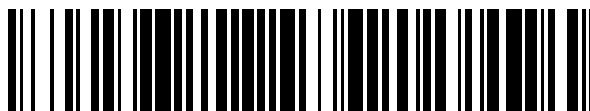


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 412**

51 Int. Cl.:

C12M 1/36 (2006.01)

C12M 3/02 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05723500 .4**

96 Fecha de presentación: **23.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1740693**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Aparato de cultivo continuo con recipiente móvil para la selección de variantes de células filtrantes**

30 Prioridad:
23.02.2004 US 547379 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2012

73 Titular/es:
DE CRECY, EUDES FRANCOIS MARIE (100.0%)
6716 SW 100TH LANE
GAINESVILLE FL 32608, US

72 Inventor/es:
DE CRECY, EUDES FRANCOIS MARIE

74 Agente/Representante:
POLO FLORES, Luis Miguel

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

ES 2 389 412 T3

DESCRIPCIÓN

Aparato de cultivo continuo con recipiente móvil para la selección de variantes de células filtrantes.

Campo de la invención

[0001] La invención descrita proporciona un método y un dispositivo que permite la selección de células vivas, con tasas de reproducción mayores y propiedades metabólicas específicas, en un medio líquido o semisólido. Para el proceso de selección (evolución adaptativa), los organismos genéticamente modificados (mutantes) surgen en una población y compiten con otras variantes del mismo origen. Aquellos con la tasa de reproducción más rápida aumentan en proporción relativa durante el tiempo que conduce a una población (y organismos individuales) con una mayor tasa reproductiva. Este proceso puede mejorar el rendimiento de organismos usados en procesos industriales o con fines académicos.

Antecedentes de la invención

[0002] La selección de una tasa reproductiva mayor (capacidad) requiere un crecimiento sostenible que se consigue mediante la dilución regular de un cultivo en crecimiento. En la técnica anterior esto se conseguía de dos formas: Dilución en serie y cultivo continuo, que difieren principalmente en el grado de dilución.

[0003] El cultivo en serie supone la transferencia repetitiva de una pequeña cantidad de un cultivo a un recipiente mucho mayor que contiene un medio de cultivo fresco. El proceso se repite cuando los organismos cultivados hayan crecido hasta saturación en el nuevo recipiente. Este método se ha usado para conseguir las demostraciones más largas de cultivo sostenido en la literatura (Lenski & Travisano: Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. 1994. Proc Natl Acad Sci USA. 15:6808-14), en experimentos que claramente probaron ser una mejora consistente en la tasa reproductiva durante un periodo de años. Este proceso normalmente se hace de forma manual, con una considerable inversión en mano de obra y está sujeto a contaminación debido a su exposición al exterior. El cultivo en serie por lo tanto no es eficiente, según se describe en el siguiente párrafo.

[0004] La tasa de selección o la tasa de mejora en la tasa reproductiva depende del tamaño de la población (Fisher: The Genetical Theory of Natural Selection. 1930. Oxford University Press, Londres, UK). Además, en una situación como la transferencia en serie en la que el tamaño de la población fluctúa rápidamente, la selección es proporcional a la media armónica ($\bar{N}$) de la población (Wright: Size of population and breeding structure in relation to evolution. 1938. Science 87: 430-431), y por lo tanto puede calcularse por aproximación por la población más baja durante el ciclo.

[0005] El tamaño de la población puede sostenerse y por lo tanto hacer la selección más eficiente mediante cultivo continuo. El cultivo continuo, a diferencia de la dilución en serie, implica un volumen relativamente menor de manera que una pequeña parte del cultivo en crecimiento se reemplaza regularmente por un volumen igual de un medio de cultivo fresco. Este proceso maximiza el tamaño efectivo de la población aumentando su tamaño mínimo durante la dilución cíclica. Los dispositivos que permiten el cultivo continuo se llaman "quimiostatos" si las diluciones tienen lugar en los intervalos de tiempo especificados, y "turbidostatos" si la dilución tiene lugar automáticamente cuando el cultivo crece a una densidad específica.

[0006] En aras de la simplicidad, en adelante se agrupará a ambos tipos de dispositivos bajo el término "quimiostato". Los quimiostatos fueron inventados simultáneamente por dos grupos en los años 50 (Novick & Szilard: Description of the chemostat. 1950. Science 112: 715-716) y (Monod: La technique de la culture continue - Théorie et applications. 1950. Ann. Inst. Pasteur 79:390-410). Los quimiostatos se han usado para demostrar cortos periodos de mejora rápida en la tasa reproductiva (Dykhuizen DE. Chemostats used for studying natural selection and adaptive evolution. 1993. Methods Enzymol. 224:613-31).

[0007] Los quimiostatos tradicionales no son capaces de mantener largos periodos de selección para una tasa reproductiva mayor debido a la no intencionada selección de variantes resistentes a la dilución (estática). Estas variantes son capaces de resistir la dilución adhiriéndose a la superficie del quimiostato, y de esta manera, superan a individuos menos pegajosos incluyendo aquellos con tasas reproductivas más altas, obviando así el fin pretendido para el dispositivo (Chao & Ramsdell: The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. 1985. J. Gen. Microbiol. 131: 1229-36).

