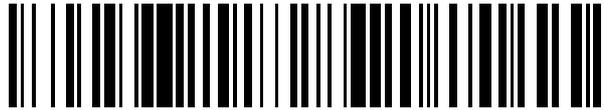


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 092**

21 Número de solicitud: 201230933

51 Int. Cl.:

C12M 3/02 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.12.2013

71 Solicitantes:

AGLARIS CELL S.L. (100.0%)

Madrid 47, 1º B

28901 Getafe (Madrid) ES

72 Inventor/es:

HORNA TOMÁS, David y

COSTA FERRANDO, Miquel

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Método y sistema de cultivo celular**

57 Resumen:

La invención se enmarca dentro de los dispositivos automatizados para el cultivo celular. La invención presenta un método y un sistema de cultivo celular que permite modificar de manera controlada la densidad y el número de células en un cultivo. En concreto, se presenta un método iterativo cuyo número de etapas de iteración se modifica en función de la demanda de densidad y número de células necesarios durante la duración del cultivo.

ES 2 435 092 A1

DESCRIPCIÓN

Método y sistema de cultivo celular

5 **OBJETO DE LA INVENCION**

La invención se enmarca dentro de los dispositivos automatizados para el cultivo celular. La invención presenta un método y un sistema de cultivo celular que permiten modificar de manera controlada la densidad y el número de células en un cultivo. En concreto, se presenta un método iterativo cuyo número de etapas de iteración se modifica en función de la demanda de densidad y el número de células necesarios durante la duración del cultivo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 En el estado de la técnica nos podemos encontrar con biorreactores automatizados, fabricados por empresas como Caridian BCT, PAN-systech o General Electric con su "biorreactor wave".

La solicitud de patente internacional WO 2010/121601 A2 de PAN-systech muestra un biorreactor automático para cultivos celulares en multipocillo.

20 Sin embargo, los dispositivos y métodos conocidos en el estado de la técnica presentan el problema técnico de no ser suficientemente versátiles en el sentido de que no permiten realizar múltiples expansiones celulares dentro de un mismo biorreactor a demanda, lo que causa que la densidad celular y el número total de células no se puedan controlar y modificar con precisión conforme se avanza en el proceso de amplificación, y que el rango de valores en el que se puede trabajar sea estrecho.

Estas limitaciones dificultan en gran medida el uso de biorreactores para la terapia celular.

25 **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

30 Para solucionar los problemas planteados en el estado de la técnica se ha desarrollado un método de cultivo celular según la reivindicación 1 y un sistema de cultivo celular según la reivindicación 10. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones particulares de la invención.

35 *El primer aspecto inventivo de la invención consiste en el mencionado método de cultivo celular y está caracterizado porque se implementa en un sistema que comprende:*

- al menos un dispositivo adaptado para cultivar células, el dispositivo comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción que comprende al menos una superficie interior adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos, y
 - ✓ al menos una precámara en conexión con la al menos una cámara de biorreacción que comprende una entrada para introducir células,

45 y porque comprende las siguientes etapas:

- a) llenar la precámara de medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas de partida con un volumen de líquido predeterminado,
- b) introducir células a través de la entrada de células para introducir células de la precámara,
- 50 c) hacer pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara de biorreacción,
- d) dejar depositar las células y dejarlas reposar un tiempo predeterminado hasta que se adhieren a la al menos una superficie interior adaptada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que a una o unas de las condiciones fisicoquímicas de partida se comporte de manera que favorece la adhesión celular,
- 55 e) circular medio de cultivo a través del dispositivo y a través de los medios de entrada-salida de fluidos
- f) una vez obtenido un número de células objetivo o alcanzada una densidad crítica en la al menos una cámara de biorreacción utilizada para el cultivo, variar al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida del medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas modificadas a las cuales se impide la adhesión celular, de forma tal que el volumen que permanece dentro del dispositivo a unas condiciones fisicoquímicas modificadas queda en las cámaras que se han utilizado para la amplificación celular,
- 60 g) trasladar el medio de cultivo con las células a la precámara, y
 - si se ha alcanzado el número de células objetivo introducir en la precámara un volumen adicional de medio de cultivo y extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de unos medios de salida, o
 - si no se ha alcanzado el número de células objetivo, introducir medio de cultivo adicional en la precámara y
 - 65 repetir las etapas desde c).

El método de la invención tiene por objeto permitir modificar de manera controlada la densidad y el número de células en un cultivo. En concreto, se presenta un método iterativo cuyo número de etapas de iteración se modifica en función de la demanda de densidad y número de células necesario durante la duración del cultivo.

5 En concreto, el método iterativo se inicia con la introducción de medio de cultivo en la precámara del dispositivo de manera que se tenga el medio separado de la al menos una cámara de biorreacción. Es entonces cuando se introducen las células objeto de ser amplificadas y posteriormente se traslada toda la mezcla formada por el medio y las células a la al menos una cámara de cultivo a través de la conexión entre la precámara y la cámara. A lo largo de este documento, se entienden como sinónimos los términos “amplificación celular” y “cultivo celular”. Por otra parte, cuando se habla de condiciones fisicoquímicas se refiere a las condiciones particulares de al menos un parámetro, como la temperatura, el nivel de pH o la concentración salina o similares.

15 Para realizar un proceso de amplificación celular con éxito, es conveniente que las células se adhieran a una superficie donde inician procesos de división celular. Por ello, la siguiente etapa del método comprende dejar reposar las células de manera que se adhieren a una superficie interior del dispositivo en la al menos una cámara de biorreacción adaptada para el cultivo celular. Esta superficie está adaptada para cambiar su adecuación para la adhesión celular en función del valor de al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida, por ejemplo, la temperatura, el pH o la concentración salina, ya sea debido a la naturaleza del material con el que se ha fabricado, o por estar recubierta con un gel o un producto cuyas propiedades varían con la al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida seleccionada, por ejemplo, la temperatura. La al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida del medio de cultivo, por ejemplo una primera temperatura T1, está seleccionada de manera que la característica que presenta la superficie interior a esa temperatura es tal que permite la adhesión celular.

25 Cuando las células se han adherido a la superficie, se procede a iniciar un flujo continuo de medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas de partida. Este flujo continuo dota a las células de nutrientes necesarios, tales como aminoácidos y vitaminas, de manera continuada y renovada para que el ritmo de crecimiento sea constante y óptimo. Así, se lleva a cabo la amplificación celular hasta obtener una densidad de células determinada, a partir de la cual la calidad del cultivo no es la requerida, o un número de células objetivo.

30 Una vez que se ha obtenido esta densidad o este número de células objetivo se varía al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida del medio a unas condiciones fisicoquímicas modificadas, para las cuales, la superficie adaptada para el cultivo celular presenta una característica fisicoquímica tal que permite que las células queden de nuevo en suspensión en el medio.

