



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 746**

51 Int. Cl.:
C12M 1/20 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01969578 .2**
86 Fecha de presentación : **08.08.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1319062**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para el cultivo y/o el tratamiento de células.**

30 Prioridad: **19.09.2000 DE 100 46 175**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

73 Titular/es: **Augustinus Bader**
Hinter den Langen Höfen 16
31275 Lehrte-Immensen, DE

72 Inventor/es: **Bader, Augustinus**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

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 2 302 746 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para el cultivo y/o el tratamiento de células.

5 La invención se refiere a un procedimiento para el cultivo y/o el tratamiento automatizado de células para finalidades de diagnóstico.

10 En el documento de solicitud de patente alemana DE 199 35 643.2 A1, más antiguo, se describe un dispositivo para el cultivo y el tratamiento de células, estando dispuesto sobre un soporte un espacio conformable para el cultivo de células. El espacio para el cultivo de células está formado en este caso, por un lado, por el soporte o por una lámina de soporte y, por otro lado, por una lámina para el cultivo de células, la cual es elástica. Con un dispositivo de este tipo es posible llevar a cabo un cultivo en masa de células con gran variabilidad y para muchas finalidades de empleo.

15 El documento de solicitud de patente internacional WO 97/33179 describe un procedimiento para el ensayo de sustancias químicas en cuanto a su eficacia como agentes protectores de las plantas, mediando empleo de una placa de cultivo que tiene numerosos huecos, en los cuales se introducen unos dispositivos de atomización así como unos orificios de alimentación y de retorno. El sistema permite realizar el ensayo de sustancias y plantas mediante un funcionamiento totalmente automático.

20 La patente US 5.707.869 describe un dispositivo para el cultivo de células, que tiene una cubeta, una tapa y una placa de pocillos múltiples, estando cada uno de los orificios provisto de una lámina inferior permeable a los gases, para el aporte de oxígeno, y de una lámina semipermeable.

25 También el documento US 5.462.874 describe el correspondiente dispositivo para el cultivo de células, que comprende una placa de pocillos múltiples introducida en una cubeta, estando los pocillos abiertos por el extremo superior y cerrados por el extremo inferior mediante una lámina semipermeable.

30 Un dispositivo de tipo constructivo y de utilización similar se describe en el modelo de utilidad alemán DE 2 95 519 602. En este caso, los pocillos, junto a la muestra, contienen una solución nutritiva. Unas conducciones de alimentación y de retorno para el abastecimiento de oxígeno se introducen en los mencionados pocillos mediante unos elementos de inserción.

35 El documento de patente británica GB 2269391 divulga un procedimiento para el cultivo de microorganismos mediante una placa con micropocillos, estando cada pocillo cerrado con una lámina semipermeable, con el fin de impedir que el medio nutritivo pueda salir, pero haga posible el abastecimiento por difusión con oxígeno de los microorganismos.

40 Otro estado de la técnica adicional es el representado por DE 197 19 751 A1.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un procedimiento para el cultivo y el tratamiento automático de células, pudiendo cultivarse y/o tratarse en un espacio lo más pequeño posible, un alto número de células, que también pueden ser de diferentes tipos, para finalidades de diagnóstico.

45 De acuerdo con la invención, el problema planteado se resuelve mediante el procedimiento mencionado en la reivindicación 1.

50 De acuerdo con la invención, se emplea un procedimiento dinámico mediante la utilización de una placa para el cultivo de células. Esto significa que mediante el aporte de oxígeno y de nutrientes, que se efectúa en un régimen continuo o discontinuo, ahora se pueden cultivar y/o tratar y observar células a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. El aporte de nutrientes y de oxígeno necesario para esto, puede efectuarse de las más diferentes maneras.

55 De una manera sencilla, se pueden conducir en este caso nutrientes y oxígeno conjuntamente por medio de una circulación continua o discontinua a través de los pocillos (entrantes) o huecos reestructurados para conformar espacios para el cultivo de células.

60 En una forma de realización muy ventajosa de la invención, sin embargo, una conducción separada de aporte de oxígeno se puede incorporar en el espacio para el cultivo de células desde la cara inferior de la placa de cultivo, a través de una lámina o membrana permeable a los gases. Normalmente, las placas para el cultivo de células están provistas de unas bases estables, impermeables a los gases. Si estas bases se reemplazan por una lámina o una membrana permeable a los gases, y se procura el correspondiente aporte de oxígeno o aire a estas zonas, entonces se produce un aporte de oxígeno sencillo y muy intenso a las células.

65 Una posibilidad adicional para el aporte de nutrientes y/o oxígeno puede consistir en que, dentro de por lo menos una parte de los huecos o espacios para el cultivo de células de la placa de cultivo, se pueden introducir unos elementos de inserción, los cuales están provistos en cada caso de orificios de alimentación y de orificios de retorno.

Unas ventajosas formas de realización y unos ventajosos perfeccionamientos de la invención se establecen a partir de las demás reivindicaciones dependientes y a partir de los ejemplos de realización que seguidamente se describen con ayuda de los dibujos.

