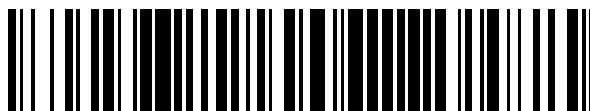


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 857**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 15166004 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2933325**

54 Título: **Colector para sistema de cultivo celular de múltiples capas de acceso limitado**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 62404 P

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

24.03.2020

73 Titular/es:

CORNING INCORPORATED (100.0%)

1 Riverfront Plaza

Corning, New York 14831, US

72 Inventor/es:

MARTIN, GREGORY y

TANNER, ALISON

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 749 857 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

Colector para sistema de cultivo celular de múltiples capas de acceso limitado

Campo

5 La presente invención se relaciona en general con un sistema para contener células en cultivo. Más específicamente, la presente invención se relaciona con dispositivos para contener células en cultivo los cuales permiten la contención controlada estéril y transferencia estéril de células y medios dentro y fuera del dispositivo.

Antecedentes

10 El cultivo in vitro de células proporciona material necesario para la investigación en farmacología, fisiología, y toxicología. Avances recientes en las técnicas de cribado farmacéutico permiten a las compañías farmacéuticas cribar rápidamente grandes bibliotecas de compuestos contra objetivos terapéuticos. Estas técnicas de cribado a gran escala requieren grandes números de células cultivadas y mantenidas in vitro. Mantener estos grandes números de células requiere grandes volúmenes de reactivos y medios de crecimiento celular y grandes números y tipos de contenedores de cultivo celular de laboratorio y equipos de laboratorio. Esta actividad también es labor intensiva.

15 Las células crecen en contenedores especializados de cultivo celular que incluyen botellas giratorias, platos y placas de cultivo celular, placas de multipozo, placas de microtitulación, matraces comunes y matraces y recipientes de crecimiento celular en múltiples capas. Las células en cultivo se unen a y crecen en las superficies inferiores del matraz, sumergidas en un medio de sostenimiento adecuado.

20 Con el advenimiento de aplicaciones de alto rendimiento basadas en células, los recipientes de cultivo celular se han desarrollado para proporcionar un área de superficie aumentada para el crecimiento celular mientras que también proporcionan intercambio necesario de gas. Estos sistemas también emplean recipientes de cultivo celular tradicionales que incluyen matraces comunes, botellas giratorias, platos de cultivo celular, así como recipientes de crecimiento celular en múltiples capas que incluyen matraces de múltiples capas, platos de cultivo celular de múltiples capas, biorreactores, bolsas de cultivo celular y similares, que pueden incluir superficies especializadas diseñadas para mejorar los parámetros de cultivo celular incluyendo densidad de crecimiento y factores de diferenciación.

25 Además, las aplicaciones de alto rendimiento basadas en células se han automatizado. La automatización permite la manipulación del recipiente de cultivo celular al igual que la realizada por el operador manual. Adicionalmente, los recipientes de matraz que tienen múltiples capas de superficies de crecimiento celular son capaces de producir mayores rendimientos de células adherentes que los matraces comúnmente conocidos que permiten crecimiento de células en una única pared inferior. Aunque estos recipientes de múltiples capas permiten el crecimiento de grandes
30 números de células, presentan desafíos especiales en el uso diario.

Hay una necesidad de un recipiente de cultivo celular que pueda proporcionar un dispositivo para dirigir el fluido dentro y fuera de un recipiente de cultivo celular de una forma que pueda automatizarse y que mejore la esterilidad de la transferencia. Además, hay una necesidad de un dispositivo tal que pueda ser adecuado para uso en el desempeño de aplicaciones de ensayo de alto rendimiento que comúnmente emplean manipulación robótica.

35 El documento US 7,293,675 B1 se relaciona con un colector para uso en un sistema dispensador de bebidas.

El documento US 4,215,721 se relaciona con un sistema modular de selección y suministro de componentes de múltiples fluidos.

40 El documento US 5,478,119 se relaciona con un dispositivo de conexión de colector polarizado para conectar múltiples conductos desde un manguito de compresión que tiene cámaras inflables a múltiples tuberías desde una fuente de fluido presurizado.

El documento US 2007/026516 A1 se relaciona con un aparato de cultivo celular en múltiples capas.

Resumen de la invención

45 Aspectos de la presente divulgación proporcionan un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas que tiene al menos tres cámaras de cultivo celular y al menos dos cámaras traqueales integrales, teniendo cada cámara de cultivo celular al menos un puerto, teniendo cada puerto una cubierta de puerto donde cada puerto está estructurado y dispuesto para acoplarse con una cubierta de puerto para proporcionar un sello liberable estanco al líquido. La cubierta de puerto puede estar unida al dispositivo de cultivo celular de múltiples capas mediante un conector, el cual puede ser un conector con bisagras. En realizaciones, la cubierta de puerto puede tener un septum. El septum puede permitir que un dispositivo de flujo de fluido, introducido a través del septum, forme un sello estanco al líquido entre el
50 dispositivo de flujo de fluido y el puerto. En realizaciones, el dispositivo de flujo de fluido puede ser una aguja, una pipeta o punta de pipeta, un tubo o una cánula. En realizaciones, el puerto puede tener un sellador el cual puede ser una estructura anular para permitir que una cubierta de puerto se conecte a una estructura complementaria en el puerto para formar un sello reversible estanco al líquido.

5 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un dispositivo de cultivo celular que tiene al menos un puerto y que tiene una cubierta de puerto deslizante estructurada y dispuesta para acoplarse con él al menos un puerto para proporcionar ya sea un puerto abierto o uno cerrado mediante el acoplamiento deslizante de la cubierta de puerto en una posición abierta o una posición cerrada en relación con el al menos un puerto. En realizaciones, la cubierta de puerto deslizante se puede conectar al dispositivo de cultivo celular mediante un conector tal como un conector con bisagras, o la cubierta de puerto deslizante puede ser integral con el dispositivo de cultivo celular.

10 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un recipiente de cultivo celular que tiene al menos tres cámaras rígidas de cultivo celular, teniendo cada cámara de cultivo celular al menos un puerto; en donde el al menos un puerto tiene una característica macho sobresaliente estructurada y dispuesta para acoplarse con un dispositivo de flujo de fluido hembra. En realizaciones adicionales, el recipiente de cultivo celular tiene al menos un puerto que tiene una característica hembra estructurada y dispuesta para acoplarse con una estructura macho de un dispositivo de flujo de fluido. En realizaciones adicionales, el recipiente de cultivo celular tiene algunos puertos con estructuras macho y algunos puertos con estructuras hembra para acoplarse con estructuras complementarias de dispositivos de flujo de fluido.

15 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas que tiene al menos tres cámaras de cultivo celular y al menos dos cámaras traqueales integrales, teniendo cada cámara de cultivo celular al menos un puerto y un colector extraíble estructurado y dispuesto para formar un sello estanco al líquido con él al menos un puerto. En realizaciones adicionales, el colector tiene una válvula. En aún realizaciones adicionales, el colector está estructurado y dispuesto para acoplarse con al menos un puerto de más de un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas, o para acoplar un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas con un depósito de líquido.

25 La presente invención proporciona un sistema de cultivo celular que comprende un primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas, un segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas y un colector que tiene al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas y al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas. Cuando el colector se acopla con las al menos dos cámaras de cultivo celular del primer sistema de cultivo celular de múltiples capas y las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo sistema de cultivo celular de múltiples capas, el fluido puede pasar de las al menos dos cámaras de cultivos celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas a las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas. Adicionalmente, la presente divulgación proporciona un sistema de cultivo celular que tiene al menos un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas que tiene al menos dos cámaras de cultivo celular, al menos un colector externo que tiene un cuerpo colector y al menos dos dispositivos de flujo de fluido estructurados y dispuestos que proporcionan el flujo de fluido entre el al menos un colector externo y las al menos dos cámaras de cultivo celular del dispositivo de cultivo celular de múltiples capas; en donde el fluido fluye hacia el colector externo y se agrupa en el cuerpo de colector antes de ser distribuido a los al menos dos dispositivos de flujo de fluido que permiten que el fluido fluya entre el al menos un colector externo y las al menos dos cámaras de cultivo celular en paralelo.

Breve descripción de los dibujos

40 La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee con las figuras de dibujos acompañantes.

La figura 1 es una vista en perspectiva en corte parcial de una realización de la presente divulgación.

Las figuras 2A, 2B y 2C son ilustraciones de realizaciones de puertos y cubiertas de puertos de la presente divulgación.

La figura 3 es una ilustración de otra realización de un puerto y cubierta de puerto deslizante de la presente divulgación.

45 La figura 4 es una ilustración de tres realizaciones del conector de la presente divulgación.

Las figuras 5A y 5B son ilustraciones de realizaciones de los selladores de la presente divulgación.

La figura 6 es una ilustración de realizaciones del matraz de cultivo celular de múltiples capas de la presente divulgación que ilustra puertos y puertos acoplados a dispositivos de flujo de fluido de la presente divulgación.

La figura 7 es una ilustración de realizaciones de puertos y acoplamientos de puertos de la presente divulgación.

50 Las figuras 8A, 8B y 8C son ilustraciones de realizaciones de la cánula de la presente divulgación.

Las figuras 9A, 9B y 9C son ilustraciones de una realización de un colector de la presente divulgación, que muestran realizaciones de válvulas de la presente divulgación.

La figura 10 es una ilustración de una realización del colector de la presente divulgación que muestra el acoplamiento de los dispositivos de flujo de fluido de la presente invención al colector de la presente divulgación.

Las figuras 11A y 11B son ilustraciones de una realización del colector de la presente divulgación.

Las figuras 12A y 12B son ilustraciones de realizaciones de la válvula del colector de la presente divulgación.

Las figuras 13A y 13B son ilustraciones adicionales de realizaciones de la válvula del colector de la presente divulgación.

5 La figura 14 es una ilustración de una realización del colector de la presente divulgación.

La figura 15 es una ilustración adicional de una realización del colector de la presente divulgación.

La figura 16 es una ilustración adicional de una realización del colector de la presente divulgación.

La figura 17 es una ilustración de un matraz de múltiples capas de la presente divulgación y su acoplamiento con una realización de un colector de la presente divulgación.

10 La figura 18 es una ilustración de dos matraces de múltiples capas usados en la presente invención y su acoplamiento con una realización de un colector como se usa en la presente invención.

La figura 19 es una ilustración de un matraz de múltiples capas de la presente divulgación y su acoplamiento con una realización de un colector de la presente divulgación.

15 La figura 20 es una vista en perspectiva de una realización de la presente divulgación que muestra una divulgación del colector de la presente invención vinculado a un contenedor.

Descripción detallada

Realizaciones de la presente invención se relacionan con un sistema de cultivo celular como se define en las reivindicaciones.

20 El dispositivo de cultivo celular de la presente invención tiene un primer y un segundo dispositivo de cultivo celular que comprenden cada uno múltiples capas de cámaras de crecimiento celular en un dispositivo integral de cultivo celular de múltiples capas. El dispositivo también tiene un colector que comprende al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas y al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas. Cuando el colector se acopla con las al menos dos cámaras de cultivo celular del primer sistema de cultivo celular de múltiples capas y las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo sistema de cultivo celular de múltiples capas, el fluido puede pasar de las al menos dos cámaras de cultivo celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas a las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas.

30 En la siguiente descripción detallada, por propósitos de explicación y no de limitación, se describen realizaciones de ejemplo que divulgan detalles específicos con el fin de proporcionar un entendimiento exhaustivo de los principios subyacentes a la presente invención. Sin embargo, será evidente para uno que tenga experiencia normal en la técnica que la presente invención se puede practicar en otras realizaciones que se apartan de los detalles específicos divulgados aquí. En otros casos, se pueden omitir descripciones detalladas de dispositivos y métodos bien conocidos de tal manera que no se oscurezca la descripción de la presente invención.

35 Cada vez más, los cultivos celulares, particularmente cultivos celulares adherentes, crecen en contenedores de alta densidad apilados, que ahorran espacio lo cual minimiza el espacio de incubadora y maximiza la superficie de crecimiento de cultivo celular. Véase, por ejemplo, Publicación US No. 2007/0026516. A medida que los contenedores de cultivo celular se vuelven cada vez más eficientes, y los espacios dentro de ellos se vuelven cada vez más restringidos, el uso práctico de estos contenedores se complica por la necesidad de mover pequeñas cantidades de líquidos dentro y fuera de estos contenedores.

40 Mantener la esterilidad de estos contenedores de alta densidad y el fluido y células contenidos dentro de ellos es de máxima importancia. Por ejemplo, los recipientes usados para expandir y tratar células en cultivo requieren que las células crezcan en un sistema estéril. Una forma de optimizar la esterilidad de un contenedor de cultivo celular es proporcionar un sistema de cultivo celular de acceso cerrado o limitado. Un sistema cerrado puede mantener la integridad de las células en cultivo y prevenir la contaminación. Las células en cultivo para uso terapéutico pueden ser únicas de un individuo, y pueden requerir condiciones para promover la proliferación y tratamiento médico específico sin contaminación. Los recipientes de cultivo celular pueden tener tapas que se eliminan alternativamente y se aplican para acceder al recipiente de cultivo celular, por ejemplo, para agregar o eliminar células o medios de cultivo. O, 45 alternativamente, los recipientes de cultivo celular pueden tener un septum en vez de tapa. La contaminación de cultivo puede resultar del material empujado en el recipiente desde el exterior a medida que se perfora el septum. Se puede minimizar el riesgo de contaminación al minimizar el acceso a las cámaras de cultivo celular. Por ejemplo, si un contenedor de cultivo celular se esteriliza, y todas las partes de interconexión que entran en contacto con el contenedor de cultivo celular se esterilizan, y las manipulaciones del contenedor de cultivo celular y las partes de interconexión se 50

minimizan y ocurren en un entorno aséptico, tal como una campana o un recinto de flujo de aire laminar, se reduce el riesgo de contaminación. Los materiales y métodos adicionales que disminuyen los riesgos de contaminación se discutirán a continuación.

5 Los contenedores de cultivo celular de múltiples capas deben permitir la entrada y salida de células y medios de cultivo celular dentro y fuera de las cámaras de cultivo celular. Hay una necesidad de facilitar el movimiento de fluidos dentro y fuera de contenedores de cultivo celular de múltiples capas de una forma que mantenga la esterilidad y minimice los derrames, mientras que también minimiza la huella del matraz de múltiples capas. Minimizar la huella de estos matraces y contenedores permite la utilización aumentada de espacio en incubadoras, así como en el almacenamiento y envío. Además, hay una necesidad de proporcionar a estos contenedores de cultivo celular en multinivel con características que soporten procesos automatizados o robóticos.