35 En un ejemplo de realización no limitativo la manera de variar al menos una de las condiciones fisicoquímicas es vaciar las cámaras de biorreacción de medio de cultivo a temperatura T1 y llenar posteriormente las cámaras de cultivo que contienen células de medio a temperatura T2. En un ejemplo particular el volumen de medio que se introduce en cada cámara a las condiciones fisicoquímicas modificadas es el volumen que se ha introducido en cada cámara al inicio del proceso. De esta manera las células a estas condiciones fisicoquímicas modificadas se despegan de las superficies adaptadas para la adhesión celular. Posteriormente, se traslada el medio líquido con las células en suspensión hacia la precámara.

45 Una vez el medio líquido a unas condiciones fisicoquímicas modificadas y las células en suspensión están en la precámara, existen dos opciones:

- o bien se precisa una mayor cantidad de células, en cuyo caso se añade más medio de cultivo a la precámara y se repiten todos los pasos desde c) hasta alcanzar el número de células objetivo, o
- se ha alcanzado el número de células objetivo, en cuyo caso se procede a la extracción del medio líquido con las células en suspensión de la precámara.

50 El método aporta la ventaja técnica de poder controlar en vivo el número de células requerido durante la duración del procedimiento, con la consecuente versatilidad de poder modificar el número de células objetivo final conforme a requerimientos del procedimiento aplicado.

55 En un segundo aspecto inventivo se presenta un sistema de cultivo celular que comprende:

- al menos un dispositivo adaptado para cultivar células, el dispositivo comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción que comprende al menos una superficie interior adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos
 - ✓ al menos una precámara en conexión con la al menos una cámara de biorreacción, que comprende una entrada para introducir células,

65 El sistema también puede utilizarse de manera versátil para diferentes utilidades, por ejemplo para la reprogramación celular o la expansión celular mediante el intercambio de dispositivos extraíbles adaptados cada uno para el tipo de práctica que se realice.

Todas las características descritas en esta memoria (incluyendo las reivindicaciones, descripción y dibujos) pueden combinarse en cualquier combinación, exceptuando las combinaciones de tales características mutuamente excluyentes.

5 **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1: En esta figura se muestra un ejemplo de realización de un sistema según la invención.

Figura 2.1, figura 2.2, figura 2.3, figura 2.4: En estas figuras se muestra un ejemplo particular de una secuencia de etapas del método según la invención aplicado a un ejemplo particular de sistema.

Figura 3: En esta figura se muestra un ejemplo particular de una cámara de biorreacción (2) con superficies adicionales de adhesión celular (39).

20 **EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Sistema de cultivo celular

El sistema de cultivo celular que se presenta en la invención es un sistema que comprende:

- al menos un dispositivo (1) adaptado para cultivar células, el dispositivo (1) comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende al menos una superficie interior (22, 3, 39) adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24),
 - ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende una entrada (5) para introducir células.

El medio de cultivo está contenido en una cámara (7) para contener medio de cultivo celular que se mantiene a las condiciones deseadas de presión, temperatura, pH, nivel de oxígeno y nivel de dióxido de carbono. Para ello, esta cámara (7) para contener medio de cultivo, en un ejemplo de realización, está dotada de sensores de estas condiciones y está conectada a una bombona de oxígeno, a una bombona de dióxido de carbono, a un dispensador de NaOH, a una bombona de nitrógeno que controla la presión (todas estas conexiones con sus correspondientes válvulas) y, en un ejemplo particular, a un intercambiador de calor (11) que permite variar la temperatura, condición fisicoquímica particular en este ejemplo.

La cámara (7) para contener medio de cultivo celular está en conexión con un dispositivo (1) mediante al menos un primer conducto (9) para el transporte de medio de cultivo; al menos un segundo conducto (10) para el transporte de gases que conecta, además, un sistema de alimentación de gases, N₂ en el ejemplo de realización de la figura 1, con el dispositivo (1). Estos al menos un primer y segundo conductos (9, 10) para el transporte, en el ejemplo representado en la figura 1, también disponen de válvulas para controlar el flujo de medio y de gas; una de las válvulas para controlar el flujo de medio permite seleccionar, en el ejemplo de la figura 1 donde la al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida fisicoquímica que varía es la temperatura, entre dos vías alternativas para el medio de cultivo, una de las cuales atraviesa un intercambiador de calor (11) que hace posible acondicionar su temperatura antes de alcanzar el dispositivo (1).

Ventajosamente, en una realización particular del sistema según la invención, el dispositivo (1) es extraíble y dota al sistema de un elemento que puede ser adquirido de manera independiente y estar adaptado al cultivo de diferentes células, como por ejemplo células de mamífero, células bacterianas, etc. Así, el dispositivo adapta el sistema para diferentes fines, con solo intercambiar el dispositivo (1) extraíble en función del procedimiento que se precise realizar.

Método de cultivo celular

El método presentado por la invención está caracterizado porque se implementa en un sistema que comprende:

- al menos un dispositivo (1) adaptado para cultivar células, el dispositivo (1) comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende al menos una superficie interior (22, 3, 39) adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24),
 - ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende una entrada (5) para introducir células,

y porque comprende las siguientes etapas:

- a) llenar la precámara (4) de medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas de partida con un volumen de líquido predeterminado, la precámara (4) estando posicionada de tal forma que el medio de cultivo no pase a la al menos una cámara de biorreacción (2),
- b) introducir células a través de la entrada de células (5) para introducir células de la precámara (4),
- c) hacer pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara de biorreacción (2),
- d) dejar depositar las células y dejarlas reposar un tiempo predeterminado hasta que se adhieren a la al menos una superficie interior (22, 3, 39) adaptada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que a unas condiciones fisicoquímicas de partida se comporte de manera que favorece la adhesión celular,
- e) circular líquido a través del dispositivo (1) y a través de los medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24), hasta obtener un número de células objetivo o hasta alcanzar una densidad crítica en la al menos una cámara de biorreacción (2) llena con medio de cultivo,
- f) una vez obtenido un número de células objetivo o alcanzada una densidad crítica en la al menos una cámara de biorreacción (2, 2', 2'') utilizada para el cultivo, variar al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida del medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas modificadas a las cuales se impide la adhesión celular, de forma tal que el volumen que permanece dentro del dispositivo (1) a unas condiciones fisicoquímicas modificadas queda en las cámaras de biorreacción (2, 2', 2'') que se han utilizado para la amplificación celular,
- g) hacer pasar el medio de cultivo con las células a la precámara (4), y si se ha alcanzado el número de células objetivo, extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de unos medios de salida (24) , o si no se ha alcanzado el número de células objetivo, introducir medio de cultivo adicional en la precámara (4) y repetir las etapas desde c).

