



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 509**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**G01N 35/10** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02808318 .6**

86 Fecha de presentación : **24.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1576085**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54

Título: **Dispositivo analítico para cultivos celulares.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

73

Titular/es: **Humanitas Mirasole S.p.A.**  
**Via Manzoni, 56**  
**20089 Rozzano, Milano, IT**

72

Inventor/es: **Parmeggiani, Luciano;**  
**Dioguardi, Nicola y**  
**Grizzi, Fabio**

74

Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 300 509 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).

# ES 2 300 509 T3

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo analítico para cultivos celulares.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo analítico para cultivos de células, y a un método analítico para cultivos de células.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un contenedor para cultivo de células, para su uso en el dispositivo y el método analíticos citados.

10 Los métodos actuales de cultivo de células *in vitro* utilizan en general sistemas físicos conocidos mediante el término "sistemas cerrados". Con este término se pretende indicar, en la presente descripción, un sistema que comprende fundamentalmente un contenedor cerrado en cuyo interior se ha dispuesto un medio de cultivo que comprende una cantidad determinada de células. En particular, dicho contenedor debe ser abierto para permitir el acceso al cultivo  
15 de células, para extraer una muestra a efectos de análisis, o para permitir el aprovisionamiento de las células con las sustancias nutritivas necesarias para su supervivencia.

El medio de cultivo permanece así en el interior del contenedor y experimenta cambios de sus componentes con el tiempo (tales como, por ejemplo, aminoácidos, sales minerales, vitaminas y antibióticos) y/o de las concentraciones  
20 relativas, debido a ser metabolizados por las células contenidas en el mismo.

Los estudios que se refieren al metabolismo celular en estos sistemas cerrados implican por lo tanto la extracción de cantidades apropiadas de medio de cultivo desde el contenedor en instantes bien determinados. Sucesivamente, las muestras, con el fin de ser analizadas, deben ser manipuladas como para ponerlas a disposición del tipo de análisis deseado.  
25

En general, las citadas muestras se realizan mediante una pipeta manipulada por un operador que extrae desde el contenedor de cultivo una cantidad de la muestra deseada, y la deposita en un soporte analítico apropiado o en tubo de ensayo.  
30

Con relación a los medios líquidos de cultivo, un tipo bien conocido de contenedor utilizado está representado por el "frasco". Los "frascos" están normalmente formados a base de capas de materiales plásticos transparentes, son sustancialmente de forma paralelepípedica, y tienen en una pared una abertura dotada de un collar sobresaliente, en el que se atornilla reversiblemente una tapa de cierre.  
35

Normalmente, por lo tanto, las tomas de muestras mencionadas anteriormente deben ser realizadas mediante instrumentos apropiados, tales como las pipetas que se han mencionado anteriormente, las cuales deben ser introducidas en el contenedor a través de la abertura de la tapa de cierre. Con frecuencia, además, es necesario operar en ambientes estériles o, no obstante, utilizar aún así instrumentos estériles o al menos no contaminados. Además, no es raro que  
40 sea necesario utilizar nuevos instrumentos o puntas de pipeta limpias para cada extracción de muestra.

Además, como se mencionó previamente, las tomas de muestras se realizan a intervalos de tiempo determinados.

A partir de la descripción, está claro que los métodos analíticos de la técnica conocida, en primer lugar, requieren un cierto número de operaciones manuales y, en segundo lugar, dichas operaciones manuales deben ser llevadas a cabo por un experto especializado en instantes preestablecidos.  
45

Todo ello debe tener lugar obviamente poniendo una atención particular para no contaminar el cultivo de células, de modo que no se alteren los resultados de los análisis.  
50

En consecuencia, el problema que subsiste en el centro de la presente invención, consiste en proporcionar un dispositivo analítico para cultivos de células que permita que se puedan subsanar las inconveniencias mencionadas en lo que antecede causadas por un método de análisis celular desarrollado en un sistema cerrado.

55 Este problema ha sido resuelto mediante un sistema analítico de cultivo de células según se reivindica en la reivindicación independiente anexa.

Un segundo objeto de la presente invención consiste en la provisión de un método analítico de cultivos de células que resuelva los problemas asociados al método de sistema cerrado.  
60

Un objeto adicional de la invención consiste en proporcionar un contenedor de cultivo de células para su uso en el dispositivo y el método anteriores.