10 En realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un matraz de múltiples capas. Una realización del matraz 100 de múltiples capas de la presente divulgación se ilustra en la vista en perspectiva en corte parcial que se muestra en la figura 1. El matraz 100 de múltiples capas tiene un cuerpo 101 de recipiente exterior definido por una placa 110 superior, una bandeja inferior (no se muestra), paredes laterales 112, y paredes 114 de extremo. Dispuestas dentro del matraz 100 están las cámaras 111 de crecimiento celular individuales como se puede ver más claramente en la porción en corte de la figura 1. Las cámaras 111 de crecimiento celular individuales están definidas cada una por una superficie 113 inferior y una superficie 115 superior. Las superficies 113 y 115 están unidas al cuerpo 101 de matraz a lo largo de las paredes laterales 112 y las paredes 114 de extremo. Preferiblemente, al menos una superficie 113 inferior dentro de cada cámara 111 es un material permeable al gas, impermeable al líquido capaz de proporcionar una superficie para el crecimiento de células 117. El material permeable al gas, impermeable al líquido puede proporcionar la superficie sobre la cual se unen las células, o el suelo de la cámara de crecimiento celular, o puede ser la superficie opuesta, o el techo de la cámara de crecimiento celular. La superficie 113 inferior, o la superficie 113 de cultivo celular puede ser flexible o rígida. Cada superficie 115 superior es preferiblemente un material rígido, en general impermeable al gas que proporcionará soporte a la cámara 111 de crecimiento celular. Las superficies del matraz de múltiples capas pueden ser transparentes, opacas, de color o incoloras. En una realización de la presente divulgación, hay espacios 118 traqueales entre cada cámara 111 de crecimiento celular. La superficie 115 superior opuesta de la cámara 111 define una pared superior a la cámara 111 de crecimiento celular, así como una porción inferior de una cámara 118 traqueal. Por lo tanto, la cámara 118 traqueal incluye una superficie 113 permeable al gas, impermeable al líquido de una primera cámara de crecimiento celular y una superficie 115 opuesta de una segunda cámara 111 de crecimiento. Los soportes 119 también pueden estar presentes para proporcionar soporte estructural para incorporar integralmente las superficies 113 y 115 en la formación de cámaras 111 de crecimiento en alternancia con espacios 118 traqueales dentro del matraz 101 unitario. Por lo tanto, cada cámara 111 de crecimiento celular alterna con una cámara 118 traqueal en orientación vertical sucesiva.

35 En una realización de la presente divulgación, las cámaras 111 de crecimiento celular individuales permiten el crecimiento celular en membranas 113 permeables al gas de tal manera que las cámaras 111 de crecimiento celular múltiples son integrales con el cuerpo 101 del matraz 100 de múltiples capas y pueden ser llenadas completamente con medios nutritivos para el crecimiento de células. La serie de espacios 118 de aire traqueal a través del matraz 100 de múltiples capas proporciona comunicación gaseosa entre las células 117 que crecen en superficies 113 permeables al gas, en medios 127 en las cámaras 111 de crecimiento celular individuales dentro del matraz de múltiples capas, y el entorno externo. Los espacios 118 traqueales permiten oxigenación de medios ubicados dentro de las cámaras 111 de crecimiento celular a través de las superficies 113 permeables al gas. Adicionalmente, las cámaras 118 traqueales pueden tomar la forma de cualquier brecha o espacio de aire, y no permiten la entrada de líquido. Como un resultado, un matraz 100 de múltiples capas de cultivo celular rígido que tiene múltiples cámaras 111 de crecimiento, que alterna con espacios 118 traqueales, se construye de manera cooperativa para proporcionar el beneficio de distribución gaseosa equivalente a un gran volumen de células 117.

50 La membrana 113 permeable al gas se puede fijar a soportes 119 y paredes 112 laterales mediante cualquier número de métodos que incluyen, pero no se limitan a unión adhesiva o solvente, sellado por calor o soldadura, compresión, soldadura ultrasónica, soldadura láser y/o cualquier otro método comúnmente usado para generar sellos entre las partes. Se prefiere la soldadura láser alrededor de la circunferencia de la membrana 113 para establecer un sello hermético alrededor de la región de membrana de tal manera que la membrana esté a nivel y fusionada con la cara de los soportes 119 tal que se convierta en una porción integral de la superficie interior del matraz de múltiples capas. Una vez que la membrana 113 permeable al gas se adhiere a las paredes laterales y paredes de extremo, la placa 110 superior y bandeja 120 inferior pueden unirse. La bandeja 120 inferior y placa 110 superior pueden moldearse por inyección. Se pueden incorporar diversos tamaños y formas de los soportes 119 para facilitar el posicionamiento de las capas 113 membranosas para el cultivo 117 celular dentro del recipiente 100 de cultivo celular.

60 Las membranas 113 permeables al gas, impermeables al líquido (véase figura 1) pueden estar hechas de una o más membranas conocidas en la técnica. Las membranas están hechas típicamente de materiales adecuados que pueden incluir, por ejemplo: poliestireno, polietileno, policarbonato, poliolefina, etilen vinil acetato, polipropileno, polisulfona, politetrafluoroetileno (PTFE) o fluoropolímero compatible, un caucho o copolímero de silicona, poli(estireno-butadienoestireno) o combinaciones de estos materiales. A medida que lo permite la fabricación y compatibilidad para el crecimiento de células, se pueden utilizar diversos materiales poliméricos. Por su competencia conocida, entonces, el poliestireno puede ser un material preferido para la membrana (de aproximadamente 0.003 pulgadas de grosor,

aunque diversos grosores también son permisivos para el crecimiento celular). Como tal, la membrana puede ser de cualquier grosor, preferiblemente entre aproximadamente 25 y 250 micras, pero idealmente entre aproximadamente 25 y 125 micras.

5 El matraz 100 de múltiples capas de la presente divulgación puede hacerse mediante cualquier número de métodos de fabricación aceptables bien conocidos por los experimentados en la técnica. En una realización de un método, el matraz 100 de múltiples capas se ensambla a partir de una recolección de partes moldeadas por inyección por separado. Aunque se puede usar cualquier polímero (tal como poliestireno, policarbonato, acrílico, poliestireno, o poliéster) adecuado para moldeo y comúnmente utilizado en la fabricación de artículos para laboratorio, se prefiere poliestireno. Aunque no es necesario, por claridad óptica, es ventajoso mantener un grosor de no mayor de 2 mm. Las partes separadas pueden ensamblarse mediante cualquier número de métodos que incluyen, pero no se limitan a: unión adhesiva o solvente, sellado por calor o soldadura, compresión, soldadura ultrasónica, soldadura láser y/o cualquier otro método comúnmente usado para generar sellos entre partes de tal manera que se convierte en una porción integral de la superficie interior del matraz de múltiples capas. La placa 110 superior y bandeja inferior se pueden alinear y unir, tal como mediante soldadura láser.

15 En una realización, las partes se mantienen juntas y están unidas por adhesivo a lo largo de la costura, soldadas por ultrasonidos, o soldadas con láser, unidas usando platinas de calor o mediante cualquier otro método. Preferiblemente, el equipo de soldadura láser se utiliza en un sistema de ensamblaje de manera parcial o totalmente automatizado. La placa superior y bandeja están alineadas correctamente mientras se hace una soldadura con láser a lo largo de la periferia exterior de la junta.

20 Ventajosamente y con el fin de mejorar la unión y crecimiento celular, las superficies internas del matraz 100 de múltiples capas, incluyendo la capa de membrana, pueden tratarse para permitir crecimiento celular. El tratamiento puede lograrse mediante cualquier número de métodos conocidos en la técnica los cuales incluyen descarga de plasma, descarga de corona, descarga de plasma de gas, bombardeo iónico, radiación ionizante, y luz UV de alta intensidad.

25 En una realización alternativa, una cámara de crecimiento celular individual puede estar limitada en un lado por una capa de membrana 110 permeable al gas, unida de una manera impermeable al líquido a las paredes laterales 112 y en el otro lado por una superficie superior que es una capa rígida, para proporcionar un elemento más rígido para la cámara 111 de crecimiento de cultivo celular individual y el matraz en múltiples capas en conjunto. Por ejemplo, una cámara 111 de crecimiento celular individual, limitada en un lado superior por una capa 115 rígida, en sus bordes por lados, y en un lado inferior por una membrana permeable al gas. Esta cámara 111 de crecimiento celular individual se puede apilar en la parte superior de otra cámara 111 de crecimiento celular individual tal, donde la porción superior de una capa 115 rígida de una cámara 111 de crecimiento celular individual forma una estructura de soporte que define los espacios traqueales debajo de una membrana permeable 113 al gas de la cámara adyacente de crecimiento celular individual. En una realización, las cámaras de cultivo celular individuales pueden ensamblarse en un recipiente de cultivo celular de múltiples capas más grande. Estas capas individuales se pueden encajar juntas, o unir de otra forma entre sí usando cualquier método de unión conocido en la técnica.

La figura 1 ilustra capas alternas de espacios 118 de aire traqueal y cámaras 111 de crecimiento celular individuales que forman el interior de matraz 100. Las cámaras 111 de crecimiento celular individuales están definidas por membranas 113 impermeables al líquido, permeables al gas unidas de una manera impermeable al líquido a las paredes laterales y paredes de extremo del recipiente de cultivo celular. El medio 127 de crecimiento celular está contenido entre las membranas 113 y las células crecen en la superficie líquida de estas membranas 113. En esta realización, la cámara 111 de crecimiento celular puede estar formada por dos capas de membrana permeable al gas unidas de una manera impermeable al líquido a las paredes laterales 112 para formar una cámara 111 de crecimiento celular individual. Los espacios 118 de aire traqueal forman capas entre las membranas permeables al gas, formando bolsas de aire para permitir que las membranas 113 permeables al gas intercambien aire en el medio 127 de crecimiento celular. En esta realización, los espacios de aire traqueal están soportados mediante soportes 119 los cuales separan y soportan las capas de la membrana 113 permeable al gas las cuales forman cámaras 111 de crecimiento celular individuales. Una ventaja de esta realización del matraz de múltiples capas que es compatible con una realización del colector de la presente divulgación es su capacidad mejorada para hacer crecer células en una superficie opuesta cuando el matraz de múltiples capas se gira 180°. De este modo, cuando se gira el matraz de múltiples capas, las células se pueden cultivar en una superficie 113 alternativa de membrana permeable al gas. Donde solo las membranas permeables al gas están en capas intermedias al matraz de múltiples capas, el crecimiento celular está por lo tanto habilitado en ambas de sus superficies 113 permeables al gas. La membrana 113 permite el libre intercambio de gases entre la cámara 111 de crecimiento de cultivo celular individual y espacios 118 traqueales. Una realización preferida incluiría una membrana 113 que es adicionalmente duradera para la fabricación, manejo, y manipulación del matraz de múltiples capas.

La accesibilidad a las cámaras 111 de crecimiento celular se logra a través de puertos 120 que se extienden a través de una superficie externa de una cámara de crecimiento celular, para crear una abertura o un espacio de paso a través de una superficie de una cámara 111 de crecimiento celular. Aunque se muestra el puerto 120 extendiéndose a través de una pared lateral en la figura 1, el puerto 120 puede estar ubicado en una pared de extremo o en cualquier otra superficie de la cámara 111 de crecimiento celular. En las realizaciones de la presente divulgación, cada cámara 111

de crecimiento celular tiene al menos un puerto 120 que permite el acceso a cada cámara de cultivo celular. En realizaciones, puede estar presente más de un puerto 120 en cada cámara de cultivo celular para permitir que el fluido ingrese en una cámara 111 de cultivo celular a través de un puerto 120 mientras el gas desplazado sale de la cámara de cultivo celular a través de otro puerto 120. Se muestra una cubierta 121 de puerto en la figura 1. En esta realización, la cubierta de puerto es un tapón. Sin embargo, realizaciones adicionales de la cubierta de puerto se discutirán y divulgarán a continuación. En realizaciones, la cubierta 121 de puerto puede tener un septum para prevenir la contaminación de los contenidos de las cámaras de cultivo celular. En realizaciones, los puertos 120 pueden tratarse con una capa de material para mejorar las capacidades estancos al agua de los puertos. Estos materiales pueden permitir que sean más susceptibles de formar sellos estancos al líquido con cánula introducida en ellos, o con cubiertas de puerto. Ejemplos de estos materiales incluyen caucho, PVC, Teflón®, corcho, silicona, goma, uretano, o cualquier otro material conocido en la técnica.

La figura 1 ilustra una realización de la presente divulgación que tiene un conjunto de puertos 120 alineados, en una esquina 107 del matraz 100 de múltiples capas. La esquina 107 puede ser plana, como se muestra en la figura 1, o redondeada, o cualquier forma. La figura 1 también ilustra la cubierta 121 de puerto la cual proporciona un cierre liberable en el puerto 120. La cubierta 121 de puerto puede ser cubiertas 121 de puerto individuales, como se muestra en la figura 1, o puede estar en tiras, como se muestra en la figura 2, estructurada y dispuesta para cerrar una tira de puertos.

Las figuras 2A, 2B y 2C ilustran realizaciones de puertos y cubiertas de puerto de la presente divulgación. Como se muestra en la figura 2A-2C, los puertos 220 pueden estar estructurados y dispuestos para acoplarse de manera reversible con cubiertas 221 de puerto para formar un sello estanco al agua. El puerto 220 y cubierta 221 de puerto pueden formar un sello estanco al agua al formar un sello de fricción entre las partes. Las cubiertas 221 de puerto pueden estar en tiras 222 estructuradas y dispuestas para formar sellos estancos al líquido contra una pluralidad de puertos 220. Los puertos 220 pueden ser aberturas que están a nivel con la superficie del matraz de múltiples capas o pueden ser estructuras elevadas, que se extienden desde la superficie del matraz de múltiples capas, definiendo una abertura. Estas estructuras elevadas pueden ser estructuras sobresalientes que proporcionan una estructura de acoplamiento macho para permitir que el puerto se acople con una cubierta de puerto hembra o un dispositivo de flujo de fluido hembra. O, el puerto puede ser una estructura hembra para proporcionar estructura de acoplamiento para una cubierta de puerto macho o un dispositivo de flujo de fluido macho.

Como se ilustra en la figura 2A, las cubiertas 221 de puerto pueden ajustarse dentro de puertos 220 para acoplarse de manera reversible con puertos 220 para formar sellos estancos al líquido. O, como se ilustra en la figura 2B, los puertos 220 pueden ajustarse dentro de las cubiertas 221 de puerto para acoplarse de manera reversible para formar sellos estancos al líquido. En una realización adicional, como se ilustra en las figuras 2A y 2B, la cubierta 221 de puerto puede contener septums 225. En realizaciones adicionales, el puerto 220 puede contener septums 225 (no se muestran).

En realizaciones, como se ilustra en la figura 2C, los puertos pueden estar rodeados por una pared 226 de puerto, una porción elevada que rodea los puertos. En esta realización, la cubierta 227 de puerto puede acoplarse de manera reversible con la pared 226 de puerto para formar un sello estanco al líquido. La cubierta 227 de puerto, hecha de plástico flexible, puede ajustarse ceñidamente dentro de la pared 226 de puerto, o puede ajustarse ceñidamente para formar un ajuste por fricción fuera de la pared 226 de puerto, para formar un sello reversible estanco al líquido. En realizaciones, la cubierta 221 de puerto puede estar unida al matraz de múltiples capas mediante un conector 230.