[0008] Se ha inventado un método y dispositivo quimiostático (el Motor Genético) para evitar la resistencia a la dilución en cultivo continuo (documento de patente US 6.686.194-B1 solicitado por PASTEUR INSTITUT [FR] & MUTZEL RUPERT [DE]). Este método usa una transferencia de fluido controlada por una válvula para mover periódicamente el cultivo creciente entre dos quimiostatos permitiendo la esterilización y enjuague de cada uno entre los periodos de crecimiento activo del cultivo. Los ciclos regulares de esterilización previenen la selección de variantes resistentes a la dilución al destruirlas. Este método y dispositivo logran el objetivo pero requieren complejas manipulaciones independientes de varios fluidos en un entorno estéril (sellado), incluido uno (NaOH) que es muy cáustico y potencialmente muy reactivo, válvulas que se dañan rápidamente, y que plantean problemas de contención y eliminación de residuos.

[0009] El documento JP 03.030.665 describe un dispositivo de subcultivo automático para organismos microscópicos o células que incluye un tubo flexible en el que el medio de cultivo está lleno y varias válvulas de bloqueo que pueden apretar o soltar dicho tubo y que se desplazan a lo largo del mismo para crear una nueva cámara de crecimiento.

5 [0010] El documento US 6.066.497 describe un aparato celular que comprende, montada en un rotor, una bomba peristáltica con canales que están conectados a botellas que contienen un cultivo celular. La bomba es capaz de vaciar las botellas gracias a los rodillos de la bomba. Los canales no se mueven.

Resumen de la invención

10 [0011] Es por tanto objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado (y completamente independiente) y un dispositivo para cultivo continuo de organismos (que incluye bacterias, arqueas, eucariotas y virus) sin interferencia de variantes resistentes a la dilución. Como otros quimiostatos, el dispositivo proporciona un medio de dilución regular de un cultivo con un medio de cultivo fresco, un medio para intercambio de gas entre el cultivo y el exterior, esterilidad y operación automática como quimiostato o como turbidostato.

15 [0012] La presente invención está diseñada para conseguir este objetivo sin transferencia de fluido, incluyendo las funciones de esterilización y enjuague. Esto representa una ventaja específica de la presente invención con respecto a la técnica anterior en la medida en que evita los riesgos y dificultades asociados con la esterilización y enjuague, incluyendo contención y complejas transferencias de fluido que incluyen solventes cáusticos.

20 [0013] El cultivo continuo se consigue dentro de un tubo estéril flexible lleno de un medio de cultivo. La superficie del medio y de la cámara son estáticas entre sí y ambas se reemplazan regular y simultáneamente por el movimiento peristáltico de la tubería a través de las "puertas" o puntos en los que el tubo está estérilmente subdividido por abrazaderas que previenen que los organismos cultivados se muevan entre regiones del tubo. Para mayor seguridad, las compuertas UV (opcionalmente) también se pueden añadir aguas arriba y aguas abajo del recipiente de cultivo.

25 [0014] El presente método y dispositivo también son una mejora con respecto a la técnica anterior en la medida en que continuamente, en lugar de periódicamente, eliminan por selección la adherencia de variantes resistentes a la dilución a las superficies del quimiostato, ya que el reemplazo de las superficies afectadas tiene lugar en tándem con el proceso de dilución.

30 [0015] El tubo se subdivide de forma transitoria de manera que haya regiones que contengan cultivos saturados (en fase adulta), regiones que contengan un medio fresco, y una región intermedia, denominada cámara de crecimiento, en la que el cultivo se mezcla con el medio fresco para conseguir la dilución. Las compuertas se liberan periódicamente de un punto del tubo y se recolocan en otro punto, de manera que el cultivo junto con su superficie de cámara de crecimiento y organismos estáticos adheridos asociados, se extrae de la cámara de crecimiento por aislamiento y se sustituye por un medio fresco y una superficie de la cámara fresca. Con este método, las variantes estáticas se contraseleccionan específicamente retirándolas de la región en la que tiene lugar la selección (la cámara de crecimiento).

Breve descripción de los dibujos

[0016] Sin ser exhaustiva ni limitadora, una posible configuración general incluirá varios componentes según se describen de aquí en adelante. A continuación se ejemplifica la presente invención en base a una realización preferida, con referencia a los dibujos en los que:

40 la Figura 1 presenta una vista general de una posible configuración del dispositivo en el que:

(1) representa la tubería flexible que contiene las diferentes regiones del dispositivo que son: medio fresco aguas arriba (7), cámara de crecimiento (10), cámara de muestreo (11) y región de cultivo eliminado (15)

45 (2) representa la caja controlada por termostato que permite la regulación de la temperatura de acuerdo a las condiciones determinadas por el usuario, y en las cuales se puede situar:

a. dicha cámara de crecimiento (10),

b. dicha cámara de muestreo (11),

c. compuerta en sentido ascendente (3) que define el comienzo de dicha cámara de crecimiento (10),

50 d. compuerta aguas abajo (4) que define el final de dicha cámara de crecimiento (10) y el comienzo de dicha cámara de muestreo (11)

e. segunda compuerta aguas abajo (5) que define el final de dicha cámara de muestreo (11),

5 f. turbidímetro (6) que permite al usuario o al sistema de control automático monitorizar la densidad óptica del cultivo y opera un sistema de control de retroalimentación (13), que permite el movimiento controlado de la tubería (1) en base a la densidad del cultivo (función de turbidostato),

g. uno o varios agitadores (9).

