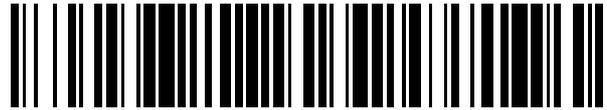


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 573**

21 Número de solicitud: 200901531

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **26.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2011**

Fecha de la concesión: **18.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **30.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2011**

73 Titular/es:

**DRO BIOSYSTEMS, S.L.**  
**Pº DE MIRAMON, 200**  
**20009 SAN SEBASTIAN, GIPUZKOA**

72 Inventor/es:

**SIMON SORIA, MARCOS**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **DISPOSITIVO Y MÉTODO PARA CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS ADHERENTES.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un dispositivo y método para cultivo tridimensional de células adherentes basado en el uso de soportes filamentosos inmersos en un medio de cultivo.

ES 2 351 573 B1

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método para cultivo tridimensional de células adherentes.

### 5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo y método para cultivo tridimensional de células adherentes basado en el uso de soportes filamentosos inmersos en un medio de cultivo.

### 10 **Estado de la técnica**

15 El cultivo celular es ampliamente empleado en la industria biotecnológica como un método para obtener diferentes productos biológicos producidos por las células y también como un método para producir células para diferentes aplicaciones, como puede ser la terapia celular. El cultivo celular también es empleado en investigación como un método muy conveniente para estudiar interacciones celulares o el efecto de diferentes sustancias en el metabolismo celular.

En los métodos de cultivo celular, las células pueden ser cultivadas en suspensión o adheridas a una superficie, como es el caso de las células dependientes de anclaje.

20 Las células dependientes de anclaje se cultivan tradicionalmente como una única capa de células en la superficie interna de recipientes con diferentes formas. Estas superficies se sumergen en un medio de cultivo apropiado, como puede ser el caso de las botellas rodantes o los frascos de cultivo tipo "T", donde el medio de cultivo se introduce en el interior del recipiente, de manera que baña las paredes donde se realiza el cultivo celular. Este tipo de cultivos son empleados, entre otras cosas, para realizar estudios de eficacia de diversas sustancias sobre el desarrollo de determinados fenómenos celulares como pueden ser la angiogénesis o la metástasis. Sin embargo, el hecho de que el crecimiento en monocapa no reproduzca las condiciones en las que las células se encuentran en la naturaleza, limita la aplicación e interpretación de los resultados obtenidos en dichos estudios.

25 Otras alternativas emplean soportes particulados con estructura macroporosa para el cultivo celular. Las células crecen en la superficie externa de las partículas y dentro de las cavidades internas, o poros, de las partículas del soporte, las cuales se mantienen en suspensión mediante diferentes modos de agitación.

30 También es conocido la preparación de los llamados esferoides, preparados de manera artesanal y en los que muchas células crecen juntas en suspensión, adheridas unas a otras, hasta el límite impuesto por la fuerza gravitacional que actúa sobre el esferoide en crecimiento que se mantiene en suspensión. Los esferoides son de particular interés en el estudio de cultivos celulares tridimensionales, ya que los esferoides simulan con mayor precisión que los cultivos superficiales las condiciones naturales en las que las células se encuentran en los organismos vivos, donde más que estructurarse en forma de monocapas, las células forman estructuras tridimensionales y tejidos.

35 En la solicitud de patente PCT/EP2006/064483, se describe el cultivo de células en la superficie de microhilos en forma de monocapas. En la descripción de la invención, se describen distintas distribuciones de microhilos adecuadas para llevar a cabo el objetivo de cultivar las células en monocapas en la superficie de los hilos.

40 De especial interés es el desarrollo de cultivos tridimensionales de células adherentes en el caso de la producción de células terapéuticas, tanto somáticas como troncales, ya que un factor clave para el éxito de las terapias desarrolladas a partir de la implantación de células, es disponer de métodos de producción con suficiente productividad y que no afecten al grado de diferenciación de las células cultivadas. En estas aplicaciones, es necesario disponer de métodos de producción de células donde se consiga una elevada productividad, superior a cientos de miles de células por lote, y con elevada homogeneidad.