En las realizaciones mostradas en las figuras 2A-2C, los puertos 220 pueden estar abiertos o sellados por una cubierta 221 o 226 de puerto. O, los puertos 220 pueden estar abiertos, y pueden contener un septum 225. Los matraces 100 de múltiples capas de la presente divulgación pueden fabricarse, esterilizarse, empaquetarse en empaquetado estéril y transportarse con puertos 220 abiertos. Cuando están listos para usarse, un matraz 100 de múltiples capas puede colocarse en un entorno aséptico, tal como una campana o recinto de flujo de aire laminar, y su empaquetado estéril puede abrirse. El líquido puede introducirse en el matraz de múltiples capas usando un dispositivo de flujo de fluido, un dispositivo para dirigir el fluido desde un lugar a otro, el cual puede incluir agujas, cánulas o pipetas, puntas de pipetas, tubos, líneas, canales, tuberías, ductos, conductos, o cualquier otro dispositivo de flujo de fluido conocido en la técnica. Una vez que se llena el matraz 100, se puede colocar una cubierta 221 o 226 de puerto sobre los puertos 220 abiertos para sellarlos, antes de que el matraz de múltiples capas sellado se introduzca en un entorno experimental, tal como una incubadora. La cubierta 221 o 226 de puerto puede proporcionarse en un empaquetado estéril separado, o puede incluirse en el empaquetado estéril que contenía el matraz de múltiples capas.

O, en una realización alternativa, el matraz de múltiples capas de la presente divulgación se puede fabricar y esterilizar, y los puertos se pueden sellar con una cubierta 221 o 226 de puerto estéril. El matraz de múltiples capas estéril sellado entonces se puede empaquetar y transportar. Cuando está listo para usarse, el matraz sellado puede colocarse en un entorno aséptico tal como una campana o un recinto de flujo laminar, eliminarse de su empaquetado, y el líquido puede introducirse en el matraz ya sea al abrir los puertos eliminando las cubiertas de puerto, o al introducir líquido en el matraz insertando una aguja, cánula, punta de pipeta, u otro dispositivo a través de septums 225 dentro de la cubierta 221 de puerto, e introduciendo líquido en el matraz de múltiples capas.

La figura 3 ilustra otra realización de un puerto y cubierta de puerto de la presente divulgación. La figura 3 ilustra puertos 320 y una cubierta 350 de puerto deslizante. La cubierta 350 de puerto deslizante se acopla con los puertos 320, o una pared 326 de puerto, para formar un sello liberable estanco al agua. En esta realización, la cubierta 350 de puerto deslizante tiene un mecanismo deslizante para permitir al usuario elegir la cubierta de puerto deseada al deslizar el mango 351, como se indica por la flecha. Como se ilustra en la figura 3, la cubierta 350 de puerto deslizante permite al usuario elegir si los puertos estarán cubiertos por aberturas o cierres, o cubiertos por septums 325, o filtros 330. Los filtros 330 pueden ser materiales de filtro conocidos en la técnica para reducir o prevenir la contaminación de células en cultivo. La cubierta de puerto deslizante se puede establecer en una posición abierta, permitiendo el flujo libre de aire dentro y fuera de la cámara de cultivo celular. En esta posición abierta, el puerto puede cubrirse con un filtro para permitir el flujo de aire dentro y fuera de la cámara de cultivo celular, pero prevenir la contaminación. O, la cubierta de puerto deslizante se puede establecer en una posición cerrada, donde la posición cerrada tiene un septum, para permitir que un dispositivo de flujo de fluido tal como una aguja o una punta de pipeta ingrese a la cámara de cultivo celular a través de la cubierta de puerto cerrada. Por ejemplo, la cubierta 350 de puerto deslizante se puede establecer para cubrir los puertos 320 con septums 325 al deslizar la cubierta de puerto deslizante en la dirección de la flecha que se muestra en la figura 3, hasta que los septums 325 estén alineados con puertos 320. Un usuario puede introducir líquido a través de los puertos 320 al insertar una aguja o cánula o punta de pipeta a través de los septums 325. Los septums 325 pueden estar estructurados o dispuestos para acomodar un dispositivo de manejo de líquidos tal como una aguja de pequeño o grande orificio, una cánula, o una punta de pipeta. Una vez que se ha introducido líquido a través de puertos 320, el usuario puede elegir dejar los puertos cubiertos con septums 325, o el usuario puede elegir cubrir los puertos 320 con filtros. Si el usuario elige cubrir los puertos 320 con filtros 330, el usuario deslizaría el mango deslizante en la dirección opuesta del mango, para alinear los filtros 330 con los puertos 320. De esta forma, el usuario puede cambiar estas recubiertas al deslizar el mango de la cubierta de puerto de una posición a la otra. En esta realización, la cubierta 350 de puerto deslizante puede ser integral con el matraz de múltiples capas de la presente divulgación, o la cubierta de puerto deslizante puede estar unida al matraz de múltiples capas mediante un conector 340. La cubierta de puerto deslizante puede ser extraíble. Si la cubierta 350 de puerto deslizante es extraíble, puede estar unida al matraz de múltiples capas mediante cualquier conector 340 tal como un conector 340 con bisagras.

Cuando una cubierta de puerto contiene un septum, y la cubierta de puerto se acopla con el puerto para formar un sello reversible estanco al líquido, el septum puede estar situado encima del puerto. Es decir, cuando la cubierta de puerto contiene un septum, el septum mismo puede estar sentado en la parte superior de o encima del puerto.

Volviendo ahora a la figura 4, la figura 4 ilustra realizaciones de conectores 401 de la presente divulgación. El conector 401 es una característica que conecta la cubierta 421 de puerto al matraz de múltiples capas. El conector 401 puede ser un conector 440 con bisagra. Un conector con bisagra puede ser una cinta delgada flexible de plástico que está unida en un lado de la cinta a la cubierta de puerto y en el otro lado de la cinta a la pared de puerto o al matraz de múltiples capas. Esta cinta delgada flexible de plástico es deformable, permitiendo por lo tanto que la cubierta de puerto se una al matraz de múltiples capas ya sea en una posición abierta (no se muestra) o en una posición cerrada, como se muestra en la figura 4. El conector 440 con bisagras puede ser una cinta más gruesa de plástico que se ha marcado con cortes para permitir que el plástico se doble en las marcas de corte. O, el conector con bisagras puede ser una bisagra de pivote, una bisagra de resorte (para asegurar que la cubierta de puerto esté en una posición cerrada o en una posición abierta) o cualquier otro tipo de bisagra conocida en la técnica. Estos conectores 440 con bisagras pueden moldearse por separado, o moldearse como una parte de la cubierta de puerto, y unirse al matraz de múltiples capas mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los métodos para moldear y unir partes de plástico como se discutió anteriormente.

En realizaciones adicionales, el conector puede ser un conector 450 de rótula. Una característica 470 de bola puede sobresalir de la cubierta de puerto o del matraz de múltiples capas, y puede acoplarse de manera reversible con las características 471 de encaje sobresalientes en la superficie opuesta. La cubierta de puerto se puede encajar en la junta de rótula para conectar las dos piezas. En realizaciones adicionales, el conector puede ser un sujetador 460 de gancho y bucle, sujetador tipo bloqueo de cremallera, adhesivo, u otros mecanismos de conexión.

La cubierta 421 de puerto puede estar conectada al matraz 100 de múltiples capas (como se muestra en la figura 4), o a una estructura del matraz 100 de múltiples capas, tal como una pared 226 de puerto (como se muestra en las figuras 2A-2C) mediante un conector 401. O, en realizaciones alternativas, la cubierta 221 de puerto o tira 222 de cubierta de puerto puede no estar unida al matraz de múltiples capas, pero puede estar separada del matraz 100 de múltiples capas. La cubierta 221 de puerto o tira 222 de cubierta de puerto puede ser desechable, de tal manera que cada vez que se accede a las cámaras de crecimiento celular a través de puertos 220, la cubierta 221 de puerto usada o tira 222 de cubierta de puerto se elimina y se desecha, y se aplica una nueva cubierta 221 de puerto o tira 222 de cubierta de puerto para cerrar los puertos 220 cuando el usuario desea cerrar el matraz de múltiples capas. La cubierta de puerto o tira de cubierta de puerto puede ser desechable y esterilizable mediante esterilización por calor o esterilización por UV, o cualquier otro método conocido en la técnica.

En realizaciones, los puertos 220 y cubiertas 221 o 226 de puerto, pueden tener un sellado interno o externo o estructuras de acoplamiento para permitir que las cubiertas de puerto se acoplen contra los puertos para proporcionar un sello estanco al líquido. Véase, por ejemplo, figura 5A y 5B. La figura 5A ilustra un sellador 500 tipo bloqueo de cremallera. Se puede proporcionar un par de resaltes 501 de sujetador paralelos, separados que forman un canal 502 en una superficie, por ejemplo, la superficie superior de un puerto o una cubierta de puerto, o una pared de puerto, y

la superficie complementaria puede tener una única cinta de material 505 flexible que, cuando se presiona en el canal de sujetador, forma un sello liberable estanco al líquido. En realizaciones, el sujetador puede estar diseñado para cambiar de color cuando se forma el sello. Por ejemplo, los resaltes de sujetador pueden llevar un color, por ejemplo, azul, y la cinta puede llevar otro color, por ejemplo, rojo, y cuando los dos elementos complementarios se presionan juntos para formar un sello, puede verse un color púrpura a través de la estructura.

La figura 5B ilustra una realización alternativa de un sellador 500. Una estructura 510 de reborde o estructura anular alrededor del puerto 520 elevado se acopla con estructuras complementarias las cuales pueden ser, por ejemplo, una barra 511 de captura flexible en la cubierta 521 de puerto o tira 522 de cubierta de puerto para permitir que la cubierta 521 de puerto se acople de manera deslizante con los puertos para crear un sello liberable estanco al líquido entre la tira 522 de cubierta de puerto y los puertos 520. Aunque solo se muestra un puerto 520 en la figura 5B, se puede usar la tira de cubierta de puerto para acoplarse de manera deslizante con una serie de puertos estructurados de manera similar para formar sellos entre una serie de puertos 520 y una tira 522 de cubierta de puerto. Estas estructuras tomadas juntas, la estructura 510 de reborde, que se acopla de manera deslizante con la tira 522 de cubierta de puerto para formar un sello estanco al líquido, son una realización de un sellador 500. O, en realizaciones adicionales, la cubierta 521 de puerto puede tener selladores internos o externos, estructuras para permitir que las cubiertas 521 de puerto se acoplen contra los puertos 520 para proporcionar un sello estanco al líquido. Como se muestra en la figura 5, la cubierta 521 de puerto puede deslizarse sobre el puerto 520 para ajustarse en la parte superior del puerto 520 para formar un sello estanco al líquido. Esto coloca un septum 525, contenido en la cubierta 521 de puerto, por encima del puerto 520, pero acoplado con el puerto para formar un sello estanco al líquido. El puerto 520 o cubierta 521 de puerto puede tener un septum 525. Si el septum 525 está en la cubierta 521 de puerto, el septum 525 no se extiende hacia abajo en el puerto, sino que está por encima del puerto y fuera del puerto. El septum 525 permite que el puerto se cierre a menos que se inserte una aguja o cánula u otro dispositivo a través del septum 525 en el puerto o cubierta de puerto. Cuando se inserta una aguja o cánula u otro dispositivo a través del septum 525 en el puerto 520 o cubierta 521 de puerto, la aguja o cánula puede pasar a través del puerto o cubierta de puerto para permitir el acceso a la cámara de cultivo celular del matraz de múltiples capas, mientras que se mantiene un sello estanco al líquido entre el puerto o cubierta de puerto y la aguja o cánula.

Volviendo ahora a la figura 6, la figura 6 ilustra una realización del matraz 100 de múltiples capas de la presente divulgación, que incorpora la cubierta 350 de puerto deslizante que se muestra en la figura 3 en un primer extremo 602 del matraz 100 de múltiples capas, y tubos 601 acoplados con puertos (no se muestran) en un segundo extremo 603 del matraz 100 de múltiples capas. El matraz de múltiples capas tiene cámaras 111 de crecimiento celular múltiples y espacios 118 de aire traqueales integrales. Se puede acceder a cada cámara 111 de crecimiento celular a través de un puerto (véase figura 7). En una realización de la presente divulgación, se puede llenar un matraz 100 de múltiples capas con fluido al bombear fluido a cada cámara 111 de crecimiento celular, a través de un tubo 601. Por ejemplo, se pueden colocar filtros sobre los puertos en el primer extremo 602 del matraz 100 de múltiples capas, al deslizar la cubierta de puerto deslizante a la posición de filtro, como se muestra en la figura 3. El fluido se puede bombear entonces a cada cámara 111 de crecimiento celular a través de un tubo 601. El aire u otro gas, desplazado por el fluido que ingresa a las cámaras 111 de crecimiento celular a través del puerto en el segundo extremo 603 del matraz 100 de múltiples capas, puede salir de las cámaras de crecimiento celular a través del puerto filtrado en la cubierta 350 de puerto deslizante. Una vez que se llena el matraz de múltiples capas, la cubierta 350 de puerto deslizante se puede ajustar para cubrir los puertos en el primer extremo 602 del matraz de múltiples capas con septums para formar un sello estanco al líquido. Los tubos 601 pueden sellarse mediante sujeción o mediante soldadura de los tubos cerrados. El matraz de múltiples capas sellado puede colocarse entonces en un entorno apropiado, una incubadora, por ejemplo, para permitir que las células crezcan en el matraz de múltiples capas. En una realización alternativa, el fluido puede bombearse en un conjunto de cámaras 111 de crecimiento celular a través de un primer conjunto de tubos 601, puede fluir a través de cámaras 111 de crecimiento celular y puede salir de las cámaras de crecimiento celular a través de un segundo conjunto de puertos, acoplado a un segundo conjunto de tubos u otros dispositivos de flujo de fluidos.

Los tubos 601, unidos al matraz de múltiples capas pueden permitir transferencia más estéril de fluido dentro y fuera del matraz de múltiples capas. Los tubos se pueden acoplar a tubos adicionales u otros dispositivos de flujo de fluido usando acopladores tales como estructuras macho o hembra que acomodan tubos en conexiones de fricción para conectar un tubo a otro tubo u otra estructura. En realizaciones adicionales, los tubos se pueden soldar por calor juntos para formar dispositivos estériles de flujo de fluido ininterrumpidos. Por ejemplo, el fluido que fluye a través de tubos soldados por calor puede conectar un matraz de multipozo a una fuente o sumidero de fluido que puede estar a una distancia lejos del matraz de múltiples capas. Para eliminar o interrumpir la conexión, los tubos solo necesitan cortarse o doblarse y sujetarse o cerrarse con soldadura por calor. El matraz de múltiples capas ilustrado en la figura 6 puede ensamblarse para incluir tubos, esterilizarse, empaquetarse y enviarse de tal manera que un usuario pueda abrir el empaquetado estéril, soldar por calor la tubería para conectar el matraz de múltiples capas a un sumidero o fuente de fluido, y usar el matraz. Esta configuración de matraz puede disminuir el riesgo de contaminación al eliminar las características potencialmente contaminantes de manejo de líquidos tales como válvulas y acopladores.

