

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 279**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015 E 18162315 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3369316**

54 Título: **Uso de un sistema de banco de células de crioconservación cerrado de alta capacidad y procedimiento para descongelar y dispensar células almacenadas**

30 Prioridad:

14.08.2014 US 201462037181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.04.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

COUPIER, HERVÉ FRANÇOIS

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 820 279 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de un sistema de banco de células de criopreservación cerrado de alta capacidad y procedimiento para descongelar y dispensar células almacenadas

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al uso de un sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad para almacenar grandes volúmenes de células, y un procedimiento de sistema cerrado para descongelar y dispensar células almacenadas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los productos biotecnológicos, incluyendo vectores virales recombinantes, implican típicamente la introducción de alguna modificación genética en células eucariotas y a continuación el crecimiento de estas células en un biorreactor o en múltiples placas o recipientes de cultivo de células grandes. Otros productos importantes incluyen cepas de vacunas de virus y virus vivos modificados.

15

[0003] Para la producción de vectores virales recombinantes, cepas de vacuna de virus y virus vivos modificados, se necesita una fuente de células uniforme para inocular biorreactores o recipientes de cultivo celular. Las fuentes de células típicas incluyen líneas específicas de células eucariotas modificadas genéticamente y clones de células controlados que tienen un estado de GMPc. Esto proporciona una base para un banco de células de trabajo del fabricante (MWCB). Un MWCB consiste en muchas alícuotas (porciones) de una suspensión celular, conteniendo cada una el mismo tipo de células y aproximadamente el mismo número de células. Estas alícuotas se preparan el mismo día y se congelan a la misma hora. A continuación, las alícuotas se mantienen a temperaturas muy frías (criopreservadas). Para cada ciclo, una o más de estas alícuotas de células se descongelan para proporcionar el mismo punto de partida que cualquier otro ciclo con las mismas células.

20

25

[0004] La inoculación satisfactoria de un biorreactor o recipientes de cultivo celular con células eucariotas requiere una densidad celular mínima para lograr un crecimiento celular adecuado. Si la densidad celular está por debajo del nivel mínimo, se requiere tiempo adicional para lograr niveles de crecimiento celular comerciales,

30

[0005] lo que añade gastos al procedimiento y aumenta la oportunidad de que los contaminantes entren en el entorno celular. Si la densidad celular es demasiado alta, los nutrientes en el medio pueden agotarse, lo que puede dar como resultado un crecimiento celular reducido, una productividad celular más baja y posiblemente la muerte del cultivo celular.

35

Otras referencias

[0006] El documento US 6.670.175 (de Bayer Pharmaceuticals) describe y reivindica bolsas de criopreservación de politetrafluoroetileno (PTFE), mientras que la descripción proporciona bolsas de etileno-propileno fluorado (FEP) y un procedimiento para usar las bolsas en un esquema de banco de células de sistema cerrado. El FEP es un copolímero de hexafluoropropileno y tetrafluoroetileno. Se diferencia de las resinas de PTFE, en parte, en que se puede procesar en estado fundido utilizando técnicas convencionales de moldeo por inyección y extrusión por tornillo. El etileno-propileno fluorado fue inventado por DuPont y se vende bajo la marca Teflon® FEP. Otras marcas son NEOFロン® de Daikin o DYNEON® FEP de Dyneon/3M.

40

45

[0007] El documento US 8.177.123 (de Sartorius Stedim) describe sistemas y procedimientos para congelar, almacenar y descongelar materiales biofarmacéuticos.

50

[0008] El documento WO 2006/078796 A2 (Michael Cohen) describe un aparato y un procedimiento para la conservación y el uso de células madre.

El documento WO 2011/140076 A1 describe un aparato para realizar un procedimiento que implica conectar una bolsa de criopreservación a través de una red de tubos de plástico estéril a un recipiente de origen de células para llenar la bolsa con células. El aparato comprende además una bomba dispensadora, una bomba de vacío, una bomba de purga y medios para soldar de forma estéril la bolsa de criopreservación y los tubos.

55

Las bolsas de criopreservación KryoSure® (American Fluoroseal Corporation) incluyen bolsas de FEP separadas que rodean los respectivos conductos de entrada/salida y están inicialmente abiertas en un extremo.

[0009] Sin embargo, a pesar de los esfuerzos anteriores y otros en el campo, el riesgo de contaminación durante el llenado, la descongelación y el vaciado de las bolsas para congelador sigue siendo un desafío crítico. Por consiguiente, se requieren aparatos y procedimientos para reducir el riesgo de contaminación y controlar mejor la criopreservación, en relación con los enfoques actuales de bancos de células.

60

RESUMEN DE LA INVENCION

65

[0010] Actualmente, el tiempo de ejecución para la amplificación celular es inaceptablemente largo y hay demasiadas fases abiertas durante las etapas de llenado y drenaje. Para resolver este problema, la presente descripción proporciona un novedoso conjunto de bolsa de almacenamiento y congelación de células y un procedimiento para usar el conjunto en células eucariotas de criopreservación para la posterior expansión del cultivo celular. La invención proporciona el uso de un sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad para almacenar grandes volúmenes de células, como se define en la reivindicación 1, y un procedimiento de sistema cerrado para descongelar y dispensar células almacenadas, como se define en la reivindicación 2. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

5 La bolsa está construida principalmente de tejido de etileno-propileno fluorado (FEP). La bolsa está diseñada para llenarse a una fracción de su capacidad máxima, de modo que la suspensión celular tenga una sección transversal muy delgada. El diseño de la bolsa incluye al menos un conducto de entrada y un conducto de salida o de inoculación, que pueden soldarse de forma estéril a la fuente de las células eucariotas. El uso de al menos dos conductos soldables estériles permite el llenado en un "sistema cerrado" de las bolsas, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación en relación con otros procedimientos de banco de células.

