



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 212**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/20 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04007860 .2**

86 Fecha de presentación : **11.06.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1445022**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Aparato multipocillo de cultivo de células.**

30 Prioridad: **14.06.2001 US 298244 P**
14.06.2001 US 298263 P
14.06.2001 US 298240 P
14.06.2001 US 298265 P
14.06.2001 US 298264 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

72 Inventor/es: **Desilets, Kenneth;**
Philipps, Jeanne y
Rising, Donald

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 270 212 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

Aparato multipocillo de cultivo de células.

Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un aparato multipocillo (multiwell) de cultivo de células que es utilizado para favorecer las interacciones de fluidos tal como cultivando células en un medio nutriente dentro de los pocillos. Más particularmente, esta invención se refiere a una placa filtrante multipocillo (multiwell) tal de un aparato multipocillo (multiwell) de cultivo de células que permite añadir o eliminar líquido a/de la placa de alimentación de un aparato multipocillo de cultivo de células sin perturbar un material tal como células dentro de los pocillos, y dos placas, una para cultivar las células y la otra para el ensayo de las células.

En el momento actual, el aparato de ensayo multipocillo para ensayar muestras incluye una placa filtrante multipocillo, una placa de alimentación de pocillo único, una placa receptora multipocillo (multiwell) y una tapa. Los pocillos de la placa filtrante multipocillo están formados por una pieza tubular con un extremo abierto al que está fijada una membrana tal como una membrana microporosa. Las piezas tubulares pueden ser insertadas dentro de una placa de alimentación de pocillos único que contiene un medio nutriente de modo que las células en los pocillos pueden ser unidas a la membrana y cultivadas en ella. Las células son alimentadas cuando los nutrientes pasan desde el medio nutriente a través de la membrana y a las células a una velocidad controlada por el gradiente de concentración de nutrientes desde el medio a las células. El medio nutriente en la bandeja de alimentación es repuesto periódicamente para mantener el cultivo de células. Es deseable efectuar el relleno del medio nutriente rápidamente y de una manera que evite daños en las membranas y las células.

Después de que ha sido alcanzado el nivel deseado de cultivo de células en las membranas de los pocillos, la placa filtrante multipocillo puede ser utilizada en métodos de ensayo convencionales. Estos métodos de ensayo son efectuados generalmente situando las membranas y las células en la placa filtrante multipocillo dentro de los pocillos de la placa receptora multipocillo situada debajo de la placa filtrante multipocillo, que tiene el mismo número de pocillos en coincidencia con los pocillos de la placa filtrante. Los pocillos de la placa receptora multipocillo contienen una composición líquida que ha de ser ensayada. La composición que ha de ser ensayada se difunde al interior de las células y después a través de la membrana. Los productos líquidos resultantes dentro de los pocillos de la placa filtrante multipocillo o en los pocillos de la placa receptora multipocillo son ensayados entonces para determinar la capacidad de la composición que es ensayada para permear la barrera celular.

Un componente importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de medicamentos es la determinación de la absorción oral y la biodisponibilidad de compuestos nuevos. Para realizar esta evaluación en un ensayo rentable, de gran rendimiento y sensible, es ideal usar un dispositivo *in vitro* con una multitud de pocillos, conteniendo células y una cantidad pequeña de material de ensayo y automatización. Clásicamente, la determinación de características de absorción oral *in vitro* es realizada usando una línea definida de células epiteliales y midiendo la velocidad de transporte aparente del medicamento a través de una

monocapa de las células. Más recientemente, es posible clasificar/ordenar la velocidad de transporte pasivo de aspirantes posibles a medicamentos usando una barrera de membrana artificial. Los valores generados por estos experimentos *in vitro* son métodos valiosos para seleccionar los aspirantes a medicamentos más probablemente satisfactorios mucho antes de que las velocidades de absorción oral sean validadas por mediciones en vivo. Un experimento típico para determinar las características de absorción de medicamentos de un compuesto químico conocido o desconocido es realizado como sigue. El dispositivo multipocillo es sembrado con células epiteliales encima del filtro en un medio definido. El mismo medio también es añadido a la placa de alimentación de pocillo único situada debajo de, y en contacto de fluido con, el dispositivo que contiene las células. Se permite que las células proliferen y se diferencien durante un número de días. El medio nutriente es sustituido periódicamente por medio reciente para reponer los nutrientes agotados y eliminar las células muertas y los desechos. Al final de un tiempo de cultivo, las células y el dispositivo multipocillo son lavados suavemente con una disolución amortiguadora (tampón) isotónica para eliminar proteínas y el medio nutriente residual. En este momento, la placa filtrante multipocillo es transferida a la placa receptora multipocillo y los productos químicos que han de ser ensayados son introducidos en el compartimento por encima de la capa de células o por debajo de las células y el soporte de filtro en la bandeja receptora multipocillo. La cámara opuesta es llena con disolución amortiguadora (tampón) libre de medicamentos y el dispositivo multipocillo es incubado durante cierto período de tiempo, típicamente a 37°C con sacudidas. Entonces, las muestras son quitadas de cualquiera de los compartimentos para ensayo. Si son deseados puntos cronológicos múltiples, muestras múltiples separadas en el tiempo son tomadas de cualquier compartimento y disolución amortiguadora (tampón) es añadida al compartimento para sustituir el volumen de muestras. Es importante que la membrana o la capa de células no sea perturbada durante la eliminación de muestras o al adición de disolución amortiguadora (tampón). La cantidad de medicamento/producto químico que es transportada a través de la barrera celular puede ser determinada por diversos métodos analíticos, pero es determinada típicamente usando cromatografía en líquido-espectrometría de masas/spectrometría de masas (LC-MS/MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry). El documento US-A-5801055 describe un aparato multipocillo de cultivo de células según la porción de preámbulo de la reivindicación 1.

Después de que las células han sido cultivadas satisfactoriamente y la placa de alimentación de pocillo único ha de ser sustituida por la placa receptora multipocillo, es deseable minimizar el transporte del medio nutriente a la placa receptora multipocillo para minimizar de tal modo la dilución de la composición que es ensayada. Así, es deseable eliminar cualesquier gotitas de medio nutriente retenidas en las superficies inferiores de las membranas después de que la placa filtrante multipocillo es separada del medio nutriente en la placa de alimentación de pocillo único.

Asimismo, sería deseable proporcionar una placa filtrante multipocillo de un aparato multipocillo de cultivo de células que facilite la adición o eliminación de líquido de los pocillos de la placa filtrante multi-

pocillo de una manera que conserve la integridad de las membranas y, cuando están presentes, las células en la membrana. Además, sería deseable proporcionar una placa filtrante multipocillo tal que pueda ser utilizada en conjunción con una placa receptora multipocillo subsiguiente para uso en conjunción con la placa de alimentación de pocillo único.

También sería deseable proveer a un aparato multipocillo de cultivo de células de una placa de alimentación que tenga diversos medios para la provisión o eliminación de líquidos en la placa de alimentación sin perturbar las células y que minimice el desplazamiento del líquido en la bandeja de alimentación durante la manipulación.

Sumario de la invención

Esta invención será descrita aquí con referencia al cultivo y al uso de células en una membrana situada y fijada al fondo de cada uno de una multiplicidad de pocillos. Sin embargo, ha de comprenderse que la presente invención no necesita ser usada en conjunción con células. Otros usos representativos incluyen filtración, diálisis, etc.

La presente invención proporciona un aparato multipocillo de cultivo de células como se define en la reivindicación 1. La placa filtrante multipocillo es usada primero en conjunción con una placa de alimentación, que puede ser un dispositivo de pocillo único o un dispositivo multipocillo, en un paso en el que el cultivo de células es favorecido y después es usada en conjunción con una placa receptora multipocillo en la que es efectuado el ensayo de muestras. La placa de alimentación de pocillo único favorece el relleno rápido del medio nutriente mientras evita daños en la barrera permeable, tal como membranas, fijada a una multiplicidad de pocillos, o daños de células situadas en las membranas. La placa de alimentación de pocillo único puede incluir una superficie inferior horizontal o inclinada para el medio nutriente rodeada por paredes que retienen el medio nutriente en la superficie inferior. La superficie inferior puede estar inclinada preferiblemente de modo que el medio nutriente puede ser suministrado a través de la placa filtrante multipocillo a la placa de alimentación de pocillo único en un punto elevado de la superficie inferior inclinada y de modo que el medio nutriente puede ser eliminado a través de la placa filtrante multipocillo desde la superficie inferior de la placa de alimentación de pocillo único en un punto bajo la superficie inferior inclinada. La placa de alimentación multipocillo prevé el uso de menos volumen de nutrientes en total, la posibilidad de usar medios diferentes en pocillos diferentes si se desea, aísla cada pocillo para impedir que la contaminación de un pocillo se extienda a otro pocillo y reduce la posibilidad de deslizamiento de los medios cuando el aparato es movido.

