

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 274**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2012 E 12706764 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2661486**

54 Título: **Biorreactor de perfusión para cultivar células en materiales estructurales**

30 Prioridad:

09.01.2011 DE 102011000061

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

14.11.2014

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (100.0%)
Helmholtzstrasse 10
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**STIEHLER, MAIK;
RAUH, JULIANE y
MILAN, FALK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 522 274 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biorreactor de perfusión para cultivar células en materiales estructurales

La presente invención hace referencia a un biorreactor de perfusión para cultivar células en materiales estructurales, así como a un sistema de biorreactor de perfusión que comprende un biorreactor de perfusión de ese tipo.

5 En el campo de la ingeniería de tejidos ("Tissue Engineering") los biorreactores se utilizan entre otras cosas para producir tejidos de sustitución (Ratcliffe y otros, Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering, Ann N Y Acad Sci., 2002, 5). Los biorreactores deben estimular in vitro el desarrollo de tejido nuevo, proporcionando estimulantes adecuados, entre otros factores de crecimiento y fuerzas de corte dinámicas, durante el cultivo de las células tisulares, gracias a lo cual - a diferencia de los cultivos de células bidimensionales - se produce un cultivo de tejidos
10 dinámico tridimensional. Un biorreactor conocido desde hace ya tiempo y que puede utilizarse con facilidad es la botella giratoria, la cual posibilita un cultivo tridimensional de células sobre microportadores porosos. Para ello, los materiales estructurales se sujetan con agujas y se colocan en una botella giratoria llena con un medio de cultivo, en cuya base un agitador magnético se encarga de producir un movimiento de la solución de cultivo alrededor de los materiales estructurales poblados de células (véase por ejemplo Stiehler y otros, Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, J Biomed Mater Res A, 2008, 96, 98). Por lo general la solución de cultivo se cambia varias veces, por ejemplo dos veces por semana. El cultivo en un dispositivo de este tipo se asocia a un flujo no-homogéneo de los materiales estructurales con medio de cultivo celular, celularmente poblados, así como a fuerzas de corte igualmente no-homogéneas que actúan de forma dinámica dentro de las construcciones de célula/portador.

20 Los así llamados biorreactores de perfusión han sido propuestos para asegurar en primer lugar una penetración segura en materiales estructurales con medio de cultivo y en segundo lugar fuerzas de corte dinámicas que actúen de forma dinámica con una distribución homogénea sobre toda la sustancia portadora. En su forma más sencilla, un biorreactor de este tipo se compone de una cámara tubular en la cual se introducen los materiales estructurales de poros abiertos, poblados con células. El medio de cultivo es transportado a través de la cámara mediante una
25 bomba, debido a lo cual el medio de cultivo es transportado de forma continua a través de los poros del material estructural (véase Bancroft y otros, Design of a Flow Perfusion Bioreaktor System for Bone Tissue- Engineering Applications, Tissue Engineering, 2003, 9 (3), 549, 550). Se considera esencial que el medio de cultivo fluya a través de los poros reticulados entre sí de los materiales estructurales y que no sea transportado cerca de las superficies delimitadoras entre los materiales estructurales y la pared de la cámara, por delante de los materiales estructurales.
30 Una conducción del flujo de este tipo se denomina también "flujo forzado". El flujo a través de los poros reticulados de los materiales estructurales posibilita un suministro comparativamente bueno de las células aplicadas sobre los materiales estructurales, las cuales se encuentran en los poros, así como una evacuación de productos de degradación que son producidos por las células.

35 Para abastecer un biorreactor de perfusión de este tipo con medio de cultivo pueden proporcionarse un primer y un segundo depósito de medios. Mediante la bomba, por ejemplo una bomba peristáltica, el medio de cultivo es bombeado por un conducto desde el primer depósito de medios hacia la cámara de cultivo, ingresando a la misma por el lado frontal superior a través de una abertura. En la cámara de cultivo el medio de cultivo atraviesa del modo antes descrito el material estructural celularmente poblado que se encuentra en el lugar y finalmente abandona la cámara de cultivo mediante una abertura en su lado frontal inferior. Mediante otro conducto, el medio de cultivo
40 alcanza entonces el segundo depósito de medios, el cual se encuentra conectado al primer depósito de medios a través de un conducto, permitiendo el intercambio del medio de cultivo circulante, así como un intercambio de gas entre el aire ambiente y el medio de cultivo (Bancroft y otros, ibídem, 552 y siguiente).

