



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 559**

51 Int. Cl.:
C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07108446 .1**

96 Fecha de presentación : **18.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1857540**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Dispositivo de elastómero para sembrar células en el fondo de un filtro.**

30 Prioridad: **19.05.2006 US 747696 P**
17.05.2007 US 750067

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2010

73 Titular/es: **BECTON, DICKINSON AND COMPANY**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417, US

72 Inventor/es: **Chen, Xiaoxi y**
Crespi, Charles L.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

CAMPO DE LA INVENCION

La invención objeto se refiere a artículos y métodos para la utilización en la siembra de células en filtros de dispositivos de ensayo.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ensayos de determinación de permeabilidad de fármacos son conocidos en la técnica anterior. Con referencia a la figura 1, se muestra una disposición típica para realizar tales ensayos. Se muestra una placa de inserción 10 de pocillos múltiples que tiene una pluralidad de pocillos abiertos 12 con una membrana porosa o filtro 14 que se extiende a través de un extremo inferior de cada uno de los pocillos 12. El filtro 14 típicamente es un material de difluoruro de polivinilideno (PVDF), tereftalato de polietileno (PET) o policarbonato (PC). También se muestra una placa de recepción correspondiente 16 que tiene pocillos receptores 18 cerrados por la parte inferior. En uso, las soluciones tampón que contienen compuestos que se van a analizar se disponen en los pocillos receptores 18. Las soluciones tampón sin los compuestos de interés se disponen en los pocillos 12 de la placa de inserción 10, y la placa de inserción 10 se coloca encima de la placa de recepción 16 entrando en contacto los filtros 14 con las soluciones tampón de los compuestos que están contenidos en los pocillos receptores 18. Las concentraciones de los compuestos en las soluciones, tanto en la placa de inserción 10 como en la placa de recepción 16, se analizan para observar la difusión de los compuestos a través de los filtros 14 y para determinar las permeabilidades de los compuestos.

En determinadas circunstancias (por ejemplo, en ciertos ensayos), puede ser deseable disponer una o más monocapas de células formadas en los filtros. Con referencia a la figura 2, se conoce en la técnica disponer soluciones de medios celulares en los pocillos 12 de la placa de inserción para incubar las células en las superficies interiores respectivas de los filtros 14 y formar monocapas de células sobre las mismas. Sin embargo, existe una mayor dificultad en la formación de monocapas de células en las superficies exteriores de los filtros. Como se muestra en la figura 3, se ha desarrollado una técnica mediante la cual la placa de inserción 10 se invierte y una gota de la solución del medio celular se dispone sobre cada uno de los filtros 14. Debido a que se puede disponer un volumen limitado del medio celular sobre cada uno de los filtros 14, es difícil conseguir de una manera consistente una monocapa de células compactas, lo cual requiere una alta densidad celular y un largo tiempo de incubación. El fallo en la formación de una monocapa de células compactas puede

conducir a que se formen "agujeros" en la monocapa de células y el posible fallo en los ensayos de determinación de permeabilidad del fármaco.

Un ensayo de determinación de este tipo se describe, por ejemplo, en el documento en EP 0757 097 del solicitante.

- 5 La formación de monocapas de células en las superficies exteriores de las membranas del filtro es deseada por varias razones. En primer lugar, con monocapas de células en ambos lados de las membranas de filtro, en particular con tipos de células diferentes, se pueden estudiar las comunicaciones celulares. En segundo lugar, las monocapas de la superficie exterior permiten a los investigadores realizar
- 10 estudios de transporte de fármacos polarizados de una manera que permita el uso de configuraciones idénticas de soluciones tampón en cada dirección del transporte del fármaco (apical a basolateral y basolateral a apical).

SUMARIO DE LA INVENCION

- 15 Se proporciona un artículo en la presente memoria descriptiva para su uso en la siembra de células sobre al menos un filtro que se extiende a través de al menos un pocillo de un dispositivo de ensayo. El artículo incluye un cuerpo de elastómero que tiene superficies primera y segunda separadas, y al menos un canal que se extiende entre y a través de las superficies primera y segunda. El canal está formado para
- 20 aplicarse de manera estanca y de manera desmontable, a una superficie exterior del pocillo en una posición separada del filtro, estando el filtro rodeado, al menos parcialmente, por el canal. De manera ventajosa con la invención objeto, la monocapa de células se pueden formar sobre la superficie exterior del filtro. El dispositivo de ensayo puede ser una placa de pocillos múltiples, una placa de inserción, una
- 25 columna, un tubo de ensayo, o una pipeta.

