

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 437**

51 Int. Cl.:  
**C12M 3/04** (2006.01)  
**C12M 1/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03021296 .3**  
96 Fecha de presentación: **19.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1400585**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

54 Título: **BOTELLA ROTATORIA.**

30 Prioridad:  
**20.09.2002 US 412205 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.02.2012**

73 Titular/es:  
**BECTON DICKINSON AND COMPANY**  
**1 BECTON DRIVE**  
**FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417, US**

72 Inventor/es:  
**Whitley, Kenneth W.**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 373 437 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

Botella rotatoria

## CAMPO DEL INVENTO

5 Este invento se refiere a un contenedor o recipiente para la producción de cultivo de células, y más particularmente a una botella rotatoria o que puede rodar que tiene pliegues axiales para aumentar la superficie de crecimiento de las células y nervios circunferenciales para reforzar las paredes de la botella.

## DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

10 Un tipo de contenedor corrientemente usado en el laboratorio para el cultivo de células es conocido como una "botella rotatoria". Las botellas rotatorias son generalmente de forma cilíndrica y están adaptadas para girar alrededor de sus ejes. Las superficies internas de tales botellas rotatorias son para proporcionar superficies activas para las células. Un medio de crecimiento líquido es introducido en la botella rotatoria. El movimiento giratorio de la botella mantiene las superficies internas humedecidas con un medio líquido, animando con ello el crecimiento de las células. Unos rodillos giratorios de un aparato apropiado son empleados para hacer girar estas botellas rotatorias.

15 Es deseable para hacer crecer grandes cantidades de células, la mayor parte para subproductos celulares, tales como sustancias farmacéuticas que son secretadas por las células. Se han utilizado distintos intentos con el fin de aumentar la superficie interna de las botellas rotatorias. Un intento ha sido aumentar la cantidad de superficie real disponible para que las células crezcan sobre ella.

20 Por ejemplo se conocen botellas rotatorias producidas como una estructura unitaria mediante una técnica de moldeo por soplado que incluyen pliegues longitudinales formados en las paredes de la botella rotatoria. Estos pliegues longitudinales aumentan la superficie efectiva interna de la botella rotatoria. Los pliegues se extienden a la cámara de crecimiento con el propósito de aumentar el cultivo o producción de las células.

25 Es además conocido por ejemplo partir del documento US-A-4912048 proporcionar un recipiente de cultivo con tales pliegues longitudinales, e incluir además collarines circunferenciales que rodean la superficie externa del extremo superior e inferior del recipiente. Estos collarines tienen el propósito de maximizar el punto de agarre del recipiente cuando el recipiente es colocado sobre su costado sobre los rodillos de un aparato giratorio.

La técnica anterior también describe una botella rotatoria que tienen pliegues en sentido transversal al eje de la botella para aumentar la superficie para hacer crecer células y que incluye además al menos un panel de drenaje longitudinal sin pliegues, y nervios de refuerzo axiales a lo largo del borde exterior de la ondulación en sentido transversal para rigidizar la botella con pliegues.

30 Es también conocido usar nervios circunferenciales en una botella rotatoria con el propósito de reforzar las paredes de la botella. A este respecto, la técnica anterior describe una botella rotatoria que tiene paredes de plástico flexibles y una pluralidad de anillos de refuerzo circunferenciales separados definidos en las paredes de plástico flexible para hacer que el cuerpo retenga una forma generalmente cilíndrica.

35 Un problema asociado con las botellas rotatorias de la técnica anterior, especialmente aquellas que tienen pliegues con el propósito de expandir la superficie para el crecimiento de las células, ha sido la tendencia de las paredes de la botella a expandirse cuando el interior de las botellas resulta presurizado. Esto hace que la botella deje de rodar en su estante de rodadura. Esto es problemático debido a que en ausencia del movimiento giratorio, una parte de las superficies interiores se queda seca, promoviendo la muerte de las células en estas áreas.

40 Es deseable por ello proporcionar una botella rotatoria con pliegues que sea reforzada de modo que añada rigidez a la pared del recipiente para impedir que la botella se expanda hasta el punto en el que la botella rotatoria deja de rodar.