En un ejemplo de realización en la primera etapa solo se llena una cámara de biorreacción (2) para el cultivo celular. La precámara (4) del dispositivo (1) se llena de medio de cultivo, en un ejemplo particular a través de una válvula (13), como se observa en las figuras 1 y 2. La cantidad de medio de cultivo que se acumula en la precámara (4) antes de cerrar esta válvula (13) es, habitualmente aunque no siempre, igual al volumen de la primera cámara de biorreacción (2). En este ejemplo solo se llena una cámara de biorreacción (2) en la primera etapa. Antes de llenar la cámara de biorreacción, se introducen en la precámara (4) las células por la entrada (5) para introducir células para que queden en suspensión en el medio de cultivo.

En el ejemplo particular de la figura 1, el medio de cultivo con las células en suspensión se hace pasar a la primera cámara de biorreacción (2) mediante el movimiento del dispositivo (1) y la introducción de nitrógeno a través de la válvula (15) ya que es inerte para las células. El dispositivo (1) es movido mediante un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1). En el ejemplo particular de la figura 1 se representa un dispositivo (1) con tres cámaras de biorreacción (2, 2', 2''):

En un ejemplo particular la precámara (4) está en conexión con la primera cámara de biorreacción (2) mediante una segunda válvula (14) que está situada en la parte de la pared que las separa próxima a una esquina de la precámara.

En el ejemplo particular representado en la figura 2.2, el dispositivo (1) varía su posición de horizontal a vertical, entendiéndose por posición vertical aquella para la cual la pared más alargada del dispositivo (1) se sitúa en dirección vertical, y por posición horizontal aquella dirección para la cual la pared más alargada del dispositivo (1) se sitúa en dirección horizontal, por medio de un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1), como se ve en la figura 1, que en esta realización particular es un motor capaz de transferir un movimiento de rotación.

La segunda válvula (14) queda en una posición tal que el medio de cultivo con las células en suspensión queda en la precámara (4) a una altura igual o superior a la misma, pudiendo por tanto pasar a través de ella. Para facilitar el traslado del medio fluido entre la precámara (4) y la cámara de biorreacción (2), la precámara (4), en un ejemplo particular, comprende una válvula (15) de entrada para gases conectada a una bombona de nitrógeno y la última cámara de biorreacción (2''), que en este ejemplo es la tercera, comprende una segunda válvula (19) de salida para gases. Así, el traslado del medio de cultivo con las células en suspensión es facilitado inyectando, en este caso particular, nitrógeno ya que es inerte para las células.

Una vez el medio de cultivo con las células en suspensión ha pasado a la primera cámara de biorreacción (2), el mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) mueve el dispositivo (1) a una posición tal que la segunda válvula (14) entre la precámara (4) y la primera cámara de biorreacción (2) queda, en este ejemplo particular, a una altura igual o superior a la del medio de cultivo con células en suspensión, y de este modo el medio de cultivo queda en la cámara de biorreacción (2) sin posibilidad de tener una vía de escape hacia la precámara (4). Esta etapa se muestra en la figura 2.3.

La cámara de biorreacción (2) comprende en su interior, en un ejemplo de realización como el mostrado en la figura 3, una serie de superficies adicionales de adhesión celular (39), que pueden tener forma esférica o tubular, entre otras formas, para que la superficie útil de cultivo sea mayor que la que permiten las superficies interiores (22, 3) adaptadas para el cultivo celular de la cámara de biorreacción (2). Las superficies adicionales de adhesión celular (39) son, en un ejemplo particular, una pluralidad de biomoléculas, preferentemente proteínas, péptidos o moléculas sintéticas activas biológicamente comprendidas en al menos una superficie interna del dispositivo.

Para que la adhesión sea posible, las superficies adicionales de adhesión celular (39) y las superficies interiores (22, 3) adaptadas para el cultivo celular de la cámara de biorreacción (2) están cubiertas, en una realización particular, de un gel que cambia sus propiedades fisicoquímicas con la temperatura. En un ejemplo particular este gel es poly (n-isopropil acrilamida). A 37°C, este gel es adecuado para la adhesión celular y permite que las células se adhieran a las superficies (3, 22, 39) cubiertas por el gel facilitando la amplificación celular. En un ejemplo particular, no se utiliza un gel sino que las superficies interiores (3, 22, 39) adaptadas para el cultivo celular de la cámara de biorreacción (2) están adaptadas para cambiar sus propiedades en función de la temperatura para permitir la adhesión celular.

Cuando la adhesión celular ha tenido lugar, nuevo medio de cultivo a una temperatura tal que la superficie interior (3, 22, 39) adaptada para el cultivo mantiene las condiciones fisicoquímicas que facilitan la adhesión celular circula continuamente por el dispositivo, entrando, en el ejemplo particular mostrado en la figura 1, por la válvula (13) de entrada de medio de la precámara (4) y saliendo por las válvulas de salida (14, 17, 18, 23) de medio. Ventajosamente, al hacer que el flujo de medio sea continuo, el medio es renovado a las condiciones requeridas para el cultivo celular.

En un ejemplo de realización el sistema comprende unos sensores de concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura situados tras la válvula de salida (17), para controlar los niveles de estas variables durante el proceso de amplificación.

En un ejemplo particular, como el representado en la figura 1, se utiliza una unidad de control (20) que comprende un sistema de control óptico (21) para controlar la densidad y el número de células, y detener la amplificación cuando se alcance el número de células objetivo.

El dispositivo (1), que está colocado en esta etapa del proceso horizontalmente, tiene en esta realización una superficie transparente (22); bajo esta superficie transparente (22), que puede estar cubierta de gel y sobre la cual, por tanto, se adhieren y multiplican las células en esta etapa, se encuentra situado al menos un microscopio que mide el número de células y la densidad celular. Este microscopio óptico transmite esta información a la unidad de control (20) y así el sistema funciona de modo automático.

Una vez que se ha obtenido el número de células objetivo o que la densidad de células alcanza un valor a partir del cual la calidad del cultivo es inferior a la requerida, se varían las condiciones fisicoquímicas del medio que circula en forma de flujo continuo a unas condiciones fisicoquímicas modificadas, para las cuales, la superficie interior (3, 22, 39) adaptada para el cultivo celular presenta una característica fisicoquímica tal que permite que las células queden de nuevo en suspensión en el medio. Para ello, una vez que el dispositivo (1) ha alcanzado unas condiciones fisicoquímicas modificadas, por ejemplo una temperatura T2 debido a la entrada de flujo a esta temperatura, se detiene el flujo continuo de medio y se deja reposar en el dispositivo (1) hasta que las células quedan de nuevo en suspensión. Posteriormente, se traslada el medio líquido con las células en suspensión hacia la precámara (4). En el ejemplo particular de la figura 1, cuando se alcanza el número de células objetivo o la densidad máxima, las cuales se detectan automáticamente en la realización particular mostrada en la figura 1 mediante la unidad de control (20) que dispone de un sistema de control óptico (21), el medio de cultivo que circula de forma continua se hace circular a una temperatura T2 un tiempo suficiente como para que esta temperatura sea uniforme en toda el dispositivo (1). A esta temperatura las superficies interiores (3, 22, 39) adaptadas para el cultivo celular presentan propiedades no apropiadas para la adhesión celular, con lo que las células vuelven de nuevo a quedar suspendidas perdiendo su adhesión a la superficie o superficies adaptadas para el cultivo. En un ejemplo particular se hace pasar el medio de cultivo desde la salida de la cámara (7) para contener medio de cultivo celular por unos conductos (9) de transporte que comprenden un intercambiador de calor (11); de este modo, la temperatura cambia de T1 a T2.