Las características y ventajas de la invención van a ser descritas ahora en lo que sigue con referencia a las figuras anexas, que hacen referencia a un ejemplo no limitativo de una realización, en las que:  
65

La figura 1 representa esquemáticamente un dispositivo analítico de cultivo de células de acuerdo con la invención,  
y

## ES 2 300 509 T3

la figura 2 representa una vista en perspectiva de un contenedor de cultivo de células de acuerdo con la invención.

Con referencia a la figura 1, el número 1 de referencia indica en general un dispositivo analítico de cultivo de células de acuerdo con la invención. Se debe apreciar que el dispositivo 1 analítico ha sido representado globalmente de forma esquemática para permitir la comprensión de su funcionamiento.

Dicho dispositivo 1 analítico comprende un tanque 2 de reserva, una bomba 3, un contenedor 4 y un dispositivo 5 de depósito.

El tanque 2, representado esquemáticamente mediante un rectángulo en la figura 1, consiste en cualquier tipo de contenedor adecuado para contener un medio de cultivo de células.

Normalmente, se encuentran comercialmente disponibles diferentes medios de cultivo adaptados adecuadamente para cada tipo de células utilizadas en el sector del cultivo *in vitro*. Alternativamente, dichos medios pueden ser preparados por los expertos en la materia, de acuerdo con las necesidades o preferencias particulares.

Preferiblemente, el tanque 2 puede estar representado por una botella de un medio líquido, o por un frasco convencional que contenga una solución de aminoácidos, sales minerales, vitaminas, antibióticos y otros componentes menores.

Además, el tanque 2 puede ser mantenido a la temperatura deseada con medios convencionales adecuados de calentamiento tales como, por ejemplo, un baño termostático de agua.

El tanque 2 está conectado a una bomba 3 a través de un tubo 6 que permite que la bomba succione medio de cultivo fresco desde el interior de dicho tanque, y que lo envíe a un contenedor 4 a través de un segundo tubo 7 de conexión. De esta manera, se forma un primer circuito cerrado unidireccional desde el tanque 2 hasta el contenedor 4.

La bomba 3 puede ser de cualquier tipo disponible comercialmente y adecuada para transferir un medio líquido de cultivo de células desde un contenedor a otro, tal como por ejemplo una bomba de vacío. Con preferencia, la bomba 3 es una bomba peristáltica que se calibra de modo que transfiera una cantidad determinada de medio fresco desde el tanque 2 hasta el contenedor 4 por unidad de tiempo, de acuerdo con el tipo de cultivo de células y con el tipo de análisis que se va a realizar. Estos ajustes, sin embargo, quedan a la discreción del experto en la materia, en tanto que los mismos dependen del perfil metabólico del cultivo de células que se va a analizar.

En particular, se debe apreciar que el uso de una bomba peristáltica permite ventajosamente obtener un flujo continuo de capacidad de suministro constante con el tiempo.

La bomba 3 está además conectada al contenedor 4 por medio de un tercer tubo 8 que permite la extracción desde dicho contenedor del medio de cultivo metabolizado por las células y que va a ser analizado.

Un cuarto tubo 9 conecta entonces la bomba 3 con el medio 10 de depósito, adecuado para depositar de forma continuada el medio de cultivo extraído desde el contenedor 4, sobre un soporte 11 elegido apropiadamente en base al tipo de análisis que se va a realizar y al tipo de cultivo de células utilizado.

En consecuencia, el tubo 8, la bomba 3 y el tubo 9 representan un segundo circuito cerrado, separado y paralelo con el primer circuito.

Los medios 10 de depósito pueden estar representados por cualquier instrumento adecuado para depositar de forma continua o semi-continua, sobre un soporte analítico, el medio de cultivo de células extraído desde el contenedor 4. Mediante el término semi-continuo se pretende indicar, por ejemplo, un depósito gota a gota.

En otras palabras, los medios 10 de depósito son tales como para liberar constantemente el medio de cultivo de manera uniformemente distribuida, continuamente o semi-continuamente sobre un soporte 11. Dichos medios pueden comprender, por ejemplo, los cepillos, plumas, puntas de fieltro, plumas de tinta (radiograf<sup>®</sup>, rotring<sup>®</sup>).

Entre los medios mencionados anteriormente, los preferidos son los cepillos debido a que los mismos permiten que se pueda dejar una cantidad óptima de medio de cultivo para su análisis, depositando el medio de cultivo en forma de una película delgada. Además, los pelos que los forman, naturales o sintéticos, pueden doblarse sin dañar incluso el más delicado de los soportes.