10

15

[0011] La bolsa también incluye una funda, que puede termosoldarse para formar un cerramiento, que protege los conductos de entrada y salida contra la contaminación y daños mecánicos (el PVC es frágil a bajas temperaturas) durante la congelación, el almacenamiento y la posterior descongelación. En el procedimiento, una vez que se llena cada bolsa, se sella su correspondiente conducto de entrada, y tanto el conducto de entrada como el de salida se encierran dentro de la funda de la bolsa. La funda está separada del cerramiento que contiene las células y puede recibir una etiqueta. Debido a que la funda está cerrada, evita el contacto entre el conducto de salida y el agua del baño de agua durante la descongelación, disminuyendo el riesgo de contaminación. Durante la inoculación, el contenido de la bolsa se drena a través de un conducto de salida soldable estéril o una línea de inoculación. Los casetes de protección "calados" permiten una transferencia térmica óptima entre el entorno exterior (por ejemplo, baño de agua o nitrógeno líquido) y las alícuotas celulares.

20

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012] Los dibujos adjuntos ilustran varios aspectos de las presentes invenciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las invenciones. Los componentes de los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar claramente los principios de la presente invención.

30

La figura 1A es un dibujo de una realización particular de la bolsa de criopreservación;
 la figura 1B es un dibujo de otra vista de la bolsa de criopreservación;
 la figura 1C es un dibujo de una bolsa de criopreservación real, hecha según la descripción, con su funda sellada para encerrar los conductos de entrada y salida;
 la figura 2A presenta una vista frontal (izquierda) y una vista posterior (derecha) de un casete metálico protector, que encierra las bolsas durante la congelación, el almacenamiento y la descongelación;
 la figura 2B presenta otro ejemplo de casetes, en su posición cerrada;
 la figura 3A es una imagen de un termosoldador de mano típico;
 la figura 3B es una imagen de un sellador de mesa, que puede emplearse para sellar bolsas de criopreservación;
 la figura 3C es una imagen de un dispositivo de termosoldadura, que une asépticamente tubos de plástico (por ejemplo, conductos de entrada y salida);
 la figura 4 es un dibujo esquemático que representa la inoculación de bolsas descongeladas en un biorreactor.

35

40

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] Como se usa en esta invención, el término "cultivo por lotes" se refiere a una técnica de cultivo celular en la que se inocula una cantidad de medio de cultivo recién preparado con células que entran rápidamente en una fase de crecimiento logarítmico y en la que el medio de crecimiento del cultivo no se elimina continuamente y se reemplaza con medio recién preparado.

50

[0014] Como se usa en esta invención, el término "cultivo por lotes alimentado" se refiere a una técnica de cultivo celular en la que una cantidad de medio de cultivo recién preparado se inocula con células inicialmente, y se suministran nutrientes de cultivo adicionales (continuamente o en aumentos discretos) al cultivo durante el proceso de cultivo, con o sin recogida periódica de células y/o producto antes de la terminación del cultivo.

55

[0015] Como se usa en esta invención, el término "cultivo de perfusión" se refiere a una técnica de cultivo celular en la que se inocula una cantidad de medio recién preparado con células que entran rápidamente en una fase de crecimiento logarítmico (como anteriormente) y en la que el medio de crecimiento se elimina continuamente de un cultivo y se reemplaza con medio recién preparado.

60

[0016] Como se usa en esta invención, el término "biorreactor" se referirá a un recipiente para cultivar células.

65

- 5 **[0017]** El biorreactor puede ser un "biorreactor de bolsa flexible". Un "biorreactor de bolsa flexible" es una cámara estéril capaz de recibir un medio líquido y que además comprende conectores, puertos, adaptadores y tubos flexibles. La cámara puede estar hecha de plástico. Además, la cámara puede estar hecha de plástico transparente laminado multicapa y, más específicamente, puede estar hecha de plástico transparente laminado multicapa y tener una capa de contacto fluido hecha de FEP.
- 10 **[0018]** Adicionalmente, los conectores, puertos y adaptadores pueden estar hechos de cualquier tipo de plástico, incluyendo, pero sin limitación: polietileno, polipropileno y policarbonato, mientras que los tubos pueden estar contruidos de cualquier tipo de plástico, incluyendo, pero sin limitación: elastómero termoplástico o silicona (por ejemplo, silicona curada con platino).
- [0019]** Las cámaras de "biorreactor de bolsa flexible" apropiadas se pueden encontrar comúnmente en la técnica e incluyen, pero sin limitación, las descritas en la Patente de EE.UU. N.º 6.544.788.
- 15 **[0020]** Como se usa en esta invención, "tejido de etileno-propileno fluorado (FEP)" se refiere a un material flexible que se asemeja a una película o tela fabricada por cualquier medio a partir de FEP. El etileno-propileno fluorado fue inventado por DuPont y se vende bajo la marca Teflon® FEP. Otras marcas son NEOFLON® de Daikin o DYNEON® FEP de Dyneon/3M. Saint-Gobain también ofrece combinaciones similares de bolsa/tejido.
- 20 **[0021]** El "conducto de entrada" es un tubo flexible a través del cual se añaden células a las bolsas de criopreservación antes de la congelación y el almacenamiento. El cloruro de polivinilo es un material preferido tanto para los conductos de entrada como de salida. De manera similar, el "conducto de salida" es un tubo flexible a través del cual las células salen de las bolsas de criopreservación después de la descongelación.
- 25 **[0022]** Cuando se usan las bolsas de congelación de células de la presente invención, se colocarán de lado en un casete de metal (también denominado caja o contenedor) en una orientación sustancialmente nivelada. El grosor de la suspensión celular en cualquier punto dentro de una bolsa no debe exceder aproximadamente los 10 u 11 milímetros. Si el grosor de la suspensión celular es sustancialmente superior a 10 u 11 milímetros, las células adyacentes a la superficie de la bolsa experimentarán diferentes condiciones de congelación y descongelación que las células en el interior de la suspensión, y pueden reaccionar de manera diferente durante el transcurso de la congelación y la descongelación y posteriormente cuando se usan en un biorreactor. El término "sección transversal delgada" se refiere a las dimensiones anteriores.
- 30 **[0023]** Conjunto de bolsa de congelación y almacenamiento de células: El conjunto incluye la bolsa de congelación de células y los tubos, puertos e interconexiones asociados.
- 35 **[0024]** Como se usa en esta invención, el término "criopreservación" se refiere a un procedimiento por el cual las células, tejidos o cualquier otra sustancia susceptible de daño causado por el tiempo o por la actividad enzimática o química se conservan enfriándolos y almacenándolos a temperaturas bajo cero.
- 40 **[0025]** Como se usa en esta invención, el término "criobanco" se refiere a una técnica mediante la cual las células se mezclan con un crioprotector (por ejemplo, DMSO con o sin hidroxietil almidón (HES)) y se colocan en un recipiente apropiado para el almacenamiento en condiciones de criopreservación. A continuación, estos recipientes se congelan usando técnicas bien conocidas en la técnica y se almacenan a bajas temperaturas, típicamente entre 45 aproximadamente -130 °C y aproximadamente -196°C. La colección de células obtenidas por el proceso es un banco de células.
- [0026]** Como se usa en esta invención, el término "banco de células maestro" se referirá a un cultivo de células (por ejemplo, células completamente caracterizadas) que se han cultivado a partir de un solo clon, dispensado en recipientes de almacenamiento (por ejemplo, dispensado en los recipientes en una sola operación), y se almacenan en condiciones de criopreservación como se ha descrito anteriormente. Las células pueden ser adecuadas para su uso posterior en un cultivo celular de producción y una recogida adicional de las proteínas y/o virus terapéuticamente relevantes, incluyendo virus, producidos de ese modo.
- 50 **[0027]** Como se usa en esta invención, el término "bolsa criogénica" es una cámara estéril que es capaz de recibir un medio líquido, es apropiada para almacenamiento en frío entre aproximadamente -130 °C y aproximadamente -196 °C, y puede comprender adicionalmente conectores, puertos, adaptadores y tubos flexibles. Como se describe en esta invención, la bolsa criogénica se construye idealmente de etileno-propileno fluorado (FEP).
- 55 **[0028]** Como se usa en esta invención, el término "matraz de agitación" se referirá a un recipiente utilizado como un matraz de cultivo en el que el medio se agita constantemente durante la incubación.
- 60 **[0029]** Como se usa en esta invención, el término "cultivos celulares en matraz de agitación" se referirá a un procedimiento de expansión celular en el que primero se cultiva (se siembra) una alícuota de células en un matraz de agitación y se hace crecer en el mismo. Las células se cultivan según su velocidad de crecimiento y usualmente se 65