Cabe señalar que los elementos del dispositivo enumerados en a-g también pueden estar situados fuera de una caja controlada por termostato, o en caso de su ausencia.

10 (7) representa el medio fresco en la tubería flexible sin usar,

(8) representa un cilindro cargado con tuberías llenas de un medio fresco para administrar dicho medio fresco y tubería durante el funcionamiento.

(12) representa las compuertas de radiación ultravioleta opcionales,

15 (13) representa el sistema de control que puede consistir en un ordenador conectado con medios de comunicación a diferentes interfaces de monitoreo o funcionamiento, como turbidímetros de densidad óptica, dispositivos de medición y de regulación de temperatura, agitadores y motores basculantes, etc., que permiten la automatización y el control de operaciones,

(14) representa el cilindro opcional de eliminación en el que se enrolla la tubería que contiene tuberías llenas de cultivo eliminado,

20 (15) representa cultivo eliminado situado aguas abajo de dicha cámara de muestreo.

La Figura 2 presenta dos posiciones del dispositivo posibles, ejemplificando el hecho de que dicha caja controlada por termostato (2) y otras piezas de dicho dispositivo asociadas con dicha cámara de cultivo se pueden bascular varios grados para agitarlas, para hacer circular el gas y eliminarlo y para garantizar la eliminación de las células granuladas (agregadas) que puedan escapar de la dilución asentándose en el fondo. Las Figuras 3 a 9 representan dicha tubería flexible (1) en posición en dicha caja controlada por termostato (2) e introducida por compuertas (3), (4) y (5) a través de las cuales dicha tubería permanecerá durante todos los pasos del proceso y a través de las cuales dicha tubería se moverá conforme a su movimiento peristáltico. La Figura 3 simboliza el estado T0 del dispositivo en el que todas las regiones de dicha tubería flexible están llenas de un medio fresco antes de la inyección del organismo del que se pretende realizar el cultivo continuo. La Figura 4 simboliza el estado T1 de dicha tubería flexible justo antes de la inyección de la cepa de organismos. La Figura 5 simboliza el estado T3 del dispositivo el cual es un periodo de crecimiento durante el cual el cultivo crece en la región definida como cámara de crecimiento (10) limitada por dichas compuertas (3) y (4). La Figura 6 simboliza el estado T3 del dispositivo, justo antes del primer movimiento peristáltico de la tubería y del medio asociado, el cual determina el comienzo del segundo ciclo de crecimiento, introduciendo la tubería y el medio frescos mediante movimiento de la compuerta 3 simultáneamente a una transferencia del volumen equivalente de la tubería, medio y cultivo fuera de la región de la cámara de crecimiento (10) y hacia la región de la cámara de muestreo (11) mediante movimiento de la compuerta 4. Es crítico reconocer que la tubería, el medio que está en la tubería y cualquier cultivo que haya crecido en ese medio se mueven juntos. La transferencia de fluido solo ocurre en la medida en que el medio fresco y el cultivo se mezclan gracias a la agitación en la región de la cámara de crecimiento. La Figura 7 simboliza el estado T4 del dispositivo que es el segundo ciclo de crecimiento; durante este ciclo los organismos que permanecen en la cámara de crecimiento tras el movimiento peristáltico de la tubería ahora pueden crecer usando nutrientes proporcionados en el medio fresco que se mezcla con el cultivo restante durante este paso. La Figura 8 simboliza el estado T5 del dispositivo, justo antes del segundo movimiento peristáltico de la tubería y del medio contenido, el cual determina el comienzo del tercer ciclo de crecimiento, introduciendo la tubería y el medio frescos mediante movimiento de la compuerta 3 simultáneamente con una transferencia del volumen equivalente de la tubería, medio y cultivo fuera de la región de la cámara de crecimiento (10) y hacia la región de la cámara de muestreo (11) mediante movimiento de la compuerta 4. La Figura 9 simboliza el estado T6 del dispositivo que es el tercer ciclo de crecimiento; este paso es equivalente al estado T4 e indica la naturaleza repetitiva de las siguientes operaciones. Pueden extraerse muestras de organismos seleccionados de la región de la cámara de muestreo (11) en cualquier momento usando una jeringa u otros dispositivos de extracción. La Figura 10 presenta un posible perfil de dientes que determinan una compuerta en la configuración que consiste en dos dientes de apilamiento que aprietan la tubería flexible. Las compuertas también se podrían determinar mediante un único diente que haga presión contra una correa móvil, abrazaderas extraíbles u otros mecanismos que prevengan el movimiento de organismos a través de la compuerta y que puedan colocarse y retirarse alternativamente en diferentes posiciones a lo largo de la tubería,

Descripción detallada de la invención

[0017] En las figuras 3 a 9 se ilustra el funcionamiento básico del dispositivo.

[0018] Una configuración posible del presente dispositivo se muestra en la figura 1, tal y como aparece tras haber sido cargado con un tubo fresco del medio estéril (se muestra dividido en regiones A-H por dichas compuertas (3), (4) y (5)).