45 Un sistema de biorreactor de perfusión de esta clase posibilita un cultivo dinámico de las células sobre los materiales estructurales. El término "dinámico" hace referencia al hecho de que los materiales estructurales son atravesados por el flujo, mientras que en el caso de un cultivo estático no se fuerza ningún movimiento del medio de cultivo. El sistema de biorreactor de perfusión garantiza un abastecimiento suficiente de las células con oxígeno y nutrientes, proporcionando adicionalmente del modo descrito un estímulo para la maduración celular.

50 Mediante los biorreactores de perfusión podría generarse un entorno de cultivo con un flujo semejante a las condiciones in vivo en el cuerpo humano. Sin embargo, eso requiere una regulación cuidadosa de las condiciones del cultivo, así como un control continuo de esas condiciones. Los biorreactores de perfusión conocidos no son lo suficientemente adecuados para ese objetivo, puesto que un control de las condiciones del cultivo en la cámara de cultivo no es posible o sólo es difícilmente posible.

55 Volkmer y otros, en su artículo científico "Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone" (Tissue Engineering, 2008, 14 (8), 1331, 1332 y siguiente) describen un reactor de perfusión con perfusión forzada, en donde una sonda para medir la presión parcial del oxígeno es introducida en la cámara de cultivo. En dicha descripción la punta de la sonda se encontraba en el centro geométrico del material estructural presente en la cámara de cultivo. Para introducir la sonda fue perforado un orificio en la pared de la cámara. Por lo tanto, este

biorreactor de perfusión no es apropiado para la práctica diaria. Además, una adaptación del reactor a los materiales estructurales con diferentes dimensiones sólo es posible con una inversión elevada.

Los biorreactores de perfusión han sido utilizados para producir tejidos óseos de sustitución. Para ello, los materiales estructurales óseos (denominados también como materiales soporte) son poblados con células precursoras óseas. El flujo a través de los materiales estructurales en el biorreactor de perfusión posibilita una maduración ósea de las células precursoras óseas. No obstante, para la aplicación clínica, para curar defectos óseos de mayor tamaño, es necesario utilizar materiales óseos vitales de estructura de una dimensión mayor. Sin embargo, los biorreactores de perfusión conocidos, debido a su estructura, sólo son adecuados para producir tejidos óseos de sustitución de un tamaño comparativamente reducido.

En la práctica clínica es además necesario proporcionar implantes, por ejemplo tejidos óseos de sustitución, de los tamaños más diversos. Se consideraría además deseable que los implantes presentaran dimensiones que sean determinadas directamente por el tamaño del defecto óseo a ser curado y no sólo por el tamaño de la cámara de cultivo del biorreactor. No obstante, una adaptación de los biorreactores de perfusión conocidos para producir un implante del tamaño deseado no es posible o sólo es difícilmente posible debido a la estructura rígida de esos biorreactores de perfusión. A modo de ejemplo, Bancroft y otros, *ibidem*, 552, prevén la utilización de tubos con diámetros diferentes, los cuales deben utilizarse como casetes en la cámara de cultivo. Las posibilidades alternativas para tratar defectos del tejido de gran tamaño combinando tejidos óseos de sustitución más pequeños producidos de forma simultánea, se asocian además a la desventaja de una estabilidad mecánica disminuida de las construcciones combinadas de ese modo, lo cual a su vez representa un riesgo aumentado de un fracaso del implante.

Por último, un requerimiento elemental de la práctica clínica consiste en la utilización solamente de componentes asépticos, lo cual implica una esterilización del biorreactor de perfusión, así como del resto de los componentes del sistema de reactor. A este respecto se considera deseable una capacidad de esterilización lo más simple posible del sistema de reactor de perfusión, lo cual no es posible o sólo es difícilmente posible en el caso de los reactores de perfusión y sistemas de reactores de perfusión conocidos.