45 El documento US-A- 5.407.809 describe un tambor digestor giratorio para convertir material residual orgánico en abono que tiene interiormente dispuesto a lo largo de su eje longitudinal una serie de tabiques separados, teniendo cada tabique un área en sección transversal variable que oscila desde el 60 al 100% del área en sección transversal del tambor y dispuesto uno con respecto a otro cuando que en el modo parcialmente abierto hace que el material y el aire introducidos en el tambor atraviesen un trayecto no lineal a través del tambor, teniendo el tambor una pluralidad de nervios interiores que se extienden longitudinalmente dispuestos en una agrupación espaciada alrededor de su circunferencia.

## RESUMEN DEL INVENTO

El objeto del invento está definido por la reivindicación 1 independiente.

El presente invento proporciona una botella rotatoria para el cultivo y crecimiento de células que incluye una pared

cilíndrica alargada que tiene un extremo inferior cerrado y una abertura para líquido en un extremo superior opuesto. La pared cilíndrica alargada incluye una pluralidad de pliegues que se extienden axiales longitudinalmente desde el extremo cerrado al extremo superior. La pared cilíndrica alargada incluye además nervios circunferenciales formados de una pieza con ella para reforzar la pared cilíndrica con pliegues.

- 5 Los nervios circunferenciales de refuerzo impiden que las paredes con pliegues se abomben hacia fuera cuando el interior de la botella resulta presurizado hasta el punto en el que la botella rotatoria deja de rodar sobre su estante de rodadura.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 es una vista en perspectiva de una botella rotatoria del presente invento.

La fig. 2 es una vista en sección horizontal del dispositivo de la fig. 1 tomada a lo largo de las líneas 2-2 de la fig. 1.

- 10 La fig. 3 es una vista en sección parcial agrandada de la parte de la botella rotatoria en la fig. 2 designada "3".

La fig. 4 es una vista en sección parcial de la pared de la botella rotatoria de la fig. 1.

La fig. 5 es una vista en perspectiva de una botella rotatoria del presente invento.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

- 15 Con referencia a los dibujos en los que caracteres de referencia similares se refieren a partes similares a lo largo de las distintas vistas de los mismos, se ha mostrado la botella rotatoria 10 del presente invento. La botella rotatoria 10 incluye una pared lateral cilíndrica 14 que se extiende desde una pared inferior 20 a una pared superior opuesta 22. Extendiéndose desde la pared superior 22 y de una pieza con ella hay una parte de cuello 24 que tiene un fileteado extendido 26 para recibir un tapón o capuchón roscado interiormente (no mostrado) en él de la manera usual. Pueden usarse otras conexiones del tapón tales como las conexiones por bayoneta. El cuello 24 puede incluir una disposición de
- 20 bloqueo 28 para mantener un tapón en una posición abierta bloqueada sobre la botella rotatoria para mantener la botella rotatoria abierta al entorno que la rodea.

- La botella rotatoria 10 incluye ondulaciones o pliegues longitudinales 12 que se extienden a lo largo de la pared lateral 14 de la botella rotatoria 10 en la misma dirección que el eje 16 de la botella rotatoria 10. Como puede verse en las figs. 2 y 3, los pliegues individuales 12 proporcionan una pluralidad de superficies 32 opuestas para la formación del crecimiento de células sobre ellas. Esta estructura con pliegues aumenta la superficie activa interior de la botella rotatoria 10 en comparación con una estructura de pared plana convencional.
- 25

Los pliegues 12 de la botella rotatoria del invento están orientados paralelos al eje 16 de la botella 10 de modo que creen ranuras o canales que apunten hacia la abertura para líquidos y transporten fluido a la misma para hacer más fácil la retirada de las células o de los subproductos celulares.

- 30 Aunque el presente invento puede ser construido en distintos tamaños y configuraciones, la estructura preferida de la botella rotatoria actual incluye una botella que es de aproximadamente 27,8 cm de longitud desde la parte superior del cuello 24 a la parte inferior de la base 20. Tal botella configurada define una longitud de superficie de crecimiento de aproximadamente 22,86 cm que tiene un diámetro de aproximadamente 11,76 cm. Como se ha mostrado en la fig. 3, los pliegues que forman las superficies internas enfrentadas 32 definen una estructura generalmente a modo de onda que
- 35 tiene vértices exteriores e interiores 38 y 40, respectivamente. La distancia entre los vértices exteriores 38 de los pliegues es de aproximadamente 0,82 cm. Las superficies enfrentadas 32 de cada pliegue 12 definen un ángulo interior  $\alpha$ . En la presente realización, el ángulo  $\alpha$  34 puede ser de aproximadamente 60°. Adicionalmente, los vértices interiores 40 de dos pliegues adyacentes definen un ángulo interior  $\beta$  36. En la presente realización, el ángulo  $\beta$  puede ser de aproximadamente 9°. Hay que resaltar que los vértices 38 y 40 de los pliegues 12 están deseablemente redondeados para facilitar la adherencia de las células a la superficie interna 32. Además, tales superficies redondeadas son fáciles de
- 40 formar por colada o moldeo y son más fuertes y están menos sujetas al agrietamiento al flexionar.

