



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 331 233**

(51) Int. Cl.:

**C12M 1/24** (2006.01)

**C12M 1/22** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**A61B 19/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02744151 .8**

(96) Fecha de presentación : **09.05.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1389232**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2004**

(54) Título: **Conjunto de bolsa de crioconservación para líneas celulares de mamíferos.**

(30) Prioridad: **09.05.2001 US 289924 P**  
**13.07.2001 US 305460 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.12.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.12.2009**

(73) Titular/es: **Bayer Pharmaceuticals Corporation**  
**400 Morgan Lane**  
**West Haven, Connecticut 06516, US**

(72) Inventor/es: **Wang, De, Qian;**  
**Gardner, Bruce;**  
**Heidmann, Rudiger;**  
**Mered, Mokhtar y**  
**Kelsey, William, H.**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 331 233 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

Conjunto de bolsa de crioconservación para líneas celulares de mamíferos.

5 **Referencias cruzadas con las solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Número 60/289924, presentada el 9 de Mayo de 2001, y de la Solicitud Provisional Número 60/305460 presentada el 13 de Julio de 2001.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un conjunto de bolsa de crioconservación flexible y a un procedimiento para la congelación, almacenamiento, y transferencia de células de mamíferos. Estas células de mamíferos se usan para inocular un biorreactor.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Los productos de biotecnología implican normalmente introducir alguna modificación genética en células de mamíferos y a continuación hacer crecer estas células en un biorreactor. Estos biorreactores están especialmente diseñados para permitir el crecimiento y el mantenimiento de las células de mamíferos.

Para la producción de un fármaco a partir de una línea específica de células de mamíferos genéticamente modificadas, se necesita una fuente celular uniforme cada vez que se inocula un biorreactor. Esta es la razón para la existencia de un Banco Celular de Trabajo del Fabricante (MWCB). Un MWCB está constituido por muchas alícuotas (porciones) de una suspensión celular, conteniendo cada una el mismo tipo de células y aproximadamente el mismo número de células. Estas alícuotas se preparan el mismo día y se congelan en el mismo momento. A continuación, las alícuotas se mantienen a temperaturas muy frías (crioconservadas). Para cada ciclo, se descongela una de estas alícuotas de células para conseguir el mismo punto de partida que en cualquier otro ciclo con las mismas células.

La inoculación satisfactoria de un biorreactor con células de mamíferos requiere una densidad celular mínima para conseguir un crecimiento celular apropiado. Si la densidad celular está por debajo del nivel mínimo, se necesitan requerimientos de tiempo extendidos para conseguir niveles de crecimiento celular comerciales que añaden costes al procedimiento y aumentan la oportunidad de que entren contaminantes en el entorno celular. Si la densidad celular es demasiado elevada, pueden agotarse los nutrientes de los medios, lo que da como resultado un crecimiento celular reducido, y posiblemente la muerte del cultivo celular.

En la práctica actual, cada alícuota de un MWCB tiene un volumen de sólo 1-2 ml. Se requiere este volumen limitado por la necesidad de congelar todas las células de una manera rápida y uniforme. Usando la tecnología existente, si se congelan grandes volúmenes, el diámetro de la suspensión influirá sobre la velocidad de congelación y descongelación de las células, lo que puede dañar las células e influir adversamente sobre la inoculación del biorreactor. La concentración celular en cada alícuota está normalmente en el intervalo de 1-20 millones de células/ml. Los biorreactores de producción contienen normalmente decenas de litros, cientos de litros, o incluso, volúmenes mayores. Debido a esta diferencia radical en el volumen, se usa una "expansión en serie de la siembra" para aumentar el número de células hasta que sean suficientes para introducir en el biorreactor de producción. Por todas las razones anteriores, la expansión en serie de la siembra para una campaña de producción es una etapa crítica del procedimiento.

En los protocolos de producción típicos, se descongela una alícuota de células procedente del MWCB y las células se cultivan en botellas pequeñas (tales como matraces en T). A medida que las células se multiplican, se transfieren a un número creciente de botellas pequeñas. Esto aumenta el número total de células sin que la densidad celular sea demasiado elevada o baja. Una vez que se han acumulado células suficientes, se transfieren a botellas grandes (tales como botellas cilíndricas o matraces con agitación). Cuando se alcanza otro umbral, las células se transfieren a un biorreactor de inoculación. La siembra en serie descrita es práctica general para las diversas líneas celulares de mamíferos y se usa ampliamente en la producción comercial y en la enseñanza (*Lindl y Bauer, 1989, Morgan y Darling, 1993*). Se proporciona también una revisión de una expansión en serie de la siembra comercial usando matraces en T y matraces para agitación centrífuga en *Whitaker y col. 1998*.

Normalmente, en el MWCB se usan viales de tapón roscado. El uso de viales de tapón roscado requiere desenroscar los tapones de vial antes del rellenado y volverlos a enroscar después del rellenado lo que es una operación manual incómoda. Lo que es un riesgo mayor es que mientras que los viales están abiertos, los contenidos están sometidos a contaminación. Es extremadamente importante que no se introduzca contaminación en los viales.

Las expansiones en serie de la siembra tardan normalmente aproximadamente de cuatro a seis semanas para completarse en condiciones óptimas. Debido al gran número de etapas de transferencia, las siembras en serie requieren mucha mano de obra y son susceptibles a la contaminación. Adicionalmente, el ambiente en botellas pequeñas y botellas más grandes no está bien instrumentado o controlado. Cambios en los niveles de pH y oxígeno pueden conducir a heterogeneidad en las células que se transfieren al biorreactor de producción. Esto puede conducir a su vez a variabilidad entre un ciclo de biorreactor y otro, y puede afectar finalmente a la calidad del fármaco que se está produciendo.

El documento D1 (US-B1-6194136) describe un procedimiento y equipo para criopreservar muestras biológicas, y menciona una bolsa de recogida fabricada en PTFE.

El Documento D2 (US-A-6022344) describe una bolsa de criopreservación diseñada para almacenar en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C. La bolsa de criopreservación está equipada con una tubería no de PVC, que se puede cerrar herméticamente y resistente al nitrógeno líquido para conexión estéril.

Cada uno de los riesgos anteriormente descritos para la preparación de una suspensión celular homogénea y uniformemente viable explica la necesidad de mejoras en esta tecnología.