45 Los métodos o dispositivos existentes aplicados al cultivo tridimensional de células adherentes adolecen de los siguientes problemas:

- 50 - En el caso de los recipientes sobre cuya superficie interior crecen las células, estas se ven forzadas a crecer en dos dimensiones hasta que toda la superficie disponible para cultivo ha sido saturada por células, momento en el cual podrían iniciar el crecimiento tridimensional. Sin embargo, las células que están en contacto con la superficie, una vez que son cubiertas por sucesivas capas celulares, ven limitado su acceso a los nutrientes provistos por el medio de cultivo, por lo que crecen en un entorno drásticamente diferente al de las células de las capas superiores del cultivo.
- 55 - En el caso de los soportes particulados macroporosos que se mantienen en suspensión mediante agitación, las células que crecen en la superficie de las partículas están sometidas a un choque continuo contra el resto de partículas en suspensión, por lo que son dañadas por las fuerzas de fricción. Mientras que las células que crecen en el interior de los poros, se encuentran sometidas a diferentes micro-ambientes creados en el interior de dichos poros, lo cual implica unas condiciones heterogéneas de cultivo. Además, una vez concluido el cultivo, la recuperación de las células está dificultada por el impedimento estérico, ya que incluso si las células son despegadas de la superficie interna de los poros, la mayoría de ellas queda atrapada en el interior de las partículas y no puede ser recuperada.
- 60
- 65

- En el caso de los esferoides, aunque tanto el entorno de cultivo como su similitud con un cultivo tridimensional perfecto son adecuadas, el método de preparación es extremadamente improductivo, y los tamaños de los cultivos obtenidos están limitados a pocos cientos o miles de células. Este tamaño máximo tan reducido de los cultivos tridimensionales que se pueden alcanzar con los esferoides es debido a los límites impuestos por la fuerza gravitacional que hace caer a los esferoides que crecen en suspensión.

Para solucionar estos problemas, es necesario encontrar el modo de mantener indefinidamente en suspensión y en un ambiente homogéneo, un cultivo tridimensional, sin someterlo a fuerzas de fricción provocadas por choques entre las partículas o turbulencias provocadas por la agitación del medio de cultivo.

## Descripción de la invención

La presente invención describe un dispositivo y un método para cultivo tridimensional de células adherentes mediante la aplicación de un medio de cultivo al dispositivo, previamente inoculado el medio de cultivo con células adherentes.

El dispositivo comprende uno o más soportes filamentosos estáticos dispuestos de modo que se favorece el desarrollo de cultivos tridimensionales. Los soportes filamentosos se encuentran dispuestos de forma paralela en el interior del dispositivo para cultivo celular tridimensional y fijados a él por sus extremos. Los soportes filamentosos también pueden estar dispuestos en estructuras de soporte que pueden ser apilables y que se fijan al dispositivo de cultivo celular tridimensional formando una o más capas de soportes filamentosos.

Los soportes filamentosos pueden haber sido sometidos a un tratamiento de modificación superficial que afecte al modo en que las células se adhieren a los mismos o al modo en que las células se comportan una vez adheridas.

El dispositivo para cultivo celular tridimensional puede adoptar diferentes geometrías, pudiendo ser de forma cilíndrica o en forma de prisma entre otras.

El método para cultivo celular tridimensional de la presente invención es de aplicación tanto a la producción de células o derivados de estas células, como a la generación de cultivos tridimensionales para el estudio de diferentes aspectos estructurales, metabólicos o de interacción entre diferentes tipos celulares.