5 Estos muestran en:

la Fig. 1 una placa para el cultivo de células (placa de pocillos múltiples) en una vista en alzado en perspectiva;

10 la Fig. 2 una sección de acuerdo con la línea II-II de la Fig. 1 en una representación ampliada con la estructuración de los huecos de la placa de cultivo, en cada caso, como un espacio para el cultivo de células;

la Fig. 3 muestra una sección de acuerdo con la línea III-III de la Fig. 2;

15 la Fig. 4 muestra una forma de realización alternativa de la estructuración de los espacios para el cultivo de células en una sección similar a la de la Fig. 2;

la Fig. 5 muestra una forma de realización adicional para la formación de espacios para el cultivo de células, asimismo en una sección correspondiente según la Fig. 2;

20 la Fig. 6 muestra la alimentación y el desecho de nutrientes a y desde los espacios para el cultivo de células en una vista desde arriba; y

la Fig. 7 muestra en una sección de detalle una forma de realización, pudiendo los espacios para el cultivo de células ser presurizados.

25 Para el cultivo y/o el tratamiento de células para finalidades de diagnóstico, se utiliza una placa 1 para el cultivo de células (placa de pocillos múltiples), en sí conocida, que en general, de un modo correspondiente a su tamaño, tiene un alto número de orificios o huecos 2. Los huecos 2 tienen unos diámetros que van desde unos pocos milímetros hasta varios milímetros, y su número puede ser hasta de varios cientos de unidades por cada placa 1 de cultivo de células.

30 A partir de las Figuras 2 a 5 pueden observarse diferentes formas de realización de los huecos 2 o de su reestructuración para dar unos espacios 2' para el cultivo de células. Según la Fig. 2, en cada hueco 2, que debe de servir como espacio 2' para el cultivo de células, se introduce un elemento de inserción 3, que está provisto de un orificio de alimentación 4 y de un orificio de retorno 5, los cuales se extienden desde la cara superior de la placa 1 para el cultivo de células hasta la cara inferior de ésta, estando las caras inferiores de la placa para el cultivo de células o los huecos cerrados/os por sus bases 6. Los elementos de inserción 3 son introducidos por consiguiente desde la cara superior de la placa 1 de cultivo de células dentro de los huecos abiertos 2. Para la hermetización de los espacios 2' para el cultivo de células, los elementos de inserción 3 están provistos por la parte periférica en cada caso de un anillo de estanqueidad 19.

40 Desde la cara de un elemento de inserción 3, que está dirigida en cada caso hacia la base 6, un ánima de separación 7 sobresale en dirección hacia la base 6. El ánima de separación 7 está situada entre el orificio de alimentación 4 y el orificio de retorno 5 y se extiende, como puede observarse a partir de la Fig. 3, de modo transversal a través del hueco 2. Mediante el ánima de separación 7 se consigue que los nutrientes, introducidos a través del orificio de alimentación 4, no puedan circular directamente hasta el orificio de retorno 3. Mediante el ánima de separación 7, son obligados a circular, a través de todo el espacio 2' para el cultivo de células y en tal caso inundar a las células 8 colocadas sobre el fondo 6. Al mismo tiempo, el ánima de separación 7 puede servir para el centrado o para la más fácil introducción del elemento de inserción 3 dentro del hueco 2.

50 En el caso de la forma de realización con el elemento de inserción 3, que se representa a la izquierda en la Fig. 2, el aporte de oxígeno a las células 8 se efectúa conjuntamente con el aporte de nutrientes a través del orificio de alimentación 4. Si se eliminan los bases fijos 6 y éstos se reemplazan por una lámina o membrana 9 permeable a los gases, según la forma de realización representada de manera ampliada en su grosor, a la derecha en la Figura 2, entonces puede efectuarse un aporte muy intenso y directo de oxígeno desde la cara inferior de la placa 1 para el cultivo de células a través de la lámina permeable a los gases (véanse las flechas). Sobre la lámina 9 permeable a los gases, que se representa esencialmente más gruesa en las Figuras por razones de claridad, se efectúan el cultivo y el tratamiento de las células 8.

60 La Fig. 4 muestra, en vez de un gran número de elementos de inserción 3 que se han de introducir en los huecos 2, una placa de cubrimiento 10, que en la Fig. 1 se representa solamente con líneas de trazos de una manera enteramente generalizada. En la placa de cubrimiento 10, dentro de los huecos correspondientes de esta placa de cubrimiento, se introducen unas conexiones de alimentación 4' y unas conexiones de retorno 5'. Como puede observarse, las conexiones de alimentación 4', en comparación con las conexiones de retorno 5', se extienden de una manera manifiestamente más profunda en los correspondientes huecos 2 o respectivamente en los espacios 2' para el cultivo de células. Tal como se puede observar adicionalmente, mediante esta medida técnica se consigue asimismo que no se efectúe ninguna circulación en cortocircuito directamente desde una conducción de alimentación a una conducción de retorno. En vez de esto, las células 8 son más bien inundadas por el medio nutritivo. En la Fig. 4 se representan una junto a otra asimismo las dos variantes: con un fondo fijo 6 y con una lámina o membrana 9 permeable a los gases.

A la izquierda en la Fig. 4 se representa cómo la placa de cubrimiento 10 es unida mediante tornillos 11 con la placa 1 para el cultivo de células. A la derecha se representa que en vez de, o adicionalmente a, una unión a través de tornillos 11 se puede conseguir una hermetización mediante una disposición de estanqueidad 12 situada entre la placa de cubrimiento 10 y la placa 1 para el cultivo de células.