## Resumen de la invención

La invención es un novedoso conjunto de bolsa de congelación y almacenamiento celular para expansión en serie de la siembra de células de mamíferos según se reivindica en la reivindicación independiente 1. La bolsa está construida principalmente de tejido de politetrafluoroetileno. La bolsa está diseñada para mantener células suficientes para que un biorreactor se pueda inocular directamente. La bolsa está diseñada para rellenarse hasta una fracción de su capacidad máxima, de tal manera que la suspensión celular tiene una sección transversal muy delgada. El diseño de la bolsa incluye un conjunto de transferencia que se puede soldar de manera estéril a la fuente de células de mamíferos. Este conjunto de transferencia que se puede soldar de manera estéril permite que las bolsas se rellenen rápidamente con riesgo mínimo de contaminación. Una vez que se rellena cada bolsa, se cierra herméticamente por debajo de la conexión con el conjunto de transferencia, se corta la bolsa "por encima" del nuevo cierre hermético (en el mismo lado del cierre hermético que el conjunto de transferencia). Cuando se va a inocular un biorreactor, se drenan los contenidos de la bolsa mediante una línea de inoculación que se suelda de manera estéril. Durante la congelación y el almacenamiento, la línea de inoculación está protegida del daño mecánico.

## Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes incorporados en, y que forman una parte de, la memoria descriptiva ilustran diversos aspectos de las presentes invenciones, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las invenciones. Los componentes de los dibujos no están necesariamente a escala. En su lugar, se ha puesto énfasis en ilustrar con claridad los principios de las presentes invenciones.

la fig. 1 es un dibujo de una realización preferida de un conjunto que se puede soldar de forma estéril con bolsas unidas;

la fig. 2 es un dibujo de una realización preferida de una bolsa de congelación celular, que muestra los diferentes compartimentos;

la fig. 3 es un detalle de la bolsa de congelación celular, que ilustra una realización preferida de la conexión entre el conjunto de transferencia y la bolsa;

la fig. 4 ilustra la realización preferida de la bolsa antes del relleno, la bolsa rellena y cerrada herméticamente, y la bolsa rellena, cerrada herméticamente y cortada;

la fig. 5 es un detalle de la bolsa de congelación celular, que muestra una realización preferida del compartimento del puerto de espiga, el compartimento de la línea de inoculación, la línea de inoculación y su conexión con el compartimento de suspensión celular;

la fig. 6 es un detalle de la bolsa de congelación celular, que muestra una realización preferida del compartimento de marca en la sección transversal antes y después de que se llene el compartimento de suspensión.

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los términos usados en esta memoria son:

**Biorreactor** - Un recipiente que contiene un entorno controlado para células en crecimiento. Los biorreactores se denominan también fermentadores.

**Tejido de politetrafluoroetileno o Tejido** - Un material flexible que semeja una película o tela preparado mediante cualquier medio a partir de politetrafluoroetileno. Los ejemplos comunes de tejido de Politetrafluoroetileno incluyen película de Teflon®.

**Conjunto de transferencia** - Una pieza de una tubería flexible, en algunos ejemplo con una o más ramas (denominadas en el presente documento como "patas", y usada para conectar el interior de la cámara de una bolsa de almacenamiento con el exterior de la bolsa y/o una fuente de la suspensión celular, y que permite el relleno o el drenaje de los contenidos de la bolsa.

## ES 2 331 233 T3

Sección transversal delgada - Cuando se usen las bolsas de congelación celular de la presente invención, se colocarán por su lado en un casete metálico (denominado también como caja o recipiente) en una orientación sustancialmente nivelada. El espesor de la suspensión celular en cualquier punto en el interior de una bolsa no debería exceder aproximadamente de 10 milímetros. Si el espesor de la suspensión celular tiene sustancialmente más de 10 milímetros, las células adyacentes a la superficie de la bolsa experimentarán condiciones de congelación y descongelación diferentes que las células en el interior de la suspensión, y pueden reaccionar de manera diferente en el curso de la congelación y la descongelación y cuando se usan posteriormente en un biorreactor.

Conjunto de bolsa de congelación celular y almacenamiento - El conjunto incluye la bolsa de congelación celular y la tubería asociada, el puerto de espiga, y se interconecta según se reivindica en la reivindicación independiente 1.

La invención es un conjunto de bolsa de congelación y almacenamiento celular que soporta un nuevo procedimiento para la expansión en serie de la siembra de células de mamíferos. La bolsa está construida principalmente de politetrafluoroetileno. La bolsa está diseñada para contener células suficientes para un biorreactor se pueda inocular directamente con su contenido. La bolsa está diseñada para rellenarse hasta una fracción de su capacidad máxima de tal manera que cuando se coloca sobre su lado, la suspensión celular tiene una sección transversal muy delgada. El diseño de la bolsa incluye un conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril a la fuente de células de mamíferos. Este conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril permite rellenar rápidamente las bolsas con riesgo mínimo de contaminación. Una vez que se rellena cada bolsa, ésta se cierra herméticamente por debajo de la conexión con el conjunto de transferencia y la bolsa se corta "por encima" del nuevo cierre hermético (en el mismo lado del cierre hermético y el conjunto de transferencia). Cuando un biorreactor se va a inocular, se drenan los contenidos de la bolsa mediante una línea de inoculación que se puede soldar de forma estéril. Durante la congelación y el almacenamiento, la línea de inoculación está protegida del daño mecánico.

La bolsa de congelación celular de la presente invención se realiza en un tejido de politetrafluoroetileno en lugar de EVA (bolsas de la técnica anterior). El tejido de politetrafluoroetileno es flexible a menos 180°C y por debajo. (Menos 180°C es la temperatura del nitrógeno líquido. Esta es la temperatura mínima práctica para el almacenamiento en un MWCB). Debido a su flexibilidad a baja temperatura, y a la vez la reducida posibilidad de fractura a baja temperatura, esta característica del tejido proporciona protección adicional de los contenidos de la bolsa de congelación celular durante la congelación, el almacenamiento a largo plazo, y la descongelación.

La bolsa de congelación celular está diseñada para contener aproximadamente 100 ml de la suspensión celular, 100 veces el volumen normalmente congelado en viales de tapón roscado. Las densidades celulares son comparables para las nuevas bolsas de congelación celular y los viales que se usan actualmente. Debido a esta diferencia de volumen, las bolsas pueden contener aproximadamente 100 veces más células que los viales. Una bolsa de congelación celular única contiene células suficientes para permitir la inoculación directa de un biorreactor.

Los volúmenes de suspensión celular que se van a congelar son una fracción de la capacidad potencial de la bolsa de congelación celular. Esto limita el espesor de la suspensión celular. Debido a que la suspensión celular es delgada, la transferencia térmica es rápida y las células se pueden congelar uniformemente a una velocidad óptima. La congelación uniforme ayuda a asegurar la homogeneidad de las células.

Las bolsas de congelación se van a fabricar con un conjunto de transferencia integral. Este conjunto de transferencia integral está compuesto por una longitud tubería de flexible, que en algunas aplicaciones puede tener una o más ramas. Estas ramas se denominan algunas veces como pata o patas. Cuando las bolsas se van a rellenar, el extremo libre del conjunto de transferencia se solda de forma estéril a la longitud de la tubería que está conectada a la fuente de la suspensión celular. Este procedimiento elimina virtualmente la posibilidad de contaminación cuando se rellenan las bolsas.