dividen en recipientes más grandes y/o múltiples durante su crecimiento hasta que la biomasa ha alcanzado un nivel suficiente para inocular un biorreactor.

5 **[0030]** Como se usa en esta invención, el término "densidad de semillas" se referirá a la densidad celular inicial a la que se inocula un matraz o biorreactor.

10 **[0031]** Como se usa en esta invención, el término "proteína terapéuticamente relevante" se referirá a cualquier proteína que pueda usarse para crear un tratamiento para una enfermedad o trastorno o para tratar una enfermedad o trastorno en un animal, incluidos mamíferos tales como ratones, ratas, monos, simios y seres humanos. Estas proteínas pueden incluir, pero sin limitación, polipéptidos de unión tales como anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión Fc, anticoagulantes, factores sanguíneos, proteínas morfogenéticas óseas, andamiajes de proteínas genomanipuladas, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, interferones, interleucinas y trombolíticos.

15 **[0032]** Por consiguiente, la descripción proporciona una bolsa de almacenamiento y congelación de células que soporta un nuevo procedimiento para un sistema de banco de células de fase cerrada. La bolsa está construida principalmente de FEP. La bolsa está diseñada para contener suficientes células para que un biorreactor o recipientes de cultivo celular puedan inocularse directamente de su contenido. La bolsa está diseñada para llenarse a una fracción de su capacidad máxima, de modo que cuando se coloque de lado, la suspensión celular tenga una sección transversal muy delgada. El diseño de la bolsa incluye un conjunto de transferencia que se puede soldar de forma estéril a la fuente de las células eucariotas. El diseño de la bolsa incluye al menos un conducto de entrada y un conducto de salida o de inoculación, que pueden soldarse de forma estéril a la fuente de las células eucariotas. El uso de al menos dos conductos soldables estériles permite el llenado y drenaje en un "sistema cerrado" de las bolsas, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación en relación con otros procedimientos de banco de células.

25 **[0033]** La bolsa también incluye un manguito, que puede ser termosoldado para formar un cerramiento, que protege los conductos de entrada y salida contra la contaminación y daños mecánicos durante la congelación, el almacenamiento y la posterior descongelación. En el procedimiento, una vez que se llena cada bolsa, se sella su correspondiente conducto de entrada, y tanto el conducto de entrada como el de salida se encierran dentro de la funda de la bolsa. La funda está separada del cerramiento que contiene las células, de modo que no interfiere con la transferencia térmica. Durante la inoculación, el contenido de la bolsa se drena a través de un conducto de salida soldable estéril o una línea de inoculación.

35 **[0034]** La bolsa de congelación de células de la presente invención está hecha de un tejido de FEP en lugar de EVA y PFE (bolsas de la técnica anterior). El tejido de FEP es flexible a menos de 196 °C (la temperatura del N₂ líquido). Debido a su flexibilidad a baja temperatura y, a su vez, a la posibilidad reducida de fractura a baja temperatura, esta característica del tejido proporciona protección adicional al contenido de la bolsa de congelación de células durante la congelación, el almacenamiento a largo plazo y la descongelación.