Particularmente preferidos son los cepillos de pelo natural tales como, por ejemplo, los de pelo de marta o los de pelo de buey. La longitud de tales pelos puede variar de acuerdo con cada caso, y en general puede estar comprendida en la gama de 4 a 10 mm, con preferencia 8 mm para los pelos de buey y 5 mm para los pelos de marta.

Como se mencionó previamente, el depósito puede hacerse por lo tanto de forma continuada si el cepillo recibe un flujo continuo, o se puede hacer de manera semi-continua en caso de que el medio de cultivo llegue a los cepillos en forma de goteo, manteniendo preferentemente el cepillo siempre impregnado con el citado medio.

## ES 2 300 509 T3

Los medios 10 de depósito están asociados reversiblemente a un dispositivo 5 de depósito, representado esquemáticamente en la figura 1, según se va a describir ahora con mayor detalle.

5 El dispositivo 5 de depósito comprende el soporte 11 mencionado anteriormente, y un medio 13 móvil adecuado para mover los medios 10 de depósito mencionados anteriormente por encima de dicho soporte, con el fin de dejar una cantidad determinada de la sustancia que ha de ser analizada a lo largo de la ruta seleccionada.

10 En particular, los medios 13 móviles están contruidos preferentemente, aunque sin limitación, a modo de un tornillo de Arquímedes que es accionado, por ejemplo, por medio de algún tipo convencional de motor eléctrico que no se ha representado en la figura 1. A dichos medios 13 móviles se encuentran asociados los medios 10 de depósito, por ejemplo mediante un cursor (no representado).

15 Adicionalmente, el cursor de los medios 13 móviles está dotado de medios 14 de enclavamiento, adecuados para sujetar los medios 10 de depósito durante su movimiento.

20 Los medios 14 de enclavamiento pueden estar contruidos, por ejemplo, por pinzas adecuadas para agarrar un soporte 12 cilíndrico por la porción extrema del tubo 9 al que están asociados los medios 10 de depósito mencionados anteriormente, según se ha representado esquemáticamente en la figura 1, o directamente por la porción extrema del tubo 9 o incluso por el propio cepillo.

25 El soporte 11 está contruido en general por una lámina de material adecuado para la fijación de una cantidad de medio de cultivo que debe ser analizado. Entre los materiales utilizados normalmente para este objetivo se encuentran las láminas o membranas de nitrocelulosa o de nilón, por ejemplo.

30 Obviamente, el experto en la materia estará en condiciones de elegir cuál es el soporte adecuado para el tipo de medio de cultivo de células a analizar tomando en consideración también el tipo de análisis que se va a realizar.

35 El soporte 11 puede ser mantenido en posición bajo los medios 10 de depósito de diferentes formas. Por ejemplo, puede estar previsto mantener el soporte suspendido por debajo de dichos medios de depósito anclándolo reversiblemente a lo largo de sus bordes más externos en forma de sándwich.

40 En otras palabras, el soporte 11 puede ser colocado sobre un plano rígido, por ejemplo, o con preferencia, solamente su borde más externo puede apoyar sobre una placa metálica a la que se aplican imanes.

45 El dispositivo 5 de depósito comprende además un conmutador/adaptador convencional para permitir el trabajo del tornillo de Arquímedes en una dirección de rotación y en la dirección opuesta, permitiendo con ello el movimiento de los medios 10 de depósito alternativamente en una u otra dirección a lo largo de dicho tornillo.

50 La velocidad de rotación del tornillo de Arquímedes puede ser regulada entonces mediante un regulador convencional de velocidad, no mostrado, como para cambiar la velocidad de movimiento de los medios 10 de depósito sobre el soporte 11 en base a los requisitos particulares impuestos por las condiciones operativas.

55 En particular, los tiempos de desplazamiento de los medios de depósito, para un soporte de 40 cm, podrían variar en general entre 1 y 5 horas.

60 Adicionalmente, el dispositivo 5 analítico puede comprender opcionalmente un temporizador con un conmutador de exclusión.

65 El contenedor 4 puede ser de cualquier tipo de contenedor de los utilizados normalmente para cultivo de células *in vitro* tal como, por ejemplo, placas y "frascos".