El método se inicia con el llenado del dispositivo de la presente invención con una suspensión de células adherentes en medio de cultivo. Tras mantener inmóvil el dispositivo y pasado el tiempo en el que las células se adhieren a la superficie de los soportes filamentosos, se retira el medio de cultivo y es reemplazado por medio fresco. El reemplazo del medio de cultivo puede ser realizado de forma continua mediante un sistema de filtrado.

La observación de la evolución del cultivo puede ser realizada de forma visual cuando el dispositivo dispone de paredes transparentes o mediante la extracción de los soportes filamentosos cuando su disposición así lo permita.

Por último y una vez que el cultivo tridimensional ha alcanzado el tamaño deseado, se inducen comportamientos en las células mediante la adición de agentes químicos. En caso necesario, las células pueden recuperarse para otros fines mediante tratamiento químico, aplicando enzimas u otros agentes químicos, o mediante tratamientos físicos, que alteren las propiedades de las células adheridas y las desprendan de los soportes filamentosos. A continuación, las células se recuperan como una suspensión celular a través del puerto de recolección.

El desarrollo de cultivos tridimensionales de células adherentes sobre soportes filamentosos estáticos permite imitar con más precisión que con otros sistemas existentes el entorno de crecimiento de las células y los tejidos en la naturaleza, por lo que es una herramienta más útil que los cultivos bidimensionales para i) analizar la interacción entre células del mismo o diferente tipo; ii) estudiar la evolución de enfermedades; iii) producir células o; iv) producir modelos experimentales de órganos y organismos.

En el contexto de esta memoria serán de aplicación las siguientes definiciones:

**Esferoide:** agregado de células que forman un cultivo homogéneo con forma esferoidal y diámetro inferior a 500 micrómetros. Típicamente un esferoide puede contener un máximo de 25.000 células.

**Cultivo tridimensional:** agregado de células que se multiplican en varias dimensiones formando capas de células. A diferencia de la estructura bidimensional de los cultivos de células en monocapa, en los que las células únicamente interaccionan con otras células a través de sus paredes laterales, los cultivos tridimensionales forman estructuras en las que la mayor parte de las células está en contacto con otras células en toda su superficie.

**Célula adherente:** célula cuyo crecimiento se produce adherida a un sustrato o soporte.

**Microhilo:** elemento con forma filamentosos y cuya sección transversal presenta una distancia máxima entre dos puntos cualesquiera contenidos en dicha sección inferior a 1000 micrómetros.

**Soporte:** superficie a la que se adhieren las células adherentes.

Estructura de soporte: armazón al que se fijan los extremos de los soportes filamentosos.

### Descripción detallada de la invención

5 El dispositivo para cultivo celular tridimensional de la presente invención consiste en uno o más soportes filamentosos estáticos, preferiblemente microhilos, que se encuentran sujetos al dispositivo que los contiene. Preferiblemente los microhilos se encuentran inmovilizados por ambos extremos a las paredes del dispositivo, conteniendo el dispositivo el medio de cultivo que alimenta a las células durante su crecimiento.

10 La disposición de los microhilos en el interior del dispositivo para cultivo tridimensional, es tal que microhilos contiguos se encuentran dispuestos de forma paralela, permitiendo el desarrollo de varias capas de células creciendo unas sobre otras sin tocar las células que crecen sobre microhilos contiguos. De forma preferible la distancia entre microhilos contiguos es igual o mayor a 100 micrómetros, o incluso mayor a 300 micrómetros.

15 En un modo de realización preferente, los extremos de uno o más microhilos se encuentran fijados a una estructura de soporte preferiblemente apilable que se introduce en el dispositivo de cultivo tridimensional y que se fija de forma desmontable al dispositivo de cultivo tridimensional formando al menos una capa de microhilos. De forma preferente, la estructura de soporte es un marco apilable.