Cada pata del conjunto de transferencia está conectada a la bolsa de congelación celular. Cada pata tiene una pinza de apriete o dispositivo similar para controlar el flujo de células a la bolsa de congelación celular unida. El conjunto de transferencia y las bolsas conectadas se esterilizan y dosifican como una unidad. Para cada bolsa, la secuencia de relleno es:

- a) se abre la pinza de apriete en la pata del conjunto de transferencia conectado,
- b) se bombea la suspensión celular al interior de la bolsa,
- c) se cierra la pinza de apriete,
- d) se extrae todo el aire de la bolsa por encima de la "línea de cierre hermético" (una línea por debajo de la conexión con el conjunto de transferencia)
- e) se cierra herméticamente la bolsa a lo largo de la "línea de cierre hermético", y
- f) se corta la bolsa por encima del cierre hermético hecho en e), cortando la conexión entre la bolsa y el conjunto de transferencia.

Si se bombea la suspensión celular a velocidad constante, se pueden rellenar las bolsas basándose en un intervalo de tiempo fijo. Una vez se cierra herméticamente la bolsa y se corta por encima de la línea de cierre hermético, el conjunto de transferencia ya no está unido a la bolsa. Esto elimina uno de los puntos de vulnerabilidad durante el almacenamiento.

La presente invención usa una longitud unida de una tubería que se puede soldar de forma estéril para drenar los contenidos. Esta longitud de tubería se denomina línea de inoculación. Un extremo de la línea de inoculación está conectado con el cuerpo de la bolsa de congelación celular. Este extremo conectado comunica libremente con el compartimento que contiene la suspensión celular. Durante el almacenamiento, la línea de inoculación está protegida del daño mecánico encerrándola firmemente en su propio compartimento. Cuando se van a usar los contenidos de la bolsa, el extremo libre de la línea de inoculación se suelda de forma estéril con una longitud de tubería que está conectada al biorreactor de inoculación.

La invención se basa en un nuevo conjunto de bolsa de crioconservación según se reivindica en la reivindicación 1 para la expansión en serie de la siembra de las células de mamíferos. Usando este nuevo conjunto de bolsa, se aumenta el número de células en cada alícuota del MWCB. Esto reduce la extensión a la cual deben multiplicarse las células en la expansión en serie de la siembra. Es posible aumentar un poco el número de células por alícuota concentrándolas. Sin embargo, es más sencillo aumentar el volumen de cada alícuota.

Para el nuevo conjunto de bolsa de crioconservación según se reivindica en la reivindicación 1 para la expansión en serie de la siembra de células de mamíferos, se aumenta el volumen de cada alícuota a 100 ml. Un biorreactor dedicado a inoculación se inocula directamente transfiriendo de manera estéril los contenidos de la bolsa de congelación celular al biorreactor. Esta inoculación tiene lugar sin que intervenga ningún matraz de cultivo de tejido, botellas cilíndricas, matraces en agitación, o recipientes comparables. El volumen inicial de cultivo en el biorreactor dedicado a inoculación es de 2 l, aumentando a 15 l a medida que se multiplican las células (*Heidemann y col, 2001*).

No es suficiente usar un vial más grande con la misma geometría que los usados en la práctica corriente. Cuando se escala esta geometría, la sección transversal más grande da como resultado tiempos de congelación más largos y un gradiente térmico significativo entre el exterior del vial y el centro. Esto es una desviación del requisito de una alícuota homogénea de células para la inoculación del biorreactor. Se usa un diseño basado en bolsa para proporcionar una sección transversal que sea de espesor comparable al los viales de congelación celular usados en la práctica actual. Más específicamente, se rellena la bolsa hasta una fracción de su capacidad máxima para proporcionar una sección transversal muy delgada. La sección transversal delgada da como resultado un enfriamiento rápido de la alícuota completa, con un gradiente térmico muy pequeño.

Existen bolsas de congelación celular en el mercado que se adecúan a los volúmenes descritos anteriormente (*Vijayaraghavan y col, 1998* y *Regidor y col, 1999*), sin embargo, estas bolsas tienen numerosas limitaciones. Las bolsas de congelación celular actualmente disponibles están construidas principalmente en acetato de etileno vinilo (EVA). El EVA es quebradizo a las temperaturas a las que se almacenan normalmente las suspensiones celulares. Esto da como resultado que las bolsas de congelación celular sean frágiles desde el momento en el que los contenidos de la bolsa se reducen a las temperaturas de almacenamiento hasta el momento en el que los contenidos de la bolsa comienzan a descongelarse. Este intervalo de vulnerabilidad incluye el almacenamiento a largo plazo, que se mide normalmente en décadas. Cualquier agrietamiento de la bolsa de congelación celular en este intervalo de vulnerabilidad da probablemente como resultado la contaminación de los contenidos.

Una segunda limitación de las bolsas de congelación celular actualmente disponibles es el uso extendido de tuberías de policloruro de vinilo (PVC) para rellenar y drenar las bolsas. La tubería de PVC es quebradiza a las temperaturas normales de almacenamiento de la suspensión celular, y se sabe que el plastificante usado en la fabricación de los materiales de PVC lixivia el plástico en los medios que lo rodean. Estas limitaciones hacen del PVC una elección indeseable para estas bolsas de congelación celular.

Una tercera limitación de las bolsas de congelación celular actualmente disponibles es que se vacían mediante un puerto con cierre Luer o cubierto por membrana. De nuevo, esto es una fuente potencial de contaminación.

## Figura 1

La Figura 1 muestra la realización preferida del conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril. El extremo libre del conjunto de transferencia es estéril y se puede soldar. En la realización preferida, toda la tubería del conjunto de transferencia es compatible con un soldador para tubería estéril. En algunas realizaciones, parte o toda la tubería diferente del extremo libre no es compatible con el soldador para tubería estéril.

En la realización preferida, hay 10 bolsas conectadas al conjunto de transferencia. En otras realizaciones, hay entre 2 y 100 bolsas conectadas al conjunto de transferencia.

En la presente realización, el extremo libre tiene la misma longitud de tubería que el resto de las patas que están conectadas. En otras realizaciones, pueden estar interviniendo uniones o conectores entre el extremo libre y las patas.

## ES 2 331 233 T3

En la realización preferida, el extremo libre del conjunto de transferencia se suelda bien herméticamente para evitar la contaminación. En otras realizaciones, el extremo libre del conjunto de transferencia no se suelda bien herméticamente, sino que en su lugar se:

1. cierra por medio de una pinza, o
2. cierra por medio de una válvula, o
3. un dispositivo de desconexión rápida, o
4. mantiene en una condición estéril por medio de un envasado secundario.