La placa filtrante multipocillo de esta invención está provista de un agujero de acceso de entrada a través del cual el medio nutriente es suministrado a la placa de alimentación de pocillo único y, preferiblemente, de un agujero distinto de acceso de drenaje a través del cual el medio nutriente es extraído de la placa de alimentación de pocillo único. El (los) agujero(s) de acceso permite(n) la inserción de un dispositivo manipulador de líquido, tal como una jeringa, cánula, pipeta, etc., a través de ellos para introducción o drenaje del medio nutriente mientras evita la necesidad de separar la placa filtrante multipocillo de la placa de alimentación de pocillo único para reponer o

suministrar medio nutriente a la placa de alimentación de pocillo único.

Los pocillos de la placa filtrante multipocillo pueden estar conformados para formar al menos una repisa extendida desde una pared del pocillo y separada de la membrana de modo que la repisa proporciona una superficie de soporte para un extremo del dispositivo manipulador de líquido tal como una jeringa, cánula, pipeta, etc. para impedir su contacto con la barrera permeable, típicamente una membrana, y las células en crecimiento. Adicionalmente, la repisa sirve como un deflector cuando medio es inyectado dentro del pocillo. La repisa permite que el medio sea añadido sin perturbar a las células en crecimiento.

La placa filtrante multipocillo de esta invención es usada en un segundo paso en conjunción con una placa receptora multipocillo, cuyos pocillos alojan un líquido que interacciona con la membrana o las células dentro de los pocillos de la bandeja filtrante multipocillo. Un agujero de acceso está situado adyacente a cada pocillo de la bandeja filtrante multipocillo para proporcionar acceso directo a los pocillos de la placa receptora multipocillo situada debajo de la placa filtrante multipocillo.

La placa de alimentación de pocillo único puede tener patillas, salientes y/o tabiques separadores para permitir la eliminación de gotitas líquidas desde el fondo de los pocillos de la placa filtrante multipocillo y para controlar el desplazamiento del líquido cuando es manipulada la combinación de placa filtrante/placa de alimentación de pocillo único.

Guías de alineación también son usadas entre la placa filtrante y cada una de las placas inferiores para asegurar que los pocillos de la placa filtrante están dispuestos en un orden particular con independencia de si es usada con una placa inferior de pocillo único o multipocillo.

También puede ser incluido el uso de patillas o salientes para permitir la eliminación de gotitas colgantes en el fondo de los pocillos de la placa filtrante cuando es separada de una placa de alimentación de pocillo único.

También puede ser incluido el uso de más tabiques separadores para reducir el movimiento del líquido en la placa de alimentación de pocillo único durante la manipulación.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es una vista en despiece ordenado desde arriba de un aparato de ensayo multipocillo que utiliza la placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 2 es una vista en corte transversal parcial de una placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 3 es una vista en corte transversal parcial de la placa filtrante multipocillo y la placa de alimentación o receptora multipocillo de esta invención.

La Figura 3A es una vista en perspectiva parcial de la alineación por patillas/agujeros de la presente invención.

La Figura 4 es una vista en corte transversal parcial de una placa filtrante multipocillo y una placa de alimentación o receptora multipocillo de esta invención.

La Figura 5 es una vista en perspectiva de una placa de alimentación de pocillo único que puede ser utilizada con la placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 6 es una vista en corte transversal par-

cial de un diseño de pocillo alternativo para una placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 6a es una vista en corte transversal parcial de un diseño de pocillo alternativo para una placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 6b es una vista en corte transversal parcial de un diseño de pocillo alternativo para una placa filtrante multipocillo de esta invención.

La Figura 7 es una vista en corte transversal de una construcción alternativa de pocillo de esta invención.

La Figura 8 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de la placa de alimentación de pocillo único de la presente invención.

La Figura 9 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de la placa de alimentación de pocillo único de la presente invención.

La Figura 10 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de la placa de alimentación de pocillo único de la presente invención.

Las Figuras 11a-11d son vistas en perspectiva de realizaciones alternativas de la placa de alimentación de pocillo único de la Figura 10 de la presente invención.

Descripción de realizaciones específicas

Aunque la presente invención es descrita con referencia a efectuar el cultivo de células y estudios de transporte en una multiplicidad de pocillos, ha de comprenderse que la presente invención es aplicable a manipulaciones que implican áreas de acceso para introducir o extraer un líquido para efectuar el procesamiento deseado, por ejemplo diálisis o separación por difusión mientras evita el movimiento de materiales en las membranas dentro de los pocillos.

Refiriéndose a la Figura 1, la placa filtrante multipocillo 10 de esta invención comprende una placa 41 que incluye una pluralidad de pocillos 42, cada uno de los cuales está emparejado con un agujero 45 de acceso. Como se muestra en la Figura 2, cada pocillo 42 comprende una pieza hueca 39 que tiene una abertura inferior 34 a la que está fijada una barrera permeable 22 tal como una membrana microporosa. Barrera permeable significa que la barrera es permeable a líquidos y gases pero no a materiales en partículas en el calibre de poro nominal de la barrera. Membranas, especialmente membranas microporosas, son un material preferido para la barrera aunque pueden ser usados otros materiales tales como membranas de ultrafiltración, esterillas o telas de fibra de vidrio o materiales de plástico tejidos o no tejidos. La pieza 39 es hueca y puede ser conformada en diversas formas. Los diseños tubulares son preferidos y son la norma industrial para tales pocillos, aunque pueden ser usados pocillos de otras formas tales como triangular, rectangular, cuadrada o hexagonal. El agujero 45 de acceso es mostrado como siendo adyacente a cada pocillo 42 asociado.

Agujeros 53 y 52 de acceso proporcionan acceso a la placa 33 de alimentación de pocillo único (Figura 5) dentro de la cual medio nutriente líquido o gel es introducido y de la que es extraído. Uno o más agujeros de acceso pueden ser usados para realizar esta función. Como se muestra, dos son usados aunque uno o más de dos (por ejemplo, cuatro, uno en cada esquina) también pueden ser usados. La placa de alimentación de pocillo único es usada preferiblemente solo con fines de alimentación en esta invención. Medio nutriente puede ser extraído e introducido a través de los agujeros 53 y 52 de acceso con un dispositivo

convencional manipulador de líquido, tal como una jeringa, extendido a través de los agujeros 53 y 52 de acceso. Aunque se muestran dos agujeros 52, 53 de acceso, podría usarse un solo agujero de acceso si se desea. Como se muestra, la placa de pocillo único tiene un fondo inclinado 64 con el área 27 de drenaje situada en el punto más bajo de la superficie 60, de modo que el drenaje completo puede ser efectuado fácilmente. Alternativamente, el drenaje y el relleno pueden ser efectuados simultáneamente sin necesidad de mover la placa filtrante multipocillo 10 con respecto a la placa 33 de alimentación de pocillo único (Figura 5). En otra realización de la placa de alimentación de pocillo único (no mostrada), puede utilizarse una placa de fondo horizontal.

En la realización mostrada en la Figura 1, la placa filtrante multipocillo 10 está provista de patillas 48 y 49 que ajustan respectivamente dentro de los agujeros 46 y 47 de la placa receptora multipocillo 11 cuando la placa receptora multipocillo 11 está situada debajo de la placa filtrante multipocillo 10. Alternativamente, las patillas 48 y 49 pueden ser situadas dentro de los agujeros 46 y 47 de la placa 33 de alimentación de pocillo único (Figura 5) cuando la placa 33 de alimentación de pocillo único está situada debajo de la placa filtrante multipocillo 10. Las patillas 48 y 49 están situadas separadas entre sí por una distancia en la dirección de la flecha 55 (por ejemplo, asimétricamente opuestas) de modo que el pocillo 42a siempre está en la posición izquierda superior mientras que el pocillo 42b siempre está en la posición derecha inferior mostradas en la Figura 1. Ubicando así los pocillos 42a y 42b, todos los pocillos 42 en la placa filtrante multipocillo 10 pueden ser identificados por su posición. La tapa separable opcional 56 es utilizada para proporcionar esterilidad a los pocillos 42 y minimizar la evaporación del medio nutriente.