En un ejemplo particular la temperatura T2 es 24°C ya que el gel poly (n-isopropil acrilamida) utilizado en este ejemplo de realización se comporta de manera que a esta temperatura las células no se adhieren.

Posteriormente se interrumpe el flujo continuo de medio de forma tal que el volumen que permanezca dentro del dispositivo sea igual al de la cámara de biorreacción (2) utilizada para la amplificación, y que todo este volumen de medio a temperatura T2 quede en la primera cámara de biorreacción (2).

5 Cuando las células se han separado y vuelven a estar en suspensión en el medio de cultivo, se traslada el medio de cultivo con las células en suspensión a la precámara. En el ejemplo de las figuras 1, 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, el dispositivo (1) es girado, en un ejemplo particular, con ayuda de un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) en sentido contrario al paso anterior de la figura 2.3 hasta alcanzar la posición mostrada en la figura 2.4, de modo que queda en posición vertical, con la segunda válvula (14) al mismo nivel o inferior que el medio de cultivo con las células en suspensión. En esta posición, y con la ayuda de los cambios de presión que inducen las válvulas de entrada y salida (15, 19) de un gas, en un ejemplo particular nitrógeno, se traslada el medio de cultivo con las células en suspensión a la precámara (4).

10 Si se continuase con el cultivo en la primera cámara para obtener mayor número de células totales, la calidad del cultivo disminuiría al acumularse un número elevado de células compartiendo una superficie de crecimiento limitada. La ventaja que aporta el método iterativo según la invención, es que el número de células cultivadas es mayor conforme se van necesitando más, pero sin que sea a costa de una densidad tal que la calidad del cultivo se vea mermada. Para ello se procede al llenado de una segunda cámara de biorreacción (2'), lo que da lugar a una nueva iteración del método según la invención, ya que no se ha alcanzado el número de células objetivo final y la calidad de las células siendo amplificadas en la primera cámara de biorreacción (2) se ve afectada por la densidad que adquiere el medio de cultivo con las células. El ejemplo de realización de la invención sigue como se describe a continuación:

20 Se llena la precámara (4) con una cantidad adicional de medio de cultivo que llega a través de los conductos (9) de transporte desde la cámara (7) para contener medio de cultivo celular y entra a través de la válvula (13). Esta cantidad adicional de medio de cultivo tiene un volumen habitualmente igual al de la segunda cámara de biorreacción (2'). De esta forma, el volumen total de medio de cultivo en la precámara (4), en esta etapa de este ejemplo de realización, es igual a la suma de la capacidad de la primera cámara de biorreacción (2) más la segunda cámara de biorreacción (2').

30 La segunda válvula (14) está en una posición tal que el medio de cultivo con las células en suspensión queda en la precámara (4) a una altura igual o superior a la misma, pudiendo por tanto pasar a través de ella. Para facilitar el traslado del medio fluido de entre la precámara (4) y las cámaras de biorreacción (2, 2'), la precámara (4), en un ejemplo particular, comprende una válvula (15) de entrada para gases conectada a una bombona de nitrógeno. La última cámara de biorreacción (2''), que en este ejemplo es la tercera, comprende una válvula (19) de salida para gases. Así, el traslado del medio de cultivo con las células en suspensión es facilitado inyectando, en este caso particular, nitrógeno ya que es inerte para las células.

35 En el ejemplo de realización mostrado en la figura 1, las cámaras de biorreacción (2, 2') están en comunicación mediante una tercera válvula (18), que permite el paso de medio de cultivo entre ambas. En esta etapa de esta realización particular, cuando todo el medio de cultivo abandona la precámara (4) las cámaras de biorreacción (2, 2') están llenas.

40 Una vez el medio de cultivo con las células en suspensión ha pasado a la primera cámara de biorreacción (2) y a la segunda cámara de biorreacción (2'), el mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) mueve el dispositivo (1) de nuevo a una posición tal que la segunda válvula (14) entre la precámara (4) y la primera cámara de biorreacción (2) queda, en este ejemplo particular, a una altura igual o superior a la del medio de cultivo con células en suspensión, y de este modo el medio de cultivo queda en la cámaras de biorreacción (2, 2') sin posibilidad de tener una vía de escape hacia la precámara (4).

50 En un ejemplo de realización particular, la primera cámara de biorreacción (2) y la segunda cámara de biorreacción (2') tienen una serie de superficies adicionales de adhesión celular (39), que pueden tener forma esférica o tubular, entre otras formas, para que la superficie útil de cultivo sea mayor que la que permiten las superficies interiores (3, 22) adaptadas para el cultivo celular de ambas cámaras de biorreacción (2, 2'). Para que la adhesión sea posible, las superficies adicionales de adhesión celular (39) y las superficies interiores (3, 22) adaptadas para el cultivo celular de las cámaras de biorreacción (2, 2') están cubiertas, en una realización particular, de un gel que cambia sus propiedades con la variación de una condición fisicoquímica determinada, en este ejemplo la temperatura. En un ejemplo particular este gel es poly (n-isopropil acrilamida). A 37°C, este gel es tal que permite que las células se adhieran a las superficies (3, 22, 39) cubiertas por el gel facilitando la división celular. En un ejemplo particular, no se utiliza un gel sino que las superficies interiores (3, 22, 39) adaptadas para el cultivo celular de las cámaras de biorreacción (2, 2') están adaptadas para cambiar sus propiedades en función de la temperatura para permitir la adhesión celular.

60 Cuando la adhesión celular ha tenido lugar, nuevo medio de cultivo a una temperatura tal que las superficies interiores (3, 22, 39) adaptadas para el cultivo mantienen las propiedades que facilitan la adhesión celular circula continuamente por el dispositivo, entrando, en el ejemplo particular mostrado en la figura 1, por la válvula (13) de entrada de medio de la precámara (4) y saliendo por la válvula de salida (17) de medio de la última cámara (2'') que se pretende llenar. Ventajosamente, al hacer que el flujo de medio sea continuo, el medio es renovado a las condiciones requeridas para el cultivo celular.

En un ejemplo de realización el sistema comprende unos sensores de concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura situados tras la válvula de salida (17), para controlar los niveles de estas variables durante el proceso de amplificación.