- En otro aspecto adicional de la invención objeto, se proporciona un método para la siembra de células en al menos un filtro que se extiende a través de al menos un pocillo de un dispositivo de ensayo. El método incluye proporcionar un cuerpo que tenga superficies primera y segunda separadas, y al menos un canal que se extiende
- 30 entre y a través de las superficies primera y segunda; y disponer el cuerpo sobre el pocillo aplicándose el canal de manera estanca al pocillo en una posición separada del filtro y estando rodeado el filtro, al menos parcialmente, por el canal.

- Estas y otras características de la invención objeto se entenderán mejor por medio del estudio de la descripción detallada que sigue y de los dibujos que se
- 35 acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La figura 1 muestra una disposición de una placa de inserción y de una placa de recepción;
- 5 la figura 2 muestra esquemáticamente una monocapa de células formada sobre una superficie interior del filtro;
- la figura 3 muestra el método de la técnica anterior para la siembra de células sobre las superficies exteriores de los filtros;
- la figura 4 muestra un artículo formado de acuerdo con la invención objeto en
- 10 uso con un dispositivo de ensayo en forma de una placa de inserción;
- la figura 5 muestra esquemáticamente una monocapa de células formada en una superficie exterior del filtro, y,
- la figura 6 muestra esquemáticamente monocapas de células formadas en las superficies interior y exterior del filtro.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Con referencia a la figura 4, se proporciona un artículo 20 para su uso en la siembra de células sobre una o más membranas o filtros 22. El artículo 20 incluye un cuerpo 24, que es preferentemente unitario, y superficies primera y segunda
- 20 separadas 26 y 28, que se forman preferentemente para que sean paralelas una a la otra. Se forman uno o más canales 30 para que se extiendan entre y a través de las superficies primera y segunda 26, 28. El cuerpo 24 puede estar formado con dimensiones variables con diversas cantidades de canales 30 que se proporcionan y se disponen en diversas agrupaciones.

- 25 Las secciones transversales de los canales 30 pueden ser constantes o pueden ser variables a lo largo de toda la longitud de los mismos. Preferentemente, como se muestra en la figura 4, los canales 30 se forman con configuraciones estrechadas progresivamente que convergen hacia la segunda superficie 28. Las secciones transversales de los canales 30 se formarán para definir obturaciones
- 30 impermeables a los fluidos con los pocillos correspondientes de un dispositivo de ensayo, como se describe a continuación.

Es preferido que el cuerpo 24 se forme de un material de elastómero. Más preferiblemente, el cuerpo 24 está formado de polidimetilsiloxano (PDMS). El PDMS permite la obturación ajustada y la retirada fácil y no destructiva después de su uso.

Los filtros 22 pueden estar formados de cualquier material conocido, incluyendo material de PVDF, PET o policarbonato (PC). Además, los filtros 22 pueden ser de distintos espesores e incluir poros de diferentes dimensiones y configuraciones.

El artículo 20 puede ser utilizado en diversas aplicaciones, pero es especialmente adecuado para su uso en combinación con un dispositivo de ensayo 32. El dispositivo de ensayo 32 puede ser cualquier dispositivo que se utiliza en procedimientos de ensayo o prueba (por ejemplo, ensayos de determinación de permeabilidad de fármacos), incluyendo pero sin limitación, placas de pocillos múltiples, placas de inserción, columnas, tubos de ensayo, y pipetas. Con propósitos ilustrativos, el dispositivo de ensayo 32 se muestra y se describe como una placa de inserción, pero son posibles otras configuraciones. El dispositivo de ensayo 32 incluye al menos un pocillo 34 a través del cual se extiende el filtro 22. Preferiblemente, el pocillo 34 termina en un extremo abierto 36 a través del cual se extiende el filtro 22. El filtro 22 se puede fijar al pocillo 34 utilizando diversas técnicas, incluyendo, a título de ejemplos no limitativos, fijación por unión, por fusión y mecánica. Una superficie interior 38 del filtro 22 está orientada a un interior 40 del pocillo 34, mientras que la superficie exterior 42 del filtro 22 da la espalda al interior 40. El dispositivo de ensayo 32 puede incluir una pluralidad de pocillos 34, teniendo cada uno de ellos uno o más de filtros 22. Preferentemente, cada uno de los pocillos 34 incluye un extremo de recepción abierto 44 opuesto al extremo abierto 36, formado para recibir soluciones de ensayo (por ejemplo, solución o soluciones tampón en el pocillo respectivo 34).