En la Fig. 5 se representa una estructuración en dos partes de la placa de cubrimiento 10 con una cubierta superior 10a y una cubierta inferior 10b. Tal y como puede observarse, la cubierta superior 10a y la cubierta inferior 10b están unidas entre sí de un modo ajustable en su distancia. Mediante unos resortes 13 colocados entremedias se consigue una tensión previa. La cubierta superior 10a está asentada a través de unas ánimas 14 situadas junto a los bordes de la placa 1 para el cultivo de células, de manera circundante sobre éstos. La cubierta inferior 10b está provista de unos huecos, a través de los cuales se hacen pasar unas conexiones de alimentación 4' y unas conexiones de retorno 5' de modo similar a la forma de realización de acuerdo con la Fig. 4. Las conexiones de alimentación 4' y las conexiones de retorno 5', de un modo correspondiente, se pueden también conducir hacia fuera a través de la cubierta superior 10a o bien por su cara superior o eventualmente también lateralmente junto a los bordes. Mediante los resortes 13 se consigue una hermetización de los espacios para el cultivo de células, puesto que la cubierta inferior 10b se apoya de un modo estanco sobre la cara superior de la placa 1 para el cultivo de células. Al mismo tiempo, se introducen de esta manera también unos apéndices 15, que, por la cara inferior de la cubierta inferior 10b, sobresalen desde ésta hacia abajo dentro de los huecos 2 para la formación de unos espacios cerrados 2' para el cultivo de células.

A partir de la Fig. 5 puede observarse también, en una representación con líneas de trazos, que toda la unidad, con la placa 1 para el cultivo de células, se puede colocar en una cubeta 16. La placa 1 para el cultivo de células se asienta en este caso de un modo periféricamente estanco sobre la cubeta 16. Entre las bases, formadas en este caso a base de una lámina o membrana 9, permeable a los gases, y el fondo de la cubeta se encuentra un espacio intermedio 17. Si se introduce oxígeno en la cubeta 16, p.ej. a través de unos orificios 18, entonces se efectúa un abastecimiento directo muy intenso de oxígeno para las células 8 que están situadas en los espacios 2' para el cultivo de células, a través de la lámina o membrana 9.

Los orificios 18 pueden corresponderse preferiblemente con el tamaño de los huecos 2. El espacio intermedio 17 puede eventualmente suprimirse, asentándose en este caso la placa 1 para el cultivo de células directamente sobre el fondo de la cubeta 16 y pudiendo efectuarse un intercambio de gases mediante una lámina o membrana 9, permeable a los gases, a través del correspondiente orificio que corresponde al diámetro de los espacios 2' para el cultivo de células. Los orificios 18 practicados en la cubeta 16 hacen posible además un mejoramiento de la visión en el caso de una observación con microscopio de las células. Preferiblemente, para esto, el material de la placa de cubrimiento 10, así como también el de la cubeta 16, se fabrican a base de un material transparente, tal como p.ej. un policarbonato o un poliéster.

Con el procedimiento de la invención, a partir de una placa 1 para el cultivo de células, de por sí conocida, se forma una especie de biorreactor para el cultivo y/o el tratamiento de células. Mediante el aporte dinámico de un medio nutritivo y de oxígeno es posible también en este caso un cultivo a largo plazo.

Una ventaja adicional de la invención es la posibilidad de automatización de procesos que transcurren de una manera rutinaria, tal como p.ej. en cualesquiera recipientes de cultivo abiertos por arriba.

Placas para el cultivo de células, de por sí conocidas, de un tipo constructivo habitual, se pueden modificar de una manera sencilla también para llevar a cabo el procedimiento conforme a la invención. Así, p.ej., de una manera sencilla, se puede eliminar el fondo fijo 8, y sobre la cara inferior de la placa 1 para el cultivo de células se puede tensar y sujetar una lámina 9 permeable a los gases a través de los huecos 2, que ahora están abiertos por ambas caras. A través de la lámina 9 permeable a los gases se puede observar el desarrollo de las células 8 también en caso necesario, para lo cual la lámina 9 ha de ser transparente.

Por el hecho de que las células 8 crecen o están dispuestas de una manera muy definida como una capa con una extensión bidimensional dentro de los espacios 2' para el cultivo de células, toda la placa 1 de cultivo de células, en caso necesario, también puede ser congelada, cuando se quieran transportar las células o almacenarlas hasta su utilización.

Por regla general, para el procedimiento de cultivo se reestructurarán la totalidad o una gran parte de los huecos 2 de una placa para el cultivo de células, para dar unos espacios 2' para el cultivo de células. En caso necesario, es evidentemente posible proporcionar también sólo espacios individuales 2' para el cultivo de células con unos elementos de inserción 3 a su vez individuales, puesto que los elementos de inserción 3 se pueden introducir también por sí solos. Los elementos de inserción 3 pueden ser alimentados o vaciados respectivamente también individualmente en el caso de unidades de cultivo individuales.

Es esencial en cada caso que se procure un abastecimiento suficiente con oxígeno a las células 8 con el fin de poder llevar a cabo también un procedimiento de cultivo de células que dure más largo tiempo, en particular para células "exigentes". A causa de la forma de realización de las placas 1 para el cultivo de células, en particular de los huecos 2, hasta ahora no eran posibles ni un cultivo ni un tratamiento de células en la forma conforme a la invención.

