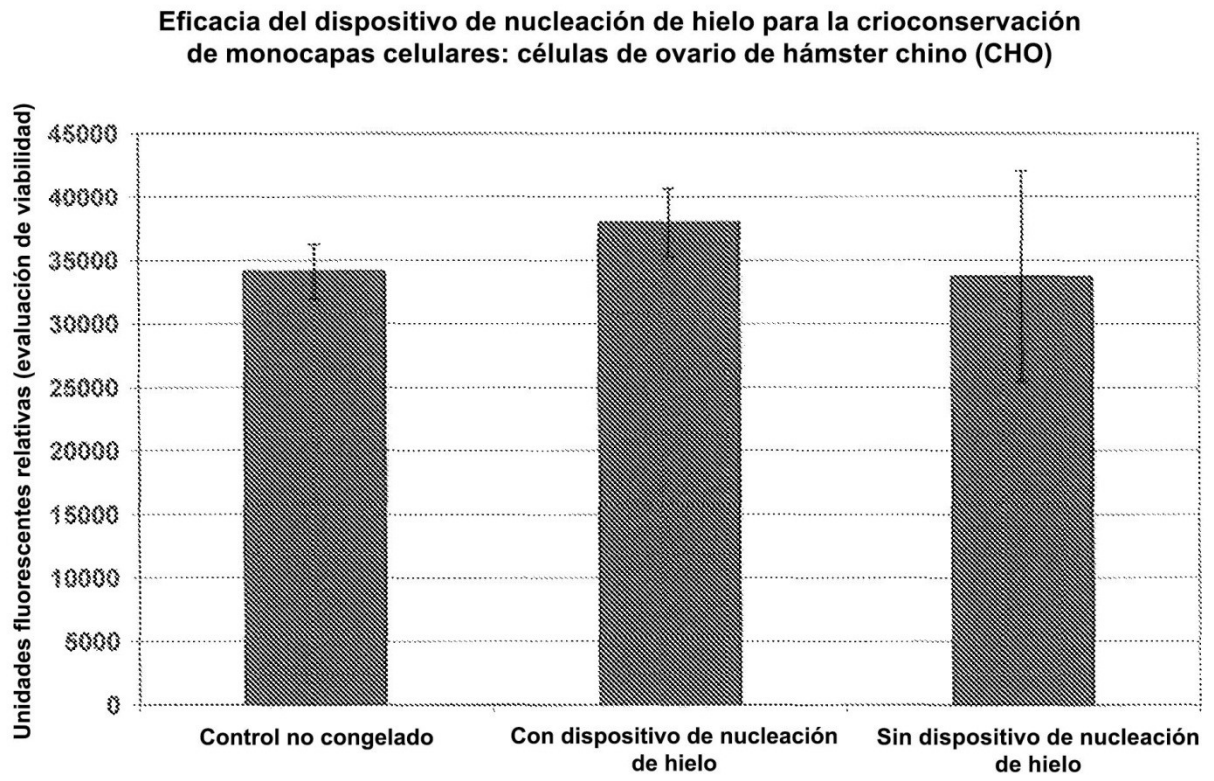


FIG. 10

A. Espiga de un solo cono