5 En un ejemplo particular, como el representado en la figura 1, se utiliza una unidad de control (20) que comprende un sistema de control óptico (21) para controlar la densidad y el número de células, y detener la amplificación cuando se alcance el nivel objetivo.

10 El dispositivo (1), que está colocado en esta etapa del proceso horizontalmente, tiene en esta realización una superficie transparente (22); bajo esta superficie transparente (22), que puede estar cubierta de gel y sobre la cual, por tanto, se adhieren y multiplican las células en esta etapa, se encuentran situados una serie de microscopios que miden el número de células y la densidad celular. Estos microscopios ópticos transmiten esta información a la unidad de control (20) y así el sistema funciona de modo automático.

15 Cuando se alcanza la densidad a partir de la cual la calidad del cultivo no es la requerida o el número de células deseados, los cuales se detectan automáticamente en la realización particular mostrada en la figura 1 mediante la unidad de control (20) que dispone de un sistema de control óptico (21), el medio de cultivo que circula de forma continua cambia el valor de la al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida seleccionada, en este ejemplo la temperatura, a una temperatura T2 un tiempo suficiente como para que esta temperatura sea uniforme en toda el dispositivo (1). A esta temperatura las superficie interiores (3, 22, 39) adaptadas para el cultivo celular presentan características fisicoquímicas no adecuadas para la adhesión celular, con lo que las células vuelven de nuevo a ser suspendidas perdiendo su adhesión a la superficie o superficies adaptadas para el cultivo. En un ejemplo particular se hace pasar el medio de cultivo desde la salida de la cámara (7) para contener medio de cultivo celular por unos conductos (9) de transporte que comprenden un intercambiador de calor (11); de este modo, la temperatura cambia de T1 a T2.

20 En un ejemplo particular la temperatura T1 es 37°C y la temperatura T2 es 24°C. ya que el gel poly n-isopropil acrilamida utilizado en este ejemplo de realización se comporta de manera apropiada para la adhesión celular a 37°C y de manera no apropiada para la adhesión celular a 24°C.

30 Posteriormente se interrumpe el flujo continuo de medio de forma tal que el volumen que permanezca dentro del dispositivo sea igual a la suma de los volúmenes de las cámaras de biorreacción (2, 2') utilizadas para la amplificación, y que todo este volumen de medio a temperatura T2 quede en estas dos cámaras de biorreacción (2, 2').

35 Cuando las células se han separado y vuelven a estar en suspensión en el medio de cultivo, el dispositivo (1) es girado con ayuda del mecanismo (16) para mover el dispositivo (1), en el ejemplo particular de la figura 1, de modo que queda en posición vertical, como indica la figura 2.4, con la segunda válvula (14) al mismo nivel o inferior que el medio de cultivo con las células en suspensión. En esta posición, y con la ayuda de los cambios de presión que inducen las válvulas de entrada y salida de gases (15, 19), en un ejemplo particular nitrógeno, se traslada el medio de cultivo con las células en suspensión a la precámara (4).

45 Si se continuase con el cultivo en la primera y segunda cámara para obtener mayor número de células totales, la calidad del cultivo disminuiría al acumularse un número elevado de células compartiendo una misma superficie de crecimiento. La ventaja que aporta el método iterativo según la invención, es que el número de células cultivadas es mayor conforme se van necesitando más, pero sin que sea a costa de una densidad tal que la calidad del cultivo se vea mermada. Para ello se procede al llenado de una tercera cámara de biorreacción (2''), lo que da lugar a una nueva iteración del método según la invención. Los pasos que en este ejemplo son similares a los descritos anteriormente para el llenado de una cámara de biorreacción y de dos cámaras de biorreacción, y todas las realizaciones particulares consideradas son aplicables igualmente. En concreto, en el ejemplo de realización mostrado en la figura 1, las cámaras de biorreacción (2, 2', 2'') están en comunicación mediante unas válvulas (18, 23), que permiten el paso de medio de cultivo entre ambas.

50 En la realización particular mostrada en la figura 1, que comprende tres cámaras de biorreacción, esta tercera cámara de biorreacción (2'') corresponde a la última cámara de biorreacción que se pretende llenar, de manera que comprende la válvula de salida de gases (19) y la válvula de salida de medio (17).

55 En este ejemplo de realización particular, cuando el medio de cultivo con las células en suspensión es trasladado, de la forma descrita anteriormente, a la precámara (4) a través de las válvulas (14, 18, 23), ya no puede continuarse el cultivo celular sin un deterioro en la calidad del cultivo.

60 En el ejemplo de realización de la figura 1, una vez se ha alcanzado el número de células objetivo mediante el sucesivo llenado de las tres cámaras anteriormente explicado, se traslada al medio de cultivo desde la precámara (4) hacia una válvula final (24) de salida de manera que el medio de cultivo abandona el dispositivo (1).

65

En una realización particular, el medio de cultivo que es trasladado desde el dispositivo (1) pasa a través de un sistema de filtrado (25) en el cual las células se separan del medio de cultivo del modo siguiente:

5 En una realización particular, el sistema de filtrado (25) comprende una cámara (26) para contener medio líquido, tal como líquido tamponado, y unos conductos (27) entre dicha cámara para contener líquido y el sistema de filtrado (25). Este sistema de filtrado (25) comprende unos medios de entrada-salida para el líquido y unos medios de entrada-salida para el medio de cultivo. En ambos casos, los medios de entrada-salida son válvulas en una realización particular. En la realización particular de la figura 1, el medio de cultivo entra al sistema de filtrado (25) a través de una válvula (28) y sale del sistema de filtrado a través de la válvula (32); el líquido, a su vez, entra al sistema de filtrado (25) a través de una válvula (29) y sale del sistema de filtrado a través de una válvula (30).

15 El sistema de filtrado (25) comprende en su interior un filtro (31) que, en una realización particular, comprende un vibrador (37). El filtro (31) retiene las células en suspensión en el medio de cultivo; en la realización particular correspondiente, las células se separan del filtro (31) mediante el movimiento que el vibrador (37) provoca en el filtro (31). El líquido que, en una realización particular, entra en el sistema de filtrado (25) a través de la válvula (29), recoge las células de modo que quedan en suspensión en él; en esta realización particular, el líquido, que en una realización particular es un líquido tamponado, sale del sistema de filtrado (25) a través de la válvula (30). Por tanto, a la salida de dicha válvula (30) se tiene líquido con una concentración de células determinada (concentración C). El medio de cultivo, en la realización particular de la figura 1, sale del sistema de filtrado (25), sin células en suspensión, a través de la válvula (32).

25 En una realización particular, el sistema comprende un sistema de esterilización (33). Concretamente, en la realización particular mostrada en la figura 1, el sistema de esterilización (33) comprende una cámara (34) para contener sustancia esterilizadora, una bomba (35) para bombear sustancia esterilizadora a través de los conductos (9, 10) para el transporte y una válvula (36) que regula la entrada de sustancia esterilizadora en el resto del sistema.