ES 2 302 746 T3

En la Fig. 6 se representan, en una vista desde arriba, la alimentación y la retirada de nutrientes y eventualmente de oxígeno a y desde los espacios 2 para el cultivo de células. Como puede observarse, en este caso está prevista una conexión de alimentación 20 común, desde la cual, a través de varias conducciones laterales 21, los espacios individuales 2 para el cultivo de células se abastecen con medio nutritivo y eventualmente también con oxígeno. A continuación, a través de conducciones laterales individuales 22, sigue la retirada conjunta a través de una conducción de salida 23.

A través de la conexión de alimentación 20 común y de la conexión de salida 23 común se puede utilizar el dispositivo p.ej. en forma de un denominado puerto de carga (en inglés “docking station”), que se conecta con un puesto central, eventualmente común con otros dispositivos. De esta manera se pueden proporcionar unas muy grandes existencias de incubación o respectivamente unos muy grandes dispositivos de cultivo.

La alimentación en común y la retirada en común con las conducciones laterales 21 y 22 se pueden efectuar p.ej. con las correspondientes conducciones, rebajes o canales situadas/os en la placa de cubrimiento 10, desde dónde, entonces, a través de unas conducciones laterales individuales 21 son abastecidos en cada caso individualmente los espacios 2 para el cultivo de células. En unión con la cubeta 16 se puede proporcionar de esta manera una especie de estructura de casete. En caso necesario se pueden disponer unas sobre otras también varias unidades. Esto es posible p.ej. mediante el recurso de que se disponen unas sobre otras varias placas 1 para el cultivo de células, pudiendo efectuarse el abastecimiento del medio nutritivo y del oxígeno a través de unas placas de cubierta 10 situadas entremedias, que están provistas de una manera correspondiente, p.ej. en cada caso en su cara superior y en su cara inferior, de unas conexiones de alimentación 21 comunes, de unas conducciones laterales 21 y 22, y de unas conducciones de salida 23 comunes.

Dependiendo del tamaño de los espacios 2 para el cultivo de células y de su número, puede ser eventualmente necesario que sean previstas varias placas de cubierta 10 con unas conexiones de alimentación 20, unas conducciones laterales 21 y 22 y unas conexiones de salida 23 dispuestas dentro de ellas, las cuales, por motivos de ocupación de espacio, están provistas de unas conducciones laterales 21 y 22 dispuestas desfasadas, para que puedan ser abastecidos todos los espacios 2 para el cultivo de células.

De manera adicional y alternativa, también las placas 1 para el cultivo de células, propiamente dichas, pueden ser provistas en cada caso de unas conexiones de alimentación 20 comunes, de unas conducciones laterales 21 y 22 y de unas conducciones de salida 23 comunes, para poder alcanzar a cada uno de los espacios 2 para el cultivo de células. Para esto, p.ej. una placa 1 para el cultivo de células se puede subdividir en el centro, y en la zona del plano de separación se pueden incorporar los canales de circulación. En cualquier caso, debería proporcionarse sin embargo una guía con canales, por medio de la cual se garantice un abastecimiento uniforme de todos los espacios 2 para el cultivo de células.

La lámina o membrana 9 puede ser también en caso necesario microporosa, lo cual tiene la ventaja de que un medio nutritivo se puede introducir no solamente desde arriba, sino también adicional o alternativamente también desde abajo, en los espacios 2' para el cultivo de células.

En la Fig. 7 se representa una forma de realización muy ventajosa, pudiendo presurizarse los espacios 2' para el cultivo de células. Con esta finalidad, la placa 1 para el cultivo de células está cerrada por su cara superior mediante una mandril 24 estanco a la presión y por la cara inferior mediante un recipiente 25 estanco a la presión. Los huecos 2 situados en la cara superior de la placa 1 para el cultivo de células, están cerrados con una lámina flexible 26, que en caso necesario puede ser también permeable a los gases o microporosa, con el fin de conseguir desde esta cara un abastecimiento con oxígeno/aire y/o con un medio nutritivo de las células 8 que se encuentran dentro de los espacios 2' para el cultivo de células. Por la cara inferior, los espacios 2' para el cultivo de células están cerrados también por medio de la membrana 9, la cual es permeable a los gases o microporosa.

Mediante las conexiones de presión 27, no representadas con mayor detalle, a través de unas correspondientes fuentes de presión, un espacio 28 entre el mandril 24 y la lámina 26 y un espacio 29 entre la membrana 9 y el fondo del recipiente 25 se pueden poner bajo sobrepresión o depresión. La regulación de las condiciones de presión es en tal caso arbitraria. Esto significa que se puede ejercer presión de una manera alternativa desde arriba o desde abajo o también al mismo tiempo sobre los espacios 2' para el cultivo de células. Para esto, la lámina 26 y la membrana 9 se deforman de modo correspondiente (véase la representación con líneas de trazos). De esta manera las células 8 son movidas mecánicamente de un modo correspondiente, lo cual posee p.ej. considerables ventajas para la producción de tejidos, tales como p.ej. huesos, cartílagos, musculatura y similares, puesto que se pueden simular mediante dilataciones en el sentido de acondicionamientos o bien un entrenamiento. Adicionalmente en los espacios 2' para el cultivo de células se pueden generar unas cargas de presión rítmicas o intermitentes. Por medio de estas medidas técnicas se pueden simular mejor las condiciones “*in vivo*”.