En la solicitud US 2004/0253716 A1 se revela un biorreactor para cultivar células dentro de una matriz portadora de un material poroso. El biorreactor presenta un recipiente interno que se encuentra dispuesto en un recipiente externo. La matriz portadora se encuentra provista de una alimentación para un medio de cultivo, para lo cual en el portador de la matriz se encuentran conformadas una entrada y una salida.

En la solicitud US 2004/0110273 A1 se revela una cámara de cultivo para preparados biológicos. En la cámara de cultivo se encuentran conformadas membranas.

Ni el biorreactor descrito en la solicitud US 2004/0253716 A1, así como tampoco la cámara de cultivo conocida por la solicitud US 2004/0110273 A1, son adecuados para cultivar materiales estructurales de mayor tamaño. Tampoco permiten una adaptación a materiales estructurales de tamaños diferentes.

Es objeto de la presente invención eliminar las desventajas correspondientes al estado del arte. En particular debe indicarse un sistema de reactor de perfusión que posibilite la producción de implantes de un tamaño comparativamente mayor, una adaptación sencilla del reactor de perfusión a materiales estructurales de tamaños diferentes, un control continuo de las condiciones de cultivo en una cámara del reactor, una capacidad para esterilizar con facilidad todos los componentes del sistema, así como una posibilidad sencilla de ampliación, por ejemplo para integrar otras funciones técnicas. Con ello no debe perjudicarse la capacidad de servicio del sistema de reactor de perfusión ni deben incrementarse los costes de funcionamiento y de producción. Por último debe indicarse un método para cultivar células en materiales estructurales mediante el sistema de reactor de perfusión acorde a la invención.

Este objeto se alcanzará a través de las características de la reivindicación 1 y de la reivindicación 11. De las características de las reivindicaciones 2 a 10 resultan variantes convenientes de la invención.

Según la presente invención se proporciona un biorreactor de perfusión para cultivar células en materiales estructurales sólida con una cámara de cultivo para alojar el material estructural, donde

- la cámara de cultivo se encuentra conformada en una carcasa y la superficie circunferencial de la cámara de cultivo se encuentra formada desde la pared interna de la carcasa y en los lados frontales de la carcasa se encuentran formadas aberturas de la carcasa para alojar elementos de cierre que pueden ser insertados en las aberturas de la carcasa de manera hermética,

- los elementos de cierre presentan aberturas a modo de canales para suministrar y descargar un medio de cultivo y la abertura a modo de canal de uno de los dos elementos de cierre presenta una sección que disminuye desde el

lado frontal del elemento de cierre que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo, en la dirección del lado frontal del elemento de cierre que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo, y

5 - la carcasa presenta una primera sección cilíndrica y segundas secciones tubulares que se sitúan de forma adyacente con respecto a la primera sección cilíndrica, donde en la primera sección cilíndrica se encuentra conformada una cavidad que se encuentra abierta en sus lados frontales, cuya pared forma la superficie circunferencial de la cámara de cultivo, y donde los elementos de cierre pueden ser insertados en las segundas secciones tubulares mediante las aberturas de la carcasa.

10 De manera preferente la carcasa es una carcasa cilíndrica. Sin embargo la carcasa puede presentar también otra forma externa. A continuación se describen las características del biorreactor de perfusión acorde a la invención mediante el ejemplo de un biorreactor de perfusión con carcasa cilíndrica.

15 El biorreactor de perfusión acorde a la invención se encuentra estructurado de forma modular, de manera que una adaptación del biorreactor de perfusión a materiales estructurales con dimensiones diferentes puede realizarse con facilidad. A diferencia del estado del arte pueden producirse implantes cuyas dimensiones son considerablemente superiores a las de aquellos que pueden producirse mediante los biorreactores convencionales. En el biorreactor de perfusión acorde a la invención no es necesario introducir casetes especiales en la cámara de cultivo con los cuales es posible solamente una adaptación a materiales estructurales reducidos, pero no a materiales estructurales de mayor tamaño.