20 En otro modo de realización preferente, el dispositivo puede contener una o más estructuras de soporte apiladas, con uno o más microhilos fijados a cada estructura de soporte formando una o más capas de microhilos. Los microhilos contenidos en las estructuras de soporte pueden disponer o no de células en su superficie. Las estructuras de soporte a las que se fijan uno o más microhilos, se separan entre sí mediante uno o más elementos espaciadores que mantienen la distancia deseada entre las sucesivas estructuras de soporte con uno o más microhilos. De forma preferente las estructuras de soporte contiguas se disponen de forma paralela. De forma opcional, un mismo dispositivo de cultivo celular tridimensional puede disponer de varias estructuras de soporte con uno o más microhilos a los que se adhieren células siendo las células de una estructura de soporte de un tipo distinto a las de otra estructura de soporte.

30 Los microhilos contenidos en el dispositivo para el cultivo celular pueden haber sido sometidos a un tratamiento de modificación superficial que afecte al modo en que las células se adhieren a los microhilos o al modo en que las células se comportan una vez adheridas.

35 El dispositivo puede adoptar diferentes geometrías, siendo preferible un dispositivo de forma cilíndrica dispuesto con el fondo circular paralelo al suelo. En un dispositivo para cultivo celular tridimensional con geometría circular, los microhilos se disponen unidos por sus extremos a las paredes del recipiente en el que se realiza el cultivo. En el caso de que uno o más microhilos se dispongan en una o más capas mediante el apilamiento de estructuras de soporte, se dispone cada estructura de soporte de manera perpendicular al eje del cilindro hueco que contiene al medio de cultivo. En otro modo de realización, el dispositivo para cultivo celular tridimensional posee forma de prisma rectangular en el que uno o más microhilos se fijan por sus extremos a las paredes del recipiente en el que se realiza el cultivo. En el caso de que uno o más microhilos se dispongan en una o más capas mediante el apilamiento de estructuras de soporte, se dispone cada estructura de soporte de forma horizontal y paralela al suelo.

45 El tamaño preferido de los dispositivos para cultivo celular en cualquiera de sus geometrías es de 100 cm en su mayor dimensión, aunque preferiblemente el tamaño máximo es de 50 cm o incluso mejor, de 2 o incluso 1 cm en su mayor dimensión.

50 El dispositivo para cultivo celular tridimensional dispone de tapas tanto en la parte inferior como en la superior de manera que, junto con las paredes, forma un recipiente cerrado, impermeable tanto a líquidos como a gases. El dispositivo para cultivo celular tridimensional puede disponer de membranas de un filtro que comunica el interior y el exterior del recipiente para permitir el intercambio gaseoso de manera estéril. Adicionalmente, el dispositivo puede contener filtros para la entrada y salida de medio de cultivo y un puerto de inoculación en la parte superior y otro de recolección en la parte inferior.

55 El método para cultivo celular tridimensional de la presente invención se inicia tras retirar la tapa del dispositivo, con el llenado con una suspensión de células adherentes en medio de cultivo y la restitución de la tapa para cerrar el dispositivo.

60 Alternativamente, las células pueden ser introducidas en el dispositivo para cultivo celular tridimensional a través de un puerto de inoculación dispuesto en la parte superior del mismo.

Posteriormente el dispositivo para cultivo celular tridimensional se mantiene inmóvil para garantizar que las células sedimenten sobre la superficie de los soportes filamentosos y se adhieran comenzando a multiplicarse.

65 Transcurrido el tiempo necesario para que las células ubicadas sobre la superficie de los microhilos se adhieran a estos, se retira el medio de cultivo usado y es reemplazado por medio fresco. De forma opcional el medio de cultivo puede ser reemplazado continuamente al ritmo deseado a través de un sistema de filtrado que permite introducir medio de cultivo al interior del sistema mientras se retira el medio de cultivo usado de manera continua. La introducción

del medio de cultivo a través del sistema de filtración permite reducir las turbulencias generadas por el recambio del medio.