En particular, el contenedor 4 representado en la figura 2 consiste en un frasco que ha sido modificado ventajosamente de modo que permita ser utilizado en un dispositivo analítico de acuerdo con la invención, o no obstante en un método analítico de acuerdo con la invención.

De forma detallada, el frasco comprende un cuerpo 40 que tiene una forma sustancialmente paralelepípedica que se extiende a lo largo de un eje X-X longitudinal. El cuerpo 40 presenta una cara 15 superior, una cara 16 inferior, un primer extremo 17 y un segundo extremo 18.

60 El primer extremo 17 está dotado de una cara 19 sustancialmente plana, de forma rectangular, cruzada por, y situada perpendicularmente al, eje X-X.

65 Ventajosamente, la cara 19 está dotada de un orificio 20 pasante, preferentemente en las proximidades de la cara 15 superior del frasco 4. Dicho orificio está en comunicación con un tubo 21 que sobresale desde la citada cara hacia el exterior.

El segundo extremo 18 es ahusado hacia el exterior del frasco 4 o, en otras palabras, tiene una forma sustancialmente troncopiramidal con la base 22 más pequeña vuelta hacia el exterior.

## ES 2 300 509 T3

Dicha base 22 más pequeña está dotada de una abertura 25 circular desde cuyo borde se extiende un cuello 23 cilíndrico, también hacia el exterior, generalmente algo inclinado hacia arriba para facilitar el llenado o el vaciado del frasco 4 evitando al mismo tiempo el derramamiento accidental del líquido cuando el frasco se extiende horizontalmente apoyando sobre la cara 16 inferior.

Normalmente, entonces, en dicho cuello 23 se encuentra atornillada reversiblemente una tapa 24 de cierre. Dicha tapa puede ser cerrada por el fondo o puede disponer de orificios cubiertos por una membrana convencional apropiada (no representada), que permita el intercambio de gases entre el exterior y el interior del frasco 4, pero no la pérdida del contenido o su contaminación.

Además, la cara 15 superior del frasco 4 se ha dotado de un orificio 26 pasante desde el que se extiende un tubo 27 hacia el exterior del frasco 4.

Preferiblemente, dicho orificio 26 y dicho tubo 27 están situados a nivel con el citado segundo extremo 18.

El funcionamiento del dispositivo 1 analítico de cultivo de células de acuerdo con la presente invención va a ser descrito ahora de forma breve en lo que sigue.

La bomba 3 está conectada, como se describió previamente, al frasco 4, que contiene una determinada cantidad de medio de cultivo líquido inoculado con el tubo 27 del frasco, y el tubo 8 se encuentra conectado con el tubo 21 del frasco.

A su vez, la bomba 3 está conectada al depósito 2 de medio de cultivo fresco, a través del tubo 6 antes mencionado, y con los medios 10 de depósito a través del tubo 9 adicional.

En este punto, la bomba 3 conecta y suministra dos circuitos separados, de los que el primer circuito se inicia en el depósito 2, pasa a través de la bomba 3 y acaba en el contenedor 4, y el segundo circuito empieza, sin embargo, en el contenedor 4, pasa después a través de la bomba 3 sin interferir con el primer circuito, y termina en los medios 10 de depósito.

De esta manera, el frasco 4 puede recibir medio de cultivo fresco desde el depósito 2 de forma continua, mientras que también descarga de forma continua el medio de cultivo metabolizado por las células presentes en el mismo, con el uso de una sola bomba 3.

En particular, se debe apreciar que los dos circuitos que se acaban de describir están controlados por un único dispositivo mecánico que permite la regulación de la velocidad de flujo del medio de cultivo fresco que entra en, y que sale desde, el frasco 4 en perfecta sincronización. En otras palabras, la cantidad de medio fresco colocado en el frasco 4 por unidad de tiempo, es siempre igual a la cantidad de medio metabolizado por las células presentes en el cultivo extraído desde el mismo frasco.

Este sistema permite ventajosamente que se mantenga constante la velocidad de flujo del medio de cultivo que se deposita en el soporte 5 analítico.

Además, el dispositivo analítico de acuerdo con la presente invención permite el paso desde un “sistema cerrado” de acuerdo con la técnica anterior, hasta un “sistema abierto”, como se va a describir mejor en lo que sigue.

Un objeto adicional de la presente invención consiste en un método analítico para cultivos de células, que permite el aprovechamiento de un “sistema abierto”.