B. Matriz de baja densidad

C. Matriz de alta densidad

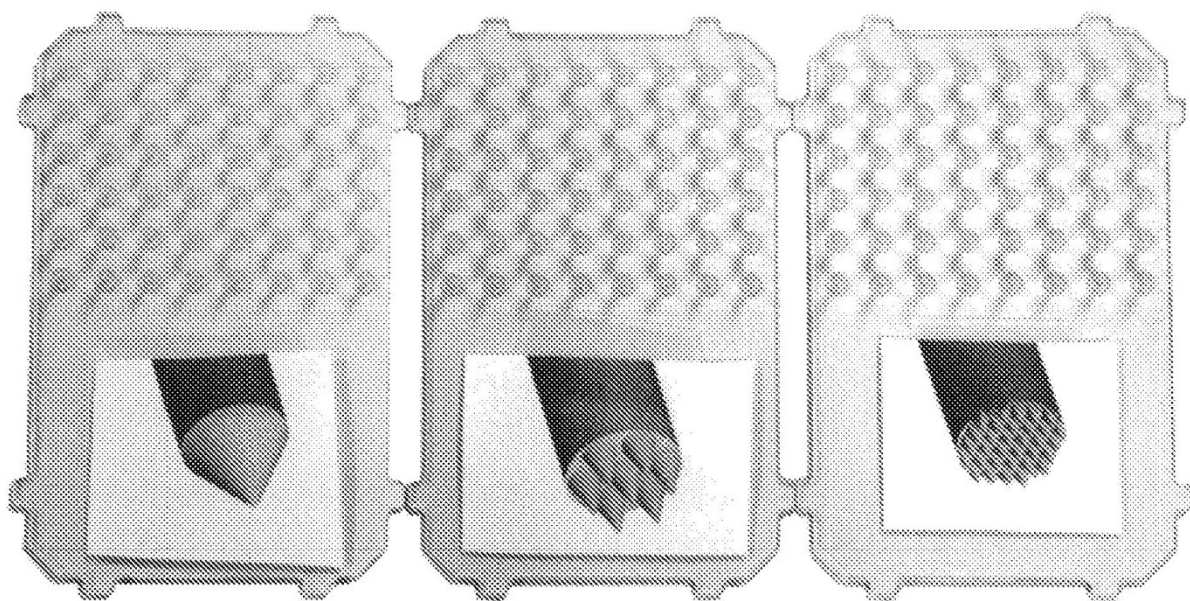