40 **[0035]** La bolsa de congelación de células está diseñada para contener hasta 400 ml de suspensión celular, 400 veces el volumen típicamente congelado en viales con tapón de rosca. También son posibles volúmenes desde tan solo varios mililitros hasta al menos aproximadamente 400 ml, o incluso volúmenes mayores, utilizando el diseño de la bolsa de crioconservación descrito. Las densidades celulares son comparables para las nuevas bolsas de congelación de células y los viales que se utilizan actualmente. Debido a esta diferencia de volumen, las bolsas pueden contener aproximadamente 100 (o hasta aproximadamente 400) veces más células que los viales. Una sola bolsa de congelación de células contiene suficientes células para permitir la inoculación directa de un biorreactor u otro recipiente de cultivo celular adecuado. Se pueden usar varias bolsas para inocular recipientes muy grandes.

50 **[0036]** Los volúmenes de suspensión celular a congelar son una fracción de la capacidad potencial de la bolsa de congelación de células. Esto limita el grosor de la suspensión celular. Debido a que la suspensión celular es fina, la transferencia de calor es rápida y las células se pueden congelar y descongelar uniformemente a una velocidad óptima. La congelación y descongelación uniformes ayudan a garantizar la homogeneidad de las células.

55 **[0037]** Las bolsas de congelación de células deben fabricarse con un conducto de entrada y conducto de salida o de inoculación integrales. Los conductos están compuestos por tramos de tubos flexibles y, particularmente, de PVC. Cuando se van a llenar las bolsas, el conducto de entrada se suelda de forma estéril a un tramo de tubos que está en comunicación de fluido con la fuente de la suspensión celular. Los dispositivos y procedimientos de soldadura estériles son bien conocidos por los expertos en la técnica de conservación de células u otros materiales biológicos. Este procedimiento de "sistema cerrado" prácticamente elimina la posibilidad de contaminación cuando las bolsas se llenan y se drenan.

60 **[0038]** Cada fase del conjunto de transferencia está conectada a la bolsa de congelación de células. Cada fase tiene una abrazadera de tornillo o un dispositivo similar para controlar el flujo de células a la bolsa de congelación de células adjunta. El conjunto de transferencia y las bolsas adjuntas se esterilizan y se entregan como una unidad. Para cada bolsa, la secuencia de llenado es:

65

- a) el conducto de entrada se suelda de forma estéril a una fase, que está en comunicación de fluido con una fuente de células;
- b) se abre la abrazadera de tornillo de la fase del conjunto de transferencia adjunto;
- 5 c) la suspensión celular se bombea a la bolsa a través de su conducto de entrada;
- d) la abrazadera de tornillo se cierra;
- e) el conducto de entrada se termosella,
- f) la bolsa se corta por encima del sello realizado en e), desconectando la bolsa del conjunto de transferencia sin haber expuesto su contenido al aire exterior (es decir, fase cerrada);
- 10 g) los conductos de entrada y salida se retiran dentro de la funda de la bolsa, y la bolsa se coloca dentro de una carcasa protectora de metal, que se utilizará para alojar la bolsa durante la congelación y el almacenamiento (esta etapa es útil cuando se deben procesar una pluralidad de bolsas);
- h) la bolsa se retira temporalmente de su carcasa protectora, y su funda se termosella de forma estéril para producir un nuevo compartimento, que encierra los conductos de entrada y salida. El cerramiento protege los conductos de entrada y salida de la exposición directa al N₂ líquido y los baños de agua;
- 15 i) la caja de metal ahora se cierra alrededor de la bolsa llena y sellada, y se baja a la temperatura de almacenamiento adecuada.

[0039] Si la suspensión celular se bombea a una velocidad constante, las bolsas se pueden llenar basándose en un intervalo de tiempo fijo. Una vez que el conducto de entrada está sellado y cortado, el conjunto de transferencia ya no está unido a la bolsa. Esto elimina uno de los puntos de vulnerabilidad durante el almacenamiento.

[0040] Según la invención, el conducto de salida se usa para drenar el contenido de las bolsas. Este conducto permanece sellado de forma estéril durante el llenado, la congelación, el almacenamiento y la descongelación de la bolsa. Como alternativa, el conducto de salida puede denominarse línea de inoculación. Un extremo de la línea de inoculación está unido al cuerpo de la bolsa de congelación de células. Este extremo unido se comunica libremente con el compartimento que contiene la suspensión celular. Durante el almacenamiento, la línea de inoculación está protegida contra daños mecánicos al estar encerrada herméticamente (junto con el conducto de entrada sellado) en un compartimento (es decir, el cerramiento formado cuando la funda de la bolsa está termosellada en la etapa (h) anterior. Cuando el contenido de la bolsa se va a utilizar, el extremo libre de la línea de inoculación se suelda de forma estéril a un tramo de tubos que está conectado al biorreactor de inoculación o recipientes de cultivo celular.

[0041] Por consiguiente, la descripción incluye un nuevo procedimiento para la expansión de cultivos celulares de células eucariotas. Con este nuevo procedimiento, se aumenta el número de células en cada alícuota del Banco de células de trabajo del fabricante (MWCB). Esto reduce la medida en que las células deben multiplicarse en la expansión de cultivos celulares. También es posible aumentar el número de células por alícuota concentrándolas (véase, por ejemplo, el documento US 2014/0273206, de Genzyme). El Solicitante prevé que una combinación del presente procedimiento de banco de células de fase cerrada y alto volumen, combinado con un procedimiento de concentración, sería extremadamente ventajosa.

[0042] En una realización, un biorreactor de inoculación dedicado puede inocularse directamente transfiriendo de forma estéril el contenido de la bolsa de congelación de células al biorreactor u otros recipientes de cultivo celular apropiados. Esta inoculación puede tener lugar sin que intervengan frascos de cultivo de tejidos, frascos giratorios, matraces de agitación o recipientes similares. El volumen inicial del cultivo en el biorreactor de inoculación dedicado puede ser, por ejemplo, de 2 l, aumentando a 15 l a medida que las células se multiplican. Por consiguiente, con una concentración de células común de $150 \times 10^6/\text{ml}$ y una capacidad de bolsa de 400 ml, es posible sembrar un recipiente de 200 l directamente a una concentración de siembra de células común de aproximadamente $0,3 \times 10^6/\text{ml}$.