[0019] La inoculación del dispositivo con el organismo elegido se puede conseguir introduciendo el organismo en la cámara de crecimiento (fig. 3) con una inyección (figura 4, región B). El cultivo podrá entonces crecer hasta la densidad deseada y comenzará el cultivo continuo (fig. 5).

[0020] El cultivo continuo continuará con los movimientos repetitivos de las regiones con compuerta de la tubería. Esto necesita los movimientos simultáneos de las compuertas, la tubería, el medio y cualquier cultivo en la tubería. La tubería siempre se moverá en la misma dirección; la tubería sin usar que contiene el medio fresco (y en adelante denominada 'aguas arriba' de la cámara de crecimiento (7)) se moverá hacia la cámara de crecimiento y mezclará el cultivo que quede ahí proporcionando así el sustrato para que sigan creciendo los organismos ahí contenidos. Antes de la introducción a la región de la cámara de crecimiento, este medio y su tubería asociada se mantendrán en condición estéril con la separación de la cámara de crecimiento por las compuertas aguas arriba (3). La tubería usada que contiene el cultivo será simultáneamente desplazada 'aguas abajo' y separada de la cámara de crecimiento por las compuertas aguas abajo (4).

[0021] La configuración de la compuerta no es un punto específico de la presente solicitud de patente. Por ejemplo, en una configuración dada, las compuertas se pueden diseñar como una cadena de múltiples dientes que se mueven simultáneamente o en otra configuración separados en diferentes cadenas sincronizadas como se ilustra en la figura 1. Las compuertas pueden consistir en un sistema hecho de dos dientes que aprietan el tubo apilándolo como se describe en la figura 10, evitando la contaminación entre las regiones G y H de la tubería gracias a la precisión de la interfaz entre los dientes. En otra configuración, las compuertas estériles se pueden obtener presionando un diente contra un lado de la tubería y de esta manera presionando firmemente la tubería contra un chasis fijo a lo largo del cual la tubería se desliza durante el movimiento peristáltico, como se esboza en las figuras 3 a 9, marcas 3, 4 y 5.

[0022] Dicha caja controlada por termostato (2) se obtiene por medios ya conocidos como un termómetro acoplado a un dispositivo de calefacción y refrigeración.

[0023] La aireación (intercambio de gas), si se necesita para el crecimiento del organismo cultivado o según el diseño del experimento, se consigue directamente y sin asistencia mecánica mediante el uso de tuberías permeables al gas. Por ejemplo y sin ser limitativo, la tubería flexible permeable al gas puede estar hecha de silicona. La aireación se puede conseguir mediante el intercambio con la atmósfera ambiente o mediante el intercambio con una atmósfera artificialmente definida (líquido o gas) que hace contacto con la cámara de crecimiento o con todo el quimioestado. Si un experimento requiere anaerobiosis la tubería flexible puede ser impermeable al gas. Por ejemplo y sin ser limitativo, la tubería flexible impermeable al gas puede estar hecha de silicona revestida o tratada.

[0024] Para condiciones de evolución anaeróbicas se pueden confinar regiones de la tubería en un área atmosférica específica y controlada para controlar la dinámica de intercambio de gas. Esto se puede lograr o bien haciendo que dicha caja controlada por termostato sea hermética y luego inyectándole gas neutral o colocando todo el dispositivo en una habitación de atmósfera controlada.

[0025] La contraselección de variantes estáticas se consigue al reemplazar la superficie de la cámara de crecimiento junto con el medio de cultivo.

[0026] El dispositivo además está diseñado para funcionar en variedad de orientaciones respecto a la gravedad, eso es, a bascular según muestra la figura 2 a lo largo de un rango de hasta 360°.

[0027] Las variantes resistentes a la dilución pueden evitar la dilución adhiriéndose entre sí en vez de a la pared de la cámara si las células agregadas pueden caer aguas arriba y de esta manera evitar su extracción de la cámara. Por consiguiente es deseable que la tubería bascule hacia abajo, de manera que las células agregadas caigan hacia la región que será extraída de la cámara de crecimiento durante un ciclo de movimiento del tubo. Esta configuración supone bascular el dispositivo de manera que las compuertas aguas abajo estén debajo de la compuertas aguas arriba respecto a la gravedad.

[0028] La cámara de crecimiento puede ser despresurizada o sobrepresurizada según las condiciones elegidas por el experimentador. Se pueden emplear diferentes medios para ajustar la presión, por ejemplo aplicando vacío o aire presurizado al medio y tubería frescos a través de su extremidad en sentido ascendente y a través de la cámara de crecimiento; otra forma de despresurizar o sobrepresurizar la tubería se puede hacer alternando el apriete y el cierre de la tubería en sentido ascendente de la cámara de crecimiento.

[0029] Si el medio está contenido en una tubería permeable al gas, puede que se formen burbujas de aire en el medio. Ascenderán a la parte superior de la región sellada de la tubería y quedarán atrapadas allí hasta que el movimiento de la región (y de las compuertas que la definen) libere la región hacia bien la cámara de crecimiento, bien la cámara de muestreo o bien el punto final del quimiostato (figura 6, regiones D-C, B o A, respectivamente). Si el dispositivo se bascula hacia abajo dichas burbujas se acumularán en la cámara de crecimiento o cámara de muestreo y desplazarán el cultivo. El dispositivo está diseñado para bascular hacia arriba periódicamente durante un ciclo de movimiento del tubo, permitiendo la extracción del gas acumulado en dichas cámaras.