Mediante el término “sistema abierto” se pretende indicar un sistema constituido fundamentalmente por un contenedor cerrado en cuyo interior se ha depositado un medio de cultivo de células que comprende una cantidad determinada de células. En particular, el contenedor puede permitir también la extracción de una muestra de cultivo o del medio de cultivo para su análisis sin necesidad de abrir el contenedor, y llevar a cabo dicha extracción manualmente a través de un instrumento manejado por un operador.

Dicho método analítico incluye la extracción continua de una cantidad de cultivo de células o de medio de cultivo para análisis desde un contenedor de cultivo de células con la utilización de medios automatizados, y el depósito de dicha cantidad continuadamente sobre un soporte analítico apropiado.

En particular, la extracción continua de una muestra de cultivo de células para su análisis tiene lugar mediante la bomba 3 peristáltica mencionada anteriormente, es decir, un medio de bombeo automatizado que una vez puesto en marcha, no requiere ninguna intervención adicional de un operador manual. El suministro de la bomba 3 será calibrado de acuerdo con el tipo de medio y/o de células cultivadas, no sobre el tipo de análisis a realizar.

En cualquier caso, estas condiciones serán seleccionadas cada vez por el experto en la materia en base a las necesidades del caso.

## ES 2 300 509 T3

Además, la extracción tiene lugar a través de un circuito cerrado que, según se ha descrito anteriormente, empieza en el contenedor, pasa a través de la bomba, y termina en el soporte a través de los medios de deposición.

5 La etapa de deposición se realiza preferentemente con medios de deposición tales como, por ejemplo, los cepillos  
10 mencionados en lo que antecede. Además, dicha etapa tiene lugar con movimiento continuado para permitir una distribución uniforme y para evitar la superposición del medio de cultivo sobre el soporte analítico a lo largo de un recorrido, que puede ser por ejemplo rectilíneo.

10 La etapa de deposición depende de algunos factores tales como, por ejemplo, la presión del fluido que sale de los medios de deposición, la cual, a su vez, determina la velocidad del flujo continuo de dicho fluido, el tipo de cultivo y los análisis que han de ser realizados, y el tipo de medio de deposición.

15 En general, con relación a los medios de deposición, se puede decir que, en el caso de que se utilicen cepillos, para una longitud total de los pelos latentes de entre 4 y 10 mm, la longitud en uso puede variar entre 3 y 7 mm.

20 En otras palabras, cuando el cepillo entra en contacto con el soporte analítico para depositar el medio de cultivo, se verá sometido a una flexión de sus pelos reduciendo su distancia entre el punto de origen y la superficie del soporte. Este fenómeno determinará la presión de deposición del medio de cultivo necesaria para la obtención de una película sobre el soporte suficiente como para realizar los análisis requeridos.

25 Además, el método de deposición dependerá del tipo de soporte analítico, de las propiedades del medio de cultivo y de la velocidad de movimiento del cepillo, y de su número de vueltas determinado por la velocidad de rotación del tornillo de Arquímedes u otro medio de movimiento.

30 Todas las condiciones aquí relacionadas están, no obstante, dentro de las habilidades de los expertos en la materia.

35 El método analítico de acuerdo con la invención puede comprender también una etapa de suministro/compensación del medio de cultivo metabolizado por las células y extraído durante la fase de toma de muestras. Esta etapa consiste en que una determinada cantidad de medio fresco se extrae desde un recipiente tal como el que se ha descrito  
40 anteriormente, y se coloca en el contenedor de cultivo de células.

45 En otras palabras, la etapa de suministro/compensación permite el mantenimiento de un volumen constante de medio de cultivo desde el que las células pueden arrastrar de forma continuada las sustancias frescas necesarias para el mantenimiento de su vitalidad normal.

50 En particular, la etapa de suministro/compensación es llevada a cabo por el medio de alimentación tal como, por ejemplo, la misma bomba peristáltica descrita en lo que antecede o por otro medio similar.

55 En cualquier caso, es preferible que la etapa de suministro/compensación esté coordinada con, y regulada por, la etapa de extracción de muestras desde el medio metabolizado, de modo que la cantidad de medio de cultivo que se extraiga desde el contenedor para su análisis sea sustancialmente compensada al mismo tiempo por una cantidad igual de medio fresco siempre añadido al contenedor.