20 El biorreactor acorde a la invención está diseñado para el cultivo de células en materiales estructurales. En la presente invención como material estructural se entiende un cuerpo sólido. Este cuerpo es tridimensional. Preferentemente éste presenta una estructura de poros abiertos, donde los poros deben estar reticulados en el cuerpo. El material estructural puede estar poblado con células antes de ser introducido en la cámara de cultivo. En la presente invención, el término "material estructural" comprende tanto materiales estructurales no poblados, así como también poblados.

25 El medio de cultivo consiste en una solución nutritiva para las células que deben cultivarse en el material estructural en el biorreactor de perfusión acorde a la invención, y preferentemente se trata de un líquido o de una mezcla de líquidos. El medio de cultivo puede ser una solución acuosa, una emulsión o una dispersión. El medio de cultivo debe fluir a través del material estructural en la cámara de cultivo en una perfusión forzada, donde se excluye un pasaje a través de la cámara de cultivo sin atravesar el material estructural.

30 La cámara de cultivo se encuentra conformada en la carcasa cilíndrica del sistema de biorreactor acorde a la invención, donde la pared interna de la carcasa forma la superficie circunferencial de la cámara de cultivo. Como una carcasa cilíndrica se entiende aquí una carcasa con dos superficies planas paralelas, las cuales se encuentran conectadas mediante una superficie circunferencial que está formada por rectas paralelas. En una forma de ejecución preferente la carcasa cilíndrica presenta esencialmente la forma de un cilindro circular recto. La carcasa es hueca, donde un área de la cavidad forma la cámara de cultivo y otras áreas de la cavidad se encuentran conformadas de forma adyacente con respecto a los lados frontales de la cámara de cultivo, en las cuales se encuentran introducidos elementos de cierre y, en el caso de que se encuentren presentes, se encuentran dispuestos elementos de mediación.

40 La carcasa del biorreactor de perfusión acorde a la invención presenta una primera sección cilíndrica y segundas secciones tubulares que se sitúan de forma adyacente con respecto a los primeros lados frontales de la primera sección cilíndrica, donde en la primera sección cilíndrica se encuentra conformada una cavidad abierta en sus lados frontales, cuya pared forma la superficie circunferencial de la cámara de cultivo, y donde los elementos de cierre pueden ser insertados en las segundas secciones tubulares.

45 En una forma de ejecución preferente la primera sección cilíndrica es igualmente tubular. No obstante esto no es necesario. Puesto que el biorreactor acorde a la invención, de manera ventajosa, también es adecuado para producir implantes cuya superficie circunferencial no corresponde a la de un cuerpo geométrico simple, como la de un cuboide, un cilindro, un cono o un cono truncado, sino cuya superficie circunferencial puede ser formada libremente en función de los requerimientos médicos, la cavidad no es forzosamente cilíndrica o cilíndrica circular. Más bien ésta puede presentar cualquier forma siempre que se encuentre abierta en sus lados frontales, es decir en los lados que se sitúan de forma adyacente con respecto a las segundas secciones tubulares, de manera que la cavidad en la primera sección se convierte en las cavidades en las segundas secciones. Una cavidad de este tipo puede obtenerse por ejemplo seleccionando un molde de fundición adecuado durante la fabricación de la carcasa. De manera alternativa, el material estructural puede ser vertido en un material de silicona obteniendo un cuerpo cilíndrico, preferentemente cilíndrico circular, que después es colocado en la carcasa como un material estructural cilíndrico.

5 Si por el contrario en la cámara de cultivo debieran tratarse materiales estructurales cilíndrica, entonces la cavidad en la primera sección es convenientemente cilíndrica circular. Las cavidades cilíndricas circulares que se sitúan de forma adyacente con respecto a la cavidad cilíndrica circular en las segundas secciones tubulares de la carcasa presentan preferentemente un diámetro mayor que la cavidad cilíndrica circular en la primera sección. Si el diámetro de al menos una de las aberturas de la carcasa es igual al diámetro de las cavidades cilíndricas circulares en las segundas secciones circulares, entonces el material estructural puede ser insertado mediante la abertura de la carcasa y la segunda sección contigua en la primera sección, cuya cavidad forma la cámara de cultivo. En este caso la carcasa puede estar diseñada de una pieza.