Mediante la utilización de la lámina 26 los espacios 2' para el cultivo de células son accesibles en caso necesario también a procesos de pipeteo.

En lugar de por medio de una sencilla lámina 26, los huecos 2 pueden ser cubiertos también mediante una membrana de material sintético a modo de diafragma.

En lugar de cargas de presión, o también adicionalmente, se pueden aplicar a las células 8 corrientes eléctricas. De esta manera se pueden provocar dilataciones p.ej. también a través de campos electromagnéticos, lo cual es ventajoso p.ej. para las células del miocardio (músculo cardíaco), células del SNC [= sistema nervioso central] (células neuronales). De esta manera se pueden ensayar p.ej. medicamentos que aceleren o reduzcan la frecuencia cardíaca, para lo cual las corrientes eléctricas estimulan eléctricamente a las células del miocardio. De esta manera se llega a interacciones entre un sistema técnico y un sistema biológico.

Los sistemas para el cultivo de células precedentemente descritos pueden ser combinados entre sí, en caso necesario también en forma de un biorreactor o respectivamente en un sistema en emparedado (del inglés sandwich). Para esto solamente es necesario prever, en lugar de una cubeta 16 o del recipiente 25, un fondo intermedio correspondientemente estructurado, de manera tal que - como se señala con líneas de trazos en la Fig. 7 - una unidad adicional 30 se conecta por debajo del recipiente 25 o respectivamente por debajo de un correspondiente fondo intermedio. En este caso, varias de tales unidades pueden ser dispuestas unas sobre otras. El biorreactor resultante de este modo puede estar constituido en este caso en una forma escalonada o también de un modo simétrico, conectándose con la unidad descrita en la Fig. 7 de modo simétrico una unidad adicional. En este caso el espacio 29 sirve para el aporte de aire/oxígeno y/o de un medio nutritivo tanto para la placa 1 para el cultivo de células como también para la placa para el cultivo de células (no representada) que se encuentra en la unidad 30. Evidentemente, en caso necesario son posibles también unas conducciones de alimentación y de salida dispuestas por separado.

En vez de células simples 8 en los espacios 2' para el cultivo de células, se pueden cultivar evidentemente también cultivos de múltiples capas.

Como una de las diferencias esenciales con respecto al estado de la técnica, hay que retener que en el caso del presente sistema para el cultivo de células se trata de procesos dinámicos, que pueden transcurrir de un modo continuo o intermitente, y no sólo de un cultivo estático de células, que después de la aplicación ya no pueden ser tratados ulteriormente.

Fundamentalmente, en el caso del presente sistema se presentan tres procedimientos con los correspondientes dispositivos:

1. En el caso más sencillo están presentes unos bases cerrados, y el abastecimiento de los espacios 2' para el cultivo de células se efectúa desde arriba a través de los orificios o huecos 2 con unos correspondientes orificios de alimentación 4 y orificios de retorno 5.
2. Una forma de realización de las placas 1 para el cultivo de células con una membrana 9 permeable a los gases o microporosa en la cara inferior y unos huecos cerrados 2 en la cara superior, con o sin orificios de alimentación 4 y orificios de retorno 5.
3. Unas láminas elásticas tanto en la cara superior como también en la cara inferior de la placa 1 para el cultivo de células, las cuales pueden ser permeables a los gases o microporosas y que son presurizadas. La membrana 9 permeable a los gases o microporosa situada en la cara inferior, puede estar formada por un gran número de membranas individuales, que cubren en cada caso por la cara inferior a los espacios 2' para el cultivo de células. En general, sin embargo, se utilizará una lámina, que cubre correspondientemente a la totalidad de la cara inferior de la placa 1 para el cultivo de células, tal como se representa en la Fig. 7.

Conforme al invención, se pueden tratar ahora por fin unos complejos sistemas para el cultivo de células, que plantean unos requisitos correspondientemente más altos al microentorno. En tal caso en los huecos 2 de la placa 1 para el cultivo de células se puede definir también una estructura tridimensional (3 D) con una extensión bidimensional, que corresponde "*in vivo*" a la distancia desde un capilar hasta el siguiente capilar. Esta sección tisular bioartificial sirve para el establecimiento de unas condiciones de cultivo típicas de órganos en un espacio pequeñísimo y hace posible por consiguiente también hacer accesibles al escrutinio con alto caudal de tratamiento (en inglés high output screening) a sistemas más complejos de cultivo concomitante mediante la utilización de diferentes tipos de células y de una matriz extracelular.

Fundamentalmente, en el caso del procedimiento conforme a la invención se presenta un sistema para cultivo en capa fina, que de una manera ventajosa es oxigenado desde abajo y que corresponde a la densidad fisiológica de las células, y ciertamente a la distancia desde un capilar sanguíneo en el organismo hasta el siguiente capilar sanguíneo.

Una de las ventajas principales del presente invención se encuentra en la miniaturización con unas unidades lo más pequeñas posibles en un espacio estrecho. De esta manera se necesitan para un procedimiento de cultivo también unas pocas células, que entonces pueden reproducirse correspondientemente durante el procedimiento.

Uno de los sectores principales de empleo del procedimiento conforme al invención es por lo tanto la investigación de los efectos de productos químicos y productos farmacéuticos sobre células, en particular sobre células humanas. De esta manera, se pueden reemplazar por lo menos en parte unos ensayos con animales, que se han de realizar de un modo muy costoso y caro.