En la realización preferida, el flujo hacia cada bolsa de congelación celular está controlado mediante una única pinza de apriete cautiva. En otras realizaciones, las pinzas de apriete en las patas del conjunto de transferencia pueden no estar cautivas sino que, en su lugar, pueden aplicarse a la tubería en el momento del uso. Adicionalmente, en algunas realizaciones, se pueden usar en lugar de las pinzas de apriete válvulas de bola, válvulas de compuerta, válvulas de mariposa, o dispositivos de control de flujo en línea comparables en las patas del conjunto de transferencia.

En la realización preferida, la longitud entre el extremo libre y el comienzo de cada pata es de 10-15 centímetros. En otras realizaciones, esta longitud puede oscilar entre 1 centímetro y 1000 centímetros.

En la realización preferida, la longitud de cada pata es de 10-15 centímetros. En otras realizaciones, esta longitud puede ser la misma o variar de pata a pata dentro de intervalo de 1 centímetro a 200 centímetros.

### Figura 2

La Figura 2 muestra la realización preferida de los compartimentos en la bolsa de congelación celular. Cuando una bolsa de congelación celular está rellena con la suspensión celular, específicamente, es el compartimento de la suspensión celular el que se rellena. Este compartimento se rellena mediante el conjunto de transferencia. La suspensión celular permanece en este compartimento durante la congelación, el almacenamiento y la descongelación. Tras la descongelación, la suspensión de células se drena de este compartimento mediante la línea de inoculación.

En la realización preferida, la capacidad del compartimento de suspensión celular cuando se infrarrellena para mantener una sección transversal delgada adecuada, es de 100 milímetros. En otras realizaciones, la capacidad del compartimento de suspensión celular puede oscilar entre 2 milímetros y 5 litros.

En la realización preferida, el compartimento de la línea de inoculación se muestra como adyacente al compartimento de suspensión celular y al compartimento de marca. En otras realizaciones, el compartimento de la línea de inoculación puede estar:

1. adyacente al compartimento de la suspensión celular, pero no adyacente al compartimento de marca, y/o
2. parcialmente dentro del compartimento de la suspensión celular, o
3. enteramente dentro del compartimento de la suspensión celular.

El compartimento de la línea de inoculación se describirá adicionalmente en relación con la Figura 5.

Se accede al compartimento de marca mediante una ranura estrecha. Tras la inserción de la marca, se rellena el compartimento de la suspensión celular. El aumento del espesor del compartimento de la suspensión celular tras el relleno obstruye la abertura en el compartimento de marca. Esto hará improbable que la marca se resbale.

En algunas realizaciones no existe compartimento de marca separado, marcándose la bolsa:

1. directamente mediante transferencia de tinta u otro pigmento (usando una prensa, estampadora, pluma, rotulador, o impresora), o
2. con una marca adhesiva, o
3. con una serie de muescas en el borde de la bolsa, o
4. estampando en relieve el material de la bolsa
5. con una serie de perforaciones del material de la bolsa, o
6. con material incluido en la suspensión celular, o
7. con marcas en la línea de inoculación

Figura 3

La Figura 3 muestra la realización preferida de la conexión entre el extremo de la bolsa del conjunto de transferencia y el compartimento de la suspensión celular. En esta realización, el extremo del conjunto de transferencia penetra en la costura del compartimento de la suspensión celular. Adicionalmente, en algunas realizaciones, puede existir un accesorio que penetre en la costura del compartimento de la suspensión celular y el conjunto de transferencia se conecta a este accesorio.

El extremo del conjunto de transferencia que está en el interior del compartimento de la suspensión celular está abierto.

Figura 4

La Figura 4 ilustra la realización preferida de la bolsa antes del rellenado (a), la bolsa rellena y cerrada herméticamente (b), y la bolsa rellena, cerrada herméticamente y cortada (c). El dibujo de la parte superior (a) muestra la bolsa antes de que se haya rellenado. Suponiendo que el conjunto de transferencia se haya conectado ya a la fuente celular, tienen lugar las siguientes etapas entre los dibujos de la parte superior y la media:

- a) se abre la pinza de apriete en la pata del conjunto de transferencia conectado,
- b) se bombea la suspensión celular al interior de la bolsa,
- c) se cierra la pinza de apriete
- d) se extrae todo el aire de la bolsa por encima de la “línea de cierre hermético”, y
- e) se cierra herméticamente la bolsa a lo largo de la “línea de cierre hermético”.

Entre los dibujos de la parte media (4(b)) y superior (4(c)), se corta la bolsa por encima del cierre hermético realizado en la etapa e). Esto retira el conjunto de transferencia de la porción de la bolsa que se va a congelar y almacenar. También, la porción que se va a almacenar contiene poco o ningún aire.

En la realización preferida, se imprime la línea de cierre hermético en la bolsa de congelación celular directamente mediante transferencia de tinta u otro pigmento (usando una prensa, estampadora, pluma, rotulador, o impresora). En otras realizaciones, la línea de cierre hermético está marcada:

1. con estampado en relieve del material de la bolsa, o
2. con una marca adhesiva, o
3. con material que se pega o se suelda a la bolsa, o
4. con una o más muescas en el borde de la bolsa, o
5. con una serie de perforaciones del material de la bolsa en el borde de la bolsa.

Figura 5

La Figura 5 muestra la realización preferida del compartimento del puerto de espiga, el compartimento de la línea de inoculación, la línea de inoculación y su conexión al compartimento de la suspensión celular. En la realización preferida, el compartimento de la línea de inoculación se dimensiona para encajar estrechamente la línea de inoculación, proporcionando a ésta protección contra el daño. Ajustando estrechamente el compartimento a la línea de inoculación, únicamente se pierde un volumen limitado de suspensión celular si se produce algún daño en la línea de inoculación. Adicionalmente, en otras realizaciones, se puede proteger la línea de inoculación mediante la inclusión de material de empaquetado en el compartimento de la línea de inoculación, la inclusión de material rígido en las costuras o la superficie del compartimento de la línea de inoculación, o la inclusión del compartimento de la línea de inoculación en el compartimento de la suspensión celular.

En la realización preferida, la longitud completa de la inoculación es compatible con un soldador para tubería estéril. En algunas realizaciones, parte de la tubería diferente del extremo libre no es compatible con un soldador para tubería estéril.

En esta realización, la tubería de inoculación es una longitud única de tubería. En otras realizaciones pueden intervenir juntas, codos u otros conectores en la tubería de inoculación.

En la realización preferida, la longitud de la tubería de inoculación en el interior del compartimento de la tubería de inoculación es de 10-20 centímetros. En otras realizaciones, la longitud de la tubería puede oscilar entre 3 centímetros y 3 metros.