REIVINDICACIONES

1. Método de cultivo celular caracterizado porque está implementado en un sistema que comprende:

- al menos un dispositivo (1) adaptado para cultivar células, el dispositivo (1) comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende al menos una superficie interior (3, 22, 39) adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24), y
 - ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara de biorreacción (2), que comprende una entrada (5) para introducir células,

y porque comprende las siguientes etapas:

- a) llenar la precámara (4) de medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas de partida con un volumen de líquido predeterminado,
- b) introducir células en la precámara (4) a través de la entrada de células (5),
- c) hacer pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara de biorreacción (2),
- d) dejar depositar las células y dejarlas reposar un tiempo predeterminado hasta que se adhieren a la al menos una superficie interior (3, 22, 39) adaptada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que a una o unas condiciones fisicoquímicas de partida se comporte de manera que favorece la adhesión celular,
- e) circular medio de cultivo a través del dispositivo (1) y a través de los medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24),
- f) una vez obtenido un número de células objetivo o alcanzada una densidad crítica en la al menos una cámara de biorreacción (2, 2', 2'') utilizada para el cultivo, variar al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida del medio de cultivo a unas condiciones fisicoquímicas modificadas a las cuales se impide la adhesión celular, de forma tal que el volumen que permanece dentro del dispositivo (1) a unas condiciones fisicoquímicas modificadas queda en las cámaras de biorreacción (2, 2', 2'') que se han utilizado para la amplificación celular,
- g) hacer pasar el medio de cultivo con las células a la precámara (4), y si se ha alcanzado el número de células objetivo, extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de unos medios de salida (24), o si no se ha alcanzado el número de células objetivo, introducir medio de cultivo adicional en la precámara y repetir las etapas desde c).

2. Un método según la reivindicación 1 caracterizado porque la al menos una de las condiciones fisicoquímicas de partida que se varía es la temperatura.

3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende controlar automáticamente el número y/o la densidad de células mediante al menos una unidad de control (20) adaptada para controlar el cultivo celular llevado a cabo en el dispositivo (1).

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el control del número y/o la densidad de células se realiza por medio de una unidad de control (20) que comprende un sistema de control óptico (21) y a través de una superficie transparente (22) comprendida en el dispositivo, el control del número de células comprendiendo la etapa:

- una vez el medio de cultivo ha pasado a la al menos una cámara de biorreacción (2), posicionar el dispositivo (1) de manera que el medio de cultivo con las células en suspensión queda sobre la superficie transparente (22) y a su vez esta superficie transparente (22) queda posicionada sobre el sistema de control óptico (21) para controlar el número y/o la densidad de células .

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende una etapa de esterilización del sistema mediante un sistema de esterilización (33) conectado con dicho sistema.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el trasvase entre precámara (4) y la al menos una cámara de biorreacción (2, 2', 2'') se realiza por presión, de manera que el medio atraviesa unas válvulas (14, 18, 23).

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque tras extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de los medios de entrada-salida de fluidos (24), las células se separan del medio de cultivo mediante:

- un medio líquido contenido en una cámara (26),
- al menos un sistema de filtrado (25) conectado a dicha cámara (26), el cual comprende:
 - ✓ unos medios de entrada-salida para el medio líquido (29),
 - ✓ unos medios de entrada-salida para el medio de cultivo (28, 32),
 - ✓ al menos un filtro (31),

y porque se implementan las etapas:

- introducir el medio de cultivo con las células en el sistema de filtrado (25),
- retener las células con el al menos un filtro (31),
- introducir medio líquido en el sistema de filtrado (25) a través de los medios entrada-salida para el medio líquido (29),

de manera que se lleva a cabo la separación de las células del medio de cultivo.

8. Un método según la reivindicación 7, caracterizado por que la separación de las células del filtro se produce por la vibración de dicho filtro mediante al menos un vibrador (37) comprendido en dicho filtro.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones caracterizado por que se realizan cultivos de distinta índole mediante un sistema que comprende una pluralidad de dispositivos extraíbles, cada uno de estos dispositivos utilizando al menos una superficie interna apropiada para el tipo de cultivo que se quiere realizar.

10. Sistema de cultivo celular que comprende:

- al menos un dispositivo (1) adaptado para cultivar células, el dispositivo (1) comprendiendo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende al menos una superficie interior (3, 22, 39) adaptada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada-salida de fluidos (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24), y
 - ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara de biorreacción (2) que comprende una entrada (5) para introducir células.

11. Un sistema según la reivindicación 10 caracterizado por que comprende una unidad de control (20) adaptada para llevar a cabo el método de control del cultivo celular según la reivindicación 1.

12. Un sistema según la reivindicación 10, caracterizado por que al menos una de las superficies interiores (3) del dispositivo es transparente, formando una superficie transparente (22) y la unidad de control (20) comprende al menos un sistema de control óptico (21) de manera que se implementa un método de control según la reivindicación 3.

13. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 12 caracterizado por que comprende al menos un sistema de esterilización (33).

14. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 13 caracterizado por que comprende:

- al menos una cámara para contener un medio líquido (26),
- al menos un sistema de filtrado (25) que comprende:
 - ✓ unos medios de entrada-salida para el medio líquido (29),
 - ✓ unos medios de entrada salida para el medio de cultivo (28, 32),
 - ✓ al menos un filtro (31),
- unos medios para el transporte de medio líquido (27) entre la cámara para contener un medio líquido (26) y el al menos un sistema de filtrado (25).

15. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 14 caracterizado por que comprende válvulas de entrada-salida (14) de la precámara (4) a la cámara de biorreacción (2) y/o válvulas de entrada-salida de gases (15, 19).

16. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 15 caracterizado porque comprende superficies adicionales de adhesión celular (39) en al menos una cámara de biorreacción (2), preferentemente proteínas, péptidos o moléculas sintéticas activas biológicamente.

17. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16, caracterizado porque la al menos una superficie interior (22, 3, 39) adaptada para el cultivo celular está recubierta de un gel.

18. Un sistema según la reivindicación 17 caracterizado porque el gel es un hidrogel poly (n-isopropil acrilamida).

19. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 18 caracterizado porque el sistema de filtrado (25) comprende un medio vibrador (37).

20. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el dispositivo (1) es extraíble.