- Como se ha descrito antes, un problema asociado con las botellas rotatorias con pliegues de la técnica anterior ha sido que los pliegues tienden a expandirse cuando el interior de las botellas resulta presurizado. En uso, la botella rotatoria es cerrada herméticamente y calentada en una incubadora. El calentamiento eleva la presión interior de la botella rotatoria, típicamente de aproximadamente 1 psi. La presión interna en la botella rotatoria puede abombar las paredes hacia fuera. Esto hace que la botella deje de rodar sobre el estante de rodadura. Como resultado, parte de la superficie interior de las botellas se quedan secas, conduciendo a la muerte de las células y a una reducción en la producción del cultivo. El presente invento resuelve una necesidad previendo nervios circunferenciales con el propósito de añadir rigidez a las paredes de la botella con pliegues, para impedir que se expandan hasta el punto en el que la botella deje de rodar sobre el estante de rodadura.
- 45
- 50

Con referencia adicionalmente a la fig. 4, la pared cilíndrica 14 de la botella rotatoria 10 incluye además nervios

circunferenciales 18 para reforzar la pared cilíndrica 14. Los nervios circunferenciales 18 están formados de una pieza con la pared cilíndrica 14. Los nervios circunferenciales 18 definen miembros de tensión que impiden que la botella rotatoria se expanda hacia fuera en respuesta a la presión interna en la botella rotatoria.

5 Como se ha mostrado en la fig. 3, se ha resaltado que en una realización preferida, la pared interior 21 del nervio 18 está al ras con el vértice 38 de los pliegues 12 en la superficie interna 32 de la botella rotatoria 10. En una realización preferida adicional, la pared exterior 23 del nervio 18 está al ras con el vértice 39 de los pliegues 12 sobre la superficie externa 33 de la botella rotatoria 10. Con referencia a la fig. 2, se ha deseado particularmente que la pared exterior 23 del nervio de 18 esté al ras con la pared exterior 31 de las secciones planas 30 para facilitar el transporte de fluido a la abertura para líquidos a lo largo de paneles 30 y eliminar la posibilidad de que el contenido líquido de la botella resulte atrapado en estas áreas.

10 En la realización del invento mostrada en la fig. 1, se han mostrado cuatro nervios longitudinalmente espaciados. Sin embargo, se ha considerado que la botella puede incluir desde dos a diez nervios circunferenciales para el refuerzo, preferiblemente de 3 - 6 nervios uniformemente espaciados a lo largo de la longitud de la botella rotatoria. Más preferiblemente, la botella rotatoria del invento incluye tres nervios uniformemente espaciados a lo largo de la longitud de la botella, como se ha mostrado en la fig. 5. Sin embargo, el invento no está limitado a este número particular de nervios de refuerzo. Se ha resaltado que pueden concentrarse nervios circunferenciales adicionales en el área que necesite el mayor refuerzo.

15 El número de nervios previstos seleccionado para maximizar la resistencia mecánica, al tiempo que se minimiza la pérdida de superficie para el crecimiento de las células. Por ejemplo, se ha encontrado por el autor del presente invento que la superficie interna de una botella rotatoria de aproximadamente  $1.700 \text{ cm}^2$  es de  $1.734 \text{ cm}^2$  en ausencia de nervios radiales 18, en comparación a  $1.694 \text{ cm}^2$ .