FIG. 11

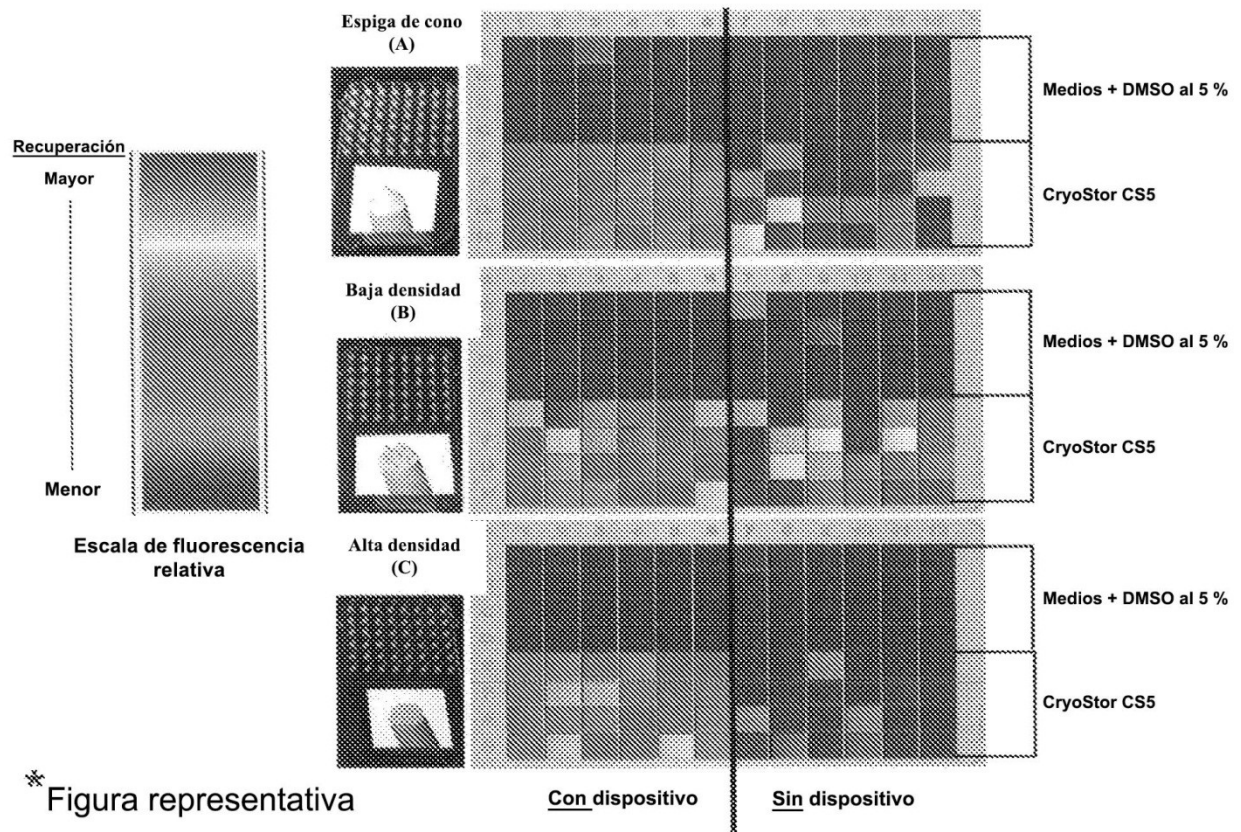


FIG. 12