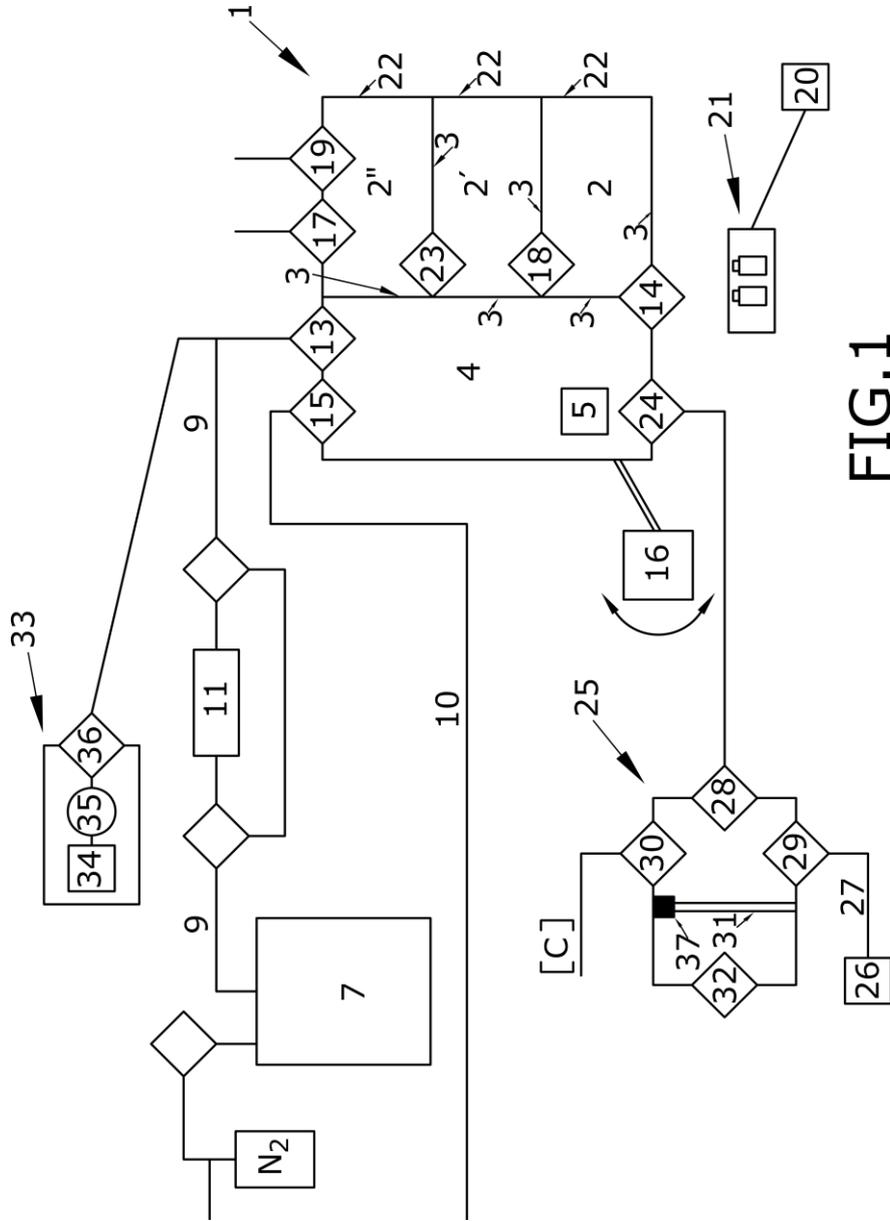


FIG. 1

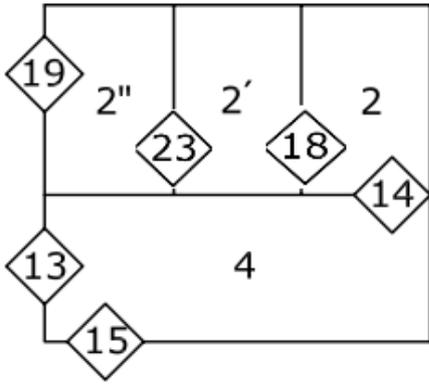


FIG. 2.1

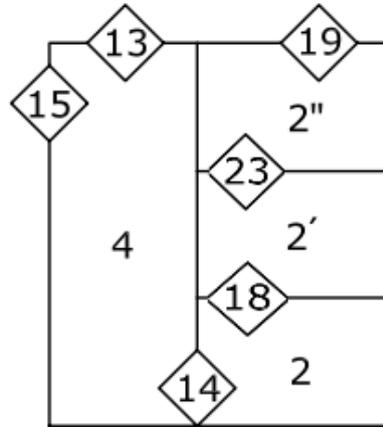


FIG. 2.2

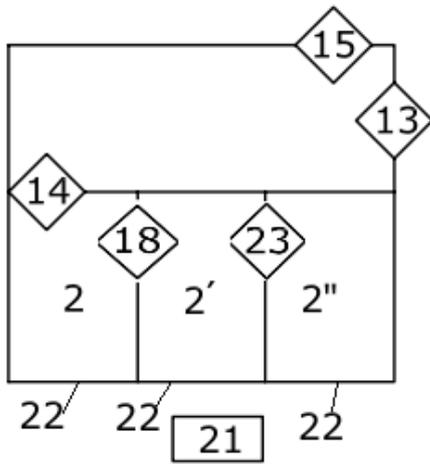


FIG. 2.3

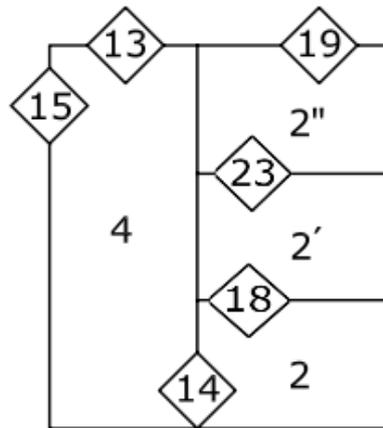


FIG. 2.4

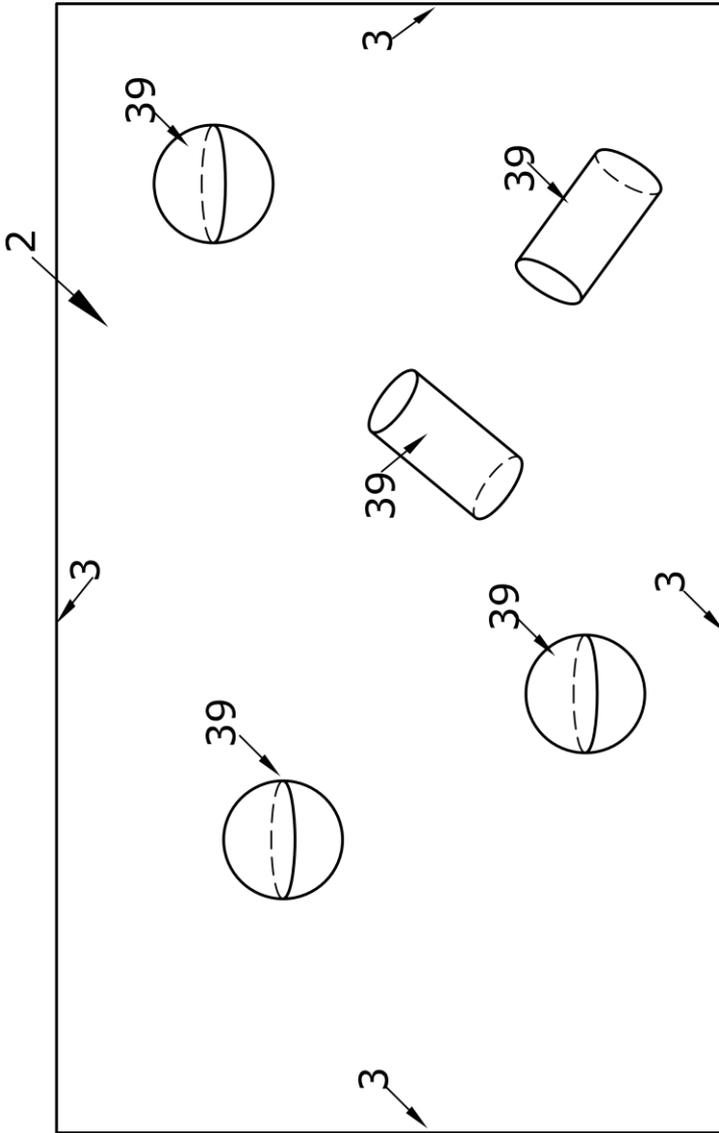


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230933

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12M3/02** (2006.01)
C12M3/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2008227191 A1 (TSUKADA MAMORU) 18.09.2008, todo el documento, especialmente ejemplo 2; reivindicaciones 1,2; figura 11.	1-20
Y	WO 03089567 A2 (HENOGEN S A et al.) 30.10.2003, todo el documento.	1-20
A	US 2004214314 A1 (SRIENC FRIEDRICH et al.) 28.10.2004, todo el documento.	1-20
A	EP 1548099 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 29.06.2005, todo el documento.	1-20

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
29.10.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

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

C12M

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

EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO

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	US 2008227191 A1 (TSUKADA MAMORU)	18.09.2008
D02	WO 03089567 A2 (HENOGEN S A et al.)	30.10.2003
D03	US 2004214314 A1 (SRIENC FRIEDRICH et al.)	28.10.2004
D04	EP 1548099 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY)	29.06.2005

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 presente solicitud de patente describe y reivindica un método de cultivo celular que comprende las siguientes etapas:

- a) Introducir medio de cultivo en una precámara a una condiciones físico-químicas determinadas,
- b) introducir células en la precámara,
- c) pasar el medio de cultivo con las células a la cámara de biorreacción,
- d) permitir que las células se adhieran a una superficie interior (un hidrogel poly n-isopropil acrilamida),
- e) circular medio de cultivo a través del dispositivo hasta conseguir el número de células deseado,
- f) una vez alcanzada la densidad celular adecuada, cambiar una de las condiciones físico-químicas (la temperatura), de forma que se impida la adhesión celular,
- g) pasar el cultivo a la precámara, y
si se ha alcanzado el número de células deseado, extraer el medio de cultivo con las células en suspensión y separar las células mediante un sistema de filtración, o
si no se ha alcanzado ese número de células, introducir medio de cultivo adicional a la precámara y repetir el proceso desde la etapa c),

y donde la cantidad de células se mide mediante un sistema automático de control óptico y el método comprende una etapa adicional de esterilización.

La solicitud reivindica también un sistema para cultivo celular que comprende un dispositivo extraíble adecuado para cultivar células mediante ese método de cultivo, con una precámara, una cámara de biorreacción y válvulas de entrada y salida, un sistema de control óptico, un sistema de esterilización, y un sistema de filtrado con un medio vibrador.

NOVEDAD