5 La evolución del cultivo tridimensional puede ser analizada visualmente mediante observación directa de las células en crecimiento sobre los soportes filamentos en el caso de que el dispositivo para cultivo tridimensional disponga de paredes transparentes. En caso de que los soportes filamentosos estén dispuestos en estructuras de soporte, éstos pueden ser extraídos para proceder a analizar el cultivo tridimensional en otro entorno.

10 Cuando el cultivo tridimensional ha alcanzado el tamaño deseado, se inducen comportamientos en las células en cultivo mediante la adición de agentes químicos. Estos agentes químicos pueden ser introducidos a través del puerto de inoculación o bien por la parte superior del dispositivo tras retirar la tapa. Estos comportamientos pueden ser, de manera orientativa aunque no limitativa, la inducción de la diferenciación celular para formar tejidos u órganos a partir de las células en cultivo, la inducción o inhibición de tumores, la inducción o inhibición de angiogénesis.

15 En caso necesario, las células pueden recuperarse para otros fines mediante tratamiento químico, aplicando enzimas u otros agentes químicos, o mediante tratamientos físicos, que alteren las propiedades de las células adheridas y las desprendan de los soportes filamentosos. A continuación, las células se recuperan como una suspensión celular a través del puerto de recolección o mediante la succión de la suspensión celular por la parte superior del dispositivo una vez retirada la tapa.

20 De forma explicativa y no limitativa de describen los siguientes ejemplos:

### Ejemplos

#### 25 1- Preparación de un dispositivo para el desarrollo de cultivos celulares tridimensionales

30 Microhilo de 30 micrómetros de diámetro formado por un alma metálica rodeada de una cubierta vítrea fue enrollado alrededor de un marco cuadrado de acero inoxidable de 60 mm de lado y 2 mm de espesor, dejando un espacio de 600 micrómetros entre cada dos de las 100 vueltas de microhilo. A continuación, los extremos libres del microhilo se pegaron al marco metálico empleando un pegamento a base de cianocrilato. Cada marco se colocó sobre cuatro espaciadores de 2 mm de altura en el interior de un recipiente de plástico, con tapa, circular, de 8,5 cm de diámetro con tapa. Sobre el marco así dispuesto se colocó otro marco de iguales características separado del anterior por cuatro espaciadores colocados en las esquinas. Sobre este segundo marco se colocó otro marco separado del anterior del mismo modo. El conjunto de los tres marcos apilados en el interior del recipiente constituye un ejemplo de un dispositivo para la realización de cultivos celulares tridimensionales.

#### 2- Desarrollo de un cultivo celular tridimensional

40 Una suspensión de células CHO-K1 a una concentración de 66.000 células por mililitro se vertió en el interior de un dispositivo para la realización de cultivos celulares tridimensionales que previamente había sido esterilizado mediante inmersión en etanol. A continuación, el dispositivo se introdujo en el interior de un incubador a 37°C, 5% de dióxido de carbono y 95% de humedad. Cada 48 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco. Transcurrida una semana, los cultivos se colocaron en un microscopio y se observó que las células habían crecido en capas sucesivas alrededor de los microhilos hasta generar cultivos tridimensionales de forma cilíndrica y un diámetro aproximado de 500 micrómetros.

#### 3- Combinación de distintos tipos celulares

50 Una suspensión de células CHO-K1 a una concentración de 66.000 células por mililitro se vertió en el interior de un dispositivo para la realización de cultivos celulares tridimensionales que previamente había sido esterilizado mediante inmersión en etanol. En otro dispositivo de las mismas características se vertió del mismo modo una suspensión celular de células HEK293 fluorescentes a una concentración de 60.000 células por mililitro. A continuación, ambos dispositivos se introdujeron en el interior de un incubador a 37°C, 5% de dióxido de carbono y 95% de humedad. Cada 48 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco. Al cabo de dos días y empleando los marcos contenidos en los dispositivos en cultivo, se produjo un nuevo dispositivo alternando capas de marcos con células HEK293 fluorescentes y células CHO-K1 y se continuó el cultivo del mismo modo. Al cabo de una semana de cultivo se observó la interacción ocurrida entre las células CHO-K1 y las células HEK293 fluorescentes que interactuaban en el cultivo tridimensional.