10 Si por el contrario con el biorreactor de perfusión acorde a la invención debieran tratarse materiales estructurales cuyo diámetro fuera mayor que el diámetro de las aberturas de la carcasa, entonces la carcasa, de manera conveniente, es de dos o más piezas. En el caso de una carcasa de dos piezas la carcasa se compone de un primer y de un segundo elemento de la carcasa, los cuales se encuentran conectados uno con otro de forma separable en un plano que corta la cámara de cultivo. La unión del primer y del segundo elemento de la carcasa puede efectuarse por ejemplo mediante una unión por tornillo o mediante un conector. Para introducir en la cámara de cultivo y retirar de la misma un material estructural la carcasa puede ser desarmada en sus dos partes.

15 De manera conveniente, el tamaño de la cámara de cultivo se escoge de modo que la superficie circunferencial de un material estructural que es introducido en la cámara de cultivo se sitúe de forma adyacente directamente con respecto a la pared interna de la carcasa, preferentemente con la pared de la primera sección, de modo que se alcance una perfusión forzada del medio de cultivo exclusivamente a través del material estructural.

20 De manera preferente, los ejes longitudinales de la primera sección cilíndrica y de las segundas secciones tubulares se sitúan en una recta común, donde los diámetros externos de la primera sección cilíndrica y de las segundas secciones tubulares son iguales, de manera que la carcasa presenta una superficie circunferencial con un diámetro externo uniforme. Preferentemente esa recta común es el eje longitudinal de la carcasa.

25 La extensión de la cámara de cultivo en dirección axial, referido al eje longitudinal de la carcasa, es determinada por la extensión longitudinal del material estructural a ser tratado, donde la extensión longitudinal del material estructural debería ser menor que la suma de la extensión de las cavidades de la primera y de las segundas secciones en dirección axial. Si es éste el caso, entonces el biorreactor de perfusión acorde a la invención puede ser adaptado fácilmente para el tratamiento de materiales estructurales con extensiones longitudinales diferentes, modificando la profundidad de inserción de los elementos de cierre o la extensión de los elementos de mediación en dirección axial.

30 La extensión de la cámara de cultivo y con ello la extensión de la primera sección, así como de la segunda sección en dirección axial, es determinada a través de la longitud del material estructural, pudiendo variar de este modo, donde la suma de la extensión axial de la primera y de las segundas secciones es invariable. De manera preferente, la extensión de la cámara de cultivo y, con ello, de la primera sección en dirección axial, corresponde a la longitud del material estructural. Como la longitud del material estructural se entiende aquí la extensión del material

35 estructural a lo largo de un eje que se sitúa sobre el eje longitudinal de la carcasa y/o de la primera sección cuando el material estructural es introducido en la cámara de cultivo.

40 La extensión de la cámara de cultivo en dirección ortogonal con respecto a su dirección axial es determinada por la extensión ortogonal, referido al eje longitudinal de la carcasa, de la cavidad en la primera sección. Sin embargo, una adaptación del biorreactor de perfusión acorde a la invención en dirección ortogonal requiere sólo cambiar la carcasa, pero no los elementos de cierre, cuando los diámetros de las aberturas de la carcasa permanecen invariables en los lados frontales de la carcasa.

45 De acuerdo con la invención se prevé que en los lados frontales de la carcasa se encuentren conformadas aberturas de la carcasa en las cuales los elementos de cierre pueden ser insertados de manera hermética. Para ello, al menos uno de los elementos de cierre presenta un cuerpo de inserción con una superficie externa que se encuentra diseñada de forma complementaria con respecto a la abertura de la carcasa y que soporta al menos un elemento de junta para hermetizar la superficie delimitadora entre la superficie externa del cuerpo de inserción y la superficie circunferencial interna de la abertura de la carcasa.