## ES 2 331 233 T3

El extremo de la línea de inoculación en el interior del compartimento de la suspensión celular está abierto. En esta realización, el extremo de la línea de inoculación penetra la costura entre el compartimento de la suspensión y el compartimento de la línea de inoculación. Adicionalmente, en algunas realizaciones, existe un accesorio que penetra la costura entre el compartimento de la suspensión celular y el compartimento de la línea de inoculación, y el conjunto de transferencia se conecta a este accesorio.

En la realización preferida, la línea de inoculación tiene una flexión de noventa grados dentro del compartimento de la línea de inoculación. Adicionalmente, en otras realizaciones, la línea de inoculación puede:

1. no tener flexión, o
2. tener un número de flexiones de 90° diferentes de 1, pero entre una y veinte, o
3. tener de una a veinte flexiones en ángulos mayores o menores de 90°, o
4. tener de una a veinte flexiones en una combinación de ángulos, o
5. formar una espiral (señalar que una línea espiral puede ser más difícil de usar en conjunción con un soldador para tubería estéril).

En la realización preferida, el extremo libre de la línea de inoculación se suelda bien herméticamente para evitar la contaminación y para reducir la probabilidad de que la suspensión celular migre a la línea de inoculación antes de que se vacíe la bolsa. Adicionalmente, en algunas realizaciones, el extremo libre de la línea de inoculación no se suelda bien herméticamente, sino que en lugar de esto se cierra por medio de:

1. una válvula de bola, válvula de compuerta, válvula de mariposa, o dispositivos de control de flujo en línea comparables incorporados por el fabricante, o
2. una válvula de bola, válvula de compuerta, válvula de mariposa, o dispositivos de control de flujo en línea comparables incorporados, añadidos por el usuario, o
3. una pinza aplicada por el fabricante, o
4. una pinza aplicada por el usuario, o
5. un dispositivo de desconexión rápida con válvula incorporada, o
6. un dispositivo de desconexión rápida tapado por el fabricante, o
7. un dispositivo de desconexión rápida tapado por el usuario.

La Figura 5 ilustra también el compartimento del puerto de espiga. En el caso en el que se dañe la línea de inoculación, será posible drenar la bolsa por medio del puerto de espiga. Debido a que el puerto de espiga está en su propio compartimento, se puede acceder a éste sin pérdida adicional de la suspensión celular desde la línea de inoculación.

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de bolsa de crioconservación del banco celular de trabajo del fabricante que comprende:

una bolsa de politetrafluoroetileno, comprendiendo la bolsa cuatro compartimentos separados y cerrados herméticamente, comprendiendo dichos compartimentos un compartimento de la suspensión celular, un compartimento del puerto de espiga, un compartimento de la línea de inoculación y un compartimento de marca;

una primera longitud de tubería no de PVC que se puede usar para acoplar de manera estéril antes de la crioconservación y conectarse y comunicar con uno de los compartimentos cerrados herméticamente una segunda longitud de tubería no de PVC resistente a una temperatura de  $-180^{\circ}\text{C}$  que se puede usar para acoplar de manera estéril tras la crioconservación y conectarse a y comunicar con uno de los compartimentos cerrados, y

un puerto de espiga que tiene medios para exportar células desde uno de los compartimentos.

2. El conjunto de bolsa de crioconservación de la reivindicación 1, en el que el compartimento de la suspensión celular comprende medios de conexión impermeable que unen dicha primera longitud de tubería con dicho compartimento de la suspensión celular, y a través del cual se pueden transferir las células al interior de dicho compartimento.

3. El conjunto de bolsa de crioconservación de la reivindicación 1, en el que el compartimento de la línea de inoculación comprende medios de conexión herméticos resistentes a una temperatura de  $-180^{\circ}\text{C}$  que unen dicha segunda longitud de tubería con dicho compartimento de la suspensión celular y a través de los cuales se pueden transferir las células al exterior de dicho compartimento.

4. El conjunto de bolsa de crioconservación de la reivindicación 3, en el cual la segunda longitud de tubería está contenida en el interior del compartimento de la línea de inoculación.

5. El conjunto de bolsa de crioconservación de la reivindicación 1, en el que el puerto de espiga está encerrado en el interior del compartimento del puerto de espiga.

6. El conjunto de bolsa de crioconservación de la reivindicación 1, en el que el compartimento de marca comprende una ranura de acceso configurada para permitir la inserción de una marca en dicho compartimento de marca.