60 Como se describió previamente, una bomba peristáltica conectada en serie con el depósito y con el contenedor puede llevar a cabo la función mencionada.

65 Preferiblemente, tanto el contenedor como el depósito se calientan hasta una temperatura de entre 35° y 45°C, incluso más preferentemente a 37°C, por ejemplo mediante un baño termostático de agua.

70 El método de análisis puede incluir adicionalmente una etapa de filtración continua del medio de cultivo que sale del contenedor de cultivo para evitar cualquier pérdida eventual de las células que se encuentran en suspensión, o la contaminación del medio de cultivo que va a ser analizado por parte de elementos no relevantes.

75 La filtración se puede realizar por medio de filtros, tales como los representados esquemáticamente en la figura 2 e indicados por el número 30 de referencia, utilizados comúnmente en el sector para obtener, por ejemplo, soluciones libres de contaminantes. Obviamente, los expertos en la materia estarán capacitados para seleccionar el filtro más apropiado de acuerdo, por ejemplo, con el tipo de células, el medio de cultivo, y la velocidad del flujo de salida.

80 Los tipos de análisis que pueden ser realizados ventajosamente de acuerdo con el método de la presente invención están dirigidos preferentemente hacia el análisis de la secreción continua de metabolitos bioquímicos o de "captación" celular.

85 De acuerdo con lo que se ha descrito, las ventajas proporcionadas por el dispositivo analítico, por el método y por el contenedor de acuerdo con la invención, parecen ser numerosas.

90 En primer lugar, el sistema aquí utilizado es de tipo "abierto" o, como se ha indicado anteriormente, un sistema que permite una actuación con el mínimo de intervención de un operador.

## ES 2 300 509 T3

De hecho, puesto que el contenedor 4 está conectado a través de la bomba 3 tanto al depósito 2 de medio fresco como a los medios 10 de depósito, no existe ninguna necesidad de que un técnico abra el contenedor 4 e introduzca un instrumento para extraer una cantidad del medio a analizar, ni que incluso tenga que abrir el contenedor para introducir nuevo medio de cultivo fresco que garantice sustancias nutricionales para las células del cultivo. Este tipo de sistema es típico de los “sistemas cerrados” mencionados anteriormente.

Además, la extracción de medio de cultivo se realiza ventajosamente de forma continuada y de una manera absolutamente regular puesto que está absolutamente automatizada.

Por el contrario, cuando se opera en un “sistema cerrado”, la extracción de las muestras puede tener lugar solamente a intervalos de tiempo y, además, tienen una mayor posibilidad de cometer errores sobre la cantidad extraída, determinada por un instrumento operado manualmente.

Además, los riesgos de contaminación con el sistema de la invención, al menos se reducen a un mínimo si es que de hecho no quedan eliminados.

Además, el sistema que se acaba de describir es absolutamente óptimo desde el punto de vista del mantenimiento de la homeostasis celular en el interior del contenedor.

A su vez, las condiciones de trabajo dan como resultado que se logre un análisis más preciso de la evolución del metabolismo celular.

Adicionalmente, la automatización permite el depósito directo sobre un soporte analítico apropiado de la sustancia que debe ser sometida a continuación a los análisis sin la adición de ninguna etapa operativa adicional por parte de un técnico.

Como puede apreciarse a partir de cuanto se ha descrito, el dispositivo, el método y el contenedor analíticos para cultivos de células de acuerdo con la invención permiten satisfacer los requisitos que han sido mencionados en la parte introductoria de la presente descripción, y al mismo tiempo superar los inconvenientes presentados por los dispositivos analíticos conocidos en el estado de la técnica.

Obviamente, un experto en la técnica, con el propósito de satisfacer exigencias y necesidades específicas, puede realizar numerosas modificaciones y variaciones en el dispositivo y el método analíticos descritos en lo que antecede, todas ellas incluidas dentro del alcance de la invención según se define en las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

5 1. Un dispositivo (1) analítico para cultivos de células, que comprende un contenedor (4) para cultivos de células, un recipiente (2) para un medio de cultivo fresco para los citados cultivos de células, un medio (3) de bombeo adecuado para introducir el citado medio de cultivo fresco en el citado contenedor y extraer medio de cultivo metabolizado desde los cultivos de células de dicho contenedor, y un dispositivo (5) de depósito adecuado para depositar el medio de cultivo metabolizado extraído desde el citado contenedor por medio de los citados medios de bombeo sobre un soporte (11) analítico, que comprende medios (10) de depósito adecuados para depositar de forma continua o semi-continua el citado medio de cultivo de células sobre un soporte (11) analítico, **caracterizado** porque dichos medios (10) de depósito comprenden plumas, puntas de plumas marcadoras, plumas de tinta o cepillos.