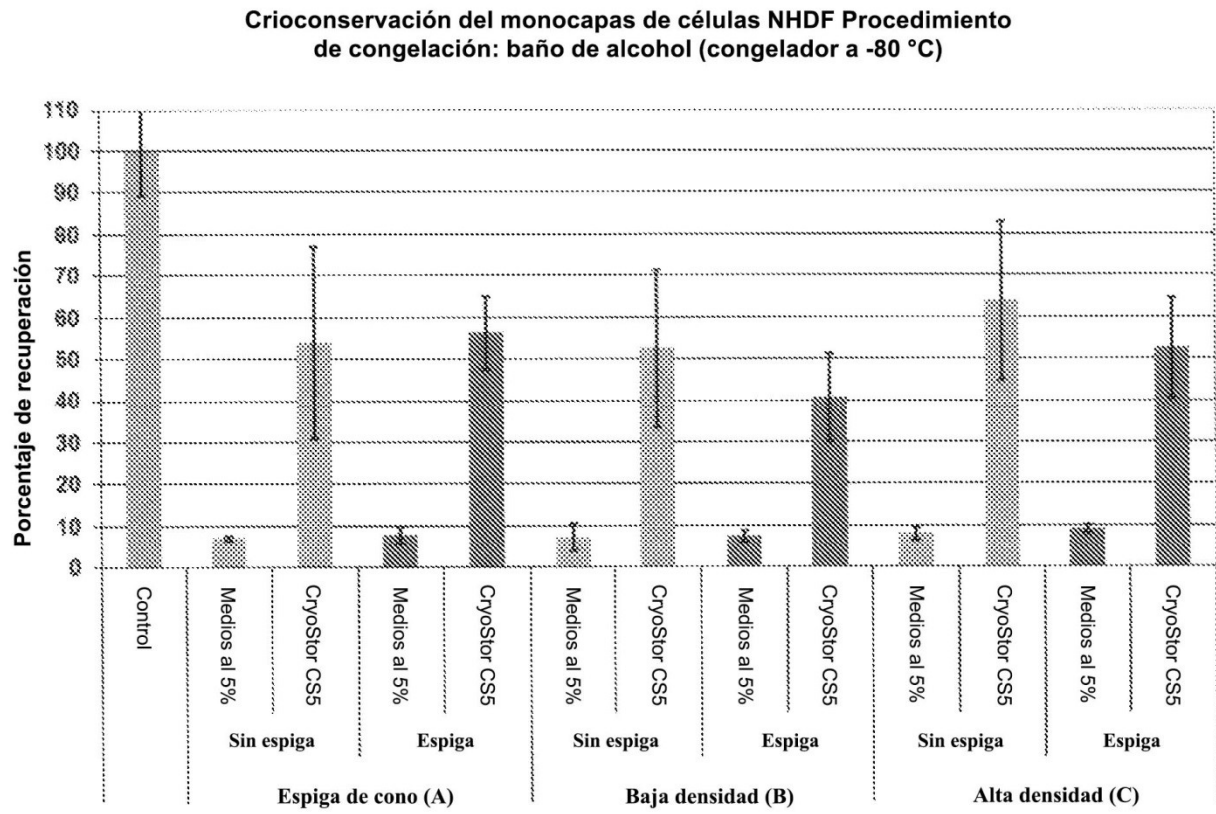


FIG. 13

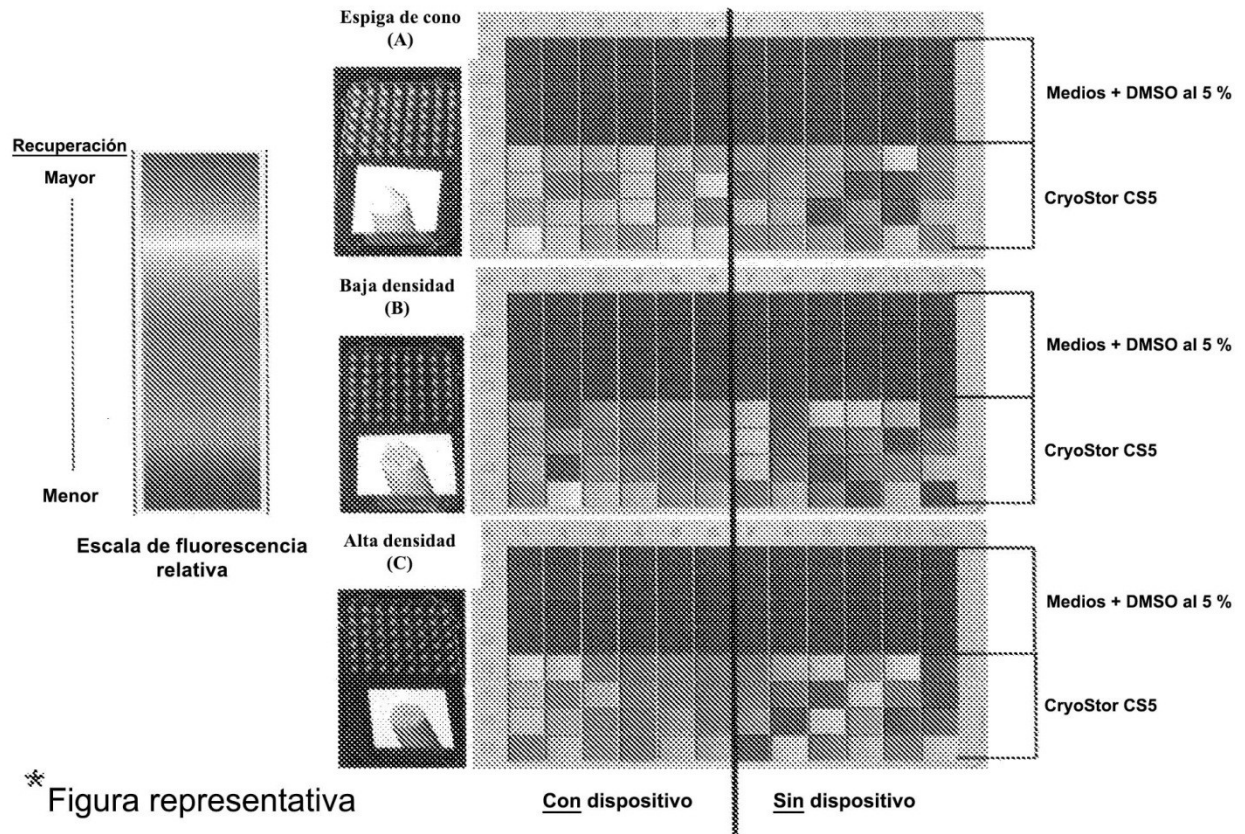