Refiriéndose a las Figuras 3 y 3a, las patillas 48 y 49 ajustan respectivamente dentro de los agujeros 46 y 47. El agujero 46 está formado con un perímetro de tres lados de modo que la patilla 48 hace contacto con las paredes del agujero 46 en tres puntos 43a, b y c. Este modo de contacto impide que la placa filtrante multipocillo 10 se mueva lateralmente con respecto a la placa receptora multipocillo 11. La patilla 49 hace contacto con las paredes del agujero 47, mostrado en forma de una ranura en esta realización, en dos puntos 45a y b de modo que las variaciones de parte a parte, o la desalineación, solo pueden ser acomodadas en la dirección mostrada por la flecha 37. Los extremos inferiores de las patillas 48 y 49 están biselados para mejorar la facilidad de inserción de las patillas 48 y 49 dentro de los agujeros 46 y 47. Además, como se muestra en la Figura 3, como la punta de la patilla 48 es más pequeña que el agujero 46 y la patilla 48 es más larga que el pocillo 42 y como la punta de la patilla 49 es más pequeña que el agujero 47 y la patilla 49 es más larga que el pocillo 42, esto permite que la placa filtrante multipocillo 10 se mueva lateralmente, como es ejemplificado por la flecha 37, cuando es levantada parcialmente desde la placa receptora multipocillo 11 como se muestra en la Figura 4. Este movimiento lateral no está limitado a la dirección o flecha 37 si las patillas 48 y 49 están ahusadas uniformemente como se muestra. Este movimiento lateral permite el contacto de la gotita 57 sobre la pared interior 59 del pocillo 50 de la placa receptora 11 de modo que la gotita 57 se mueve al interior del pocillo 50 des-

de la membrana 22. Esta separación por contacto de la gotita 57 impide la contaminación cruzada del líquido al interior de un pocillo adyacente al pocillo 50 mostrado.

Ha de comprenderse que las patillas 48 y 49 pueden tener longitud igual o menor que los pocillos 42 siempre que sean más largas que los agujeros 46 y 47. El movimiento lateral controlado de la placa filtrante multipocillo 10 es efectuado formando las patillas 48 y 49 y los agujeros 46 y 47 de modo que cuando las patillas 48 y 49 son extraídas parcialmente de los agujeros 46 y 47, un espacio es formado entre las patillas 48 y 49 y las paredes interiores de los agujeros 46 y 47 que permite el movimiento lateral de las patillas 48 y 49 dentro de los agujeros 46 y 47 y, de este modo, el movimiento lateral de la placa filtrante multipocillo 10 de modo que es efectuada la separación por contacto de las gotitas 57. Por ejemplo, esto puede ser efectuado formando superficies inclinadas en las patillas 48 y 49 desde la parte superior de las patillas a la parte inferior de las patillas donde las paredes de los agujeros 46 y 47 son verticales.

Una ventaja adicional de usar las patillas de alineación para alinear las placas superior e inferior del dispositivo es que la alineación es precisa y constante y no requiere un ajuste preciso entre los lados de las placas. De este modo, puede haber algún descuido o indulgencia en las tolerancias del ajuste entre los lados de placas pero se garantiza la alineación exacta de las placas debida a la disposición de patillas/agujeros. Esto es particularmente ventajoso en aplicaciones robóticas puesto que las placas pueden ser manipuladas fácilmente por el manipulador robótico sin prestar demasiada atención al ajuste requerido entre los lados respectivos. Además, permite diseñar un sistema de placas que permite a los manipuladores robóticos apretar ligeramente las placas y sin embargo obtener la separación fácil y completa entre sí y la alineación exacta y constante.

El uso de la placa filtrante multipocillo 10 es ejemplificado con referencia a la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, la placa filtrante multipocillo 10 está situada encima de la placa receptora multipocillo 11 que incluye una multiplicidad de pocillos 50, tal como 96 pocillos, que corresponden en número y tamaño y ubicación a los de la placa filtrante 10. La placa receptora multipocillo 11 puede ser usada como una bandeja de alimentación en lugar de la bandeja de alimentación de pocillo único o puede ser usada en ensayo tal como en estudios de ensayos de medicamentos de células cultivadas en los pocillos de la placa filtrante 10. Una ventaja de usar una primera placa receptora multipocillo como una bandeja de alimentación es que el volumen de fluido requerido es menor que el de una bandeja de pocillo único lo que minimiza los costes de alimentación. También tiene la ventaja de aislar cada pocillo de los otros tal como durante el cultivo de células de modo que si un pocillo resulta contaminado o no funcional, los otros pocillos sobreviven para ensayo adicional. Por último, el uso de una bandeja receptora de pocillos múltiples (multipocillo) como una bandeja de alimentación reduce la posibilidad de derrame respecto a la de una bandeja de pocillo único o número pequeño de pocillos (por ejemplo, 2 a 4 pocillos). Esto puede resultar ventajoso en aplicaciones de manipulación robótica. En uso, la placa receptora multipocillo 11 está situada tal que la membrana 22 (Figura 2) del pocillo 42 se extiende dentro

de un solo pocillo 50 de la placa receptora multipocillo 11. Cada uno de los pocillos 42 tiene asociado con él un agujero 45 de acceso que permite el acceso a un pocillo 50 de la placa receptora multipocillo 11 utilizada durante un paso de ensayo de muestra. La placa filtrante multipocillo 10 puede estar provista de cuatro patas 44 que ajustan dentro de entrantes 51 de la placa receptora multipocillo 11, para proporcionar de tal modo estabilidad mecánica de la placa filtrante multipocillo 10. Las patas 44 también sirven para situar las membranas 22 para evitar el contacto con las superficies inferiores de los pocillos 50, para mejorar de tal modo el contacto del líquido con las membranas 22. Además, las patas 44 proporcionan protección de las membranas 22 si la placa filtrante multipocillo 10 es colocada sobre una mesa de trabajo. El dispositivo es usado de modo similar con la placa de alimentación de pocillo único de la Figura 5. Sin embargo, como hay un pocillo común en la placa de alimentación de pocillo único, el líquido en la placa es compartido entre los pocillos de la placa filtrante. Las patas 44 y los entrantes 51 siguen impidiendo el contacto entre el fondo de la placa de alimentación y las membranas.

Refiriéndose a la Figura 6, el pocillo puede tener al menos un entrante 32 formado en su pared lateral 39, con una repisa 19 formada en el fondo del entrante 32, adyacente a la membrana 22. El entrante 32 y la repisa 19 pueden ser formados por moldeo convencional.

Refiriéndose a la Figura 6a, la pieza tubular 39a del pocillo 42 de la placa filtrante puede ser usada opcionalmente para formar una repisa 19a. La repisa 19a es formada por moldeo convencional, tal como moldeo por inyección o sobremoldeo, en el que la repisa 19a se extiende desde la pieza tubular 39a, adyacente a la membrana 22.

Refiriéndose a la Figura 6b, la repisa 19b es formada por moldeo convencional, tal como moldeo por inyección o sobremoldeo, en el que una porción de la pared 39b es rebajada.

Como se muestra en la Figura 7, la repisa 19c puede incluir una superficie cóncava 80 que sirve para dirigir el líquido desde una jeringa, cánula, pipeta, etc. en la dirección mostrada por la flecha 82. Esto sirve para reducir la presión del líquido procedente de la jeringa sobre la membrana 32, conservando de tal modo la integridad de la membrana 22 y conservando la integridad de una capa de células en la membrana 22.

Refiriéndose a la Figura 8, la placa 33 de alimentación de pocillo único, que tiene el agujero 71 y la ranura 73 y es utilizada con la placa filtrante multipocillo de esta invención, incluye las paredes 62, 64, 66 y 68 y la superficie 60 de soporte para alojar un medio nutriente. La superficie 60 de soporte incluye dos subsecciones superficiales 70 y 72 separadas por el trayecto 74 de drenaje. Las subsecciones superficiales 70 y 72 están inclinadas hacia abajo desde las paredes 66 y 62 en las direcciones ejemplificadas por las flechas 78 y 76 hacia el trayecto 74 de drenaje. El trayecto 74 de drenaje proporciona flujo de fluido desde el área 26 de introducción de líquido en la superficie 60 al área 27 de drenaje de líquido como es ejemplificado por la flecha 75.