[0043] En una realización, el sistema de banco de células de fase cerrada puede usarse para congelar y almacenar cualquiera de los siguientes: células procariontas, líneas celulares eucariotas, líneas celulares modificadas, líneas celulares que albergan un vector viral recombinante, antígenos concentrados (por ejemplo, virus o viriones inactivados de la fiebre aftosa), y vacunas de ADN.

[0044] En una realización, las células son células de mamífero. En otra realización, las células de mamífero se seleccionan del grupo que consiste en: células CHO, CHO-10-DBX11, CHODG44, CHO-S, CHO-K1, Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK-293, NIH-3T3, células W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NSO, CRL7030, células HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Ag14 y células de hibridoma. Las células de insectos como Sf9 también podrían ser una diana para Merial.

[0045] En otra realización, las células son células transfectadas o transducidas de manera estable.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0046] La figura 1 representa una bolsa según la presente descripción. En la figura 1A y 1B se muestra una

bolsa de FEP (1); un primer conducto de PVC (2); un segundo conducto de PVC (3); y un filtro poroso opcional, para permitir un proceso de esterilización de gas (por ejemplo, óxido de etileno) (4). El conducto de entrada (2) y el conducto de salida (3) permanecen ambos fijados de forma estéril al conducto de entrada rígido (5) y al conducto de salida rígido (6) durante las etapas de llenado, congelación, almacenamiento y descongelación. Y mientras que los conductos 5 rígidos representados actualmente son de la variedad de puerto perforable, la bolsa de crioconservación también puede emplear tapones con estriado de FEP.

[0047] Como se muestra en la figura 1, la bolsa tiene un primer cerramiento de etileno-propileno fluorado (FEP) (7), que está adaptado para recibir y contener asépticamente un volumen de materiales biológicos (por ejemplo, 10 células). El primer cerramiento (7) está en conexión de fluido con un conducto de entrada de FEP rígido (5), que se puede conectar a un primer tubo flexible de PVC (2). El primer cerramiento también está en conexión de fluido con un conducto de salida de FEP rígido (6), que se puede conectar a un segundo tubo de PVC flexible (3). La bolsa también incluye un estuche de FEP (8), que inicialmente está abierto en un extremo (9), y que por lo demás es contiguo al cerramiento (7), pero no está conectado de forma fluida con el mismo debido a un sello (10) entre el cerramiento (7) y 15 el estuche (8). Por lo tanto, los conductos rígidos (5, 6) están acoplados de forma estanca con, y rodeados por, el FEP que constituye el cerramiento (7) y el estuche (8), y el estuche (8) no está en comunicación de fluido con el primer cerramiento, ni con los puertos de entrada (5) ni de salida (6).

[0048] Como se muestra en las figuras 1A y 1B, el estuche (8) se extiende lo suficiente como para que cuando 20 el primer cerramiento (7) se haya llenado con el material biológico, los tubos de PVC puedan retirarse al estuche (véase la figura 1C), que a continuación se termosella en un punto aproximadamente indicado por la letra "S", para formar un segundo cerramiento (11), que ahora contiene ambos tubos de PVC (2, 3), los cuales se han sellado asépticamente (marcados en la figura 1C con las letras "AS"). La bolsa (1) también contiene un orificio (12), que es adecuado para recibir un medio para colgar la bolsa (por ejemplo, para facilitar el llenado y vaciado de material 25 biológico de las bolsas). Cualquier etiqueta adecuada (20) puede estar impresa en la bolsa (1), e idealmente, debería estar ubicada en la porción (21) de la bolsa que contiene el orificio de suspensión (12). Esta porción (21) se separa de forma estanca del resto de la bolsa mediante un termosellado (22) entre esta y el cerramiento (7).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad para almacenar grandes volúmenes de células, en el que el uso comprende las siguientes etapas:

- 5 a. conectar una de una pluralidad de bolsas de criopreservación de alta capacidad al sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad, en el que dicha pluralidad de bolsas de criopreservación comprende cada una de las características n a q a continuación, y en el que el sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad comprende las características i a m a continuación;
- 10 b. poner una fuente de células en conexión de fluido con el sistema;
- c. permitir que las células entren en contacto de fluido con las bolsas y llenen cada bolsa hasta una capacidad deseada;
- d. termosellar asépticamente cada uno de los tubos de PVC de entrada;
- e. retirar tanto el tubo de entrada como el tubo de salida en cada estuche;
- 15 f. termosellar cada estuche para encerrar y proteger los tubos de PVC y etiquetado opcional;
- g. colocar las bolsas en casetes; y
- h. congelar las bolsas dentro de sus respectivos casetes, almacenando así los grandes volúmenes de células,

en el que el sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad comprende:

- 20 i. una interfaz de usuario para controlar y monitorizar la dispensación de materiales biológicos líquidos en una pluralidad de bolsas de criopreservación;
- j. una pluralidad de bolsas de criopreservación;
- k. una pluralidad de conexiones de fluido, adaptadas para llenar la pluralidad de bolsas;
- 25 l. un medio de termosellado para sellar los tubos y bolsas;
- m. una pluralidad de casetes de metal para contener, congelar, almacenar y descongelar las bolsas;

en el que, adicionalmente, dicha pluralidad de bolsas de criopreservación son cada una de ellas una bolsa de criopreservación de alta capacidad (1), que está adaptada para su uso en el sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad, y que es resistente a las temperaturas del nitrógeno líquido; y en el que dicha bolsa de criopreservación de alta capacidad comprende:

- 35 n. un primer cerramiento de etileno-propileno fluorado (FEP) (7);
- o. al menos un conducto de entrada rígido de FEP (5), en conexión de fluido con el primer cerramiento, y que puede conectarse a un primer conducto flexible soldable estéril que es un tubo de PVC (2);
- p. al menos un conducto de salida rígido de FEP (6), en conexión de fluido con el primer cerramiento, y que puede conectarse a un segundo conducto flexible soldable estéril que es un tubo de PVC (3); y
- 40 q. un estuche de FEP (8), que inicialmente está abierto en un extremo (9), y que es contiguo al primer cerramiento, pero termosellado a partir del mismo, y que rodea tanto el conducto de entrada rígido como el conducto de salida rígido, de modo que el estuche no esté ni en comunicación de fluido con el primer cerramiento, ni con los conductos de entrada ni de salida; y en el que el estuche se extiende lo suficientemente lejos como para que cuando el primer cerramiento se haya llenado con el material biológico, los tubos de PVC se puedan retirar al estuche, que, a continuación, se puede termosellar para formar un segundo cerramiento (11), que ahora contiene ambos tubos de PVC.