**Extremo libre del conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril**

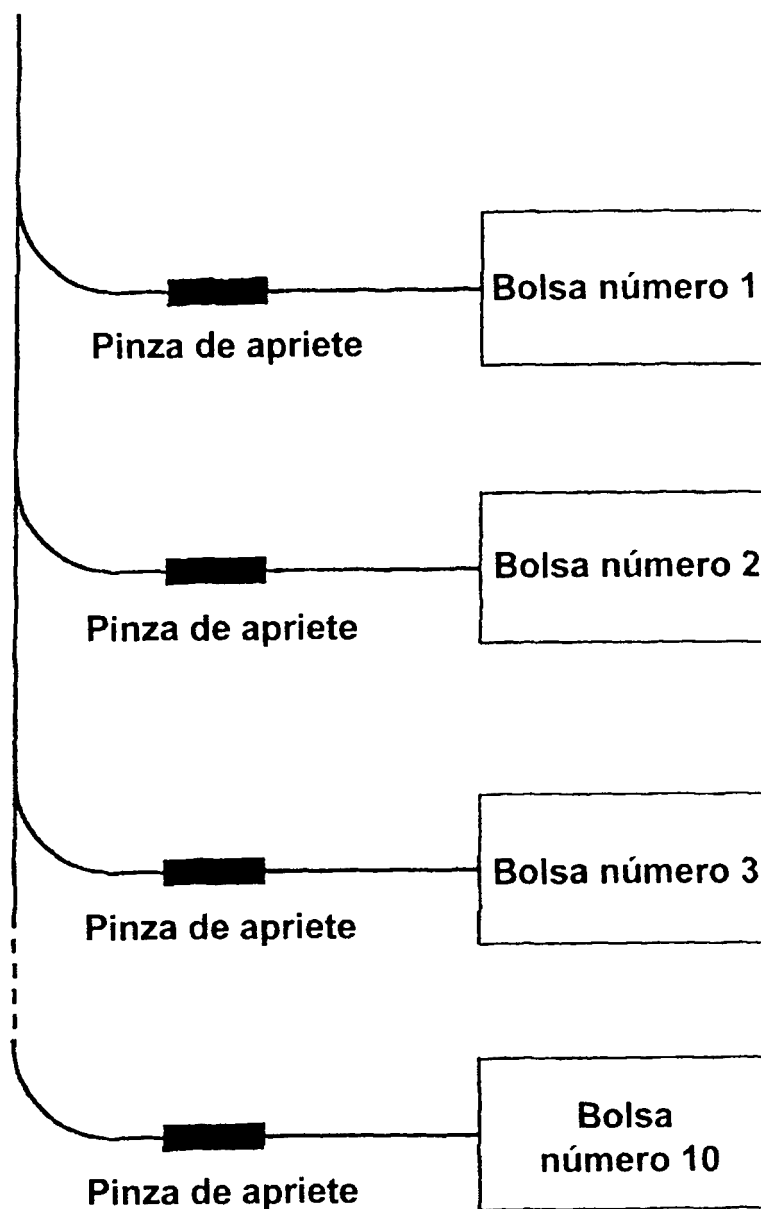


**Figura 1**

**Realización preferida del conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril con las bolsas unidas.**

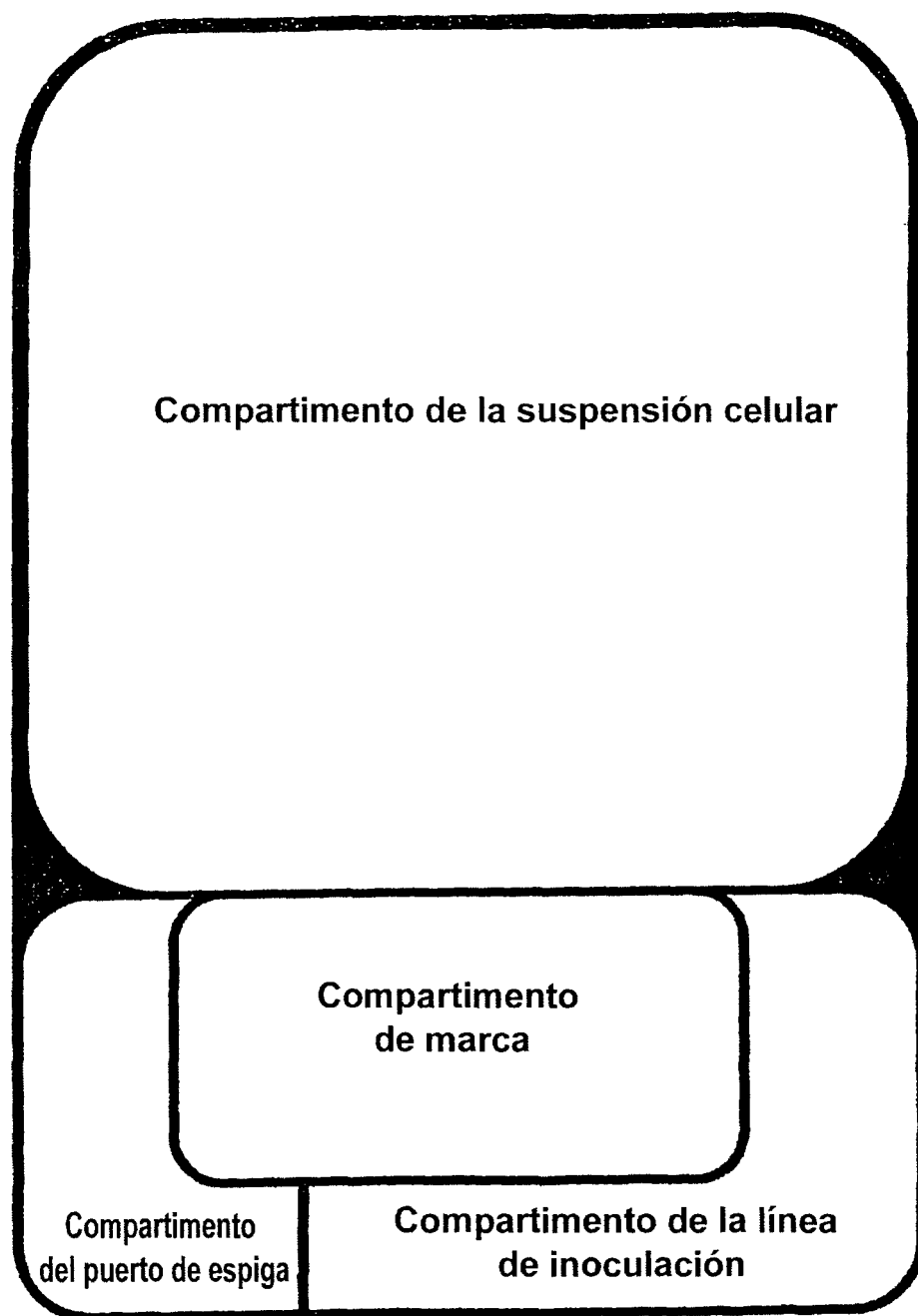


**Figura 2**

**Dibujo de una realización preferida de una bolsa de congelación celular, que muestra los diversos compartimentos.**

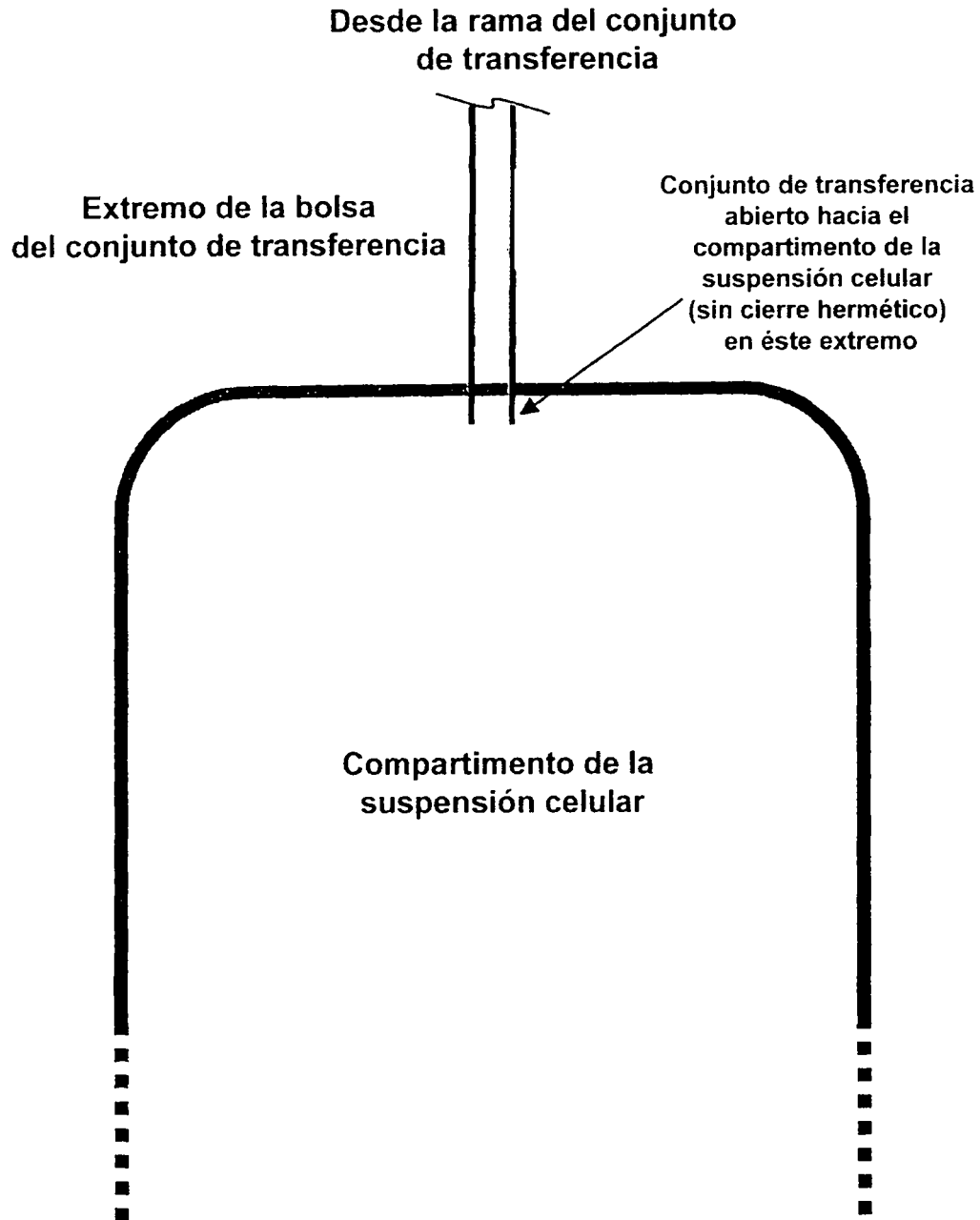