Refiriéndose a la Figura 9, se ilustra una placa alternativa 21 de alimentación de pocillo único utilizada con la placa filtrante multipocillo de esta invención. Esta realización está provista de uno o más salientes

extendidos desde la superficie interior y de soporte de la placa de alimentación de pocillo único en una distancia que permite su contacto con las membranas de los pocillos de la placa filtrante multipocillo. Como se muestra, los salientes son patillas 61 que se extienden desde las superficies 23 y 25 hasta una posición donde pueden hacer contacto con las membranas 22 de los pocillos 42. El fin de este contacto es efectuar el drenaje del líquido en exceso desde la superficie inferior de las membranas 22 a las patillas 61 y al interior de la placa 21 de alimentación de pocillo único. Esta práctica es denominada corrientemente "separación por contacto" ("touch-off") en el campo de pipetado y significa eliminar líquidos/muestra residuales adheridos a las puntas de pipetas. La forma de los salientes puede ser variada siempre que proporcionen la misma función. Formas típicas incluyen cónica, piramidal, rectangular y alveolada. Una patilla 61 está situada adyacente a cada pocillo 42. La placa 21 de alimentación de pocillo único también comprende las superficies inclinadas 23 y 25 que proporcionan el flujo de líquido en las direcciones de las flechas 27 y 29 y en la dirección de la flecha 31 al interior del área 30 de drenaje. El movimiento de la placa filtrante multipocillo 10 hacia las patillas 61 puede ser efectuado por cualesquier medios convencionales.

En una realización alternativa adicional de la presente invención, pueden usarse uno o más tabiques separadores para reducir el movimiento o desplazamiento del líquido en la bandeja de alimentación, especialmente durante la manipulación, por personas o equipo robótico. La Figura 10 muestra una realización tal.

En esta realización se muestra el uso de cuatro tabiques separadores 100. Los tabiques separadores 100 están fijados al fondo 102 de la bandeja 104 de alimentación. Preferiblemente, son formados como parte de la bandeja 104 de alimentación tal como por moldeado por inyección junto con la bandeja cuando es fabricada aunque pueden añadirse como elementos separados que están fijados a los lados o el fondo de la bandeja o permitirse que descansen libremente sobre el fondo de la bandeja. Como se muestra, los tabiques separadores están dispuestos en un modelo cruciforme y están separados y son distintos entre sí. Como se muestran, cada uno de ellos también está formado en un modelo ondulado o en "S" repetitivo. Alternativamente, el (los) tabique(s) separador(es) puede(n) ser recto(s) o curvilíneo(s) o cruzado(s) (elementos en forma de X), etc. siempre que sea(n) capaz (capaces) de realizar su función mientras permiten que la bandeja de células (no mostrada) ajuste dentro de la bandeja 104 de alimentación y permitir que el fluido en la bandeja 104 de alimentación circule de modo que no se produzcan puntos muertos. Como se muestra, el (los) tabique(s) separador(es) 100 no toca(n) las paredes laterales de la bandeja 104. Ellos pueden hacerlo si se desea. Preferiblemente, cuando tocan las paredes laterales, hay uno o más agujeros pasantes formados en el tabique separador, preferiblemente a lo largo de su borde inferior para permitir el movimiento sin estorbos de fluido a lo largo de las paredes.

La altura del uno o más tabiques separadores 100 no es crítica siempre que sea suficiente para ayudar a reducir la cantidad de movimiento del líquido en la bandeja 104 de alimentación mientras es manipulada. Típicamente, la altura de tabique separador puede

estar entre el 20% y el 100% de la profundidad del líquido en la bandeja 104. En otra realización, la altura de tabique(s) separador(es) está entre el 35% y el 80% de la profundidad del líquido en la bandeja 104. Alternativamente, la altura de tabique(s) separador(es) está entre el 50% y el 75% de la profundidad del líquido en la bandeja 104.

El número de tabiques separadores no es crítico. En una realización, es preferido que sea usado solo un tabique separador, extendido al menos parcialmente en la longitud o la anchura de la bandeja. En otra realización, es preferido que sean usados al menos dos tabiques separadores en algunas direcciones transversales definidas entre sí. En tal realización, los dos tabiques separadores pueden formar un ángulo de 25 a 90 grados aproximadamente entre sí a fin de asegurar que el movimiento de líquido es controlado en ambas direcciones de la longitud y la anchura de la bandeja.

La Figura 11a muestra una disposición alternativa de tabiques separadores en la realización de la Figura 10. En esta figura, son usados tabiques separadores 100 rectos en lugar del diseño de tabiques separadores ondulados de la Figura 10. En la Figura 11b se muestra el uso de una serie de tabiques separadores 100 repetitivos. Aquí, los tabiques separadores son mostrados como una serie de modelos en "X" extendidos por el fondo de la bandeja de alimentación. La Figura 11c muestra el uso de una serie de tabiques separadores 100 dispuestos paralelos y separados entre sí y un tabique separador 100 si y otro no se extiende desde la misma pared lateral. En la Figura 11d se muestra un tabique separador único que se extiende sustancialmente en la longitud de la bandeja de alimentación.

Si se desea, esos tabiques separadores 100 pueden tener uno o más agujeros pasantes en ellos adyacentes a su superficie inferior con la bandeja a fin de permitir la circulación sin estorbos por toda la bandeja. Alternativamente, en los tabiques separadores que están formados separadamente, los tabiques separadores están fabricados tal que solo tocan el fondo de la bandeja en dos o más puntos de modo que el fluido puede circular por debajo del (de los) tabique(s) separador(es).

En otra realización, el(los) tabique(s) separador(es) puede(n) ser usado(s), en lugar de las patillas o salientes tratados anteriormente, como los medios para permitir que se separe el líquido en exceso desde el fondo de la placa de células durante su extracción de la bandeja de alimentación. En esta realización (no mostrada), el (los) tabique(s) separador(es) deberían tener una altura similar que la de las patillas o salientes tratados anteriormente. Además, el número de tabiques separadores usados debería ser suficiente para asegurar que todos los pocillos en la placa de células reciben fuerza suficiente a fin de quitar cualesquier gotitas sin perturbar a las células que crecen en la placa.

Aunque las realizaciones de la presente invención han sido mostradas como estando dirigidas a una placa filtrante con 96 pocillos, también pueden usarse otras configuraciones de pocillos tales como 6, 12, 24, 48 o 384 pocillos. En todos los casos, la segunda placa receptora y la placa de alimentación multipocillo, si tiene pocillos múltiples, deberían tener el mismo número de pocillos que la placa filtrante y estar alineados con los pocillos de la placa filtrante.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato multipocillo de cultivo de células que comprende una placa filtrante multipocillo (10) y una placa de alimentación (21; 33; 102);

teniendo dicha placa filtrante multipocillo (10) una multiplicidad de pocillos (42) extendidos desde una placa (41) y una multiplicidad de primeros agujeros (45) de acceso a través de dicha placa (41), siendo dichos primeros agujeros (45) de acceso iguales en número que dichos pocillos (42) y estando uno de dichos primeros agujeros (45) de acceso situado adyacente a cada pocillo (42) de dicha placa filtrante (10), comprendiendo cada uno de dichos pocillos (42)

(a) una pieza hueca (39) que tiene dos aberturas y se extiende desde dicha placa (41), y

(b) una barrera permeable (22) sujeta alrededor de una inferior (34) de dichas aberturas; y

teniendo dicha placa de alimentación (21; 33; 102) un solo pocillo para alojar dicha multiplicidad de pocillos (42) de dicha placa filtrante (10);

caracterizado porque

dicha placa filtrante multipocillo (10) comprende uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso que están separados de dichos primeros agujeros (45) de acceso para acceder a dicho pocillo único de dicha placa de alimentación (21; 33; 102).

2. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso para acceder a dicho pocillo único de dicha placa de alimentación (21; 33; 102) está/están dispuesto(s) en la(s) esquina(s) de la placa filtrante (10).

3. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 1 o 2, en el que la barrera permeable (22) es seleccionada del grupo compuesto por una membrana, una esterilla de fibra de vidrio, una tela de fibra de vidrio, una lámina de plástico tejida, una lámina de plástico no tejida y un filtro microporoso.

4. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada uno de dichos pocillos (42) de dicha placa filtrante (10) tiene una repisa (19; 19a; 19b; 19c) extendida hacia dentro desde una pared de la pieza hueca (39).

5. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 4, en el que dicha repisa (19b; 19c) está formada por un entrante en dicha pared.

6. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha placa de alimentación (21; 33) tiene una superficie de soporte inclinada (60) que tiene una o más áreas de drenaje (27; 30) desde las que líquido puede ser eliminado y una o más áreas de introducción (26) a las que líquido puede ser suministrado desde dichos uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso de dicha placa filtrante multipocillo (10), con dicha superficie de soporte inclinada (60) estando inclinada en una configuración para efectuar el drenaje de líquido desde dichas una o más áreas de introducción (26) a dichas una o más áreas de drenaje (27; 30), y paredes (62, 64, 66, 68) que rodean dicha superficie (60) de

soporte para encerrar dicha superficie (60) de soporte.

7. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha placa de alimentación tiene una superficie de soporte plana que tiene una o más áreas de drenaje desde las que líquido puede ser eliminado y una o más áreas de introducción a las que líquido puede ser suministrado desde dichos uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso de dicha placa filtrante multipocillo (10), y paredes que rodean dicha superficie de soporte para encerrar dicha superficie de soporte.

8. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 6, en el que dicha superficie de soporte inclinada (60) comprende una pluralidad de subsecciones (70, 72; 23, 25) de superficie de soporte, cada una inclinada desde dichas paredes a un trayecto de drenaje (64; 74) conectado a dichas subsecciones (70, 72; 23, 25) de superficie de soporte.

9. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 6, 7 o 8, en el que uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso están dispuestos en la placa filtrante multipocillo (10) en una posición correspondiente a dichas una o más áreas de drenaje (27; 30) y/o dichas una o más áreas de introducción (26).

10. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 6, 7, 8 o 9, en el que la placa de alimentación 21 incluye una multiplicidad de salientes (61) extendidos desde dicha superficie (23, 25) de soporte en una dirección sustancialmente igual que la dirección en la que dichas paredes se extienden desde dicha superficie de soporte, teniendo dichos salientes (61) una longitud que permite que dichas paredes soporten dicha placa filtrante multipocillo (10) y permitan el contacto de dichos salientes (61) con cada barrera (22) de un pocillo (42) de dicha placa filtrante (10) cuando dicha placa filtrante es separada del soporte por dicha placa de alimentación (21).

11. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 10, en el que dichos salientes son seleccionados del grupo compuesto por patillas, pirámides, rectángulos, alvéolos y conos.

12. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la placa (de alimentación 102) contiene uno o más tabiques separadores (100).

13. El aparato multipocillo de cultivo de células de la reivindicación 12, en el que los tabiques separadores (100) tienen una forma seleccionada del grupo compuesto por elementos ondulados, elementos curvilíneos, elementos rectos y elementos cruzados.

14. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo además una tapa (66) para la placa filtrante (10).

15. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la placa filtrante (10) contiene 96 pocillos (42).

16. El aparato multipocillo de cultivo de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el uno o más segundos agujeros (52, 53) de acceso para acceder a dicho pocillo único de dicha placa de alimentación (21; 33; 102) están dispuestos en la placa filtrante multipocillo (10) fuera de la red de los primeros agujeros (45) de acceso y los pocillos (42).