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método de cultivo ni el dispositivo de la solicitud tal y como están reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 20 de la presente solicitud tienen novedad según el artículo 6 de la Ley 11/1986, de Patentes.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Sí se han encontrado, sin embargo, documentos cuya combinación podría conducir al experto en la materia al método ni al sistema de cultivo de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 20 de la presente solicitud no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Así, el documento D01, que se considera el más cercano del estado de la técnica, describe en su ejemplo 2 un sistema de cultivo celular formado por un recipiente recubierto por gel que responde a temperatura (poly (N-isopropil acrilamida)). En el recipiente se introducen el medio de cultivo y las células, que se adhieren al gel en las condiciones de cultivo (37° C). El sistema dispone de un recipiente para aportar medio fresco al biorreactor mediante un sistema de bombas y válvulas, y de un sistema de control óptico que permite conocer el estado de las células a lo largo del tiempo de cultivo y determinar en qué momento se ha alcanzado la cantidad de células necesaria. En ese momento, la temperatura se baja a 20° C, con lo que las células se separan del gel, y se pasan a un nuevo recipiente o se recuperan en el recipiente de cultivo para continuar su crecimiento.

El sistema y método de cultivo descritos en este documento son esencialmente iguales a los descritos en la presente solicitud, salvo por el hecho de que en ésta se prepara el cultivo en la precámara antes de introducirlo en el biorreactor, y que las células se pasan a la precámara para determinar si se ha alcanzado la densidad de células necesaria. Tampoco se incluye en el sistema de D01 un sistema de filtrado de las células para separarlas del medio de cultivo ni un sistema de esterilización.

Por otro lado, el documento D02 describe un aparato para cultivo celular que comprende una primera cámara reservorio para contener el medio de cultivo, un biorreactor para el cultivo celular y un biofiltro conectado con el biorreactor, de forma que, mediante un sistema de bombas y válvulas, se conduce el medio de cultivo desde el reservorio hasta el biorreactor, donde se lleva a cabo el cultivo celular, para posteriormente llevar el medio de cultivo con las células al filtro, donde las células quedan retenidas (el medio de cultivo pasa a una cámara de desecho), para ser devueltas de nuevo a biorreactor y continuar su cultivo.

Por tanto, si el experto en la materia, partiendo de la información divulgada en el documento D01, quisiera llegar al sistema de la solicitud, encontraría evidente combinar los documentos D01 y D02 e incluir una primera cámara con el medio de cultivo (incluir también las células en ese primer recipiente resultaría obvio), y utilizar esa misma precámara para sacar el medio con las células tras el cultivo y decidir si se deben extraer las células mediante filtración o si se debe continuar el cultivo durante más tiempo.

Por último, ni la etapa de esterilización del sistema ni el hecho de que el dispositivo sea extraíble aportan actividad inventiva a la solicitud, pues son procesos y características sobradamente conocidos en el campo técnico de la invención.

Es decir, la combinación de los documentos D01 y D02 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 20 de la presente solicitud, que, por lo tanto, no cumplen el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes.

Los dos últimos documentos citados en el presente informe se consideran cercanos a la solicitud, pero no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

Ambos describen sendos biorreactores para cultivo celular con sistemas de control automático, pero que en ningún caso conducirían de manera evidente hasta el dispositivo y método reivindicados en la solicitud, por lo que ninguno de los documentos afecta la actividad inventiva de la misma.