Es preferido que el artículo 20 esté provisto de un número y localizaciones de canales 30 que se corresponden al número y localizaciones de los pocillos 34 en el dispositivo de ensayo 32. De esta manera, el artículo 20 se puede utilizar para sembrar células simultáneamente en la pluralidad de los filtros 22. Además, cada uno de los canales 30, en particular en la segunda superficie 28, está formado para definir una obturación estanca a los fluidos en los pocillos 34, estando siendo rodeados los filtros 22, al menos parcialmente, por los canales 30. Específicamente, al menos las superficies exteriores 42 de los filtros 22 deben ser rodeados por los canales 30; sin embargo, es preferido que los filtros 22 sean rodeados completamente por los canales 30.

Con referencia a la Figura 4, se representa la utilización del artículo 20. Es preferido que en una primera etapa 46, el dispositivo de ensayo 32 sea situado para que tenga las superficies exteriores 42 de los filtros 22 orientadas hacia arriba por la gravedad (por ejemplo, invirtiendo el dispositivo de ensayo 32). En una segunda etapa

48, el cuerpo 24 se dispone sobre el dispositivo de ensayo 32, aplicándose de manera estanca los canales 30 a los pocillos 34, estando rodeados los filtros 22, al menos parcialmente, por los canales 30. Los canales 30 forman obturaciones impermeables en las superficies exteriores 50 de los pocillos 34. Cuando los canales 30 tienen una configuración estrechada progresivamente, es preferido que los pocillos 34 se inserten en los canales 30 a través de la segunda superficie 28, que define aberturas más estrechas en los canales 30 de la primera superficie 26.

En una tercera etapa 52, una o más soluciones de medio celular 54 se disponen en cada uno de los canales 30 por encima de los filtros 22. Con las obturaciones estancas a los fluidos definidas por los canales 30, y estando rodeados los filtros 22, al menos parcialmente, por los canales 30, las soluciones de medio celular 54 se mantienen retenidas dentro de los canales 30 en comunicación con los filtros 22. Es preferido que se permita la incubación de las células con el fin de facilitar la formación del crecimiento celular en las superficies exteriores 42 de los filtros 22. Una vez preparadas, las soluciones de medio celular 54 se retiran y se suelta el artículo 20, dejando el dispositivo de ensayo 32 listo para su utilización

Como se muestra en la figura 5, se pueden desarrollar una monocapa celular 56 en la superficie exterior 42 de uno o más de los filtros 22 utilizando la presente invención. Para cada uno de los filtros 22, la monocapa celular 56 puede estar formada ajustadamente debido a la capacidad de mantener las soluciones de medio celular 54 en cantidades suficientemente grandes a través de la superficie exterior 42 de la extensión completa del filtro 22.

La invención objeto se puede utilizar con metodología convencional. Por ejemplo, en relación con la figura 6, las técnicas conocidas para la siembra de células pueden ser utilizadas para desarrollar la monocapa celular 56 en la superficie interior 38 de uno o más de los filtros 22. Además, la invención objeto puede ser utilizada para desarrollar la monocapa celular 56 en la superficie exterior 42 del uno o más filtros 22 para tener el o los filtro(s) 22 emparedado(s) por las monocapas de células 56. Las monocapas de células 56 se pueden formar del mismo o de diferentes tipos de células para permitir el estudio de las comunicaciones celulares.

REIVINDICACIONES

1. Un artículo para su uso en la siembra de células en al menos un filtro (22) que se extiende a través de al menos un pocillo (34) de un dispositivo de ensayo (32),
5 comprendiendo el citado artículo:

un cuerpo de elastómero (24) que tiene superficies primera y segunda separadas (26, 28), y al menos un canal (30) que se extiende entre y a través de las citadas superficies primera y segunda (26, 28), estando formado el
10 citado canal (30) para aplicarse de manera estanca y de manera desmontable a una superficie exterior (50) del pocillo (34) en una localización separada del filtro (22), estando rodeado el filtro (22, al menos parcialmente, por el citado canal (30)

- 15 2. Un artículo como en la reivindicación 1, en el que el citado cuerpo de elastómero (24) está formado por polidimetilsiloxano.