15 2. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho recipiente (2) está representado por una botella o un frasco que contiene una solución que comprende aminoácidos, sales minerales, vitaminas y antibióticos.

3. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos medios (3) de bombeo comprenden medios que crean un flujo continuo o semi-continuo de suministro constante en el tiempo.

20 4. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dichos medios (3) de bombeo consisten en una bomba de vacío o en una bomba peristáltica.

5. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos cepillos se eligen a partir de los cepillos de pelo sintético y los de pelo natural, siendo los de pelo natural de buey o de marta.

25 6. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la longitud de los pelos está comprendida entre 4 y 10 mm, con preferencia 8 mm para los pelos de buey y 5 mm para los pelos de marta.

30 7. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho dispositivo (5) de depósito comprende además un medio (13) móvil adecuado para mover los citados medios (10) de depósito sobre dicho soporte (11).

8. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho medio (13) móvil comprende un tornillo de Arquímedes.

35 9. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además medios (14) de enclavamiento adecuados para sujetar operativamente dichos medios (10) de depósito sobre el citado soporte (11).

40 10. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dichos medios (14) de enclavamiento comprenden al menos una pinza elástica asociada al citado medio (13) móvil.

11. El dispositivo (1) analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho soporte (11) se elige en el grupo consistente en láminas o membranas de nitrocelulosa o de nilón.

45 12. El método analítico para cultivos de células, que comprende la extracción continua de una cantidad de cultivo de células o de medio de células para su análisis, desde un contenedor de cultivo de células mediante un medio automatizado, y el depósito continuo de dicha cantidad sobre un soporte analítico apropiado, y con un movimiento continuado para permitir una distribución uniforme sobre el citado soporte analítico, en el que dicha deposición tiene lugar a través de medios de deposición seleccionados entre los cepillos, las puntas de plumas marcadoras, las plumas y las plumas de tinta.

50 13. El método analítico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha extracción tiene lugar con medios automatizados.

55 14. El método analítico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dichos medios automatizados se eligen entre una bomba de vacío y una bomba peristáltica.

60 15. El método analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que dicha extracción tiene lugar en un circuito cerrado que se inicia a partir de dicho contenedor hasta el citado soporte a través de los citados medios automatizados.

16. El método analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además el suministro/compensación del medio de cultivo de células metabolizado extraído desde el contenedor.

65 17. El método analítico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el suministro/compensación comprende la extracción de una cantidad determinada de medio fresco desde un recipiente, y su transferencia a dicho contenedor de cultivo de células.

## ES 2 300 509 T3

18. El método analítico de acuerdo con las reivindicaciones 16 ó 17, en el que el suministro/compensación tiene lugar a través de medios de alimentación por bomba.

5 19. El método analítico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dichos medios de alimentación por bomba comprenden la misma bomba peristáltica de la reivindicación 14.

20. El método analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el suministro/compensación están coordinados con la extracción desde el contenedor.

10 21. El método analítico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la bomba peristáltica está conectada en serie con el recipiente y con el contenedor.

15 22. El método analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que el recipiente y el contenedor se calientan hasta una temperatura comprendida entre 35° y 45°C, con preferencia 37°C.

23. El dispositivo analítico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende un contenedor (4) adecuado para cultivos de células, que comprende una abertura (27) de entrada para el suministro de medio de cultivo fresco y una abertura (20) de salida para la extracción de medio de cultivo metabolizado.

20 24. El dispositivo analítico de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende un cuerpo (40) equipado con una cara (15) superior, una cara (16) inferior, un primer extremo (17) y un segundo extremo (18), **caracterizado** porque dicho primer extremo comprende una cara (19) con un orificio (20) pasante adecuado para ser encajado herméticamente con un tubo (21) puesto en comunicación con el exterior de dicho contenedor, y porque dicha cara superior comprende un orificio (26) pasante adecuado para ser encajado herméticamente con un tubo (27) puesto en comunicación con el exterior.

25 25. El dispositivo analítico de acuerdo con la reivindicación 23 ó 24, que comprende adicionalmente un cuello (23) susceptible de ser cerrado reversiblemente con una tapa (24).