La figura 7 representa una vista ampliada del área de puerto e ilustra conexiones entre puertos y tubos o cánulas en realizaciones de la presente divulgación. Los puertos 720 pueden tener estructuras macho 730 o hembra 731. Los puertos 730 macho pueden tener estructuras sobresalientes las cuales permiten que las agujas, puntas de pipeta, tubos, cánula 732, u otros dispositivos de flujo de fluido se ajusten ceñidamente alrededor del puerto 730 macho para

formar un sello estanco al líquido. Los puertos 731 hembra pueden tener estructura de receptáculo para permitir que la cánula, agujas 735, tubos o puntas de pipeta u otros dispositivos de flujo de fluido se ajusten ceñidamente en el puerto 731 hembra para formar un sello estanco al líquido.

Los dispositivos de flujo de fluido, incluyen agujas, cánula, puntas de pipeta o tubos y son dispositivos los cuales permiten que el fluido se dirija dentro y fuera de un matraz de múltiples capas. Las figuras 8A-8C ilustran un dispositivo de flujo de fluido tal, una cánula 801. La figura 8A ilustra cánula 801 múltiple, unida a un colector 840. La cánula puede estar unida al colector en sus extremos 813 proximales. En una realización, una cánula 801 de la presente divulgación puede permitir el flujo direccional de líquido, mientras que también permite un flujo separado, o ventilación de aire o gas. Por ejemplo, la cánula que se muestra en la figura 8 tiene una punta 802 distal afilada para perforar un septum y una segunda punta 803 la cual está próxima a la primera punta. La segunda punta 803 también puede ser afilada, y está asociada con una segunda trayectoria 811 de flujo. Cuando se examina en sección transversal como se ve en la figura 8C, la cual es una ilustración en sección transversal, tomada en la línea 8-8 que se muestra en la figura 8B, la cánula tiene dos trayectorias de flujo separadas, una para el líquido 810 y una para el aire 811. Cuando el extremo distal de la cánula 802 se inserta en un puerto de un matraz de múltiples capas como se muestra en la figura 7, el líquido puede fluir hacia el matraz de múltiples capa a través de la trayectoria 810 de líquido, y el aire desplazado puede escapar del matraz de múltiples capas a través de la misma cánula a través de la trayectoria 811 de aire, que se ventila al aire exterior a través de ventilación 812 de aire la cual puede estar ubicada en el extremo 813 proximal de la cánula. Esta ventilación de aire puede estar cubierta con material de filtro para prevenir la contaminación de esta trayectoria de aire. Usando esta realización de cánula, el líquido puede introducirse en una cámara de cultivo celular cerrada, y el aire desplazado puede ventilarse fuera al mismo tiempo, sin la necesidad de un segundo puerto abierto en cada cámara de cultivo celular para permitir la liberación de aire desplazado. La cánula puede ser una estructura tubular rígida que define una primera trayectoria interior estructurada y dispuesta para conducir fluido y una segunda trayectoria interior estructurada y dispuesta para conducir fluido y que tiene un extremo proximal y uno distal.

Estos dispositivos de flujo de fluido pueden estar acoplados a un colector. Un colector es un dispositivo estructurado y dispuesto para contener múltiples dispositivos de flujo de fluido. El colector también puede estar estructurado y dispuesto para dirigir el fluido dentro y fuera de múltiples dispositivos de flujo de fluido. Por ejemplo, el colector puede estar estructurado y dispuesto para contener múltiples cánulas o tubos o puntas de pipeta que están espaciadas de una forma para asegurar que los múltiples dispositivos de flujo de fluido se alineen con puertos de una estructura de cultivo celular de múltiples capas. El colector puede ser interno (integral con la estructura de cultivo celular de múltiples capas) o externo (separado de la estructura de cultivo celular de múltiples capas).

La figura 9A ilustra una realización de un colector 900 externo de la presente divulgación. En una realización, el colector 900 es un dispositivo para la manipulación de contenidos de matraz a medida que ingresan y salen del matraz de múltiples capas. El colector 900 externo tiene acopladores 930 para acoplar dispositivos de flujo de fluido o cánula 910 al colector 900. Estos acopladores 930 pueden ser estructuras hembra (como se muestra), y dispositivos de flujo de fluidos tales como puntas de pipeta o cánula pueden insertarse en estas estructuras hembra para acoplar los dispositivos de flujo de fluido al colector. O, los acopladores 930 pueden ser acopladores macho como se muestra en la figura 10.

La figura 10 ilustra una realización adicional del colector 1000 externo de la presente divulgación. El colector 1000 que se muestra en la figura 10 tiene una abertura 1001 con cuello, una válvula 1004 interpuesta entre la abertura con cuello y el cuerpo 1006 de colector, acopladores 1030 macho estructurados y dispuestos para acoplarse con dispositivos 1010 de flujo de fluido tales como cánula, puntas de pipeta o tubería.

Los dispositivos de flujo de fluidos tales como puntas de pipeta o cánula pueden estar estructurados y dispuestos para insertarse en las cámaras de crecimiento celular a través de los puertos 120 del matraz 100 de múltiples capas. Por ejemplo, los fluidos que ingresan al colector a través de la abertura 1001 con cuello del colector pueden fluir dentro del cuerpo 1006 de colector, y a través de la cánula 1010. Cuando estas cánulas 1010 se insertan en los puertos 120 del matraz 100 de múltiples capas (véase figura 1), el fluido puede fluir a través de la cánula 1010 hacia el interior de cámaras de cultivo celular individuales.

Refiriéndose de nuevo a la figura 9, el colector 900 externo puede tener una válvula 904. En una posición abierta, como se muestra en la figura 9B, el fluido puede fluir libremente a través de la válvula 904 desde la abertura 901 con cuello al cuerpo 906 de colector. En una posición cerrada, como se muestra en la figura 9C, el fluido no puede pasar de la abertura 901 con cuello al cuerpo 906 de colector. Esta válvula puede ser operable al girar una llave de válvula, accesible desde el exterior del colector 900 externo. El colector externo ilustrado en la figura 9 puede conectar múltiples cámaras de cultivo celular en un matraz de cultivo celular de múltiples capas en paralelo. Es decir, el fluido que ingresa al cuerpo 906 de colector a través de la abertura 901 con cuello puede fluir a través de múltiples dispositivos 901 de flujo de fluido para ingresar en múltiples cámaras de cultivo celular al mismo tiempo. En una realización alternativa, los colectores externos de la presente divulgación pueden estar estructurados y dispuestos para permitir que el fluido fluya desde una cámara de cultivo celular en un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas a otra cámara de cultivo celular en otro dispositivo de múltiples capas a través del colector sin mezclarse con fluido unido a otra cámara de cultivo celular. En esta realización alternativa, el fluido pasa de un dispositivo de cultivo celular de múltiples capas a otro en serie.

Las figuras 11A y 11B ilustran dos realizaciones de un colector 1100 en serie. Los dispositivos 1110 de flujo de fluido, en este caso tubos, están unidos a un cuerpo 1106 de colector. El cuerpo 1106 de colector tiene puertos 1120 los cuales son ya sea macho 1121 o hembra 1122 y están estructurados y dispuesto para formar sellos estancos al líquido con los tubos 1110. El colector 1100 en serie puede tener una válvula para permitir que el fluido fluya desde un lado del colector en serie al otro lado del colector en serie, o para detener que el fluido fluya a través del cuerpo 1106 de colector. Las figuras 12A y 12B ilustran una realización de una válvula 1104 para el colector 1100 en serie que se muestra en las figuras 11A y 11B. En esta realización, la válvula puede operar para abrir (como se muestra en la figura 12A) o cerrar (como se muestra en la figura 12B) un pasaje a través del cuerpo 1106 de colector desde un lado del colector al otro. Un dispositivo 1108 de apertura de válvula opera para conmutar la válvula entre la posición abierta y cerrada. Como se muestra en las figuras 12A y 12B, el dispositivo de apertura de válvula puede girar para abrir o cerrar la válvula como en una válvula de mariposa. En una realización alternativa, como se ilustra en las figuras 13A y 13B, el dispositivo 1109 de apertura de válvula puede operar al deslizar el dispositivo 1109 de apertura de válvula desde una posición abierta a una posición cerrada, como se muestra por las flechas. Cuando la válvula está abierta, un pasaje 1113 se alinea con aberturas 1114 a cada lado del colector 1100. Cuando la válvula está cerrada, los pasajes 1113 no están alineados con las aberturas 1114 y no puede fluir fluido desde un lado del colector al otro. Aunque se han ilustrado particularmente tres realizaciones de válvulas, muchos mecanismos de válvula son conocidos en la técnica y pueden ser aplicables en realizaciones de la presente divulgación. Las válvulas pueden ser mecánicas o electrónicas, por ejemplo, se pueden usar válvulas solenoides o válvulas magnéticas.

Realizaciones del colector externo se ilustran en las figuras 14 - 16. La figura 14 ilustra un colector 1400 externo que tiene una abertura 1401 con cuello, un cuerpo 1406 de colector y una válvula 1404. La abertura con cuello puede estar cubierta por una tapa 1402. La tapa 1402 puede estar presente o ausente. Si está presente, la tapa puede incorporar filtros para permitir el intercambio de gas entre los espacios internos y externos del sistema de cultivo celular. En realizaciones adicionales, la abertura con cuello puede estar unida a la tubería la cual permite la comunicación de fluido desde un depósito de fluido al colector, al matraz de múltiples capas (véase figura 20).

La figura 15 es una ilustración de una realización adicional del colector 1500 de la presente divulgación. En esta realización, el cuerpo 1505 de colector conecta dos conjuntos de tubos 1510, estructurados y dispuestos para insertarse en dos matraces adyacentes de múltiples capas, como se muestra en la figura 18. Usando esta realización, es posible conectar múltiples capas adyacentes para formar una red de múltiples matraces de múltiples capas. Además, si se usa esta realización de colector, es posible llenar múltiples matraces de múltiples capas con fluido al administrar fluido a un matraz de múltiples capas. Por ejemplo, dos o más matraces de múltiples capas pueden conectarse juntos usando esta realización 1500 de colector. El fluido puede administrarse a un matraz de múltiples capas en la parte superior de un apilamiento de matraces de múltiples capas conectados. Para llenar todos los matraces, se permite que el fluido fluya desde el matraz superior, a través de todos los matraces intermedios hasta un matraz inferior hasta que todos los matraces se llenen con fluido. Dependiendo de la estructura interna del colector, si el fluido se agrupa en el cuerpo 1505 de colector, o si el fluido fluye desde un tubo en un lado 1510 del cuerpo de colector a un tubo correspondiente en el otro lado del cuerpo 1510 de colector, el fluido puede fluir a través de esta realización del colector a matraces de cultivo celular de múltiples capas en serie o en paralelo. Por ejemplo, si el cuerpo 1505 de colector permite que el fluido se mezcle a medida que ingresa al colector desde la cánula, este colector permite que todas las capas dentro de un único matraz de múltiples capas, o entre matraces de múltiples capas se mezclen, y de esa manera se conecten en paralelo. Si el cuerpo de colector mantiene conexiones definidas, puede conectar cámaras de cultivo celular de matraz a matraz en serie. Por ejemplo, si el tubo 1 está conectado solo al tubo 2 a través del cuerpo de colector, y si el tubo 3 está conectado solo al tubo 4 a medida que pasa a través del cuerpo de colector, entonces la cámara de cultivo celular a la que se accede por el tubo 1 está conectada en serie con la cámara de cultivo celular a la que se accede por el tubo 2, y la cámara de cultivo celular a la que se accede por el tubo 3 está conectada en serie con la cámara de cultivo celular a la que se accede por el tubo 4.

En una realización adicional, los tubos 1510 pueden reemplazarse por cánula o agujas u otros dispositivos de flujo de fluido estructurados y dispuestos para conectarse de una manera estanca al líquido al colector y al matraz de múltiples capas. Por ejemplo, la tubería puede ajustarse en un ajuste por fricción sobre un puerto cuando el puerto tiene una altura y se extiende por encima de la superficie del matraz de múltiples capas. O, como alternativa, la tubería puede insertarse en un puerto para formar un sello estanco al líquido cuando el puerto está estructurado y dispuesto para formar un ajuste por fricción estanco al líquido entre la tubería y el puerto.

La figura 16 ilustra una realización adicional de la presente divulgación. La figura 16 muestra dos colectores 1600 que tienen cada uno un cuerpo 1605 de colector conectado a la cánula 1610, una válvula 1604, y una abertura 1601 con cuello conectada a la tubería 1642 la cual conecta los dos colectores juntos. Será entendido por los experimentados en la técnica que los colectores de la presente divulgación pueden existir en cualquier configuración y pueden conectar un matraz de múltiples capas con otro matraz de múltiples capas, pueden conectar un matraz de múltiples capas con un depósito de líquido o un contenedor de desechos, pueden conectar un colector con otro colector, y pueden proporcionar múltiples conexiones a través de conectores, válvulas, bombas u otras conexiones conocidas. Además, será entendido por los experimentados en la técnica que cualquiera de las características descritas con respecto a cualquiera de las realizaciones divulgadas aquí se puede practicar en diferentes combinaciones sin desviarse del alcance de la divulgación.

En todas realizaciones de colector, la distancia entre la cánula puede corresponder a la distancia entre los puertos de cámaras de cultivo celular en el matraz de múltiples capas. El número de cánulas presentes puede corresponder al número de capas o cámaras de cultivo celular en el matraz de múltiples capas. Realizaciones del colector pueden empaquetarse en el lugar en un matraz de múltiples capas, para ser eliminadas por el usuario, o pueden empaquetarse por separado del matraz de múltiples capas. Los colectores, matraces de múltiples capas, cubiertas de puerto, tiras de cubierta de puerto, tubería y todas las características y accesorios descritos aquí pueden esterilizarse y venderse en empaquetado estéril, juntos o por separado.

Volviendo ahora a la figura 17, puede haber puertos 1720 en dos lados del matraz 100 de múltiples capas, los cuales pueden ser puertos 1740 de entrada y puertos 1750 de salida. En una realización, a medida que el fluido ingresa al matraz 100 de múltiples capas a través de la cánula 1710 de un colector 1700 insertado en los puertos 1740 de entrada, el fluido o gas desplazado puede salir del matraz 100 de múltiples capas a través de los puertos 1750 de salida en el otro lado del matraz. El fluido se puede mover a través del colector al proporcionar presión positiva o negativa al colector, por ejemplo, usando una bomba o un vacío unido al colector o al matraz (véase figura 20). Una vez que las cámaras de cultivo celular del matraz 100 de múltiples capas se han llenado completamente con fluido, la cánula 1710 del colector 1700 puede eliminarse de los puertos 1740 de entrada, y tanto los puertos 1740 de entrada como los puertos 1750 de salida pueden taponarse con cubiertas 1721 de puerto. El matraz 100 de múltiples capas, en esta configuración, tanto con puertos de entrada y salida cerrados por cubiertas de puerto, es un sistema de cultivo celular de múltiples capas cerrado. Este matraz de múltiples capas cerrado puede girarse entonces para maximizar la superficie de crecimiento celular dentro de las cámaras de crecimiento celular (es decir, poner la placa inferior hacia abajo) y colocarse en una ubicación adecuada para el cultivo celular, tal como una incubadora. En realizaciones adicionales, el colector 1700 puede no tener cánula, pero puede formar un sello estanco al líquido directamente con puertos (véase, por ejemplo, figura 10).