Referencias citadas en la descripción

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • DE 19935643 A1 [0002]
- WO 9733179 A [0003]
- US5707869 A [0004]
- 15 • US 5462874 A [0005]
- DE 295519602 [0006]
- GB 2269391 A [0007]
- 20 • DE 19719751 A1 [0008]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el cultivo y/o para el tratamiento automatizado de células para finalidades de diagnóstico por medio de un dispositivo, que se basa en una placa (1) para el cultivo de células, que tiene un gran número de huecos (2), que están abiertos por la cara superior de la placa para el cultivo de células (1), y están cerrados por su base (6), en los cuales se disponen las células (8), **caracterizado** porque

los nutrientes fluyen de un modo continuo o discontinuo con o sin oxígeno por los mencionados huecos (2) que actúan como espacios (2') para el cultivo de células y que contienen las células (8), y que son conducidas a través de ellos.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el oxígeno es introducido en los huecos (2) por medio de un dispositivo permeable a los gases a través de sus bases (6) en forma de una membrana o lámina (9) permeable a los gases.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque los nutrientes son introducidos en los huecos (2), a través de una estructura microporosa de sus bases (6) en forma de una membrana o lámina microporosa (9).

4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la placa (1) para el cultivo de células está cubierta por una placa de cubrimiento (10).

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque la placa (1) para el cultivo de células se introduce en una cubeta (16) con orificios (18) para el aporte de oxígeno.

6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque en por lo menos una parte de los huecos (2) de la placa (1) para el cultivo de células se pueden introducir unos elementos de inserción (3), que en cada caso están provistos de orificios de alimentación (4) y de orificios de retorno (5), a través de los cuales se pueden introducir y desechar los nutrientes y el oxígeno.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque los elementos de inserción (3) están provistos, en cada caso en sus caras dirigidas hacia sus bases (6), de un ánima de separación (7) entre los orificios de alimentación (4) y los orificios de retorno (5), de manera tal que los nutrientes introducidos a través del orificio de alimentación (4) no puedan circular directamente hacia el orificio de retorno (5) y son desechados.

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque la placa (1) para el cultivo de células está cubierta con una placa de cubrimiento (10), que tiene unas conexiones de alimentación (4') y unas conexiones de retorno (5'), las cuales penetran dentro de los huecos (2) y a través de las cuales se pueden introducir y retirar los nutrientes y el oxígeno.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque las conexiones de alimentación (4') penetran más profundamente en los huecos (2) que las conexiones de retorno (5'), de manera tal que los nutrientes introducidos a través de las conexiones de alimentación (4') no pueden circular directamente hacia las conexiones de retorno (5') y son desechados.

10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, **caracterizado** porque la placa de cubrimiento (10) está estructurada de dos partes, con una cubierta superior (10a) y una cubierta inferior (10b), estando las dos cubiertas (10a, 10b) unidas entre sí elásticamente o de forma movable una con respecto a la otra.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque la cubierta inferior (10b) está provista de unos apéndices (15), los cuales penetran por lo menos en una parte de los huecos (2) y a través de los cuales son hechas pasar las conexiones de alimentación (4') y las conexiones de retorno (5'), las cuales a su vez están guiadas a través de la cubierta superior (10a).

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** porque la unidad, que se compone de una placa (1) para el cultivo de células, que tiene un dispositivo permeable a los gases en su base (6) en forma de una membrana o lámina (9) permeable a los gases, de una cubierta superior (10a), de una cubierta inferior (10b) y de unos apéndices (15), está colocada en una cubeta (16), asentándose la placa (1) para el cultivo de células circunferencialmente de modo estanco sobre la cubeta, y siendo conducido el oxígeno a través de los huecos (18) dentro de la cubeta a través de la membrana o lámina permeable a los gases (9) dentro de los espacios (2') para el cultivo de células.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** porque entre la cubeta (16) y la placa (1) para el cultivo de células se encuentra un espacio intermedio (17).

14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-13, **caracterizado** porque la alimentación y la retirada de nutrientes con o sin oxígeno a o desde los espacios individuales (2') para el cultivo de células, se efectúa a través de una conexión de alimentación (20) común, de una conexión de salida (23) común, así como de conducciones

ES 2 302 746 T3

individuales laterales (21), que se derivan de la conexión de alimentación, y de conducciones individuales laterales (22), que se derivan de la conexión de salida, y en cada caso desembocan en los espacios individuales para el cultivo de células.

5 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** porque las conexiones (20, 21, 22, 23) se efectúan a través de unas conducciones, unos rebajes o unos canales existentes en la placa de cubrimiento (10).

10 16. Procedimiento para el cultivo o el tratamiento automatizado de células para finalidades de diagnóstico, mediante un dispositivo que se basa en una placa (1) para el cultivo de células, que tiene un gran número de huecos (2) que están abiertos por la cara superior de la placa (1) de cultivo y están cerrados por sus bases (6), los cuales actúan como espacios (2') para el cultivo de células, y en los cuales se recogen las células (8), **caracterizado** porque los espacios (2') para el cultivo de células son presurizados a través de unas conexiones de presión (27).

15 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque la presión conferida a los espacios (2') para el cultivo de células viene mediada por la presurización de los espacios intermedios (28, 29) situados por encima y por debajo de la placa (1) para el cultivo de células, a través de una membrana o lámina (9) elástica, que sirve como fondo (6), y de una membrana o lámina elástica (26), con la cual el hueco (2) está cubierto por su parte superior.