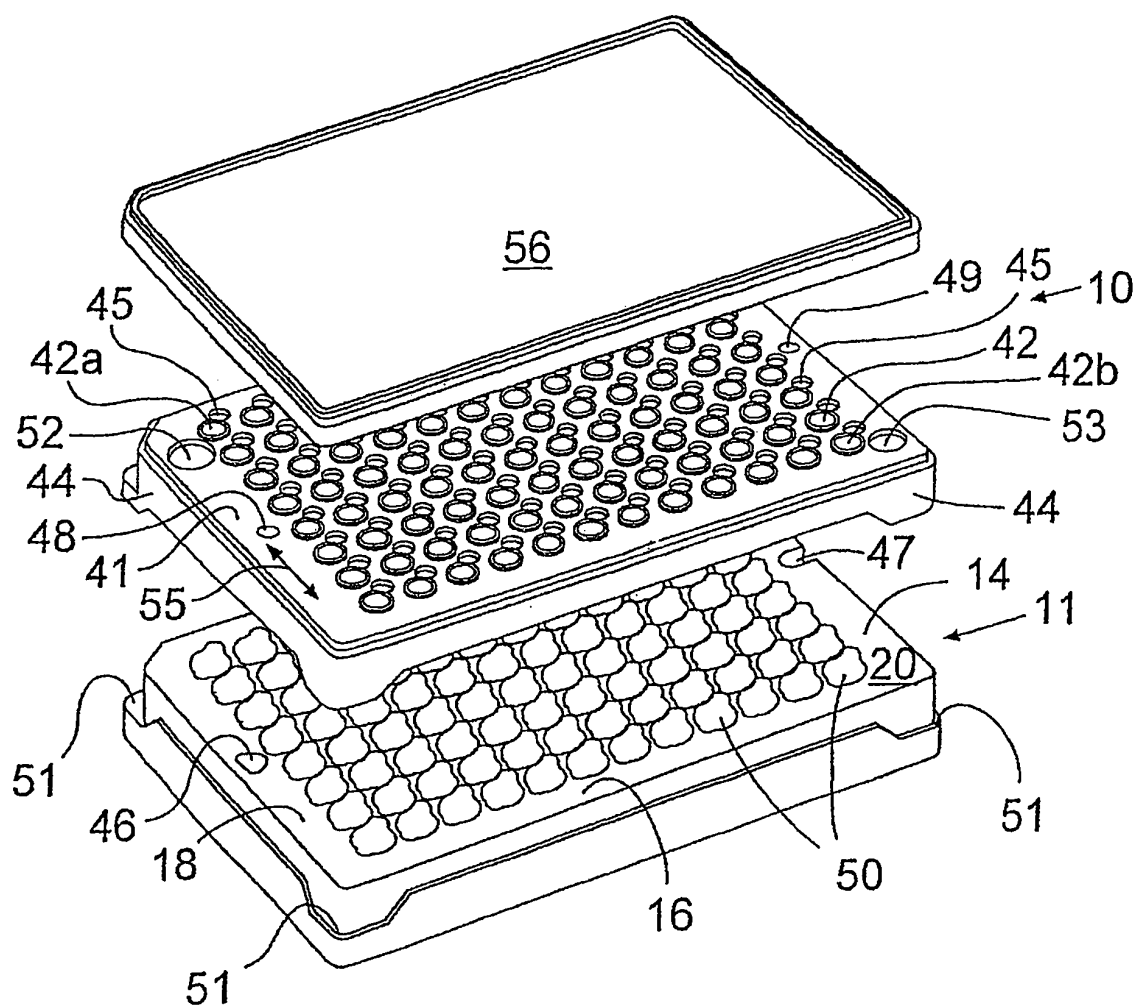


Figura 1

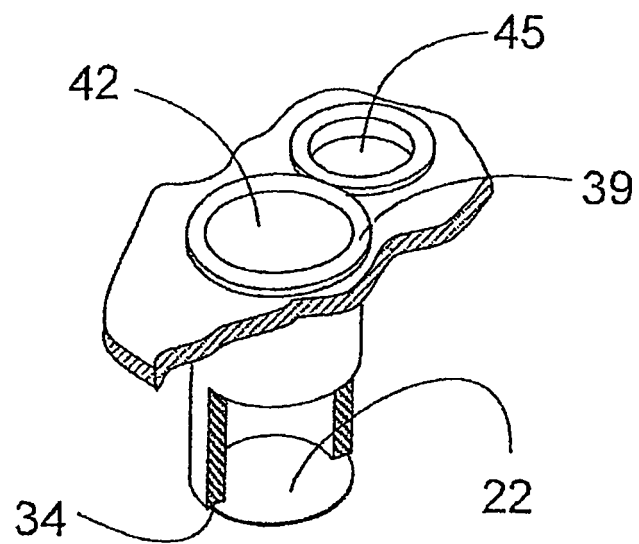


Figura 2

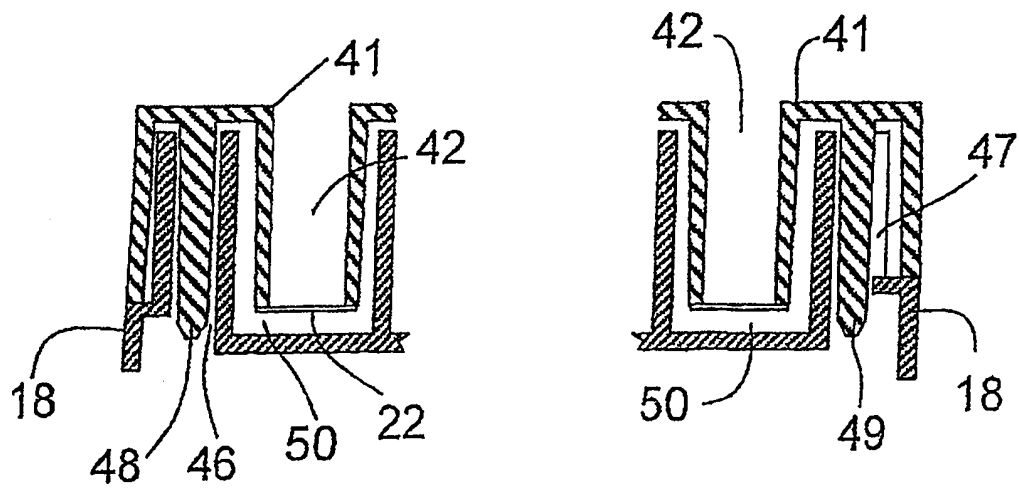


Figura 3

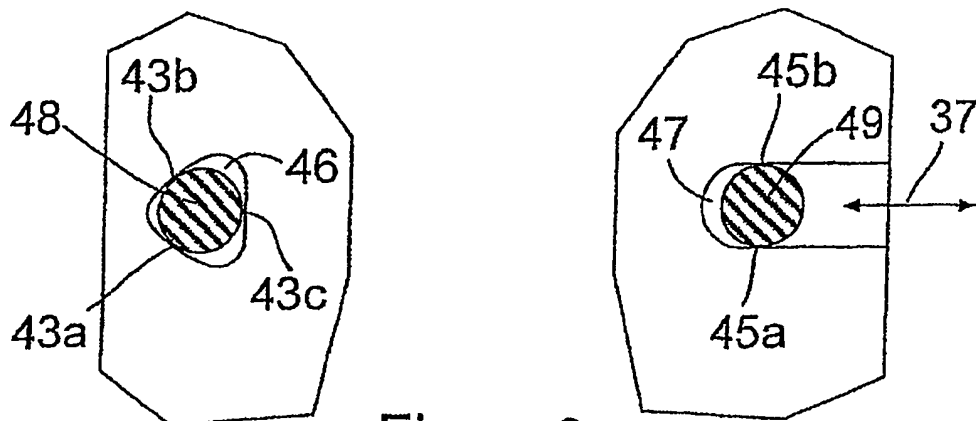


Figura 3a

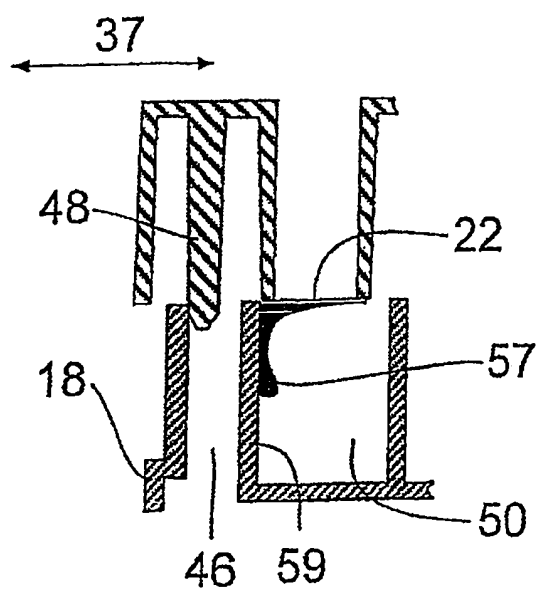


Figura 4

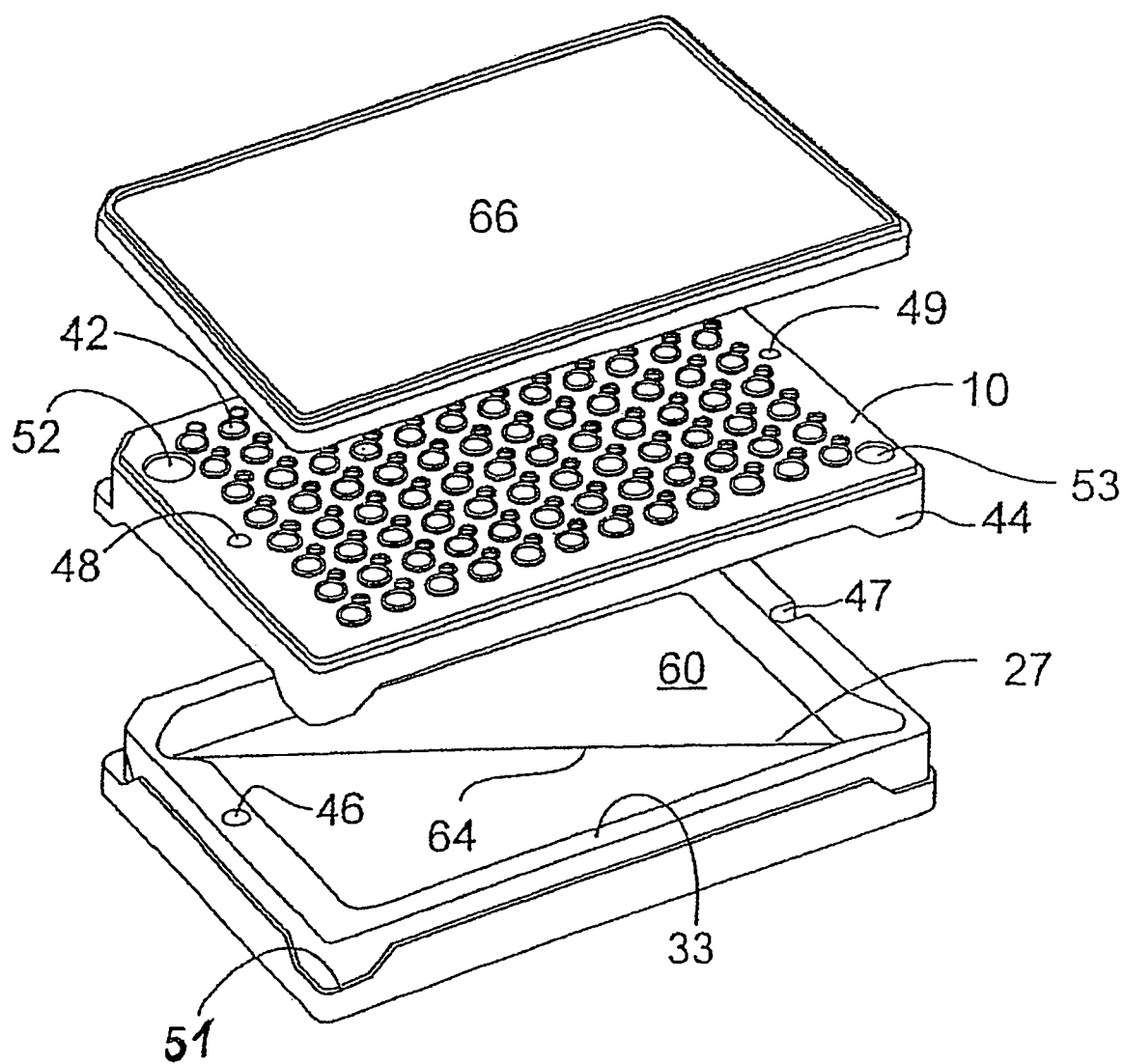