50 En una forma de ejecución preferente de la invención al menos uno de los elementos de cierre se encuentra diseñado de dos piezas, donde la primera pieza consiste en un cuerpo base esencialmente cilíndrico, en donde se encuentra conformada una abertura a modo de un canal para el suministro y la descarga de un medio de cultivo, y la segunda pieza consiste en un manguito que se encuentra fijado de forma separable sobre el cuerpo base.

55 En una primera forma de ejecución del elemento de cierre de dos piezas, la superficie circunferencial externa del manguito se encuentra en contacto hermético con la carcasa cuando el elemento de cierre está inserto en la carcasa. En este caso, la superficie circunferencial externa del manguito forma la superficie externa del cuerpo de inserción. En una segunda forma de ejecución, una sección de la superficie circunferencial del cuerpo base queda expuesta, es decir que no es cubierta por el manguito cuando éste se encuentra fijado al cuerpo base. De manera conveniente, esta sección de la superficie circunferencial del cuerpo base se sitúa de forma adyacente con respecto

al lado frontal del cuerpo base que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo cuando el elemento de cierre se encuentra inserto en la abertura de la carcasa. En este caso, la sección expuesta del cuerpo base se encuentra en contacto hermético con la carcasa.

5 De manera preferente el manguito presenta una forma anular. Para la fijación del manguito sobre el cuerpo base, el manguito, en su superficie circunferencial interna, puede presentar un roscado interno que es complementario con respecto a un roscado externo que se encuentra conformado en la superficie circunferencial externa del cuerpo base. De este modo, el manguito y el cuerpo base pueden ser atornillados el uno con el otro.

10 En la superficie circunferencial externa del manguito o en la sección expuesta del cuerpo base, en dirección circunferencial con respecto al eje longitudinal del manguito, pueden proporcionarse ranuras circunferenciales para alojar anillos de obturación. Las ranuras se encuentran conformadas en la superficie circunferencial externa, preferentemente en un área que, al insertar los elementos de cierre en las aberturas de la carcasa, entra en contacto con la superficie circunferencial interna de las aberturas de la carcasa.

15 Si el cuerpo base presenta una sección expuesta de la superficie circunferencial en su lado frontal que se orienta hacia la cámara de cultivo cuando el elemento de cierre está inserto en la carcasa, entonces uno o más elementos de junta, por ejemplo anillos de obturación, son comprimidos al atornillar el cuerpo base y el manguito, gracias a lo cual se alcanza un cierre particularmente hermético de la abertura de la carcasa. Sin ser considerado como obligatorio, para este fin puede preverse que el manguito se desplace en la dirección de la sección expuesta al atornillarse en el cuerpo base, debido a lo cual se ejerce presión sobre los elementos de junta allí fijados. De este modo, los elementos de junta son comprimidos en dirección axial, referido al eje longitudinal del cuerpo base, extendiéndose en dirección axial, gracias a lo cual puede lograrse un cierre hermético.

20 Los elementos de cierre pueden presentar además conformaciones, por ejemplo moleteados o muescas, que facilitan una inserción en las aberturas de la carcasa y, en el caso de una estructura del elemento de cierre conformada por manguito y cuerpo base, facilitan un atornillado del manguito y el cuerpo base. En el último caso mencionado, en el manguito, en su superficie circunferencial externa, puede estar conformado un resalte circunferencial que regularmente presenta escotaduras en su superficie circunferencial externa. El cuerpo base puede presentar además acanaladuras. Esto se considera en particular conveniente cuando la longitud del manguito es menor que la longitud del cuerpo base, referido a su eje longitudinal, de manera que queda expuesta un área de la superficie circunferencial del cuerpo base que se sitúa de forma adyacente con respecto al lado frontal del cuerpo base. En esa área pueden proporcionarse moleteados y/o muescas. Esa área consiste por tanto en una segunda sección expuesta de la superficie circunferencial del cuerpo base que se encuentra conformada en el otro lado frontal del cuerpo base como la primera sección expuesta.