[0030] Los movimientos basculantes del dispositivo, y/o la agitación de la cámara de crecimiento por un dispositivo externo (9) se pueden usar para disminuir la agregación de células en la cámara de crecimiento. Alternativamente, en la tubería se pueden incluir una o varias barras de agitación llenas del medio fresco antes de la esterilización y agitadas magnéticamente durante las operaciones de cultivo.

[0031] La longitud proporcional de las regiones del medio fresco definidas por las compuertas aguas arriba comparadas con la longitud de la cámara de cultivo definirán el grado de dilución conseguido durante un ciclo.

[0032] La frecuencia de la dilución puede determinarse cronometrando (función de quimiostato) o por regulación por retroalimentación en la que la densidad del cultivo en la cámara de crecimiento se mide con un turbidímetro (figura 1-marca 6) y el ciclo de dilución tiene lugar cuando la turbidez alcanza un valor de umbral (función de turbidostato).

[0033] La cámara de muestreo permite la retirada del cultivo para analizar el resultado del experimento, recolectar organismos con una tasa de crecimiento mejorada para otros cultivos, almacenamiento o implementación funcional, u otros fines como conteo de la población, comprobación de la composición química del medio o pruebas de pH del cultivo. Para conseguir la monitorización permanente del pH dentro de la cámara de crecimiento, la tubería puede incluir de serie una línea de indicación de pH incrustada en la pared de la tubería.

[0034] Se puede usar cualquier forma de material líquido o semisólido como medio de cultivo en el presente dispositivo. La capacidad de utilizar sustratos de crecimiento semisólidos es un avance notable respecto de la técnica anterior. El usuario puede elegir y definir el medio de cultivo que definirá los procesos metabólicos mejorados por el proceso de selección.

[0035] De ser necesario el presente dispositivo puede contener múltiples cámaras de crecimiento, de manera que las compuertas aguas abajo de una cámara de crecimiento se conviertan en las compuertas aguas arriba de otra. Esto podría, por ejemplo, permitir que un organismo creciera solo en la primera cámara, y luego actuara como fuente nutritiva para un segundo organismo (o virus) en la segunda cámara.

[0036] Este dispositivo y método permiten a los investigadores y desarrolladores de productos desarrollar cualquier cepa de células vivas cultivables en suspensión mediante crecimiento sostenido (cultivo continuo); el organismo mejorado resultante puede constituir una nueva cepa o especie. Estos nuevos organismos pueden identificarse por mutaciones adquiridas durante el cultivo, y estas mutaciones pueden permitir distinguir a los nuevos organismos de las características genotípicas de sus antecesores. Este dispositivo y método permite al investigador seleccionar nuevas cepas de cualquier organismo vivo segregando individuos con tasas de reproducción mejoradas mediante un proceso de selección natural.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La presente lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. A pesar de la extrema diligencia tenida al compilar las referencias, no se puede excluir la posibilidad de que haya errores u omisiones y la OEP queda exenta de todo tipo de responsabilidad a este respecto.

Patentes citadas en la descripción

- US 6686194 B1 [0008]
- JP 03030665 B [0009]
- US 6066497 A [0010]

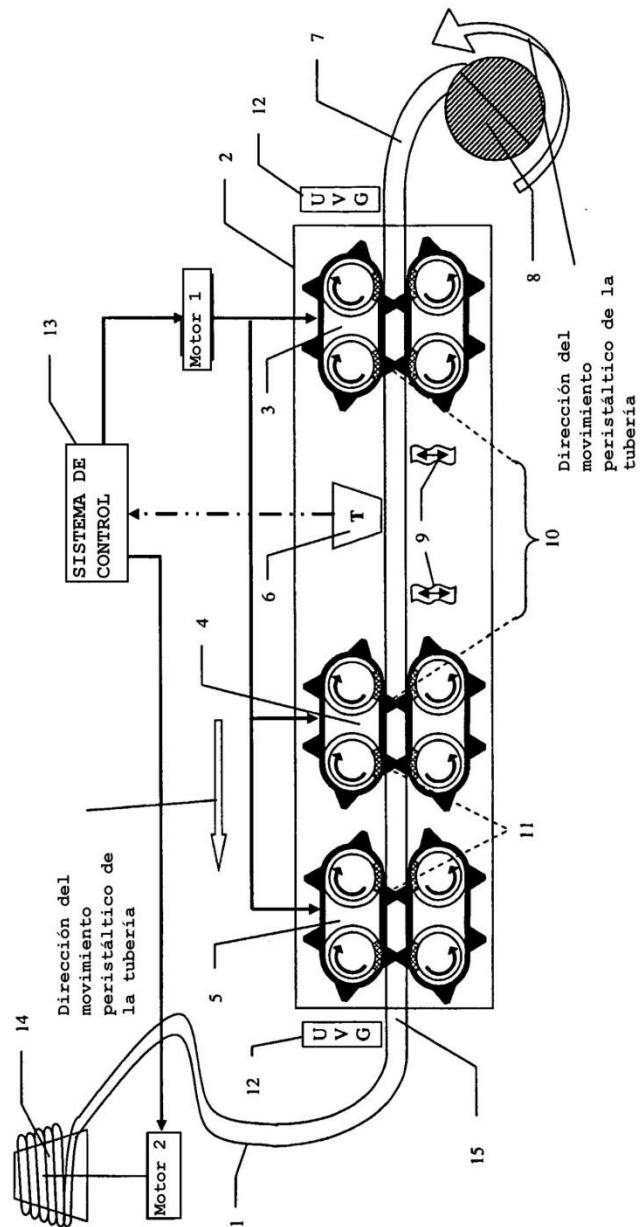
Bibliografía distinta de la de patentes citada en la descripción