3. Un artículo como en la reivindicación 1, en el que el citado canal (30) tiene una forma estrechada progresivamente.

20

4. Un método para la siembra de células en al menos un filtro (22) que se extiende a través de al menos un pocillo (34) de un dispositivo de ensayo (32), comprendiendo el citado método:

25 proporcionar un cuerpo (24) que tiene superficies primera y segunda separadas (26, 28) y al menos un canal (30) que se extiende entre y a través de las citadas superficies primera y segunda (26, 28), y,
disponer el citado cuerpo (24) sobre el citado pocillo (34) aplicándose de manera estanca el citado canal (30) al citado pocillo (34) en una localización
30 separada del citado filtro (22) y estando rodeado el citado filtro (22), al menos parcialmente, por en el citado canal (30).

5. Un método como en la reivindicación 4, en el que el citado filtro (22) incluye una superficie interior orientada hacia el interior del citado pocillo (34) y una superficie

exterior de espaldas al interior del citado pocillo (34), estando rodeada la citada superficie exterior del citado filtro (22) por el citado canal (30).

5 6. Un método como en la reivindicación 5, que comprende, además, la etapa de dirigir la citada superficie exterior del citado filtro (22) para que se oriente por gravedad hacia arriba antes de la etapa de disponer el citado cuerpo (24) sobre el citado pocillo.

10 7. Un método como en la reivindicación 5 ó 6, que comprende, además, la etapa de sembrar células sobre la citada superficie interior del citado filtro (22).

8. Un método como en la reivindicación 4, en el que el citado cuerpo (24) es de elastómero.

15 9. Un método como en la reivindicación 4, en el que el citado cuerpo (24) está formado por polidimetilsiloxano.

10. Un método como en la reivindicación 4, en el que el citado canal (30) tiene una forma estrechada progresivamente.

20 11. Un método como en la reivindicación 10, en el que el citado canal (30) converge desde la citada primera superficie (26) a la citada segunda superficie (28), y el citado pocillo (34) se extiende dentro del citado canal (30) a través de la citada segunda superficie (28) estando dispuesto el citado cuerpo (24) sobre el citado pocillo (34).

25 12. Un método como en la reivindicación 4, que comprende, además, la etapa de disponer al menos una solución de medio celular en el citado canal (30) después de la etapa de disponer el citado cuerpo (24) en el citado pocillo (34).

30 13. Un método como en la reivindicación 12, que comprende, además, la etapa de permitir la incubación de células después de la etapa de disponer al menos una solución de medio celular en el citado canal (30).

14. Un método como en la reivindicación 13, que comprende, además, la etapa de separar el citado cuerpo (24) del citado pocillo (34) después de la etapa de permitir la incubación de células.

5 15. Un método como en la reivindicación 12, que comprende, además, la etapa de separar el citado cuerpo (24) del citado pocillo (34) después de la etapa de disponer al menos una solución de medio celular en el citado canal (30).

10 16. Un método como en la reivindicación 4, en el que el citado dispositivo de ensayos se selecciona del grupo formado por placas de pocillos múltiples, placas de inserción, columnas, tubos de ensayo y pipetas.