2. Un procedimiento de sistema cerrado para descongelar y dispensar células almacenadas, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 50 a. exponer cada una de una pluralidad de bolsas de criopreservación de alta capacidad selladas, que se han llenado con células y se han almacenado según el uso de la reivindicación 1, a un baño de agua que contiene agua a una temperatura de descongelación adecuada;
- b. cortar el segundo cerramiento termosellado para permitir el acceso al conducto de salida;
- c. soldar de forma estéril el conducto de salida a los tubos, que está en comunicación de fluido condicional con una bolsa, recipiente o biorreactor objetivo;
- 55 d. drenar cada bolsa en la bolsa, recipiente o biorreactor objetivo; descongelando y dispensando de este modo las células almacenadas;

en el que dicha pluralidad de bolsas de criopreservación son cada una de ellas una bolsa de criopreservación de alta capacidad (1), que está adaptada para su uso en un sistema de banco de células de criopreservación de fase cerrada y alta capacidad, y que es resistente a las temperaturas del nitrógeno líquido; y en el que dicha bolsa de criopreservación de alta capacidad comprende:

- 60 e. un primer cerramiento de etileno-propileno fluorado (FEP) (7);
- f. al menos un conducto de entrada rígido de FEP (5), en conexión de fluido con el primer cerramiento, y que puede conectarse a un primer conducto flexible soldable estéril que es un tubo de PVC (2);

g. al menos un conducto de salida rígido de FEP (6), en conexión de fluido con el primer cerramiento, y que puede conectarse a un segundo conducto flexible soldable estéril que es un tubo de PVC (3); y

5 h. un estuche de FEP (8), que inicialmente está abierto en un extremo, y que es contiguo al primer cerramiento, pero termosellado a partir del mismo, y que rodea tanto el conducto de entrada rígido como el conducto de salida rígido, de modo que el estuche no esté ni en comunicación de fluido con el primer cerramiento, ni con los conductos de entrada ni de salida; y en el que el estuche se extiende lo suficientemente lejos como para que cuando el primer cerramiento se haya llenado con el material biológico, los tubos de PVC se puedan retirar al estuche, que, a continuación, se puede termosellar para formar un segundo cerramiento (11), que ahora contiene ambos tubos de PVC.

10

3. El uso de la reivindicación 1 o el procedimiento de la reivindicación 2, en los que el segundo cerramiento comprende una funda u otro medio para recibir y contener una etiqueta, que puede usarse para mencionar información sobre el contenido de la bolsa.

15 4. El uso de la reivindicación 1 o el procedimiento de la reivindicación 2, en los que el conducto de entrada de FEP rígido se puede conectar a los tubos de PVC flexibles de entrada a través de un conector cónico de plástico rígido de tipo estriado, y en los que el conducto de salida de FEP rígido se puede conectar a los tubos de salida flexibles a través de un conector de plástico rígido de tipo estriado, estando cada conector ahusado en ambos lados de manera que puedan encajar firmemente dentro de sus respectivos conductos y los tubos de PVC.

20

5. El uso de la reivindicación 1 o el procedimiento de la reivindicación 2, en los que los conductos comprenden además anillos de retención.

6. El uso de la reivindicación 1 o el procedimiento de la reivindicación 2, en los que la bolsa comprende un
25 orificio, que es adecuado para recibir un medio de suspensión para colgar la bolsa.