- **LENSKI ; TRAVISANO.** Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1994, vol. 15, 6808-14 [0003]
- **FISHER.** The Genetical Theory of Natural Selection. *Oxford University Press*, 1930 [0004]
- **WRIGHT.** Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science*, 1938, vol. 87, 430-431 [0004]
- **NOVICK ; SZILARD.** Description of the chemostat. *Science*, 1950, vol. 112, 715-716 [0006]
- **Monod:** *La technique de la culture continue - Théorie et applications*, 1950, vol. 79, 390-410 [0006]
- **DYKHUIZEN DE.** Chemostats used for studying natural selection and adaptive evolution. *Methods Enzymol.*, 1993, vol. 224, 613-31 [0006]
- **CHAO ; RAMSDELL.** The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 1985, vol. 131, 1229-36 [0007]

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo que mejora la tasa de reproducción (mediante una mayor velocidad de reproducción y/o rendimiento reproductivo) de células vivas en suspensión o cualesquiera organismos cultivables, incluyendo bacterias, arqueas, eucariotas y virus mediante un proceso de selección natural, dicho dispositivo incluye:
 - a) una tubería flexible estéril (1) que contiene un medio de cultivo,
 - 5 b) un sistema de compuertas (3, 4, 5) logrado con abrazaderas que dividen la tubería en:
 - una región aguas arriba que contiene un medio de cultivo fresco (7),
 - una cámara de crecimiento (10) que contiene el cultivo situado entre las regiones aguas arriba y aguas abajo,
 - y una región aguas abajo que contiene cultivo residual (15),
 - 10 c) un medio para mover la tubería (1) con respecto a las compuertas (3, 4, 5), de manera que una porción (B) de la cámara de crecimiento y del cultivo asociado puedan soltarse y separarse de la cámara de crecimiento, y de manera que una porción (D) de la tubería fresca que contiene medio sin usar pueda unirse a una porción (C) del cultivo y del medio asociado ya presente en la cámara de crecimiento,
- 15 **caracterizado porque** la tubería (1), el medio y el cultivo dentro de la tubería se mueven mediante el movimiento peristáltico simultáneo de las compuertas.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho sistema de compuertas además divide la tubería (1) en una cámara de muestreo (11) situada aguas debajo de dicha cámara de crecimiento.
3. El dispositivo según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho sistema de compuertas además divide la tubería (1) en múltiples cámaras de crecimiento, de manera que la compuerta aguas abajo de una cámara de crecimiento se convierta en la compuerta aguas arriba de otra.
- 20 4. El dispositivo según la reivindicación 1-3, en el que la tubería es flexible para permitir el apriete y la segregación en cámaras separadas.
5. El dispositivo según la reivindicación 1-4, en el que dichas compuertas están diseñadas como una o más cadenas de múltiples dientes que se mueven simultáneamente.
- 25 6. El dispositivo según la reivindicación 1-5, en el que dichas compuertas consisten en un sistema hecho de dos dientes que aprietan el tubo apilándolo, evitando la contaminación entre regiones (G, H) de la tubería gracias a la precisión de la interfaz entre los dientes.
7. El dispositivo según la reivindicación 1-6, en el que la tubería es permeable al gas, por ejemplo compuesto principalmente de silicona para permitir el intercambio de gas entre el organismo cultivado y el exterior, según el tipo de experimento.
- 30 8. El dispositivo según la reivindicación 1-6, en el que la tubería es impermeable al gas, para prevenir el intercambio de gas entre el organismo cultivado y el exterior, si el experimento requiere anaerobiosis.
9. El dispositivo según la reivindicación 1-8, en el que la tubería es transparente o translúcida para permitir la medición de la turbidez.
- 35 10. El dispositivo según la reivindicación 9, que además comprende un turbidímetro (6) y un sistema de control (13), para monitorizar la densidad óptica del cultivo y operar un movimiento controlado de la tubería (1) en base a la densidad del cultivo.
11. El dispositivo según la reivindicación 1-10, que además comprende un medio para despresurizar o sobrepresurizar, respecto a la atmosfera ambiente, la tubería de la cámara de crecimiento y medios y cultivos asociados, según lo requieran las necesidades del experimento.
- 40 12. El dispositivo según la reivindicación 1-11, que además comprende una línea de indicación de pH incrustada en la pared de la tubería para conseguir la monitorización permanente del pH dentro de la cámara de crecimiento.
13. El dispositivo según la reivindicación 1-12, que además comprende un medio (2) para calentar o enfriar la tubería de la cámara de crecimiento y los medios y cultivos asociados, según sea apropiado para las condiciones del experimento.
- 45 14. El dispositivo según la reivindicación 1-13, que además comprende un medio (9) para agitar o mantener sin movimiento la tubería de la cámara de crecimiento y los medios y cultivos asociados.