#### 60 4- Transfección de un cultivo tridimensional

65 Una solución del plásmido pCMV/EGFP, que expresa la proteína verde fluorescente, mezclada con lipofectamina, fue introducida en el interior de un dispositivo para la realización de cultivos celulares tridimensionales que contenía un cultivo tridimensional de células CHO-K1. Al cabo de 24 horas se observó la señal fluorescente emitida por la proteína verde fluorescente expresada en el interior de las células que habían sido transfectadas.

5- *Estructura de soporte circular en pocillos de placa multipocillos*

Microhilo de 30 micrómetros de diámetro formado por un alma metálica rodeada de una cubierta vítrea fue enrollado alrededor de marcos cilíndricos de plástico de 35 mm de diámetro y 1 mm de espesor, dejando un espacio de 600 micrómetros entre cada dos de las 100 vueltas de microhilo. A continuación, los extremos libres del microhilo se pegaron a los respectivos marcos circulares empleando un pegamento a base de cianocrilato. Cinco marcos así preparados se colocaron uno sobre otro separados por una arandela de plástico de 35 mm de diámetro y 0,1 mm de espesor en el interior de un pocillo de una placa multipocillo que disponía de 6 pocillos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para cultivo tridimensional de células adherentes que comprende uno o más soportes filamentosos, **caracterizado** porque la disposición de dichos soportes filamentosos contiguos es de forma paralela.
2. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la distancia entre dichos soportes filamentosos contiguos es de al menos 50 micrómetros.
- 10 3. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque dichos soportes filamentosos tienen un diámetro máximo de 1000 micrómetros.
4. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque los extremos de dichos soportes filamentosos están inmovilizados por sus extremos a las paredes de dicho dispositivo.
- 15 5. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque dichos soportes filamentosos se disponen en al menos una estructura de soporte que se fija a dicho dispositivo de cultivo celular.
6. Dispositivo según reivindicación 5 **caracterizado** porque dichas estructuras de soporte son apilables.
- 20 7. Dispositivo según reivindicación 6 **caracterizado** porque dichas estructuras de soporte se separan por al menos un elemento separador.
8. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque comprende membranas filtrantes que permiten la entrada y salida de medio de cultivo estéril de manera continua.
- 25 9. Método para cultivo tridimensional de células adherentes **caracterizado** porque:
- 30 a) se llena un dispositivo de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores con una suspensión de células adherentes en medio de cultivo.
- c) se reemplaza el medio de cultivo agotado por las células por medio fresco.
- d) se analizan las células en crecimiento sobre los soportes filamentosos.
- 35 e) se inducen comportamientos en las células en cultivo.
- f) se recuperan las células del cultivo tridimensional.
- 40 g) se extrae la suspensión celular para su posterior uso en otras aplicaciones.
10. Método para cultivo tridimensional de células adherentes según reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho análisis de las células en crecimiento sobre dichos soportes filamentosos se realiza de forma visual.
- 45 11. Método para cultivo tridimensional de células adherentes según reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho análisis se realiza mediante la extracción de dichas estructuras de soporte que contienen dichos soportes filamentosos.
12. Método para cultivo tridimensional de células adherentes según reivindicación 9 **caracterizado** porque dicha inducción de comportamientos se realiza mediante la adicción de agentes químicos.
- 50 13. Método para cultivo tridimensional de células adherentes según reivindicación 9 **caracterizado** porque dicha inducción de comportamientos se realiza mediante la combinación de estructuras de soporte con células de distinto tipo en un mismo dispositivo.
- 55 14. Método para cultivo tridimensional de células adherentes según reivindicación 9 **caracterizado** porque dicha recuperación se realiza mediante tratamiento químico, enzimático o físico.