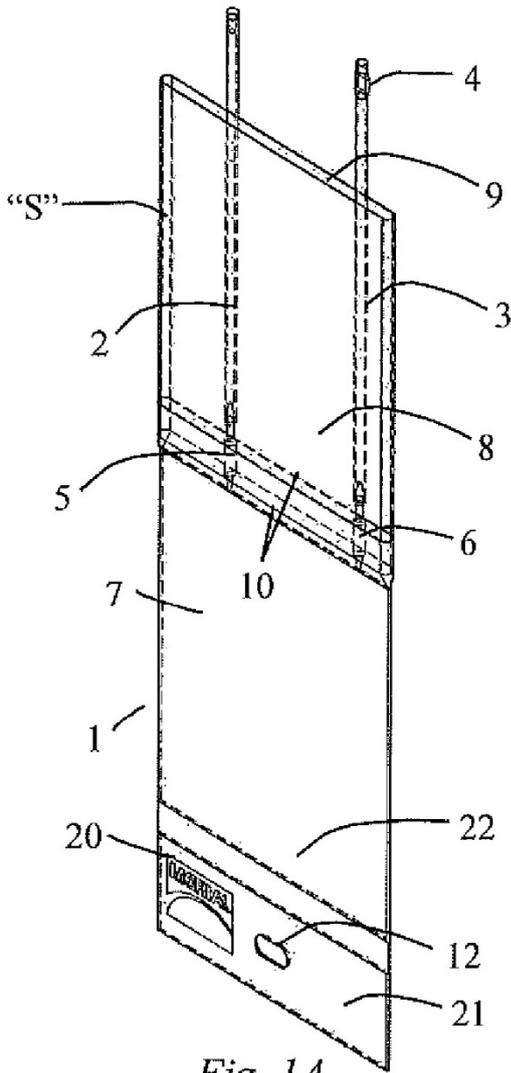


Fig. 1A

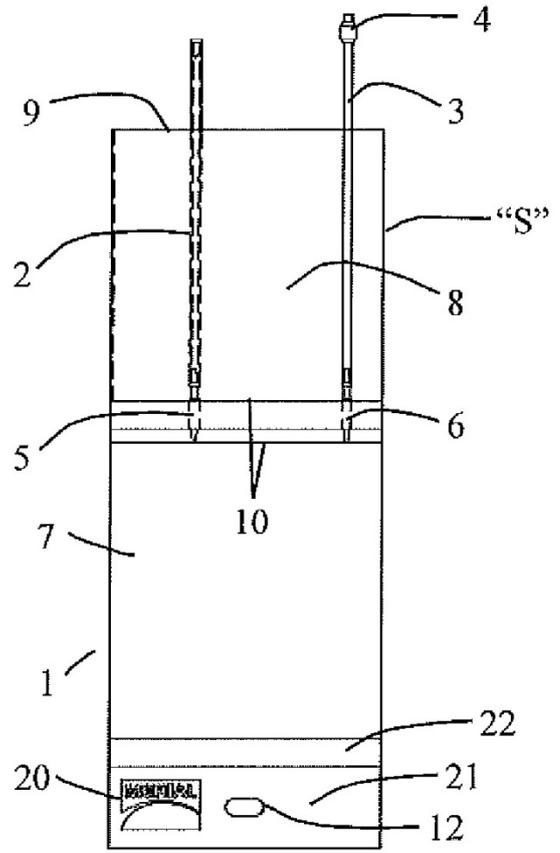


Fig. 1B

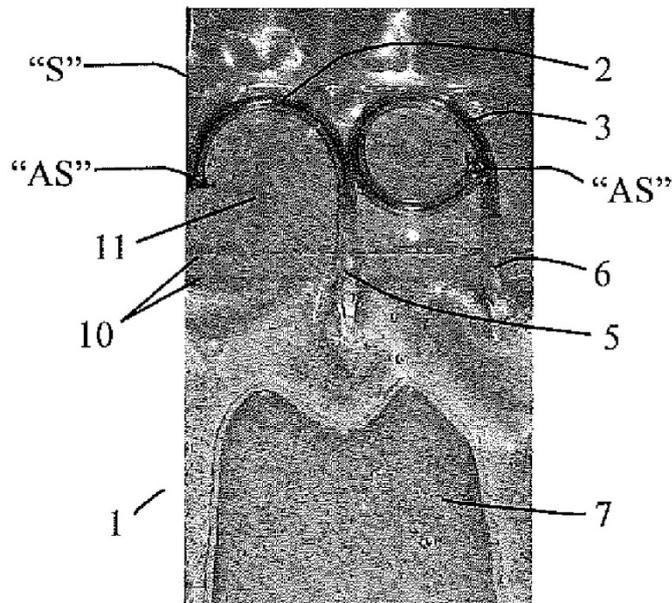


Fig. 1C

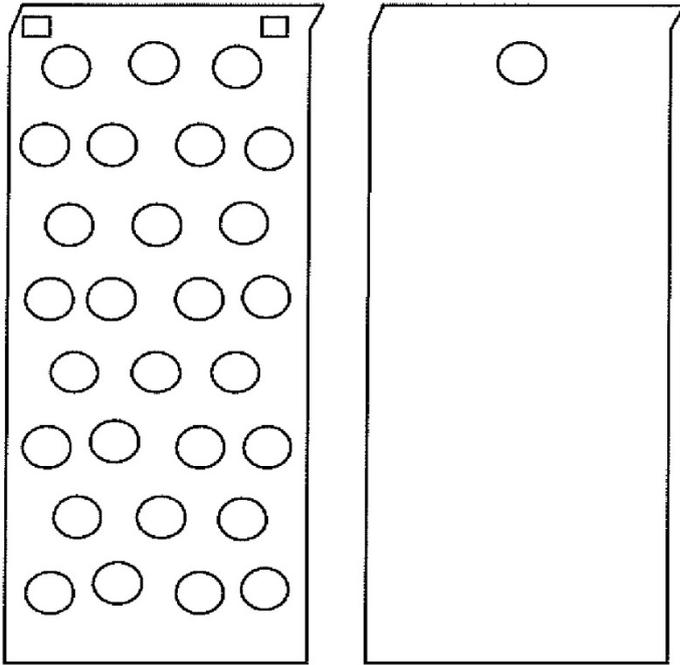


Fig. 2A

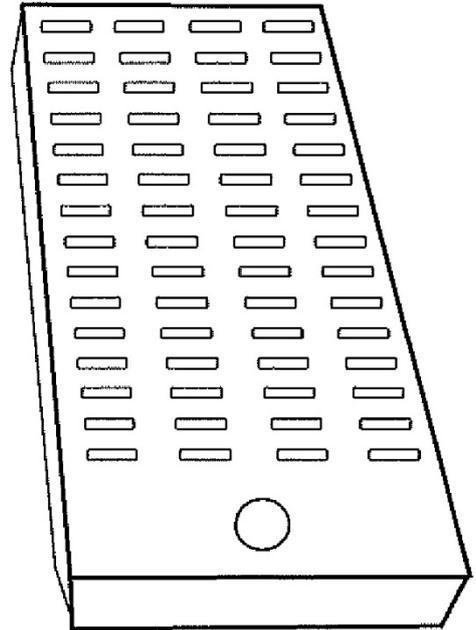