20 18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado** porque la membrana o lámina (9) es permeable a los gases o microporosa.

25 19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, **caracterizado** porque la membrana o lámina (26) es permeable a los gases o microporosa.

20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque los nutrientes con o sin oxígeno circulan de una manera continua o discontinua a través de los mencionados huecos (2), que actúan como espacios (2') para el cultivo de células y que contienen a las células (8), y que son conducidas a través de dichos huecos.

30 21. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 16-20, **caracterizado** porque en los espacios (2') para el cultivo de células se generan unas cargas de presión rítmicas o intermitentes, de manera tal que las células (8) pueden ser movidas mecánicamente del modo correspondiente.

35

40

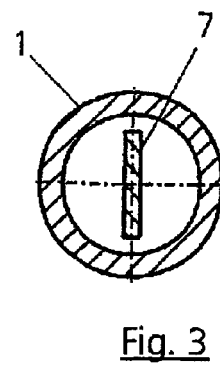
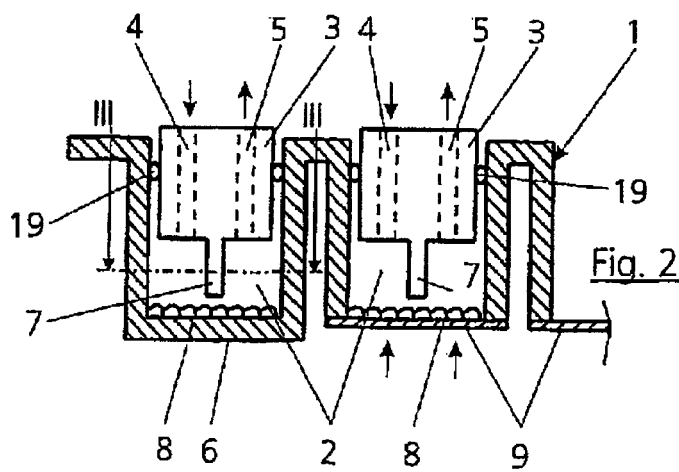
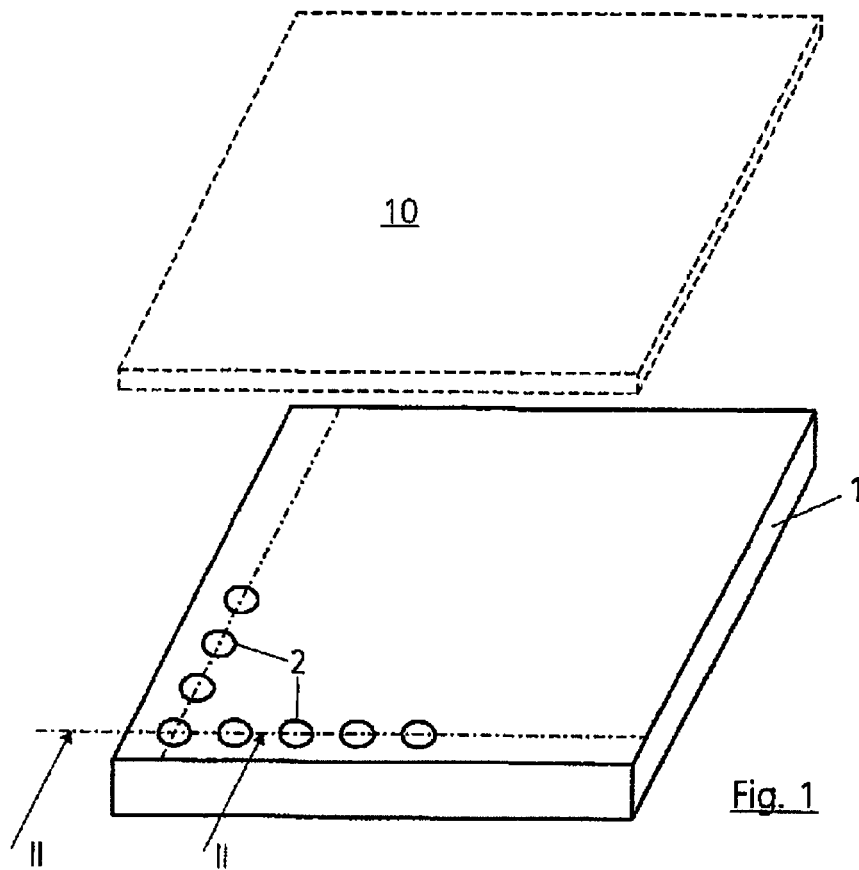
45