20 Como se ha mostrado en las figs. 1 - 2, la botella rotatoria 10 puede incluir además secciones planas 30 que se extienden en sentido longitudinal diametralmente opuestas donde no hay presentes pliegues 12 con el fin de mejorar la visión microscópica del contenido de la botella rotatoria 10 y/o para facilitar su formación. En realizaciones preferidas del presente invento, la botella rotatoria contiene dos secciones planas 30 diametralmente opuestas para facilitar la visión microscópica. La disposición particular de secciones planas 30 mostrada en los dibujos no es crítica. Además la anchura de las secciones planas 30 no es crítica, excepto porque estos paneles también representan una pérdida de incremento de superficie. Un problema asociado con las botellas rotatorias con pliegues de la técnica anterior que tienen secciones planas para visión microscópica ha sido que estas secciones resultan distorsionadas cuando el interior de la botella resulta presurizado, haciendo difícil la visión microscópica. Debe resaltarse que los nervios de refuerzo 18 de la botella rotatoria del invento sirven además para impedir esta distorsión de las secciones planas para permitir una visión microscópica continua.

25 Se ha resaltado que la botella rotatoria 10 puede incluir una parte rebajada (no mostrada) en la pared inferior 20 para facilitar el apilamiento de la botella rotatoria con una botella similar en una relación de anidado.

30 El presente invento proporciona una botella rotatoria con pliegues longitudinalmente que puede ser usada para aumentar el cultivo o la producción de células por unidad bien para células de tipo adherente o bien para células que crecen en suspensión. Se ha hecho resaltar que células de tipo adherente incluyen células que requieren una superficie de soporte para crecer en ellas, así como células capaces de crecer sobre una superficie de soporte. Mediante la frase "aumento en el cultivo o producción de células", se quiere decir que hay un aumento en el número de células y/o sus subproductos o recipiente o unidad de cultivo. Como se ha mostrado en los dibujos aquí, la pared cilíndrica de la parte del cuerpo de la botella rotatoria tiene pliegues longitudinales a lo largo de una parte sustancial de su longitud, ondulando así las superficies interior y exterior de la pared del cuerpo en el recipiente. La ondulación interior aumenta la superficie disponible para la unión y crecimiento de células de tipo adherente, aumentando así el cultivo o la producción de células por recipiente. Además, se ha observado que con respecto a las células que crecen en suspensión, la ondulación interior de la botella rotatoria del invento mejora la citación del cultivo de suspensión y ayuda a dispersar las células y promover el crecimiento del cultivo.

35 Después de que se han formado células sobre las superficies interiores de la botella rotatoria del presente invento haciéndola rodar en el ambiente apropiado para la formación de las células, la botella rotatoria con las células formadas sobre sus paredes es retirada del aparato convencional para botellas rotatorias. El medio líquido en el que se forman las células que permanece en la botella puede ser decantado desde la botella a lo largo de pliegues longitudinales y paneles de visión planos y una pequeña cantidad de solución salina puede ser añadida para impedir que las células se sequen. Alternativamente, el medio líquido puede permanecer si es solamente una pequeña cantidad. Después de ello, puede usarse un aparato rascador para retirar las células de la superficie interior de la botella rotatoria.

40 Un procedimiento más convencional para retirar células es la introducción de una solución que contiene la enzima proteolítica tripsina, junto con un agente quelante, que tiene el efecto de hacer que las células se liberen de la superficie interior para decantarse desde la botella rotatoria a lo largo de los pliegues longitudinales y de las secciones planas

5 longitudinales. Subsiguientemente, la botella es generalmente desechada. Así, la ventaja de proporcionar una botella rotatoria, tal como la del presente invento, que puede ser producida de modo barato mediante moldeo por soplado, usada una vez y desechada es fácilmente evidente. La botella rotatoria del invento proporciona una estructura unitaria que incluye una pared cilíndrica alargada con una superficie muy aumentada para la formación del crecimiento de células en ella, incluyendo además estas paredes cilíndricas nervios de refuerzo a su alrededor y formados de una pieza con ellas con el propósito de reforzar las paredes de la botella. Estos nervios de refuerzo eliminan la necesidad de desecher la botella rotatoria de modo prematuro durante el cultivo debido a la flexión repetida de los pliegues que puede causar fatiga y hacer que la botella deje de rodar sobre el aparato para botellas rotatorias, especialmente durante largos periodos de uso durante el proceso de cultivo de células por lotes. Los nervios de refuerzo radiales impiden el curvado y extensión de los pliegues longitudinales.