Fig. 3B

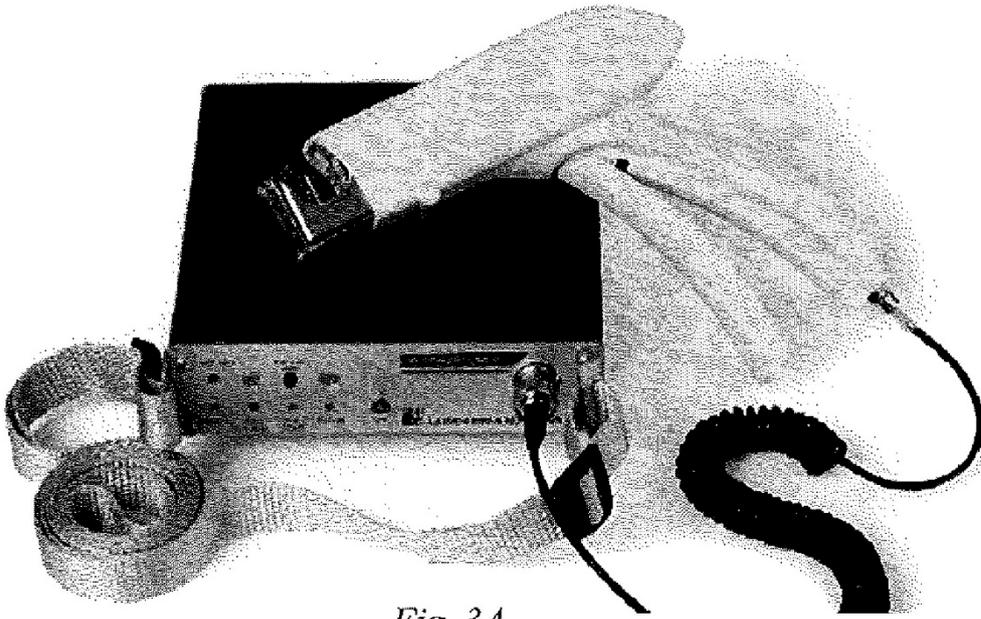


Fig. 3A

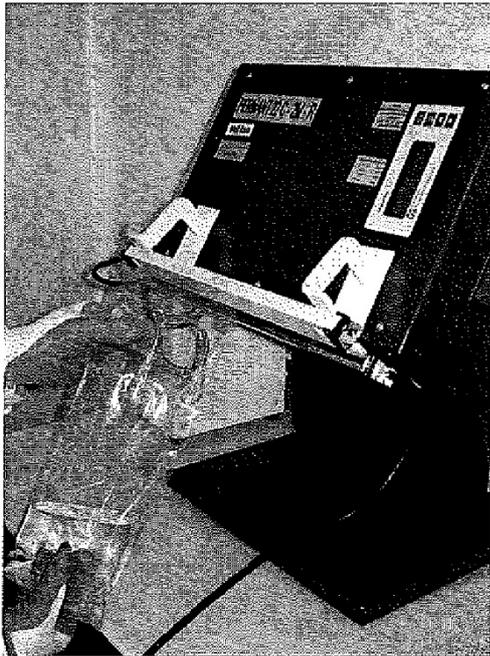


Fig. 3B

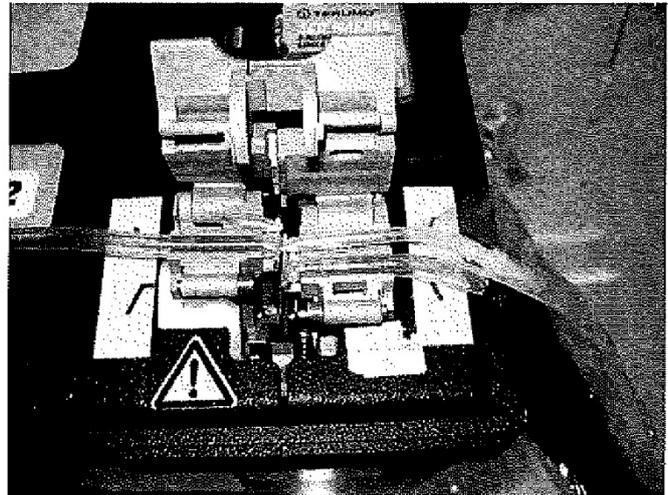


Fig. 3C

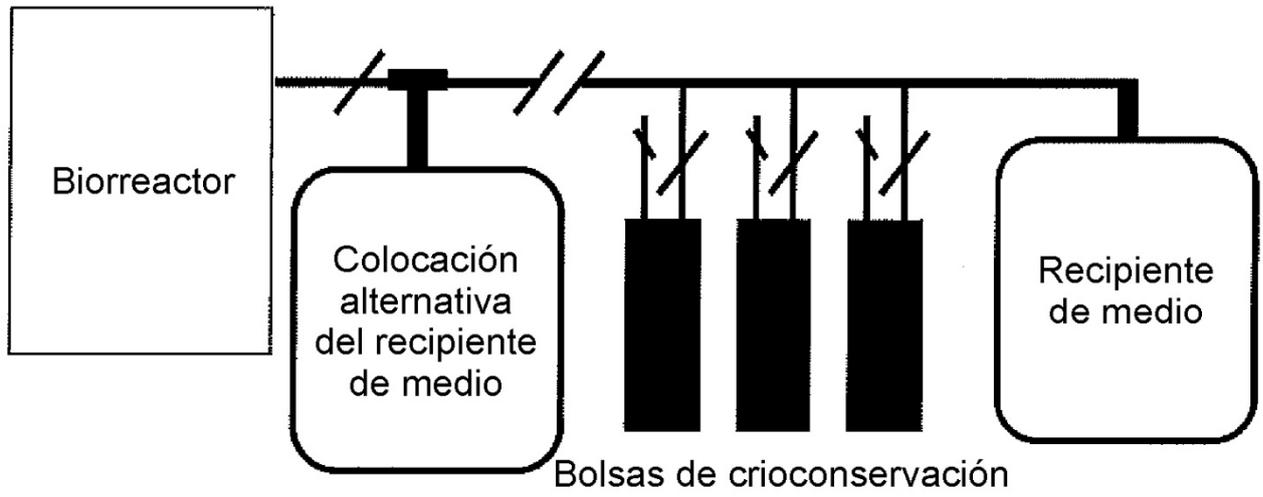


Fig. 4