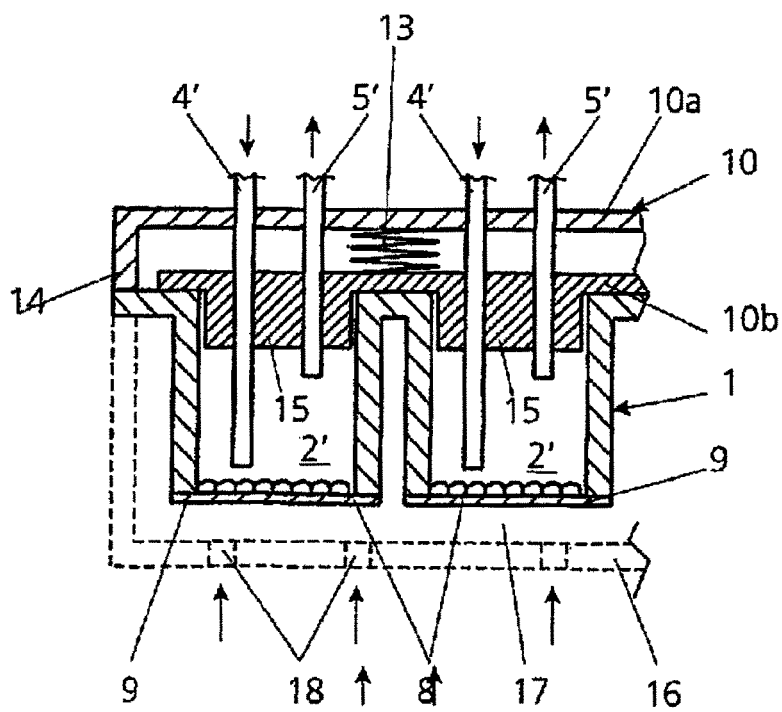
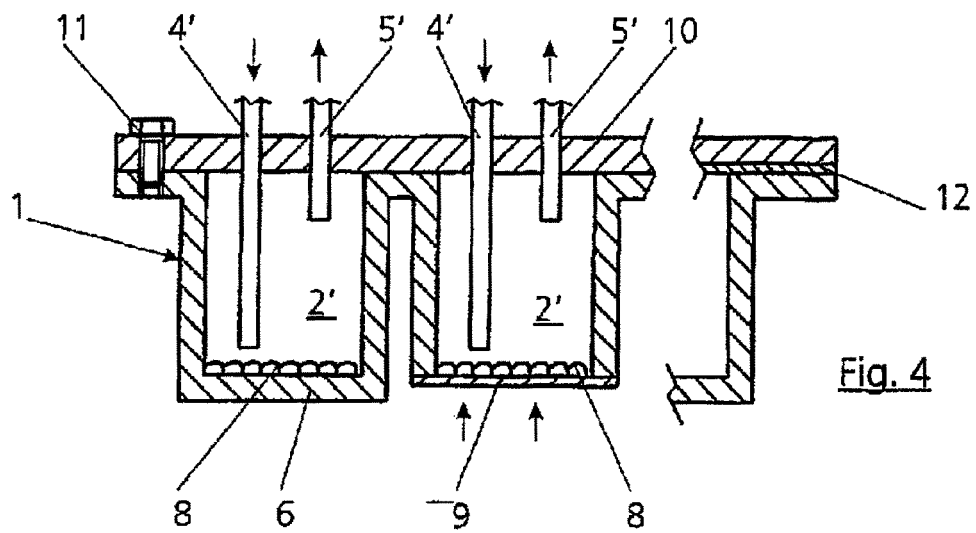
50

55

60

65





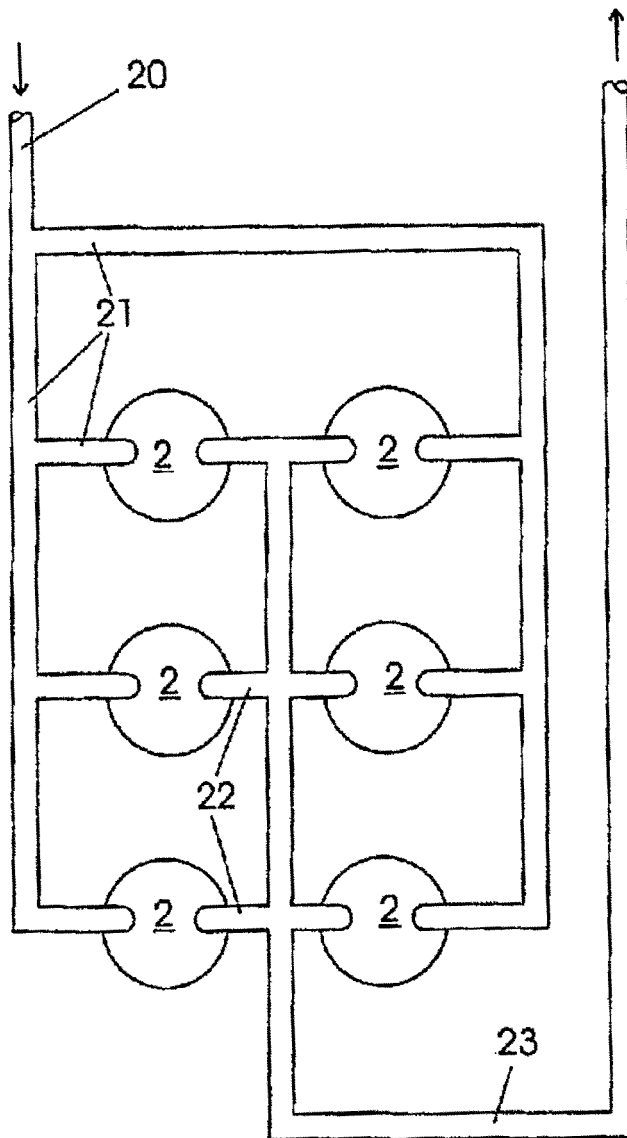


Fig. 6