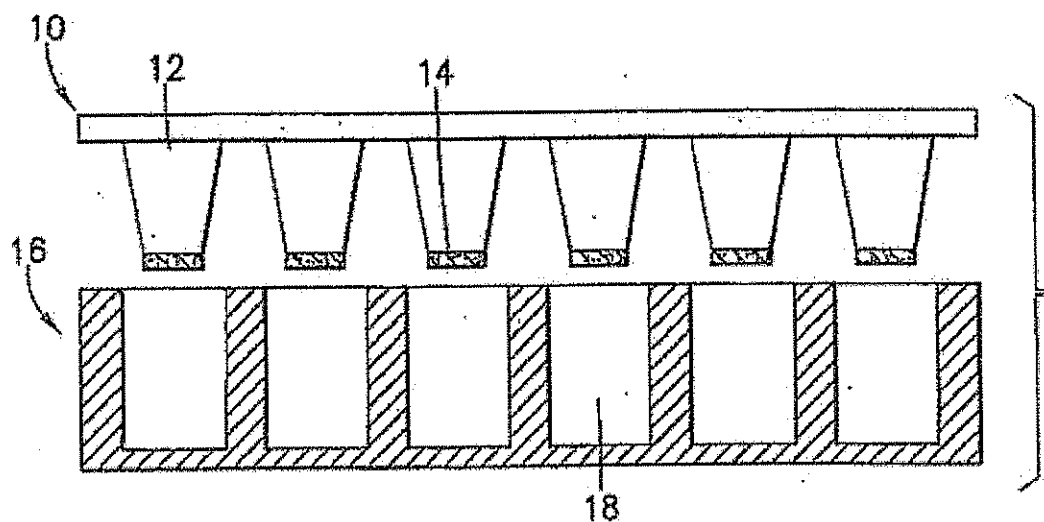


FIG. 1

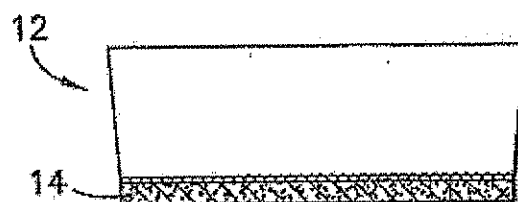


FIG. 2

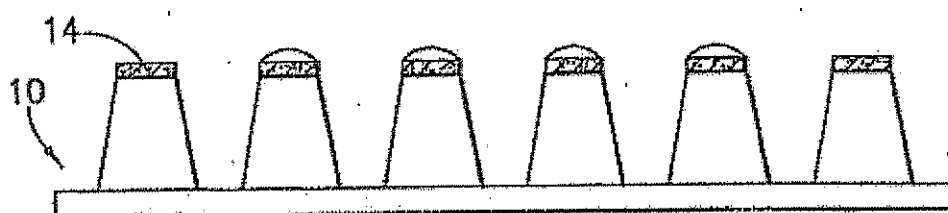


FIG. 3