FIG. 14

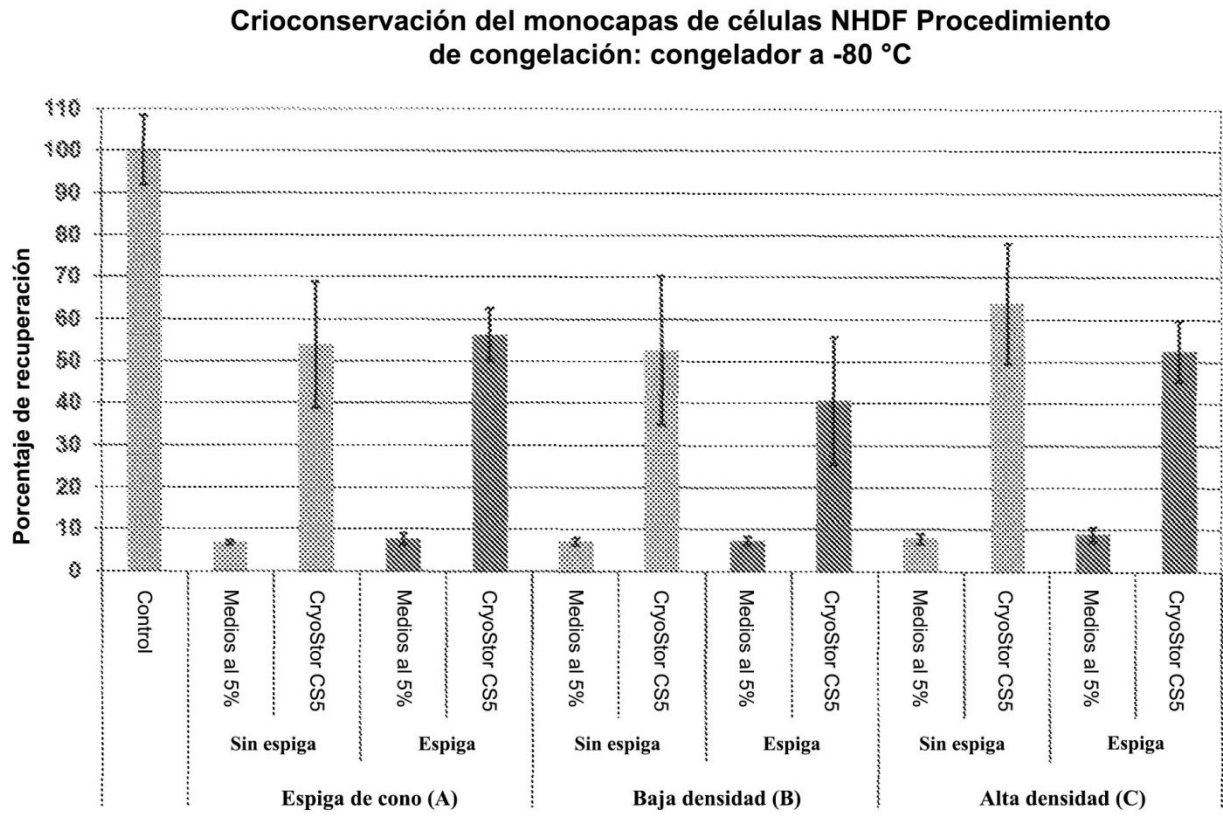


FIG. 15