10 Al ver en general las condiciones para producir botella rotatoria de acuerdo con el invento, puede ser utilizada una variedad de materiales termoplásticos incluyendo, por ejemplo, poliestireno, polietileno-tereftalato, poliolefinas o poli(cloruro de vinilo). El poliestireno es particularmente deseable ya que parece que las células crecen bien y en grandes cantidades sobre este material.

15 La pared de la botella debería tener un espesor suficiente para proporcionar una botella con resistencia mecánica adecuada cuando se llena con un medio líquido. Típicamente, el espesor de película será desde aproximadamente 25,4 mm - 1,52 mm para una botella rotatoria de 2,25 l. La resina termoplástica usada para formar botellas mediante técnicas de extrusión, soplado o moldeo por soplado - inyección debería ser capaz de fluir fácilmente para formar los pliegues longitudinales y los nervios circunferenciales de refuerzo de la botella.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un contenedor para cultivar el crecimiento de células que comprende: una pared cilíndrica alargada (14) que tiene un extremo inferior cerrado y una abertura para líquidos en un extremo superior opuesto, incluyendo dicha pared cilíndrica alargada:

5 (i) una pluralidad de pliegues (12) que se extienden axiales longitudinalmente que al menos se extienden parcialmente desde dicho extremo cerrado a dicho extremo superior;

caracterizado porque dicha pared cilíndrica (14) incluye además

(ii) al menos un nervio circunferencial (18) formado de una pieza con dicha pared cilíndrica para reforzar dicha pared cilíndrica; y

10 (iii) al menos una sección (30) longitudinal sin pliegues que define un panel de drenaje,

en el que al menos dicho nervio está al ras con las partes más exteriores de dicho panel de drenaje.

2.- El contenedor según la reivindicación 1, en el que el contenedor es una botella rotatoria (10).

3.- El contenedor según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha pared cilíndrica (14) incluye dos secciones longitudinales (30) sin pliegues diametralmente opuestas, cada una de las cuales define un panel.

15 4.- El contenedor según una de las reivindicaciones 1 - 3, en el que extendiéndose desde dicho extremo superior hay una parte de cuello (24) que tiene filetes (26) exteriores de una pieza para recibir un tapón interiormente roscado en ellos.

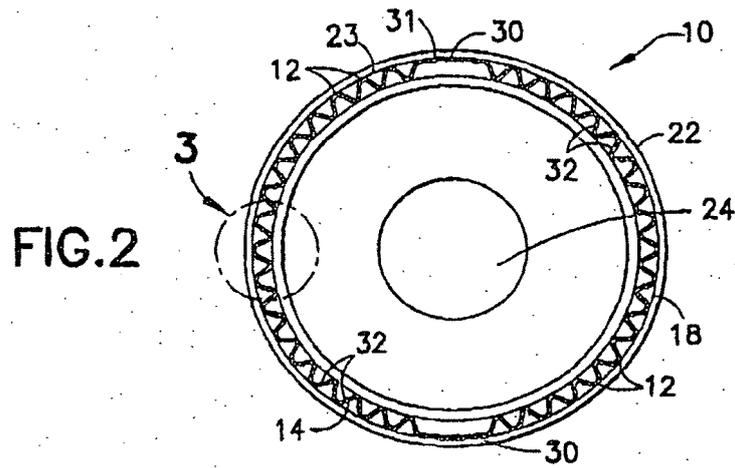
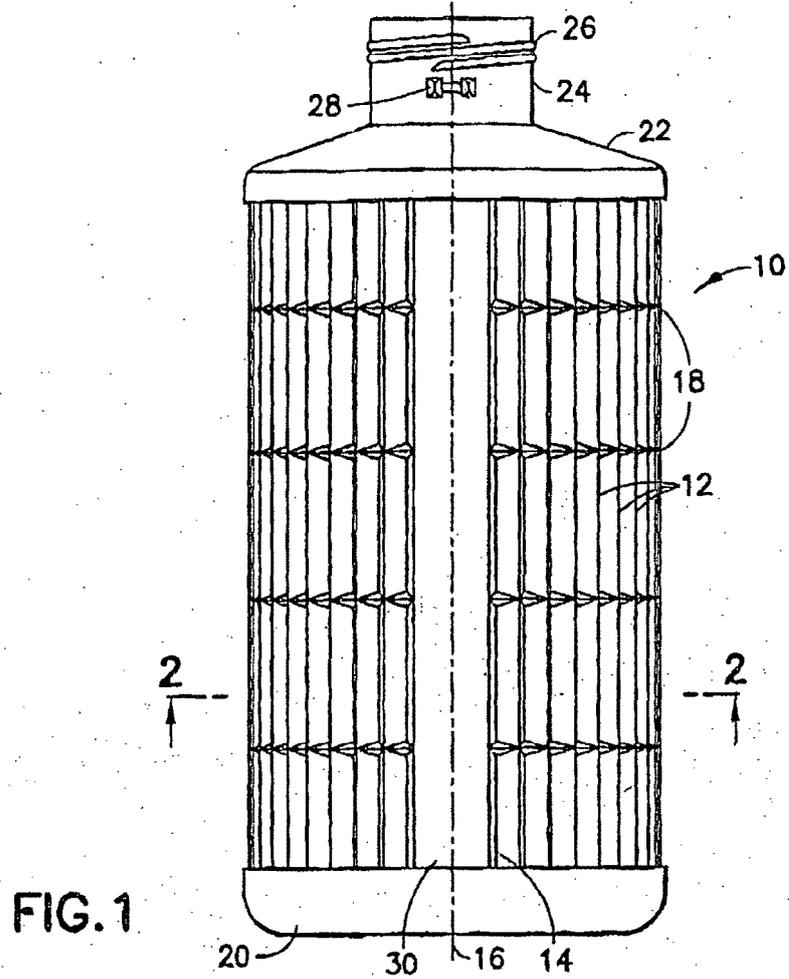
5.- El contenedor según la reivindicación 4, en el que dicha parte de cuello (24) incluye además una disposición de bloqueo (28) para mantener un tapón en una posición abierta bloqueada sobre dicho contenedor para mantener dicho contenedor abierto a un entorno que rodea a dicho contenedor.