30 26. El dispositivo analítico de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende adicionalmente un filtro que es aplicable al orificio (20) o al tubo (21).

35 27. El dispositivo analítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que dicho contenedor es un frasco para cultivos de células que tiene forma de paralelepípedo que se extiende longitudinalmente a lo largo de un eje X-X.

40

45

50

55

60

65

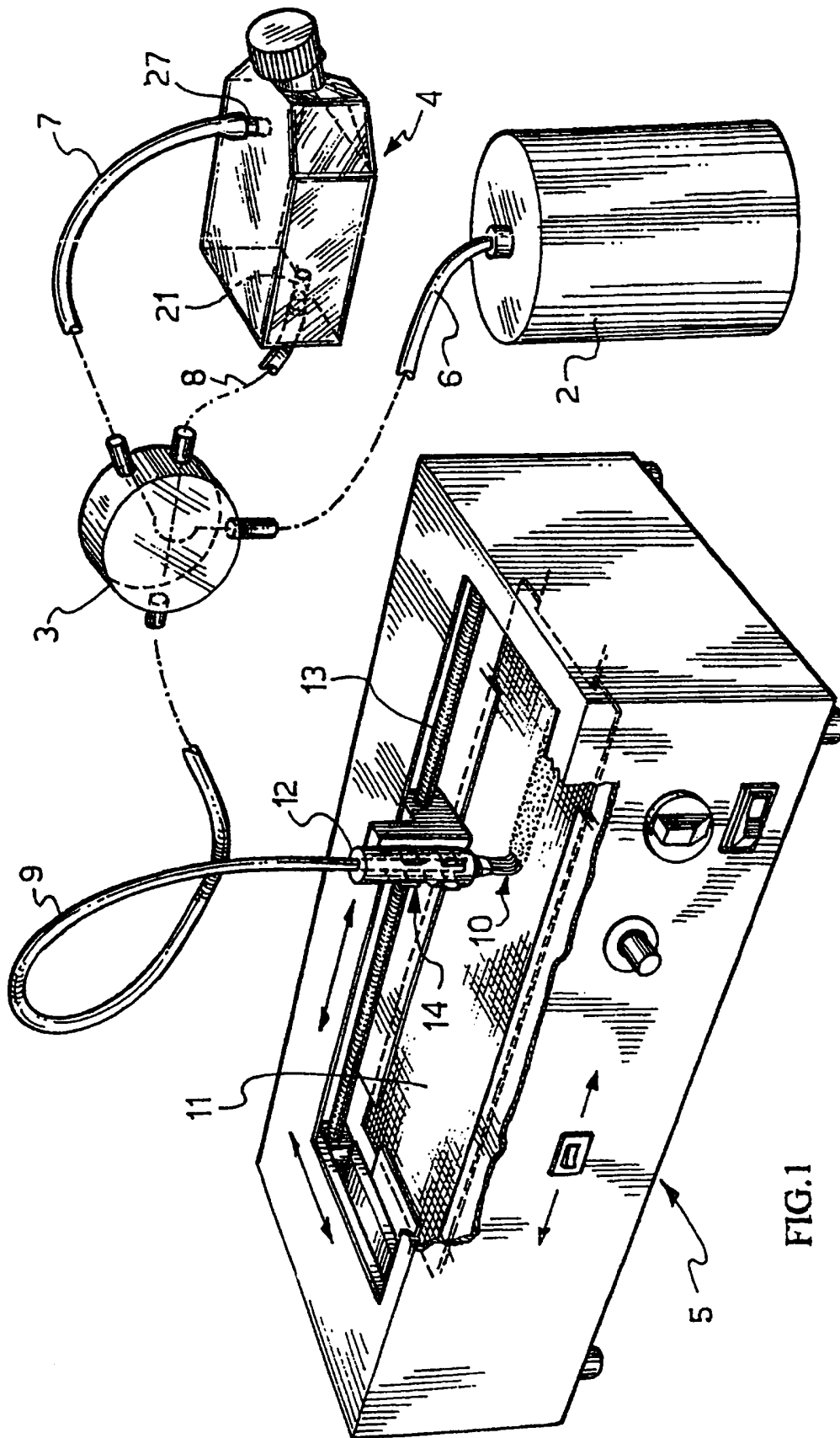


FIG.1