Figura 3

Detalle de la bolsa de congelación celular, que ilustra una realización preferida de la conexión entre el conjunto de transferencia y la bolsa.

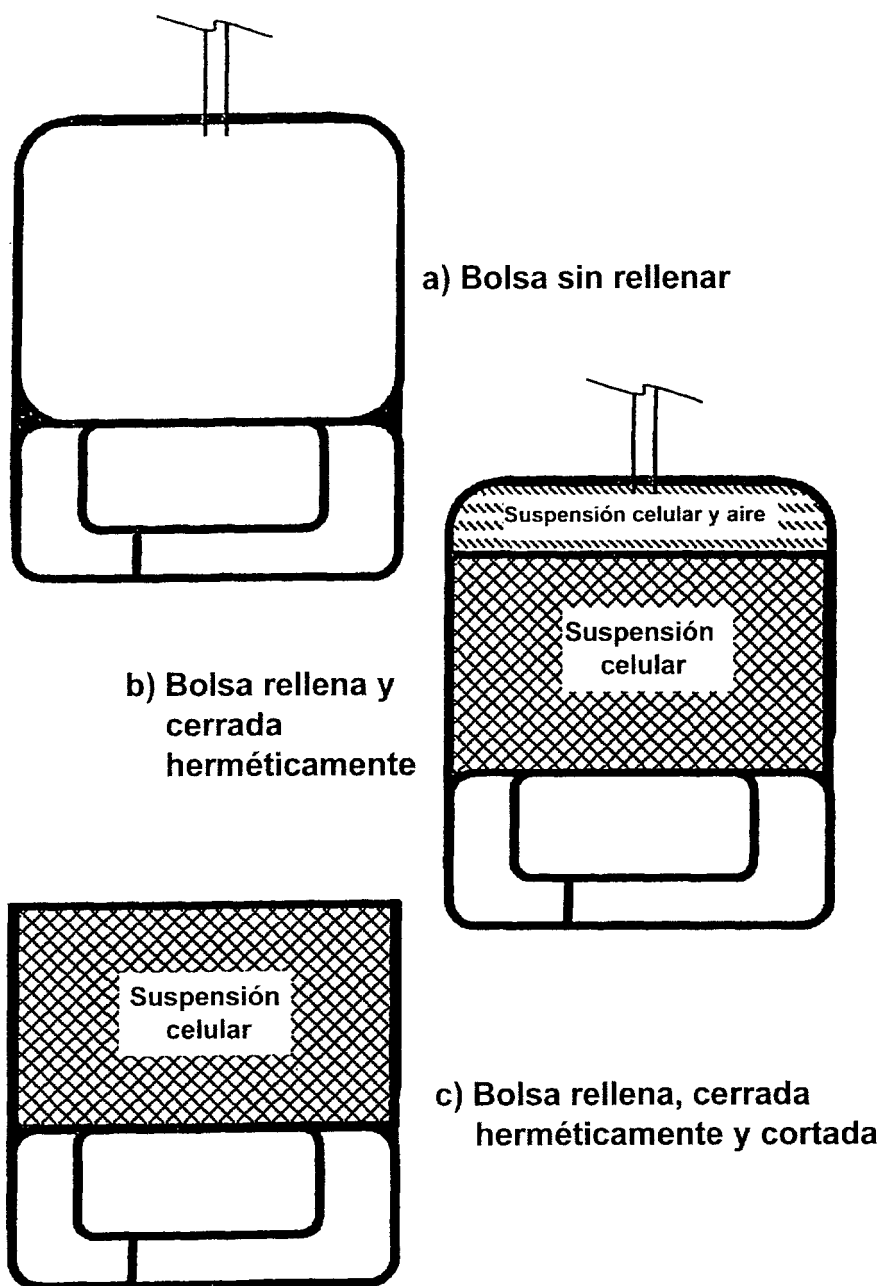


**Figura 4**

Realización preferida de la bolsa a) antes de rellenar, b) la bolsa rellena y cerrada herméticamente, y c) la bolsa rellena, cerrada herméticamente y cortada.