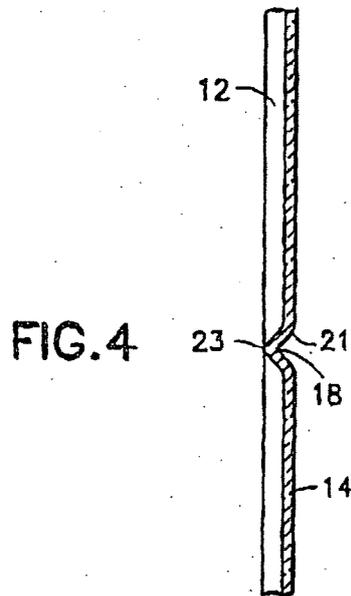
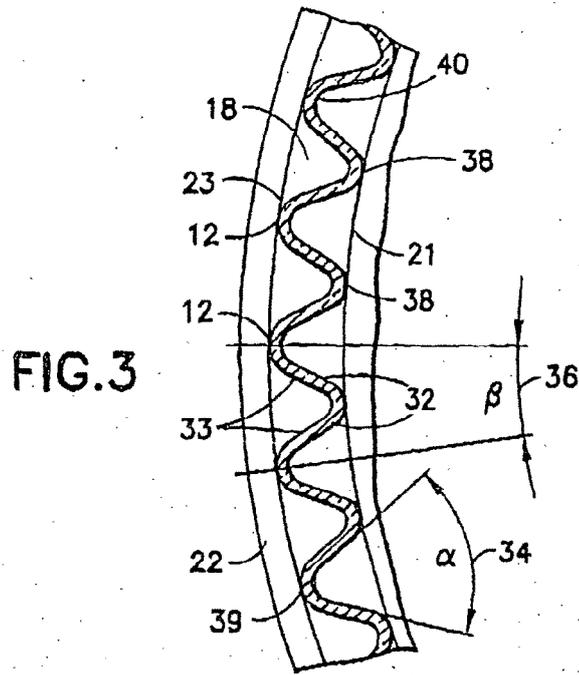
20 6.- El contenedor según una de las reivindicaciones 1 - 5, en el que dichos pliegues (12) definen una pluralidad de superficies interiores (32) opuestas para la formación del crecimiento de células en ellas.

25 7.- El contenedor según una de las reivindicaciones 1 - 6, incluyendo cada uno de dichos pliegues una primera pared lateral que se extiende entre un primer punto de extremidad y un primer vértice (40); y una segunda pared lateral que se extiende entre un segundo punto de extremidad y dicho primer vértice, estando situado dicho primer vértice (40) radialmente más lejos desde un centro longitudinal de dicho contenedor que dichos primer y segundo puntos de extremidad.