15. El dispositivo según la reivindicación 14, en el que la tubería puede incluir una o varias barras de agitación para agitar.
16. El dispositivo según la reivindicación 1-15, que además comprende un medio (2) para confinar regiones de la tubería a un área atmosférica específica y controlada para controlar la dinámica de intercambio de gas.
- 5 17. El dispositivo según la reivindicación 1-16, que además comprende un medio (2) para bascular la tubería y los medios y cultivos asociados de la cámara de crecimiento bien hacia abajo para eliminar células agregadas o hacia arriba para eliminar aire.
- 10 18. Un método que aumenta la tasa de reproducción de células vivas en suspensión o cualesquiera organismos cultivables, incluyendo bacterias, arqueas, eucariotas y virus mediante un proceso de selección natural, que comprende:
 - a) dividir una tubería flexible estéril (1) que contiene un medio de cultivo (7) mediante el cierre de compuertas (3, 4, 5) en una región aguas arriba (7) que contiene un medio de cultivo fresco, una cámara de crecimiento (10) que contiene el cultivo en crecimiento situado entre las regiones aguas arriba y aguas abajo, una cámara de muestreo (11) situada aguas debajo de dicha cámara de crecimiento, y una región aguas abajo (15) que contiene cultivo residual;
 - 15 b) proporcionar un cultivo inicial en la cámara de crecimiento (10) descrita mediante una inyección estéril de un fermento láctico;
 - c) mantener condiciones de crecimiento según requisitos experimentales;
 - 20 d) después de cierto crecimiento del cultivo aplicar un movimiento peristáltico simultáneo de las compuertas (3, 4, 5) para mover la tubería (1), y el medio y el cultivo dentro de la tubería, a fin de mover porciones iguales de medio fresco y de cultivo (respectivamente) dentro y fuera de la región definida como cámara de crecimiento, permitiendo que la porción restante del cultivo se mezcle con la porción introducida del medio fresco y continúe creciendo;
 - 25 e) reproducir los pasos c) y d) hasta el final del experimento para conseguir cultivo continuo y selección de variantes con mayores tasas reproductivas;
 - f) extracción de una muestra del cultivo de la cámara de muestreo (11) según las necesidades.
19. Un método según la reivindicación 18 en el que el paso c) incluye mantener las condiciones de crecimiento según la temperatura, presión, densidad óptica, acidez química, agitación y/o aireación con varios gases.
- 30 20. Un método según la reivindicación 18 o 19 en el que el paso c) además incluye confinar regiones de la tubería a un área atmosférica específica y controlada para controlar la dinámica de intercambio de gas.
21. Un método según la reivindicación 18-20 en el que el paso c) además incluye una combinación de bascular el dispositivo y hacer funcionar agitadores para agitar convenientemente para mezclar el cultivo para prevenir o reprimir la agregación de organismos vivos.
- 35 22. Un método según la reivindicación 18-21 en el que el paso a) además comprende dividir la tubería en múltiples cámaras de crecimiento, de manera que la compuerta aguas abajo de una cámara de crecimiento se convierta en la compuerta aguas arriba de otra, y en el que el paso b) además incluye proporcionar un segundo organismo en dicha cámara de crecimiento.



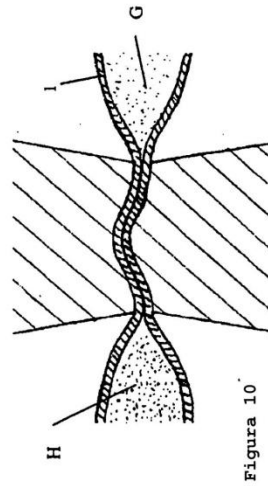
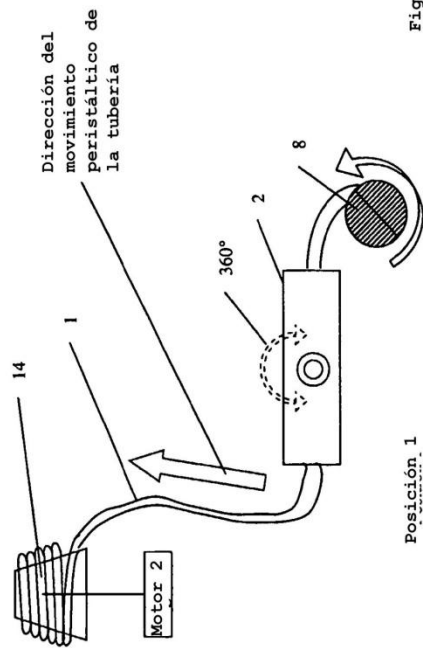
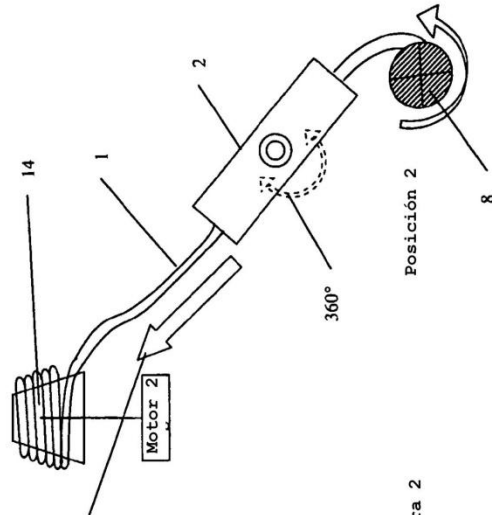