Figura 5

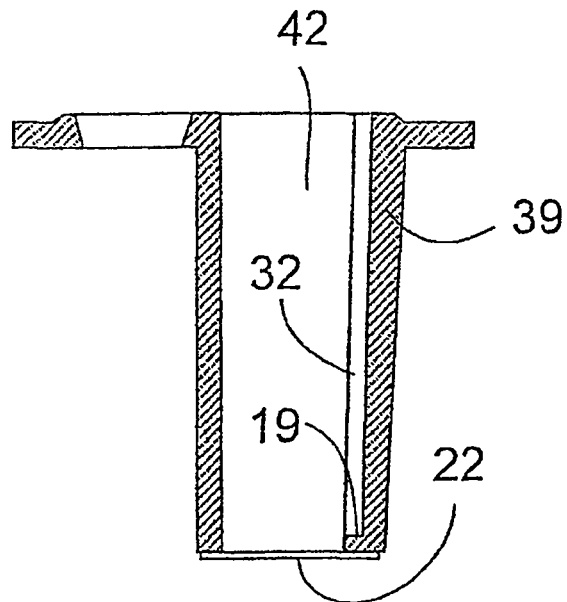


Figura 6

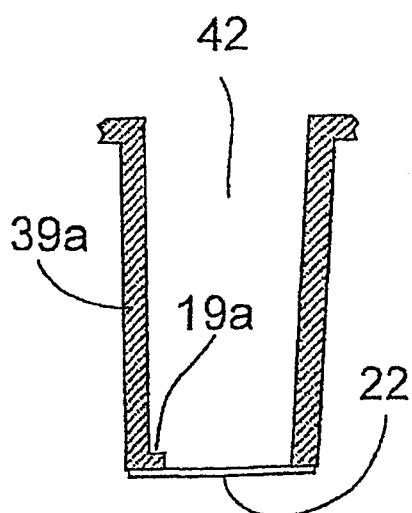


Figura 6a

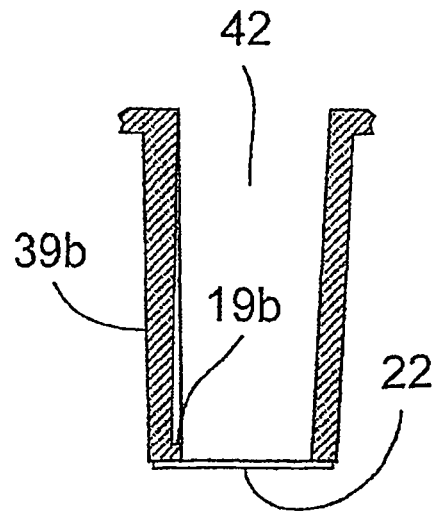


Figura 6b

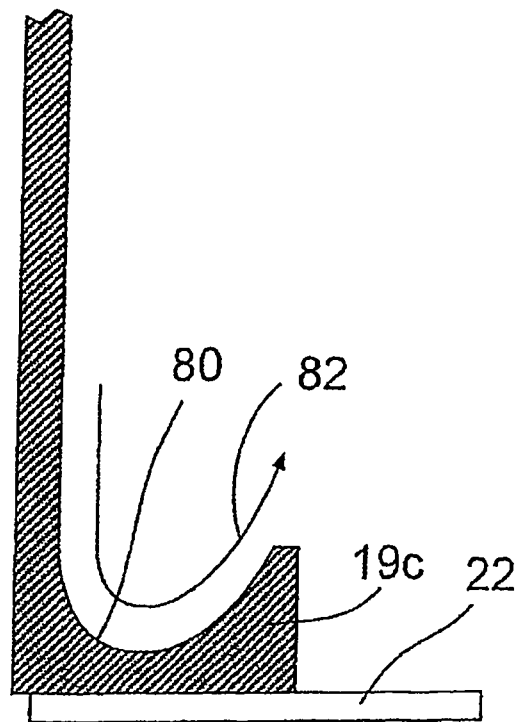


Figura 7

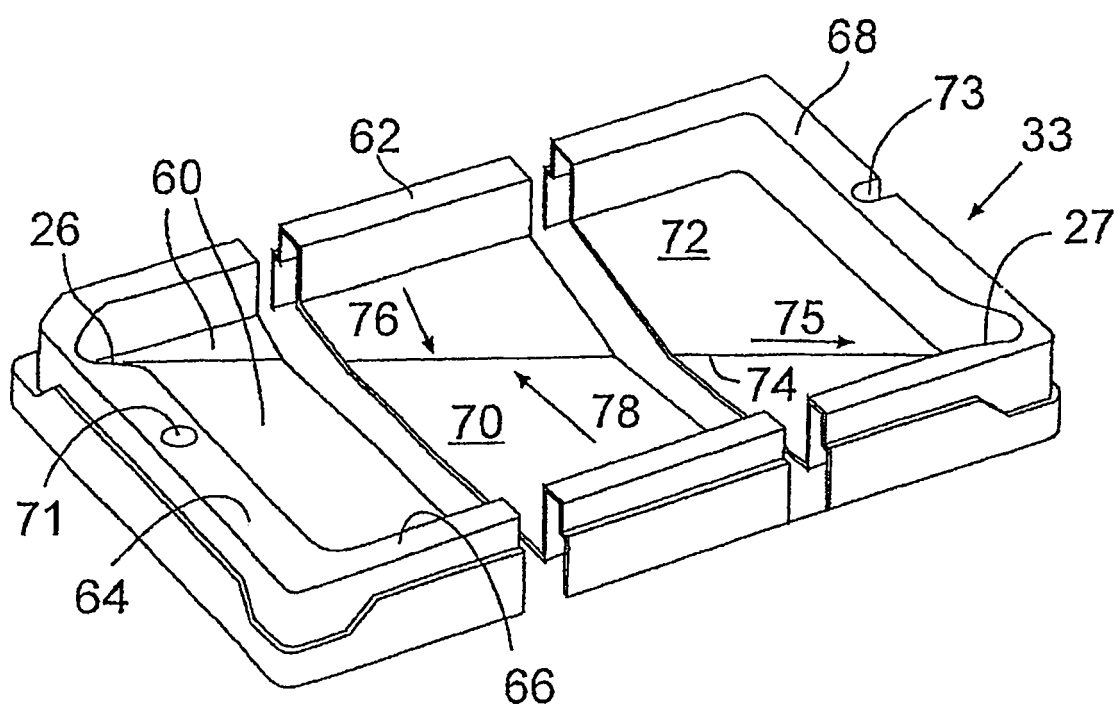


Figura 8