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200901531

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.06.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12M 3/00** (01.01.2006)  
**C12N 5/00** (01.01.2006)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007012605 A2 (DRO BIOSYSTEMS SL) 01.02.2007	1-14
X	ES 1067871 U (DRO BIOSYSTEMS S L) 01.07.2008	1-14
X	EP 1333086 A1 (NISSHO KK et al.) 06.08.2003	1-14
X	DRO BIOSYSTEMS SL: -Static Support Bed- (Concept, Features & Advantages) 2006 [recuperado el 15.10.2010]. Recuperado de Internet: <URL:http://www.dro.es/ssb/concept.htm>	1-14
A	DONALD I W: "Production, Properties and Applications of Microwire and Related Products" J. of Materials Sci., (1987), vol. 22, pp.: 2661-2679, ISSN 0022-2461.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
11.01.2011

Examinador  
A. Maquedano Herrero

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12M, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.01.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 9-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-14	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007012605 A2 (DRO BIOSYSTEMS SL)	01.02.2007
D02	ES 1067871 U (DRO BIOSYSTEMS S L)	01.07.2008
D03	EP 1333086 A1 (NISSHO KK et al.)	06.08.2003
D04	DRO BIOSYSTEMS SL: -Static Support Bed- (Concept, Features & Advantages) 2006 [recuperado el 15.10.2010]. Recuperado de Internet: <URL:http://www.dro.es/ssb/concept.htm>	
D05	DONALD I W: "Production, Properties and Applications of Microwire and Related Products" J. of Materials Sci., (1987), vol. 22, pp.: 2661-2679, ISSN 0022-2461.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud reivindica un dispositivo para cultivo tridimensional de células adherentes que comprende uno o más soportes filamentosos contiguos dispuestos de forma paralela. Los extremos de los soportes filamentosos se encuentran inmovilizados mediante unión a las paredes del dispositivo. Las estructuras de soporte son apilables y los dispositivos comprenden membranas filtrantes que permiten la entrada y salida de medio de cultivo de manera continua.

La solicitud reivindica, asimismo, un método de cultivo tridimensional de células adherentes basado en la utilización del dispositivo antes mencionado.

D01 se refiere a un dispositivo que se utiliza, entre otras cosas, para el cultivo celular. Este dispositivo contiene microfilamentos apilados a los que se adhieren las células del cultivo. Estos dispositivos contienen además membranas filtrantes.

D02 describe unas bolsas fabricadas en plástico que disponen en su interior microfilamentos apilados de forma paralela para el cultivo de células. Estas bolsas incluyen dispositivos de entrada y de salida, de modo que se pueda realizar la inoculación del cultivo celular y mantenerlo en óptimas condiciones mediante la circulación continua de medio.

D03 reivindica un receptáculo para el cultivo de células que contiene en su interior microfilamentos huecos apilados de forma paralela para que se adhieran las células del cultivo.

D04 es la página web del solicitante que describe de forma bastante esquemática el producto que se reivindica.

De estos cuatro documentos (D01-D04), tan sólo D03 hace referencia a que el dispositivo se utilice en cultivos tridimensionales. Sin embargo, aunque en el resto de los documentos (D01, D02 y D04) no se haga comentario alguno al respecto, la estructura del dispositivo se halla anticipada por ellos.

Por otro lado, aunque ninguno de los documentos (D01-D04) afecta a la novedad de las reivindicaciones de método de cultivo (reiv. 9-14), se considera que las características técnicas que se incluyen en dichas reivindicaciones, salvo el uso de los dispositivos reivindicados, carecen de una actividad inventiva, por ser características comúnmente utilizadas en el estado de la técnica.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-8 no cumplen el requisito de novedad, aunque sí las reivindicaciones 9-14. Por otro lado, las reivindicaciones 1-14 no cumplen el requisito de actividad inventiva.