8.- El contenedor según la reivindicación 7, en el que dichas primera y segunda paredes laterales están dispuestas de modo convergente con relación a dicho primer vértice (40).

30 9.- El contenedor según la reivindicación 8, en el que dichas primera y segunda paredes laterales definen un ángulo de aproximadamente 60 grados entre ellas.





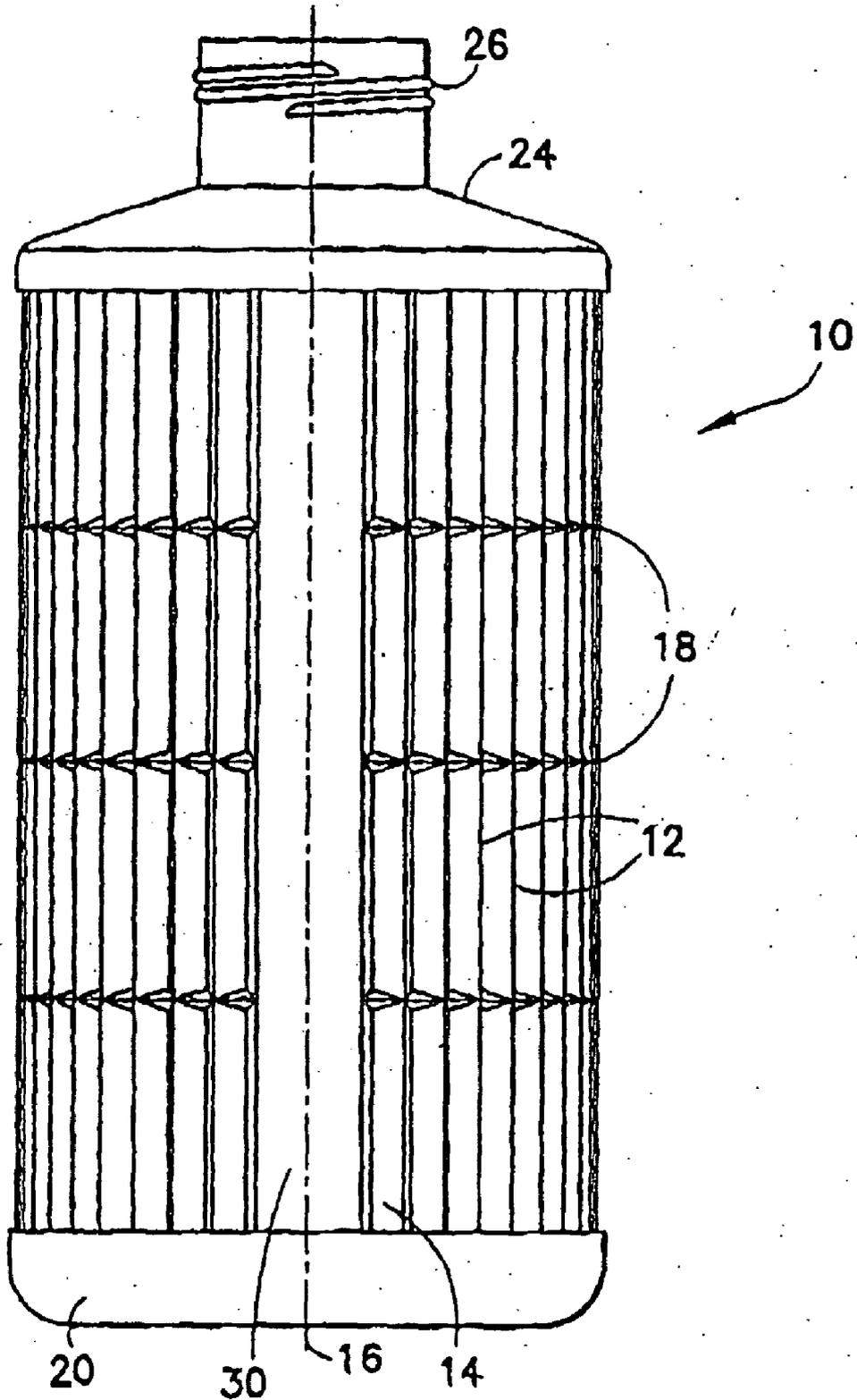


FIG.5