Cuando llega el momento de vaciar la cámara de cultivo celular, el matraz 100 de múltiples capas se puede eliminar de su ubicación para el crecimiento celular, girar de tal manera que los puertos estén en una posición "hacia arriba", las cubiertas 1721 de puerto tanto en el puerto de entrada como el de salida se pueden eliminar, ya sea manualmente o mediante manipulación robótica, y la cánula de un colector se puede insertar en el matraz de múltiples capas para eliminar el fluido, ya sea mediante succión o mediante gravedad. A medida que se vacía el matraz de múltiples capas, el matraz se puede inclinar de tal manera que el fluido restante se presente en las puntas de la cánula, extendiéndose hacia el matraz 100 de múltiples capas.

La figura 18 es una vista en perspectiva de una realización de la presente invención que muestra cómo se pueden conectar juntos múltiples matraces mediante una realización del colector de la presente invención. Cuando la cánula 1810 en un lado del colector 1800 se inserta en puertos 1803 de un matraz 1801 de múltiples capas, y la cánula 1811 en el otro lado del colector 1800 se inserta en puertos 1804 del otro matraz 1802 de múltiples capas, los dos matraces se pueden unir juntos. Los medios y células se pueden transferir de un recipiente al otro a través del colector 1800, así conectado. Por ejemplo, el recipiente con células que van a ser distribuidas a otro recipiente (o varios otros recipientes para proliferación celular) puede inclinarse hacia arriba como se muestra en la figura 18, y las células pueden transferirse desde un primer recipiente 1802 a un segundo recipiente 1801 mediante gravedad. En una realización alternativa, se puede unir una bomba a un segundo conjunto de puertos 1830 para accionar el fluido desde el primer recipiente 1802 al segundo recipiente 1801. O, se podría unir una bomba de vacío a los puertos 1835 del recipiente receptor para extraer el fluido desde el primer recipiente 1802 hasta el segundo recipiente 1801.

La figura 19 ilustra una realización adicional de una realización del colector, como se muestra en la figura 14, unido a un matraz de múltiples capas. La figura 19 muestra un matraz 100 de múltiples capas con un colector 1900 unido. El colector 1900 tiene un cuerpo 1905 de colector, una abertura 1901 con cuello, una tapa 1903 y una válvula 1904. El cuerpo 1905 de colector se acopla con el matraz 100 de múltiples capas a través de los puertos (no se muestran) para permitir que el fluido que ingresa a la abertura 1901 con cuello fluya a través del colector 1900 y dentro de las cámaras de cultivo celular del matraz 100 de múltiples capas. El colector 1900 puede estar unido permanentemente al matraz de múltiples capas, o puede ser extraíble. El colector 1900 puede ser desechable, y esterilizable. Cuando se elimina el colector 1900, los puertos del matraz de múltiples capas pueden estar cubiertos por cubiertas de puerto, y el acceso a las cámaras de cultivo celular del matraz de múltiples capas es limitado. Cuando se elimina el colector 1900, el matraz de múltiples capas tiene una huella rectangular o cuadrada regular, permitiendo colocar múltiples matraces de múltiples capas en un espacio cerrado tal como una incubadora o una caja de empaquetado sin la necesidad de acomodar un colector en forma irregular o abertura.

La figura 20 ilustra una realización de la presente divulgación conectada a una realización de un dispositivo 2020 de recolección de células o depósito. Mientras que el colector externo que se muestra en la figura 20 es la realización que se muestra en las figuras 8, 9 y 10, cualquier realización de colector externo puede ser apropiada aquí. El colector 2000 externo tiene cánula 2010, un cuerpo 2005 de colector, una válvula 2004, y una abertura 2001 con cuello. El colector 2000 externo está estructurado y dispuesto para acoplarse con un contenedor de cultivo celular de múltiples capas (no se muestra). En esta realización, el colector externo puede acoplarse a un depósito de líquido externo el cual puede ser un dispositivo de recolección de células o un depósito de medios de cultivo. En la figura 20 se muestra un dispositivo 2020 de recolección de células. El colector 2000 externo se puede acoplar al dispositivo de recolección de células a través de una tapa 2015 de contenedor, la cual está unida al contenedor 2020 de recolección de células mediante tubería 2002. El extremo de contenedor de la tubería 2025 se desliza en una perforación 2030 en el

- contenedor 2020 cuando la tapa 2015 de contenedor se atornilla o se encaja en su lugar. En una realización alternativa, el contenedor de recolección se puede preensamblar con la tubería 2002 ya conectada al contenedor 2020. El contenedor 2020 tiene un segundo puerto 2040 para conectarse a la tubería 2041 que conduce a una bomba de vacío (no se muestra). Cuando este ensamblaje se conecta a un matraz de múltiples capas a través de los puertos del matraz de múltiples capas, y se proporciona un vacío al contenedor a través del segundo puerto 2040, el vacío puede producir que el líquido y, en algunos casos células, se eliminen del matraz de múltiples capas y se depositen en el contenedor 2020. El contenedor puede ser un contenedor estéril, y el colector externo y tubería pueden esterilizarse, permitiendo la eliminación estéril de células y fluido de un matraz de cultivo celular de múltiples capas a un contenedor.
- 5
- 10
- Estos procesos pueden realizarse en un ajuste automatizado. Por ejemplo, un colector externo, conectado a un contenedor de recolección estéril como se muestra en la figura 20, puede manipularse de manera robótica para acoplarse a un matraz de múltiples capas y eliminar los contenidos del matraz de múltiples capas. Con este tipo de manipulación robótica, se reduce el contacto humano y se reducen los riesgos de contaminación y derrames.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de cultivo celular que comprende
un primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas,
un segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas; y
- 5 un colector que comprende:
al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas; y,
al menos dos dispositivos de flujo de fluido que comprenden una cánula, una aguja o un tubo que se acoplan con al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas,
- 10 caracterizado porque cuando el colector se acopla con las al menos dos cámaras de cultivo celular del primer sistema de cultivo celular de múltiples capas y las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo sistema de cultivo celular de múltiples capas, el fluido puede pasar de las al menos dos cámaras de cultivo celular del primer dispositivo de cultivo celular de múltiples capas a las al menos dos cámaras de cultivo celular del segundo dispositivo de cultivo celular de múltiples capas.
- 15 2. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 en donde el colector comprende además una válvula.