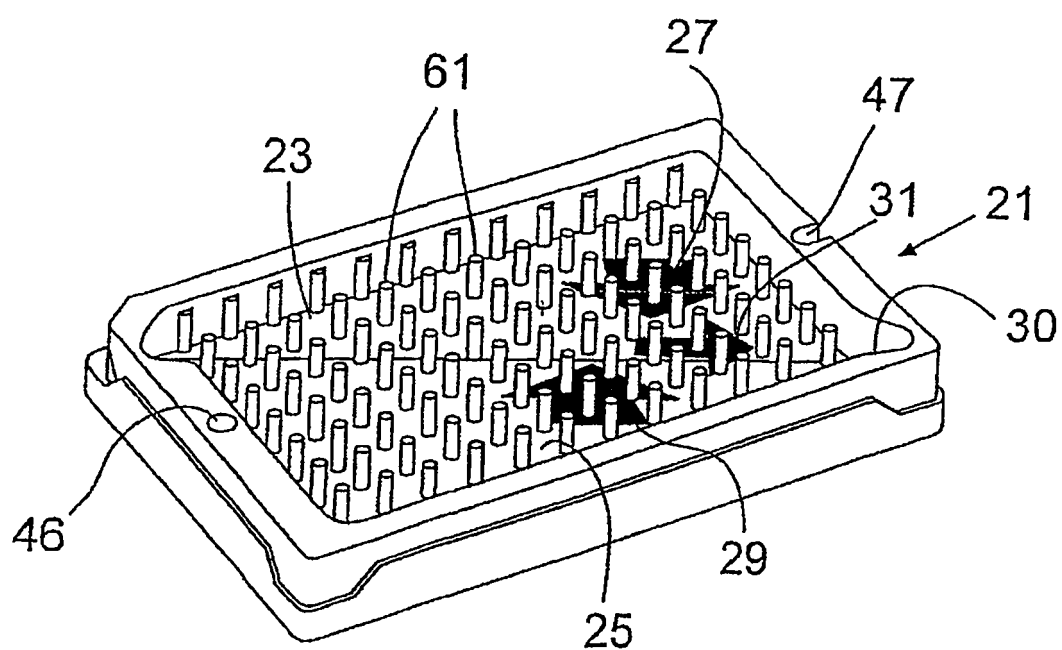


Figura 9

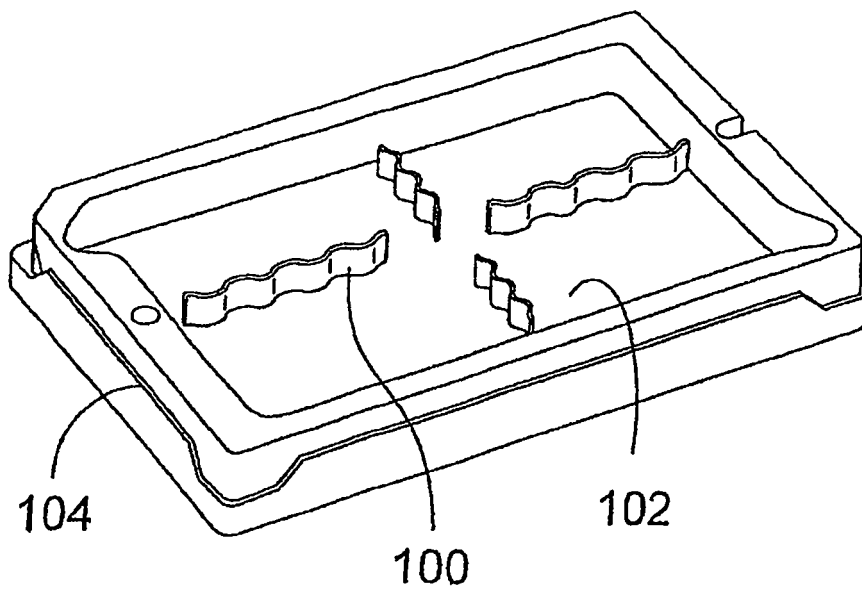


Figura 10

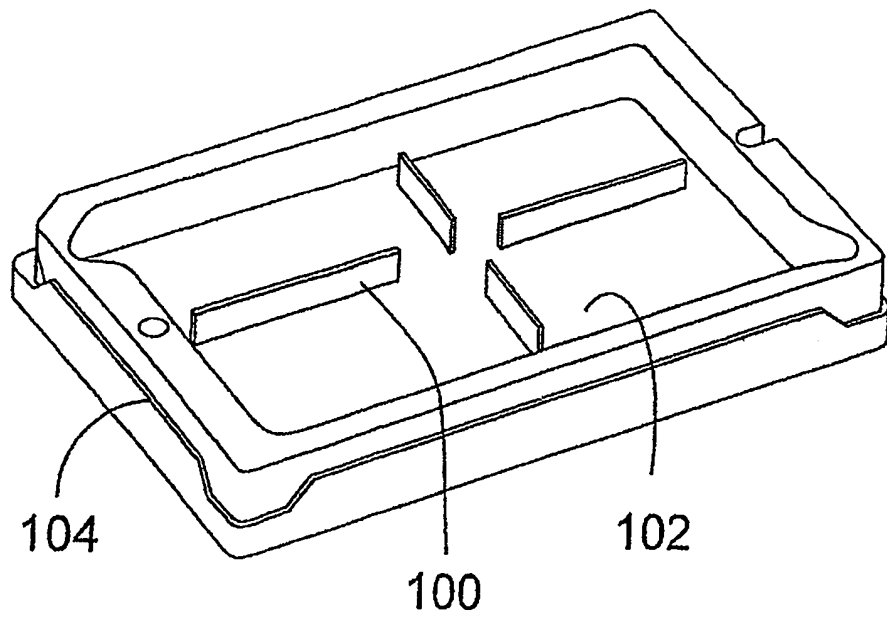


Figura 11a

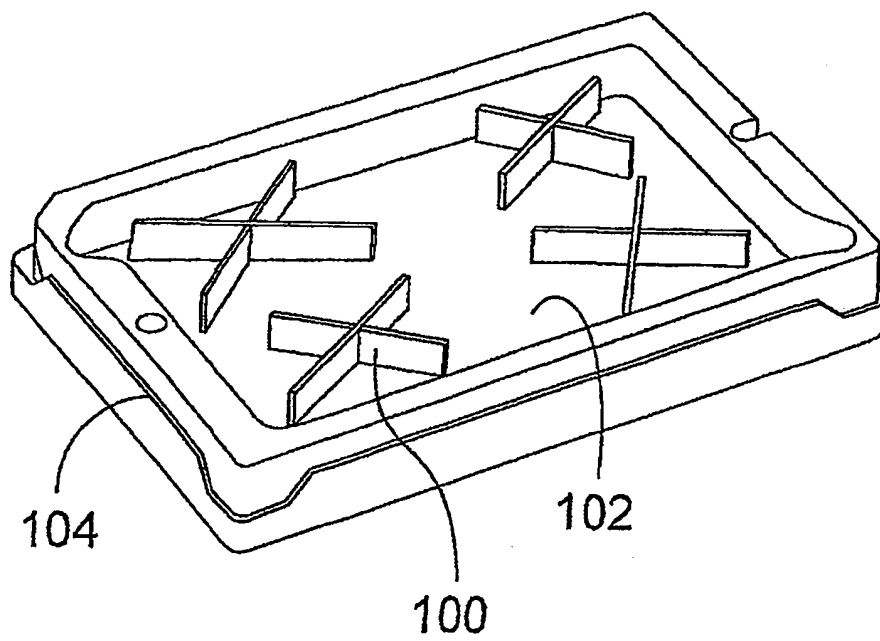


Figura 11b

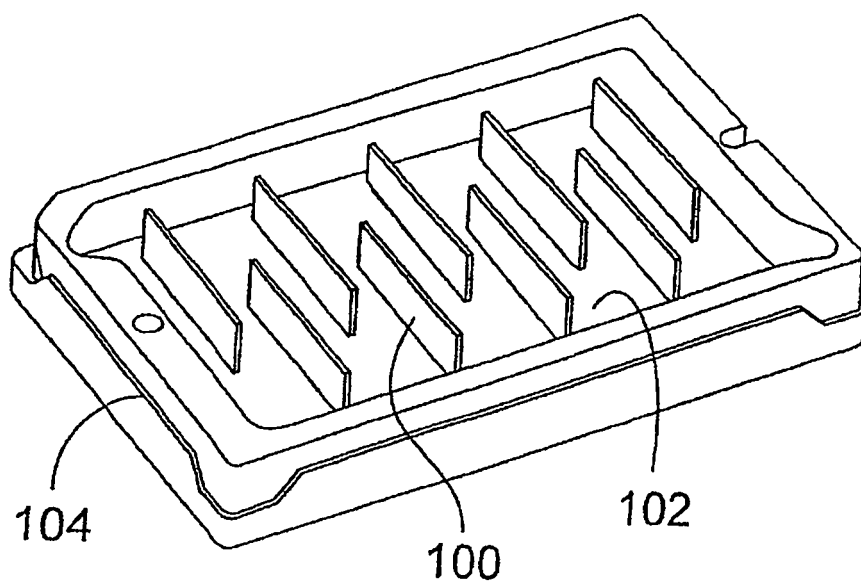


Figura 11c

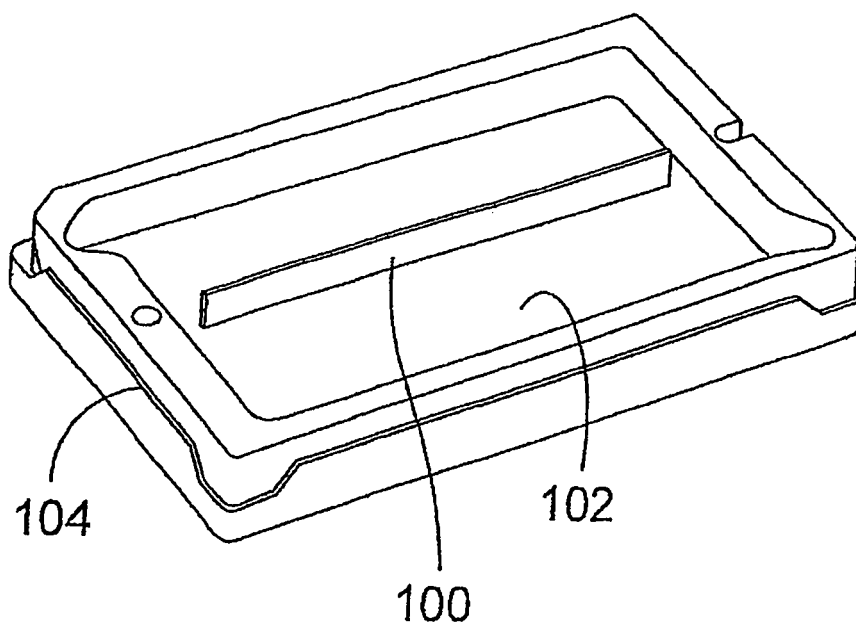


Figura 11d