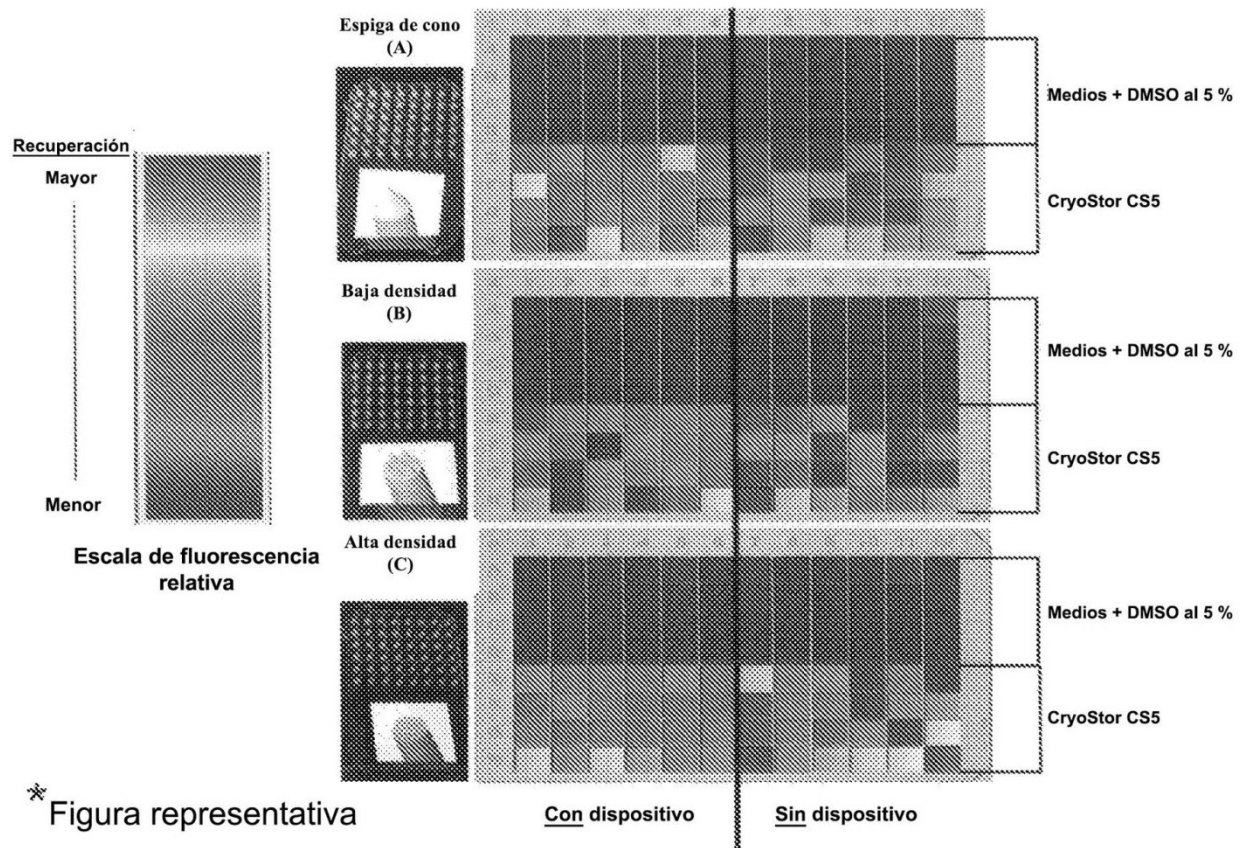


FIG. 16

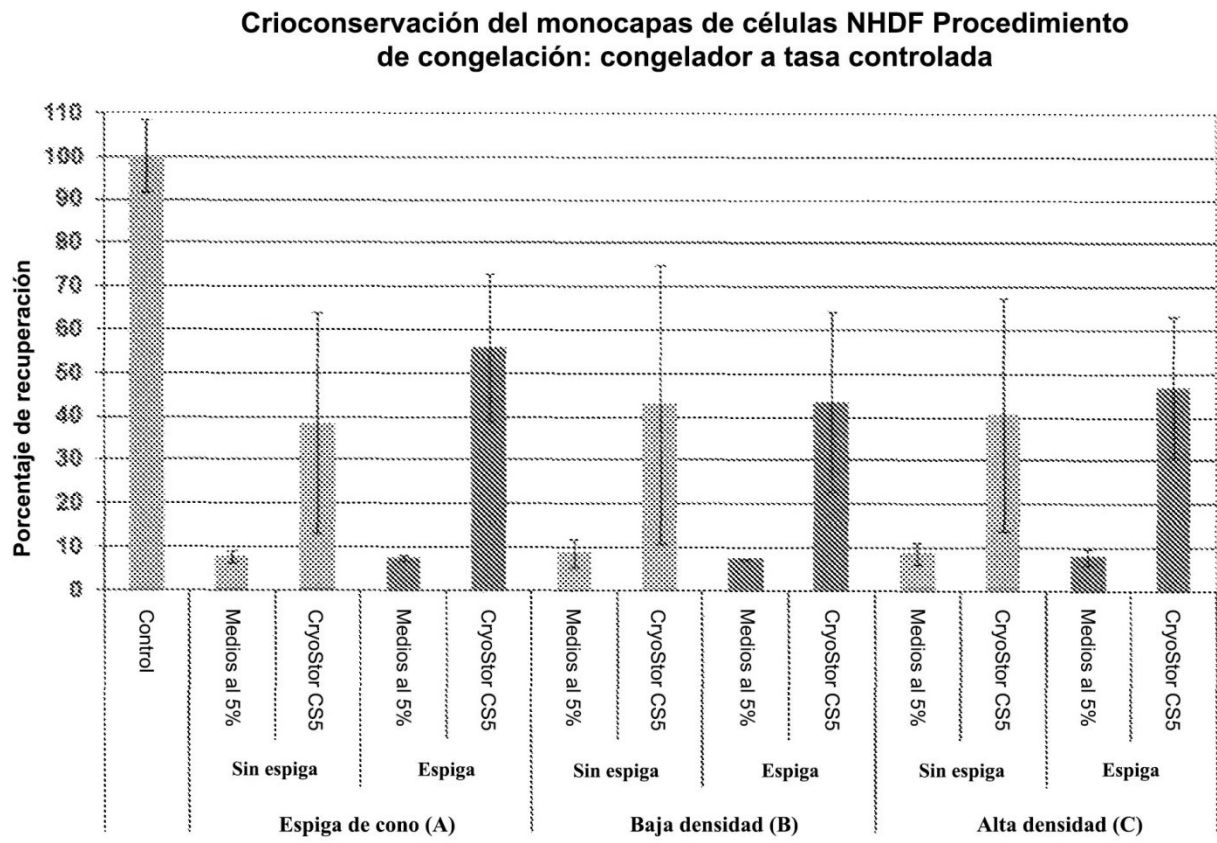