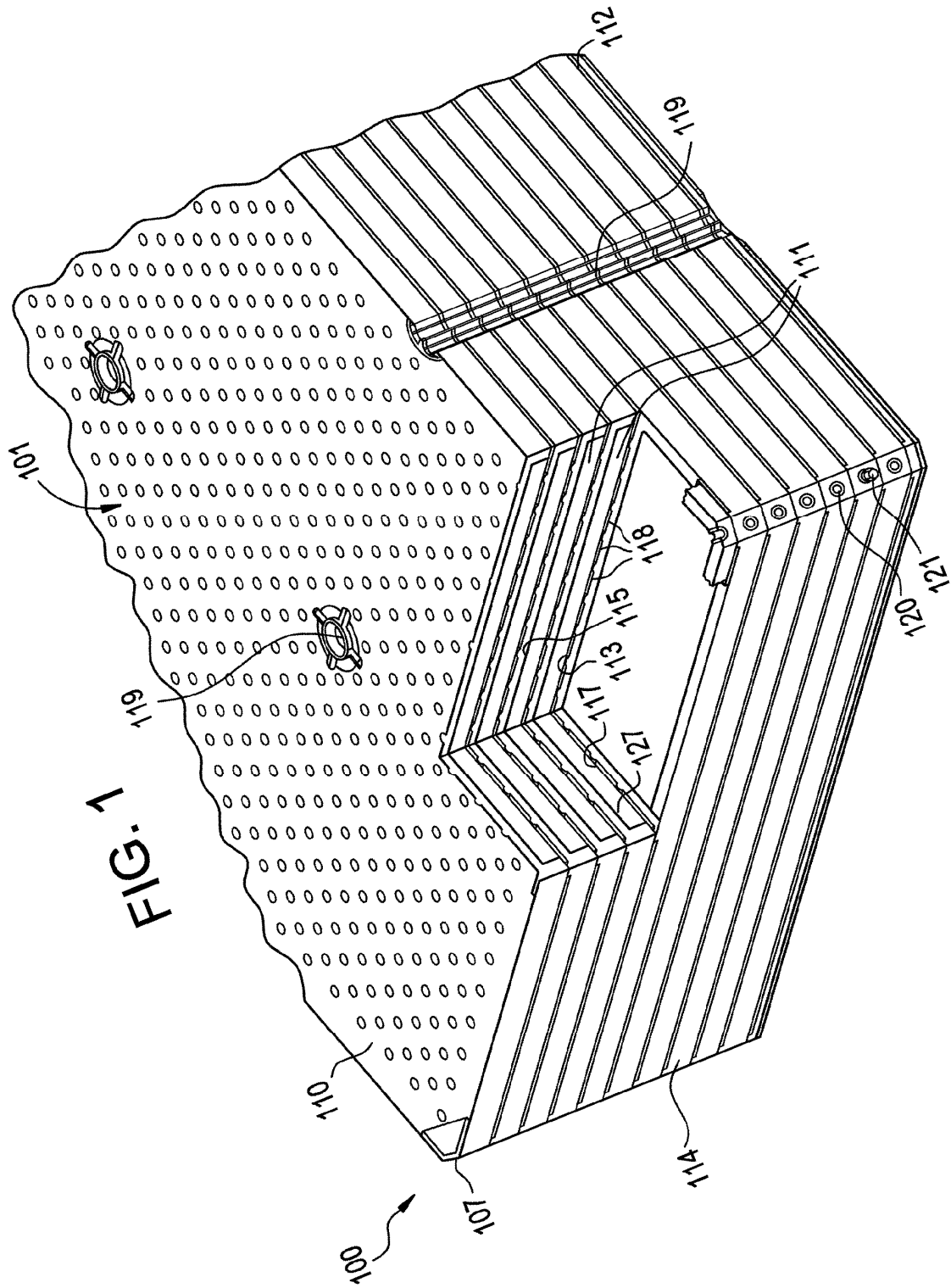


FIG. 2A

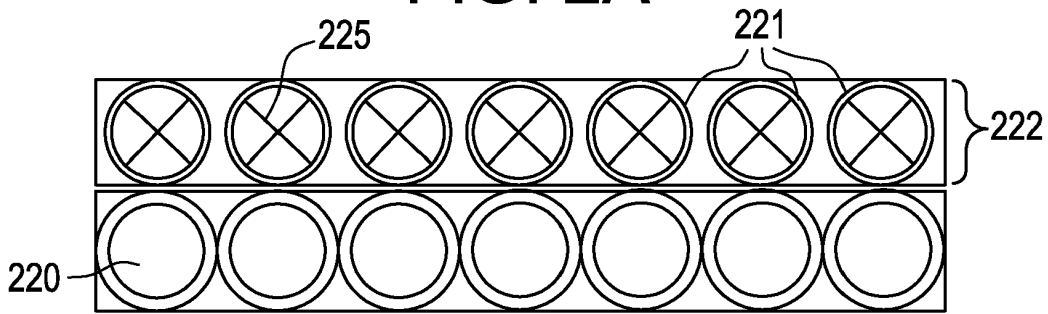


FIG. 2B

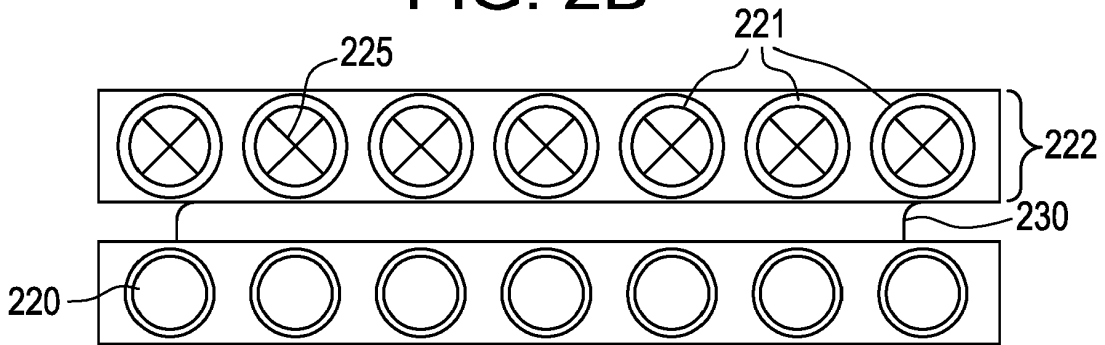


FIG. 2C

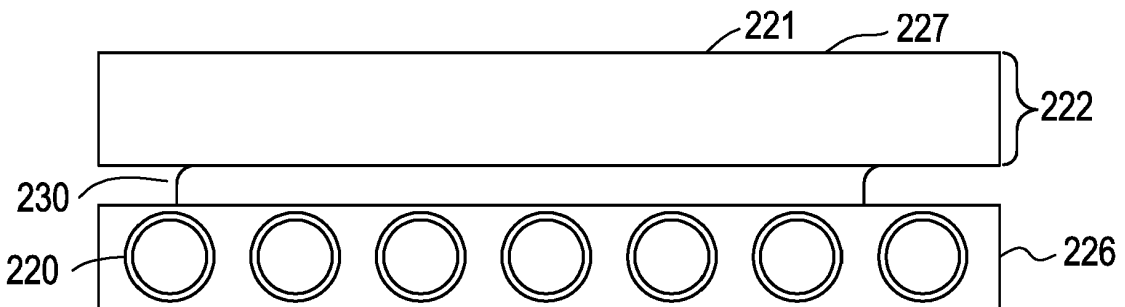


FIG. 3

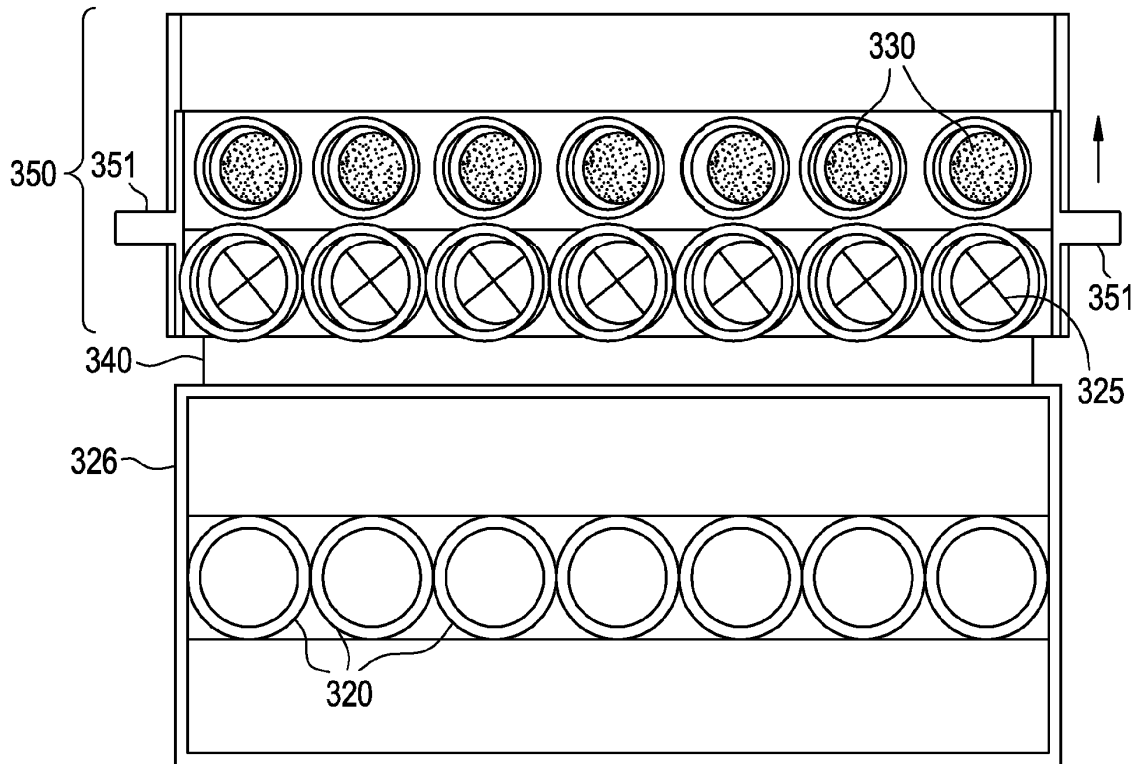


FIG. 4

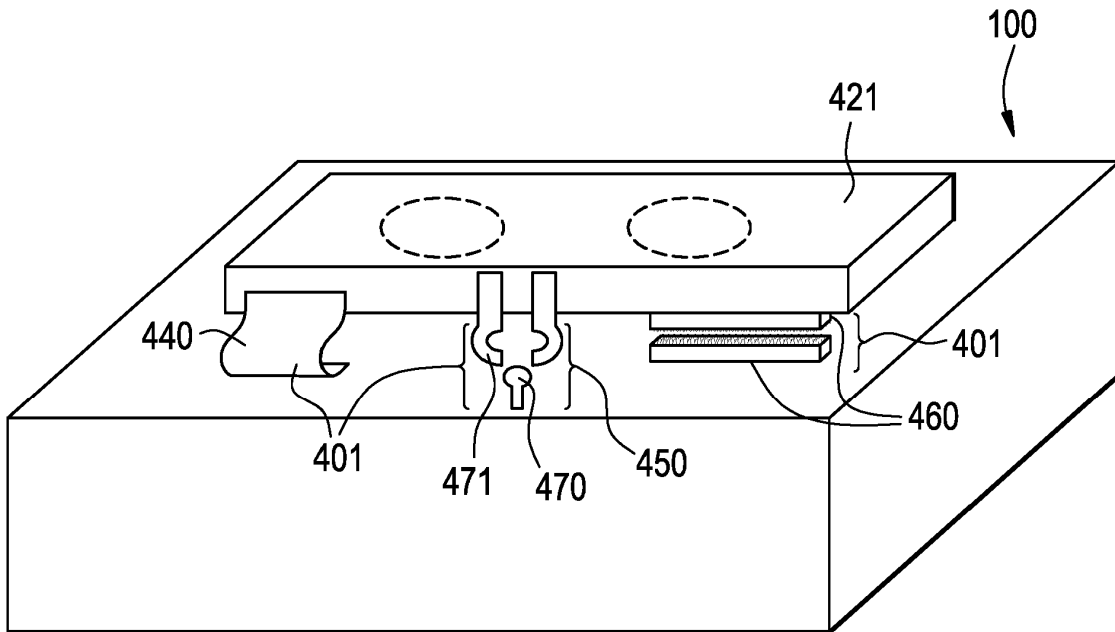


FIG. 5A

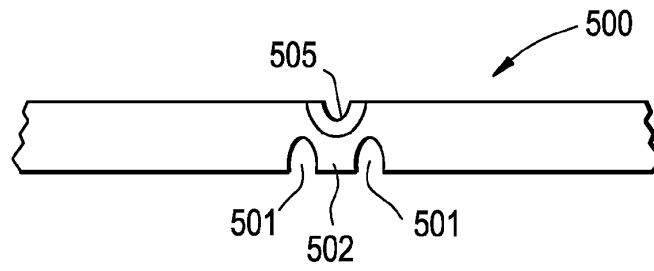


FIG. 5B

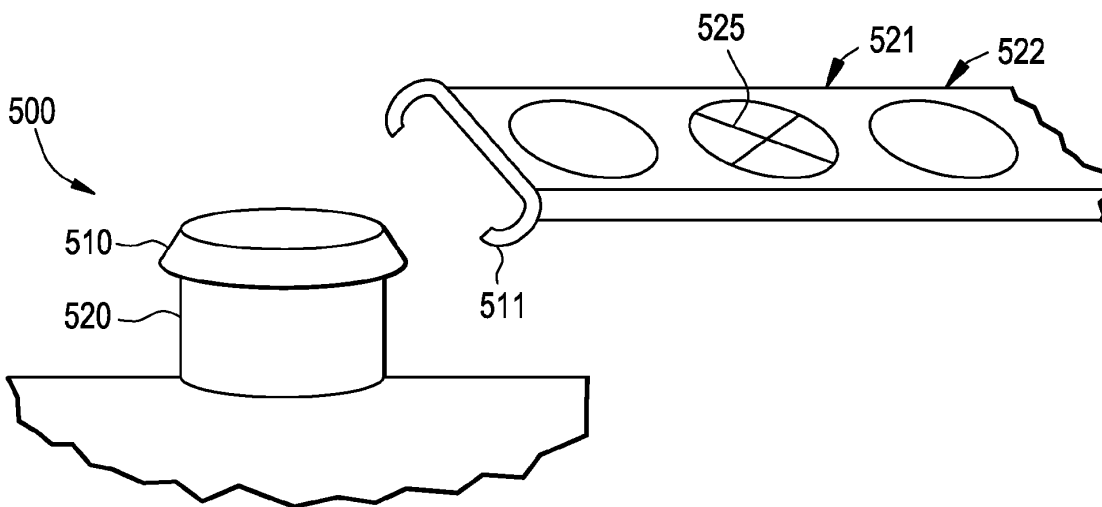


FIG. 6

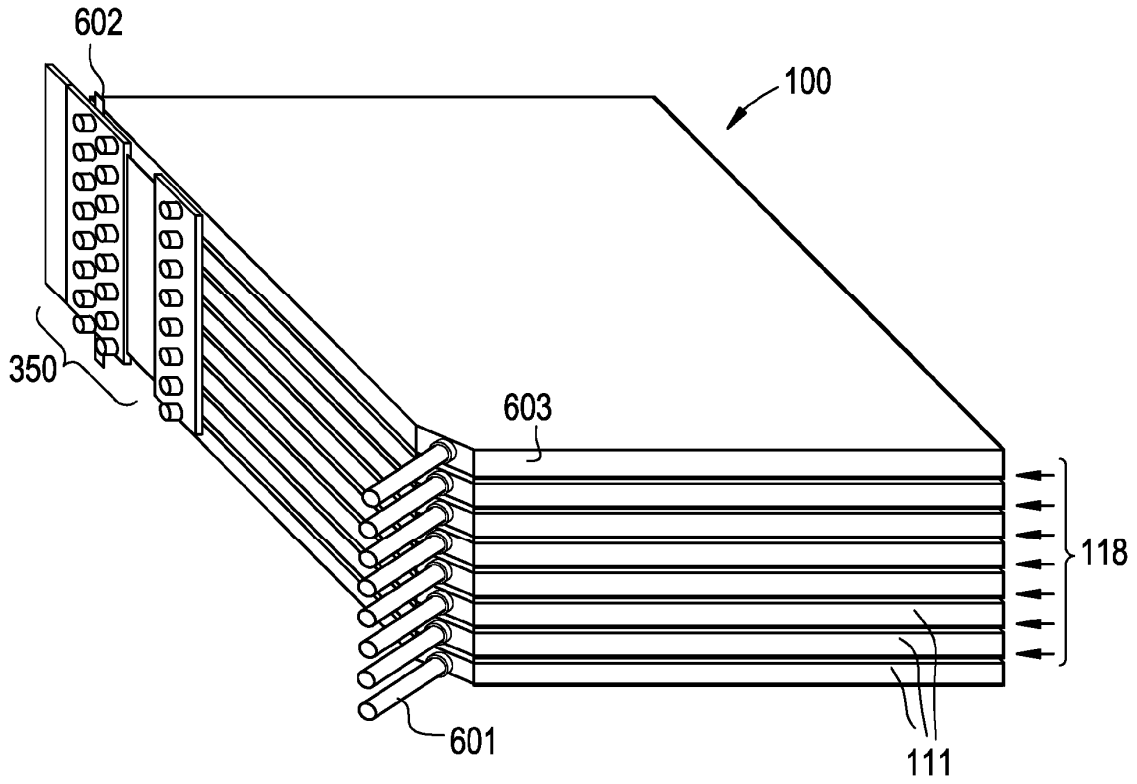


FIG. 7

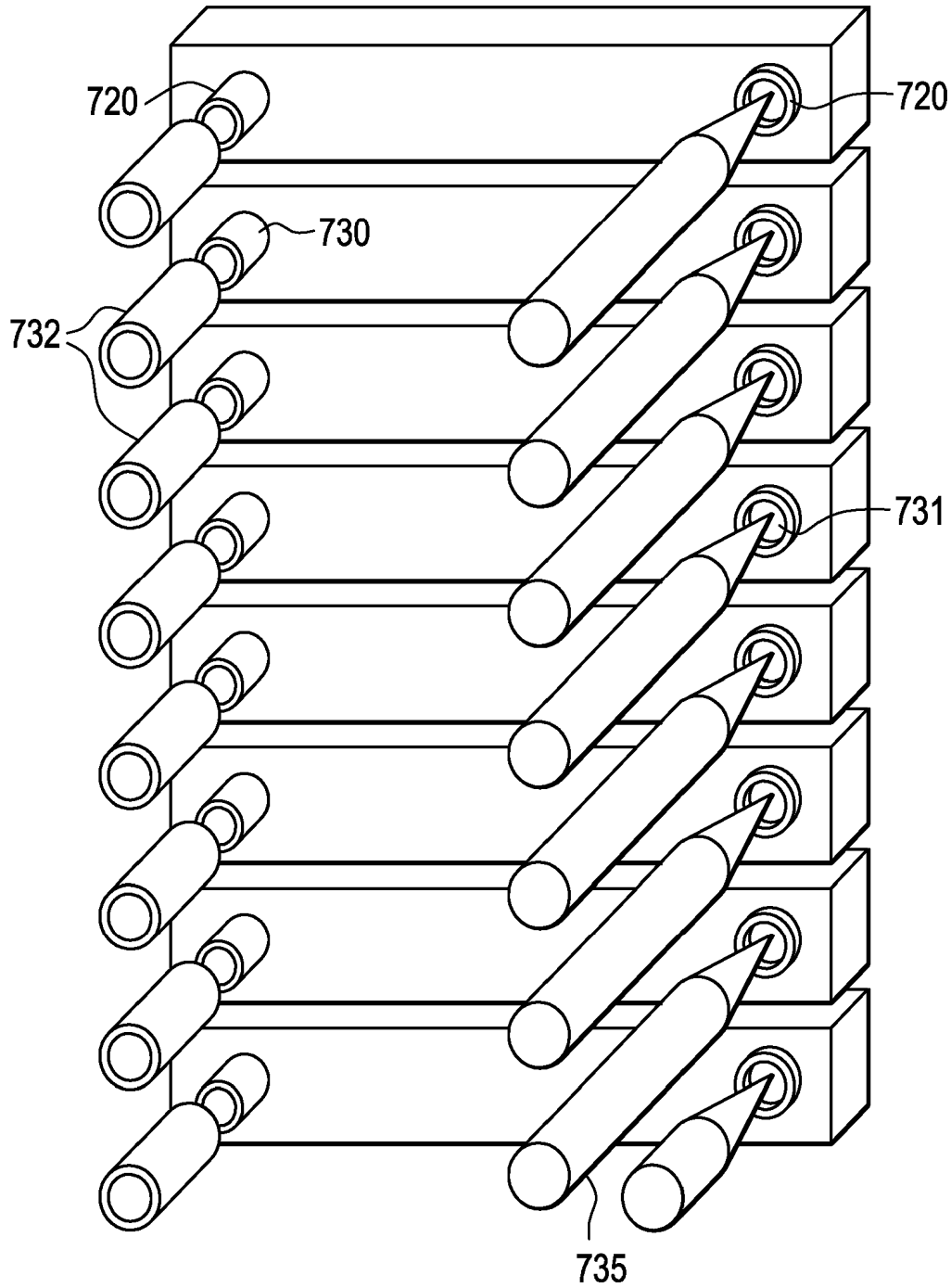