TÉCNICA ANTERIOR

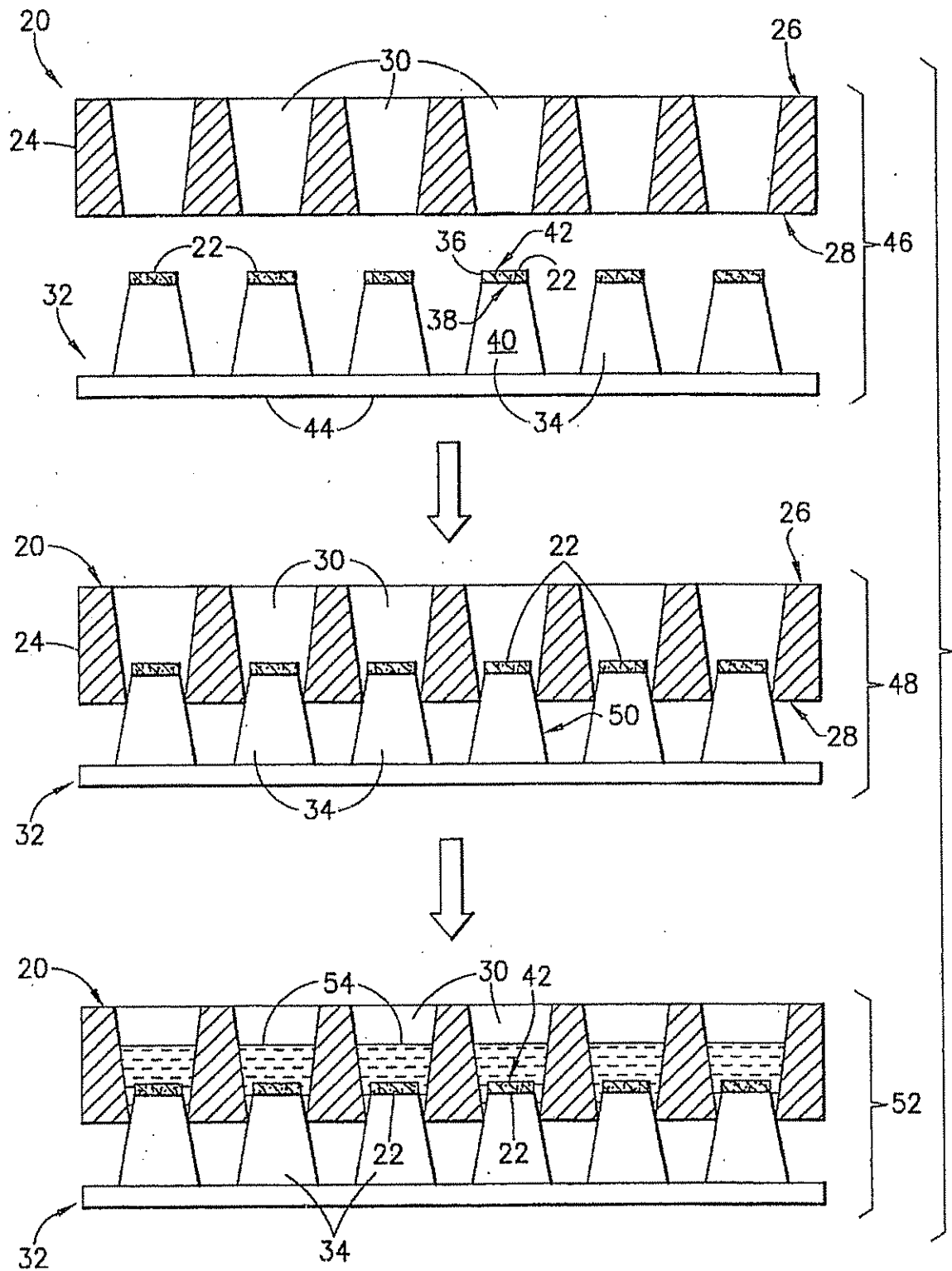


FIG. 4

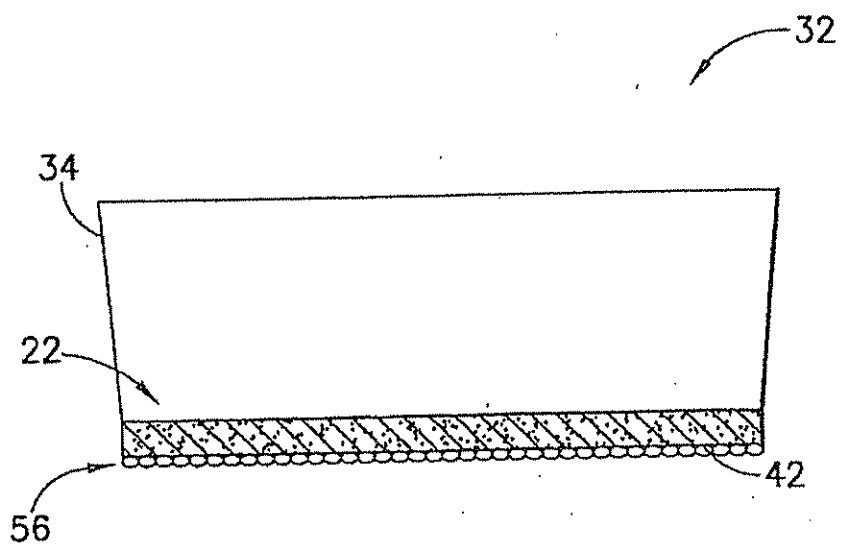


FIG. 5

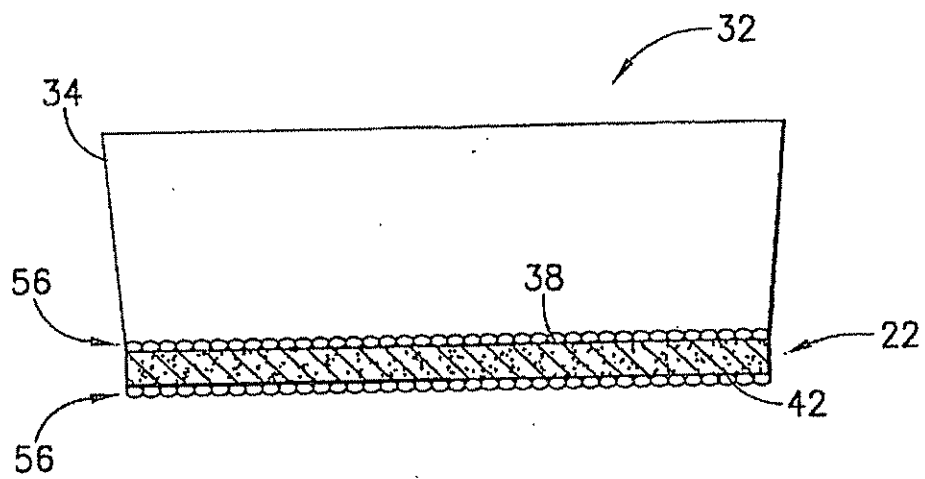


FIG. 6