Fig. 3 - Tubo lleno de medio antes de la inyección - Estado T0. Medio fresco en cada región de la tubería A, B, C, D, y E

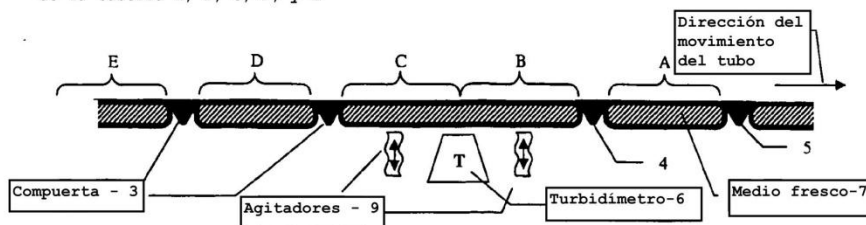


Fig. 4 - Cámara justo después de la inyección - Estado T1, just al comienzo del primer ciclo. Cultivo en crecimiento en las regiones C y B.

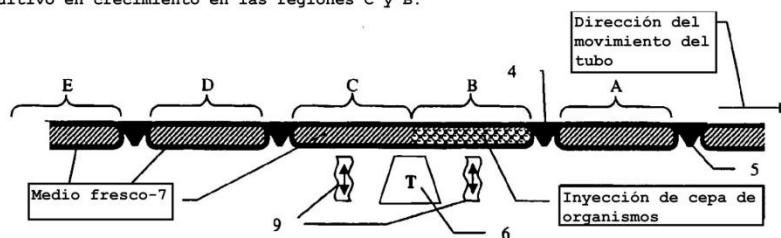


Fig. 5 - Estado T2, durante el primer ciclo de crecimiento. Cultivo en crecimiento en las regiones C y B.

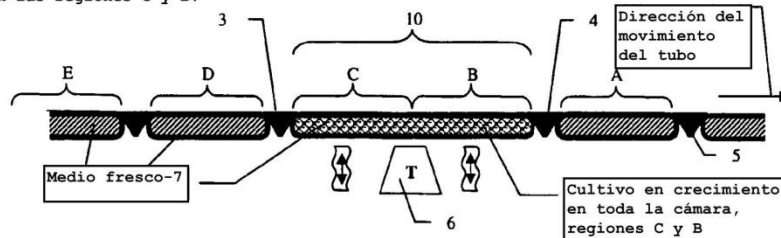


Fig. 6 - Estado T3, justo al comienzo del segundo ciclo de crecimiento, justo después del primer movimiento del tubo. Cultivo en crecimiento en las regiones D y C.

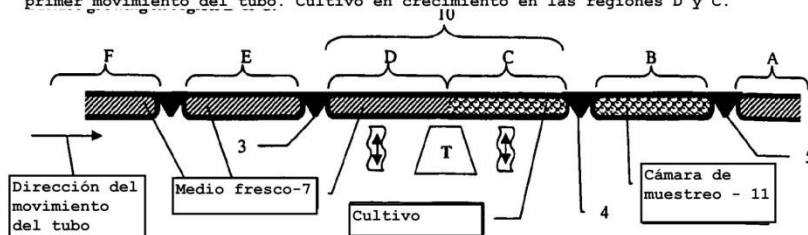


Fig. 7 - Estado T4, durante el segundo ciclo de crecimiento. Cultivo en crecimiento en las regiones D y C.

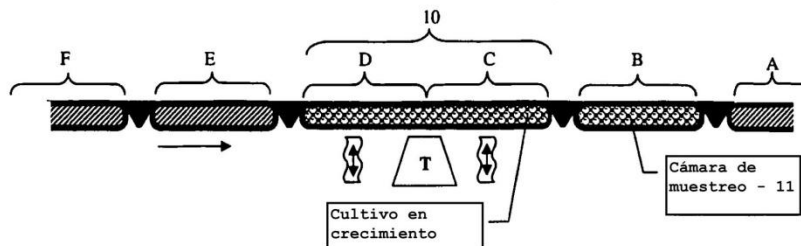


Fig. 8 - Estado T5, justo al comienzo del tercer ciclo de crecimiento, justo después del segundo movimiento del tubo. Cultivo en crecimiento en las regiones E y D.

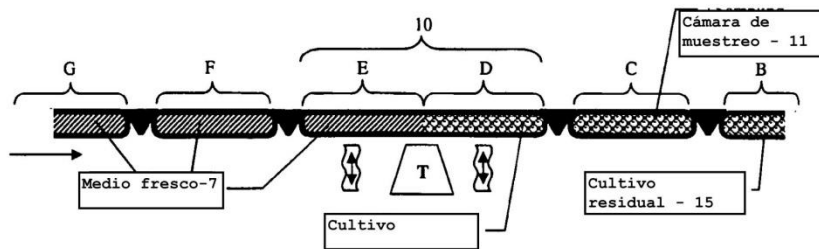


Fig. 9 - Estado T6, durante el tercer ciclo de crecimiento. Cultivo en crecimiento en las regiones E y D.