FIG. 8A

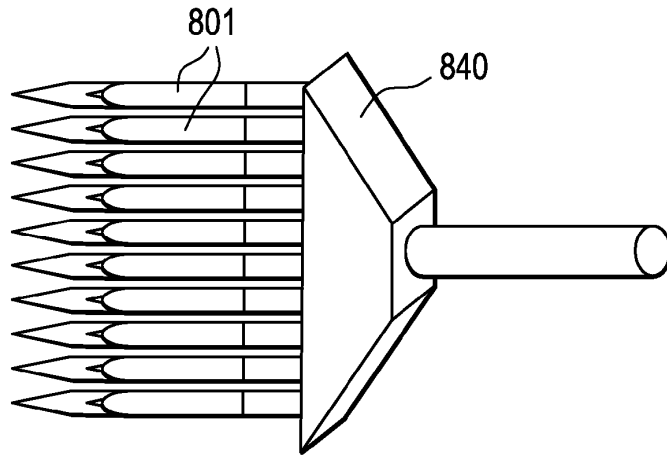


FIG. 8B

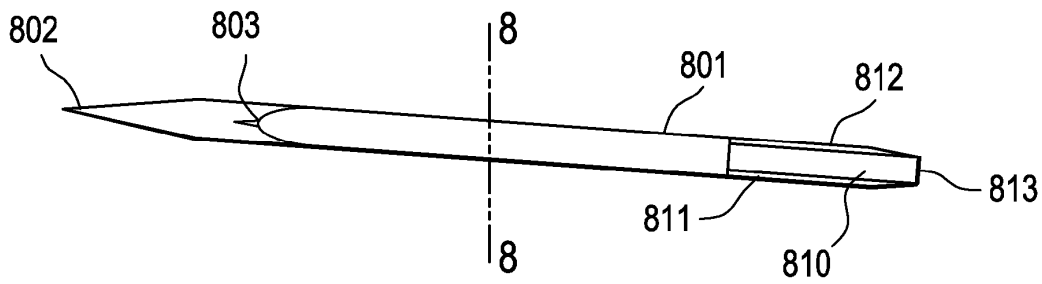


FIG. 8C

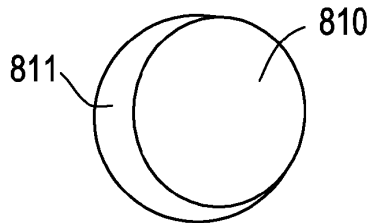


FIG. 9A

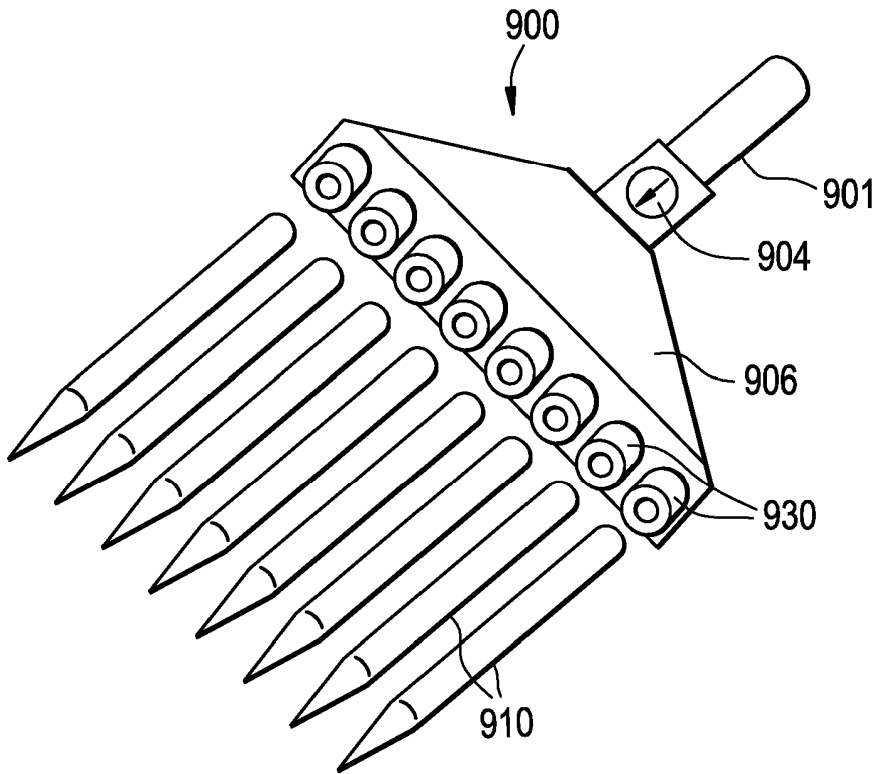


FIG. 9B

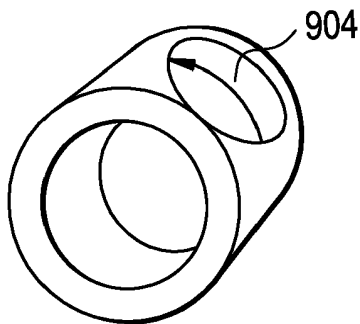


FIG. 9C

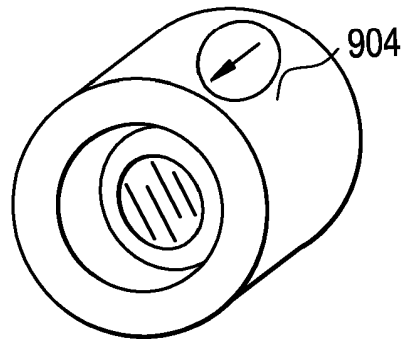


FIG. 10

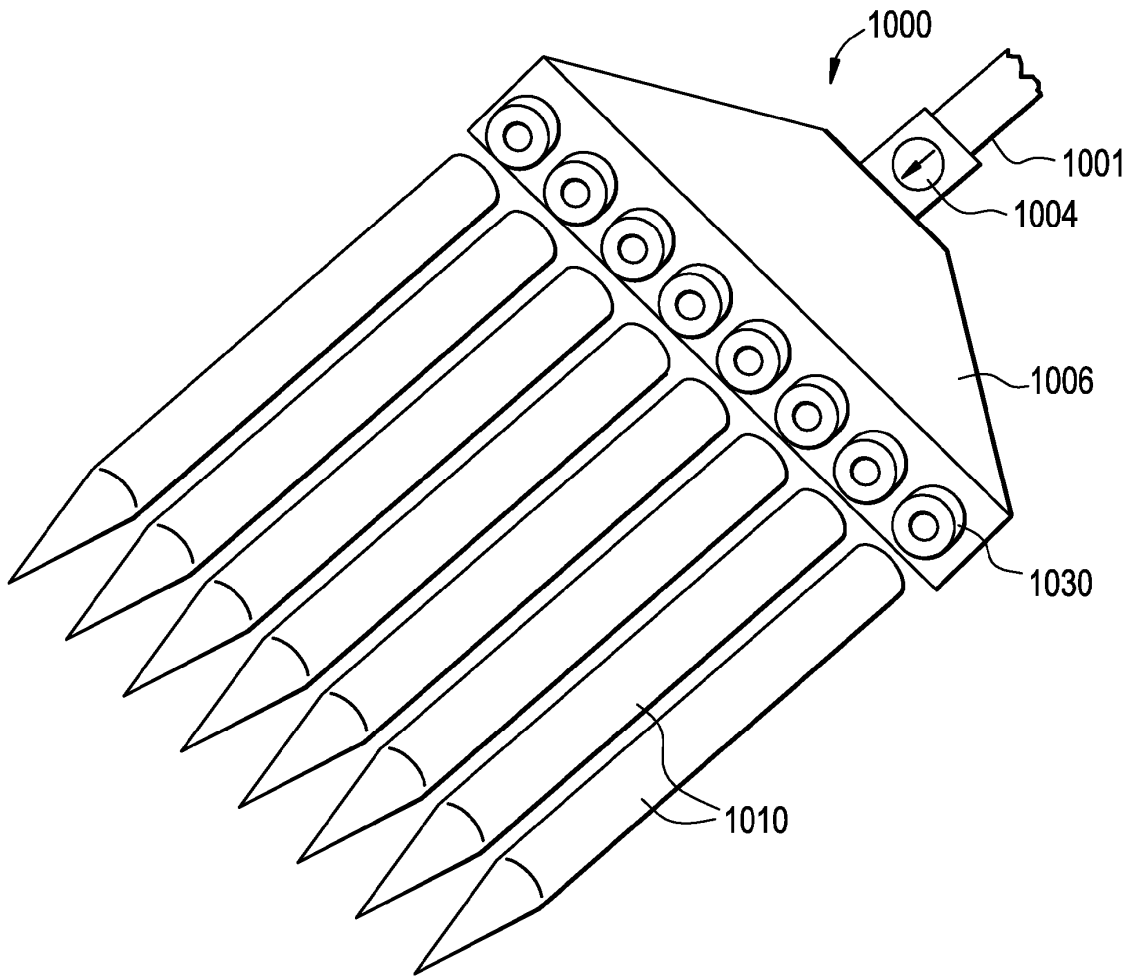


FIG. 11A

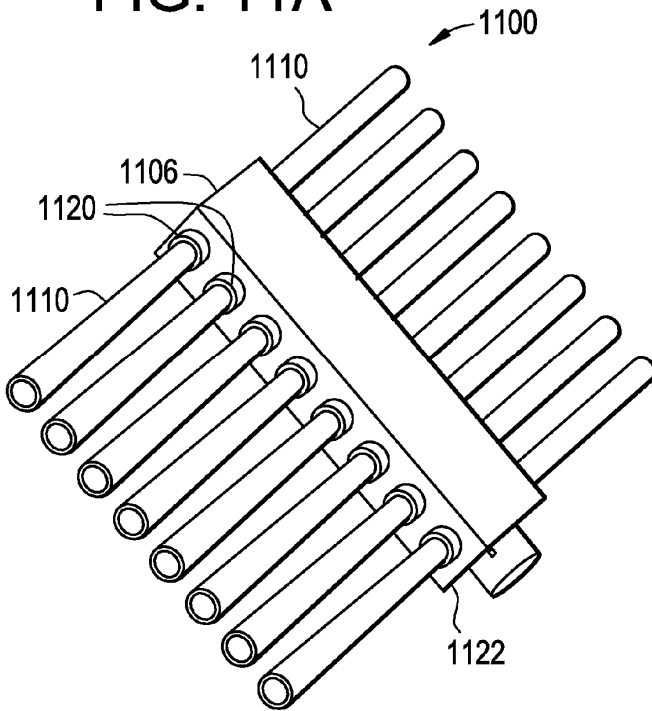


FIG. 11B

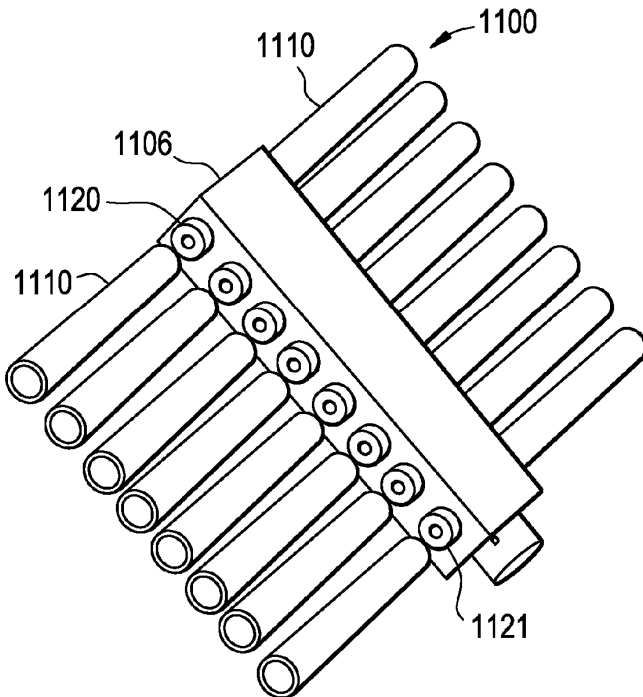


FIG. 12A