FIG. 17

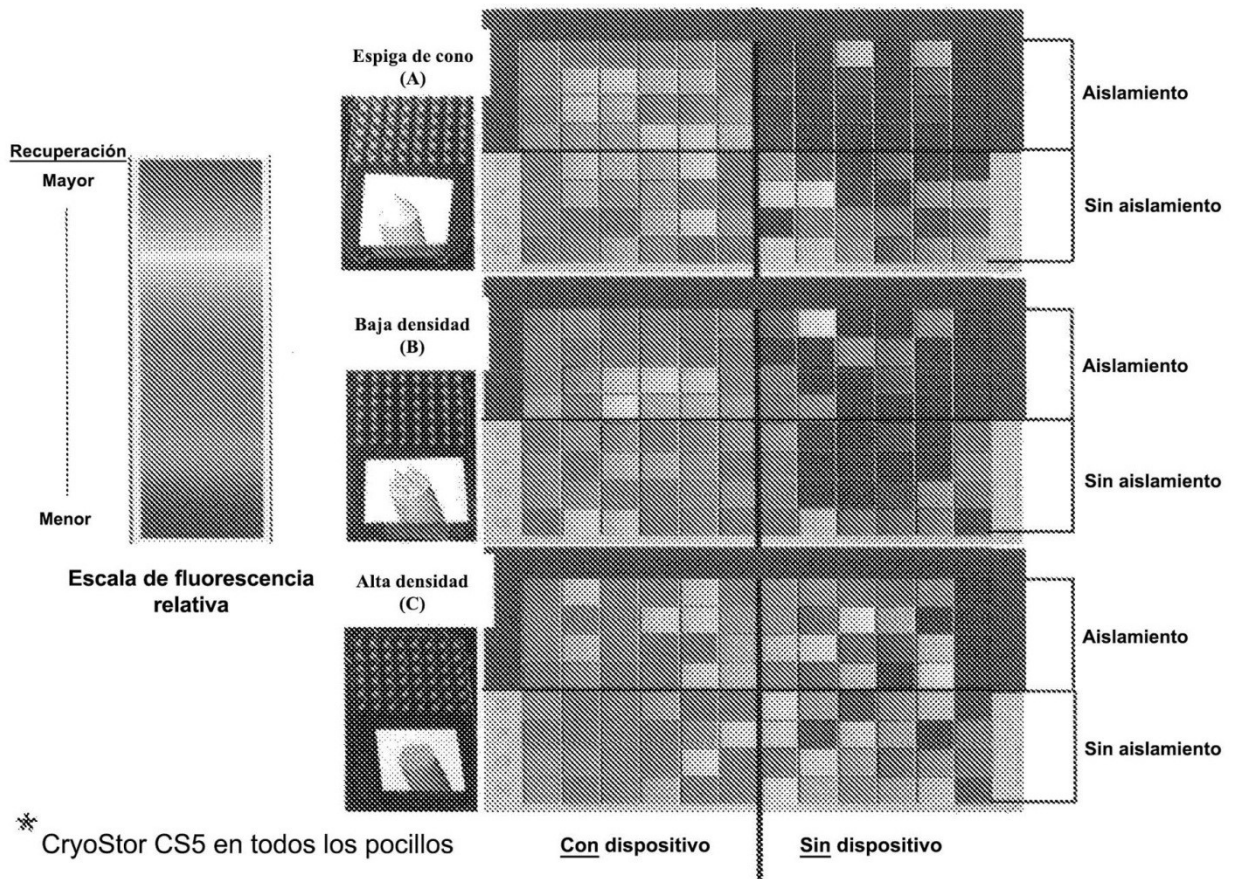


FIG. 18