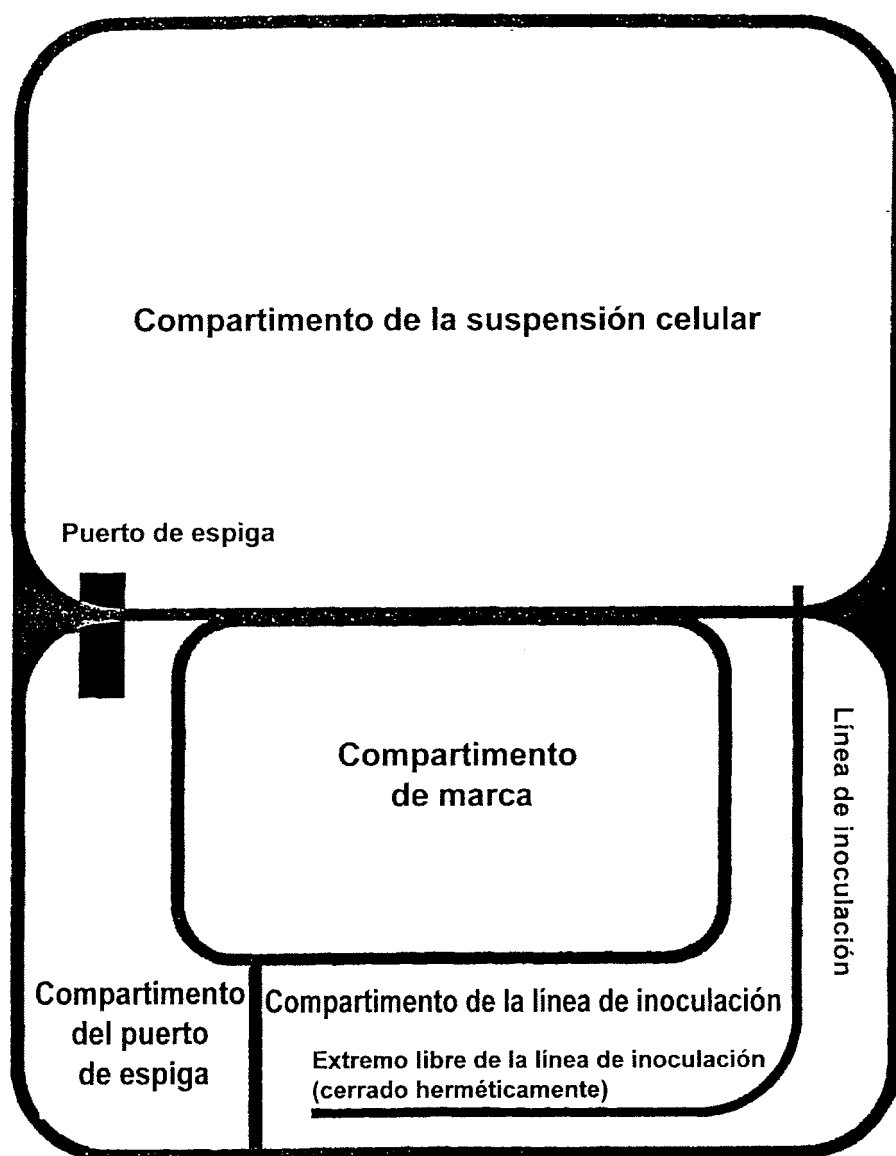


**Figura 5**

Detalle de la bolsa de congelación celular, que muestra una realización preferida del compartimento del puerto de espiga, el compartimento de la línea de inoculación, la línea de inoculación y su conexión con el compartimento de la suspensión celular.

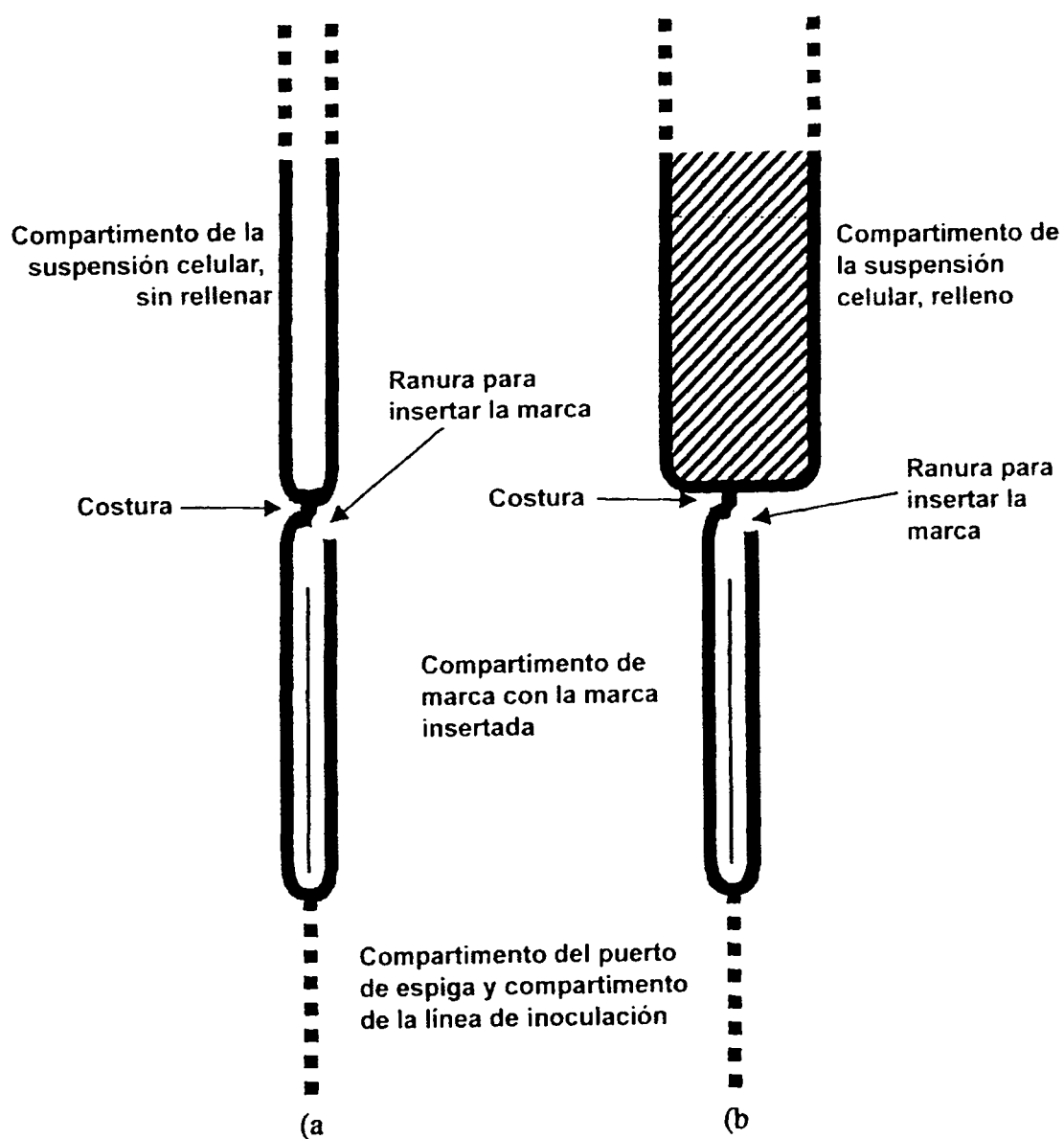


**Figura 6**

Detalle de la bolsa de congelación celular, que muestra una realización preferida del compartimento de marca en sección transversal. En la izquierda, el compartimento de la suspensión celular está sin rellenar (a, en la derecha, éste está relleno (b).