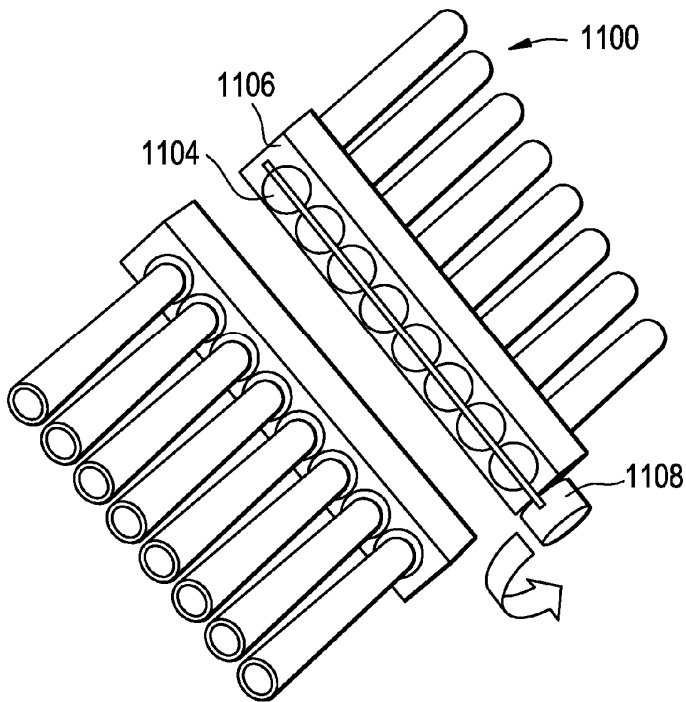


FIG. 12B

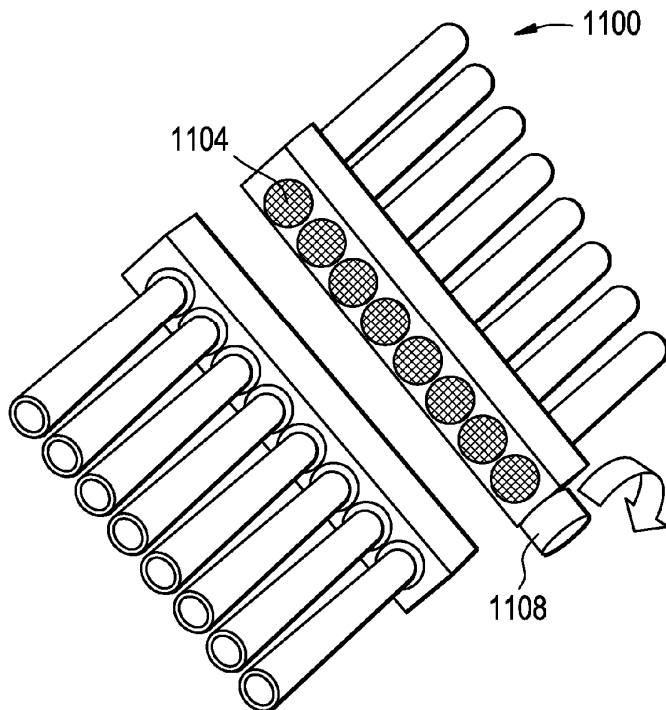


FIG. 13A

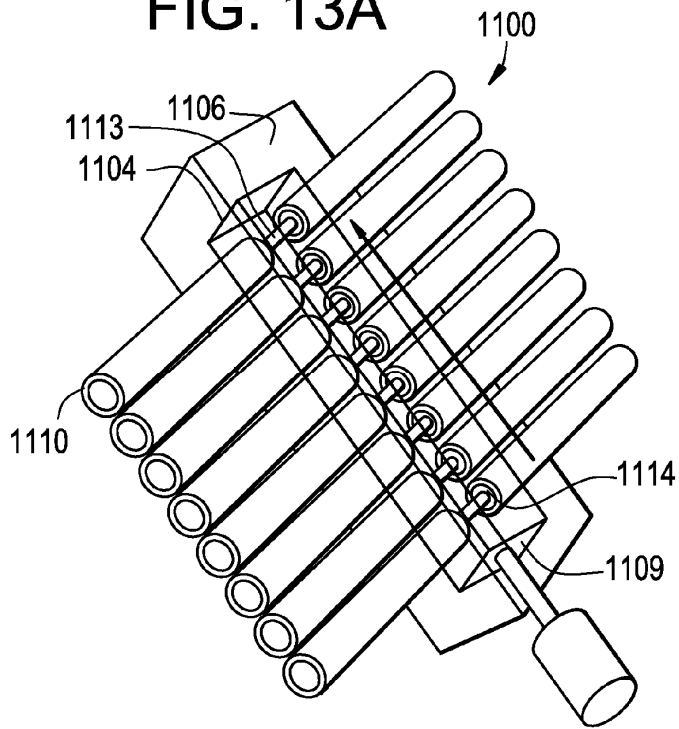


FIG. 13B

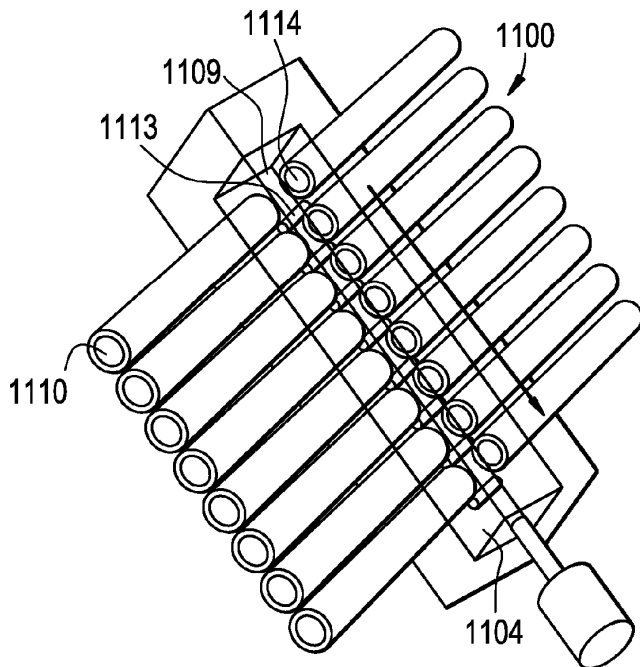


FIG. 14

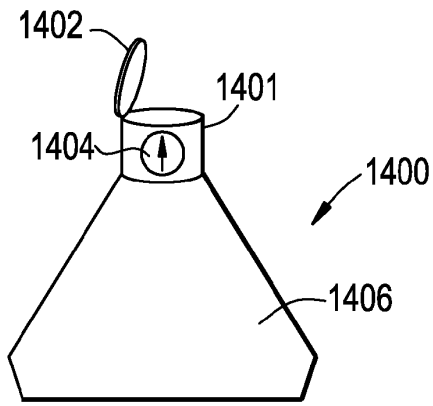


FIG. 15

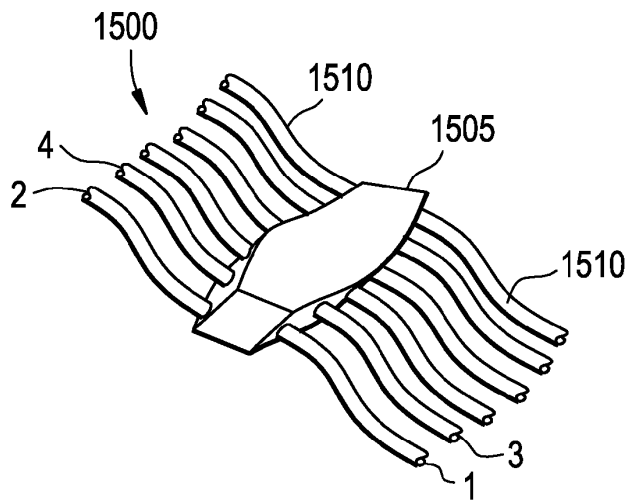


FIG. 16

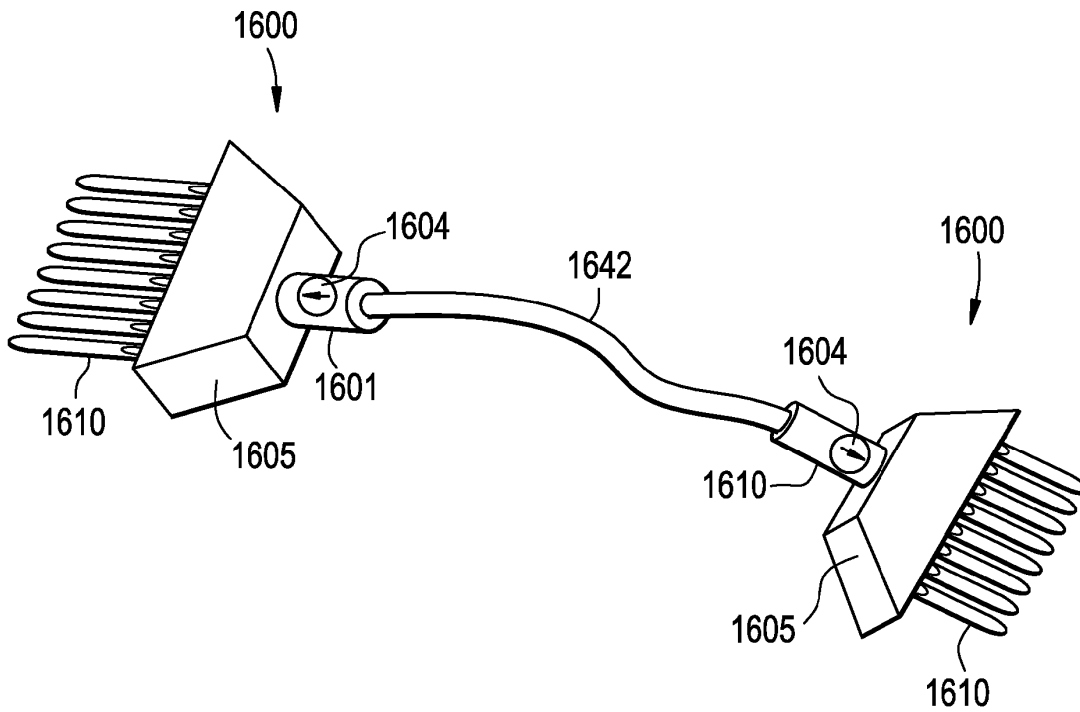


FIG. 17

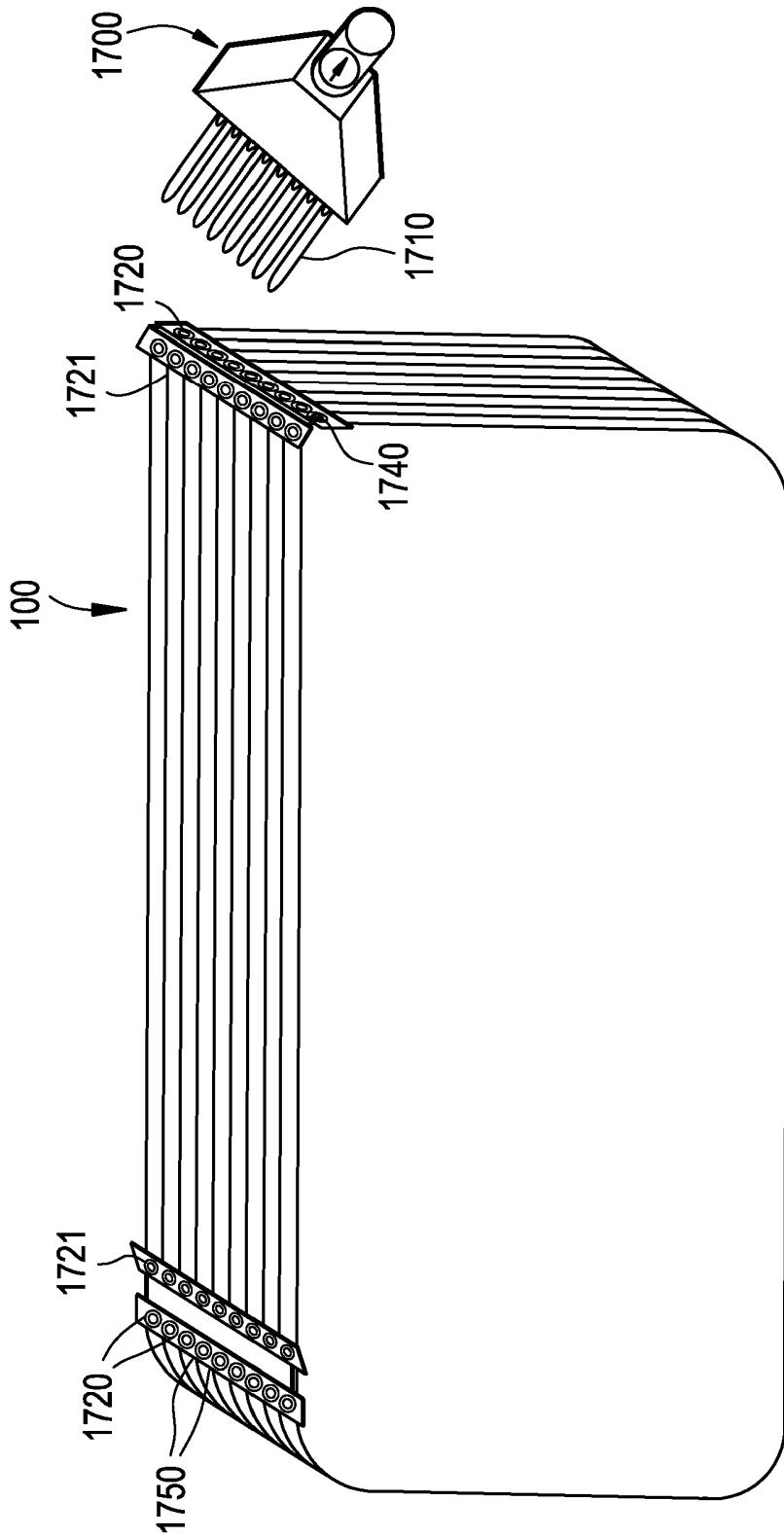


FIG. 18

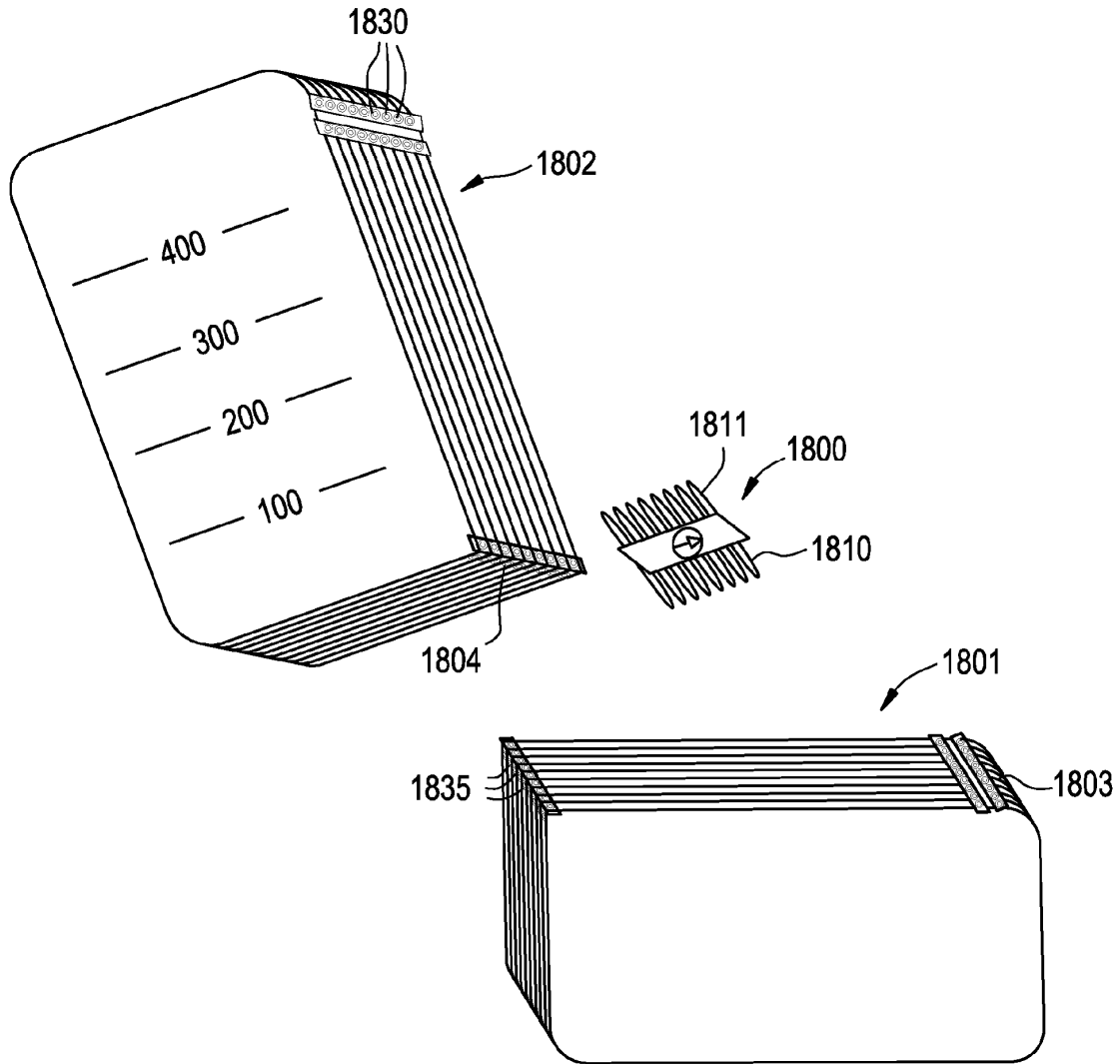


FIG. 19

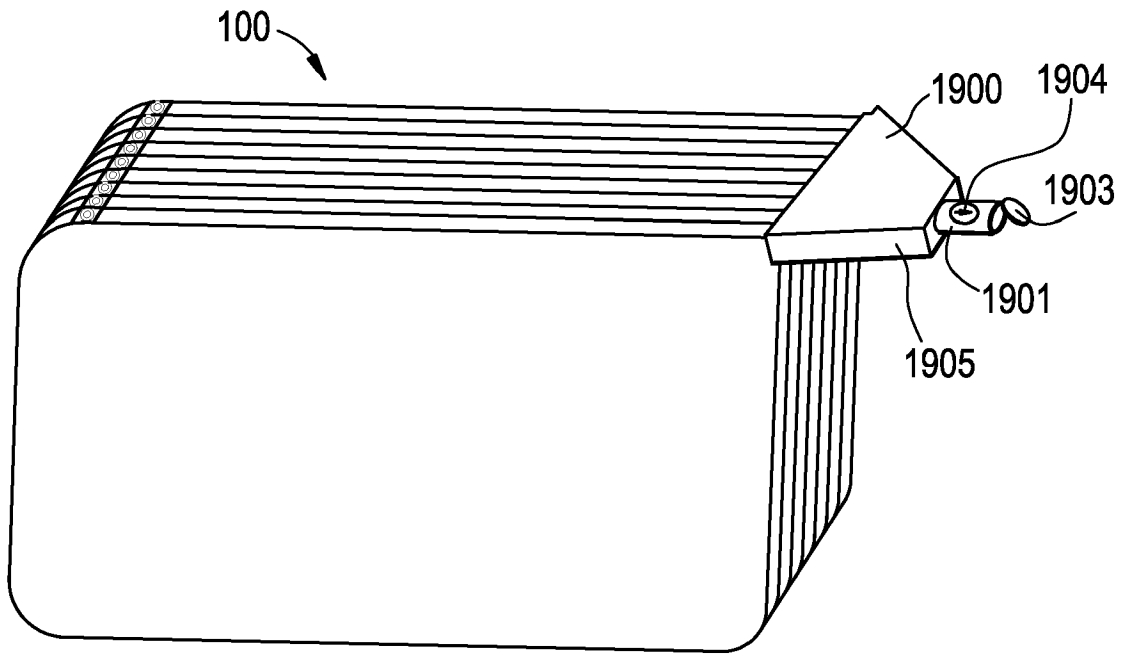


FIG. 20