35 Al menos uno de los elementos de cierre, de manera conveniente los dos, presentan una abertura a modo de un canal para el suministro y/o la descarga del medio de cultivo, con una sección que disminuye desde el lado frontal del elemento de cierre que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo, en la dirección del lado frontal del elemento de cierre que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo, cuando el elemento de cierre se encuentra inserto en una abertura de la carcasa. De manera conveniente, las aberturas a modo de canales, antes de alcanzar el lado frontal del elemento de cierre que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo, se convierten en una sección cilíndrica circular que se extiende hasta ese lado frontal. Preferentemente esa sección presenta un roscado interno en donde un elemento de conexión tubular para un tubo flexible puede ser atornillado de manera que una parte del elemento de conexión sobresale del elemento de cierre, donde en esa parte puede ser sujetado un tubo flexible. Para ello, de forma conocida, esa parte puede presentar un área con una superficie circunferencial externa que disminuye, la cual a lo largo del eje longitudinal del elemento de cierre se encuentra distanciado de un resalte circunferencial que se encuentra conformado de manera que permite atornillar el elemento de conexión en el elemento de cierre. A modo de ejemplo, la superficie circunferencial externa del resalte circunferencial puede estar diseñada de forma hexagonal a modo de un tornillo.

De manera preferente los dos elementos de cierre están realizados del mismo modo.

50 Preferentemente, una o las dos aberturas de la carcasa en los lados frontales de la carcasa presentan un diámetro que corresponde al diámetro interno de las segundas secciones. No obstante, las aberturas de la carcasa también pueden ser más pequeñas. De manera preferente, las aberturas de la carcasa se sitúan sobre el eje longitudinal de la carcasa. Se considera preferente que las aberturas de la carcasa sean del mismo tamaño.

55 Para medir las condiciones del proceso en la cámara de cultivo y en particular en el material estructural que se encuentra en la cámara de cultivo, una abertura para la sonda puede proporcionarse en la carcasa. La abertura para la sonda consiste en una abertura en la pared de la carcasa en el área de la cámara de cultivo, a través de la cual una sonda puede ser introducida en la cámara de cultivo. Si la cavidad en la primera sección de la carcasa es cilíndrica, entonces la abertura para la sonda, preferentemente en la superficie circunferencial de la primera sección, se encuentra diseñada de manera que el punto central de la abertura para la sonda se encuentra distanciado

simétricamente de los dos lados frontales de la primera sección. La abertura para la sonda puede presentar un roscado interno en el cual puede atornillarse el soporte para la sonda.

5 En una forma de ejecución de la invención, el biorreactor de perfusión comprende además un elemento soporte que puede colocarse sobre la carcasa de manera que la sonda puede ser introducida en la cámara de cultivo a través de una abertura para la sonda en la carcasa, pudiendo mantenerse allí de forma segura. De manera preferente el elemento soporte presenta una primera perforación que es complementaria con respecto a la pared externa de la carcasa, al menos en el área de la cámara de cultivo, y una segunda perforación, cuyo eje longitudinal se extiende de forma ortogonal con respecto al eje longitudinal de la primera perforación, donde un soporte para la sonda es guiado a través de la segunda perforación. La primera perforación en particular debe ser complementaria con respecto a la superficie circunferencial externa de la primera sección de la carcasa. La sonda, por ejemplo, puede estar determinada para medir la presión parcial del oxígeno en el medio de cultivo en el material estructural.

15 De manera preferente, el soporte de la sonda es un elemento tubular, a través de cuya cavidad se extiende un sensor de la sonda, por ejemplo un electrodo de medición, una fibra óptica u otro elemento de medición conocido por el experto. Preferentemente, la superficie circunferencial del soporte de la sonda presenta una primera área que está diseñada de forma complementaria con respecto a la segunda perforación en el elemento soporte y que se encuentra en contacto con la superficie circunferencial de la segunda perforación cuando el soporte de la sonda es introducido en el elemento soporte. De este modo se alcanza una sujeción segura de la sonda. La superficie circunferencial externa del soporte de la sonda puede presentar además una segunda área que se sitúa de forma adyacente con respecto a la primera área y que se encuentra diseñada de manera que facilita la inserción del soporte de la sonda en el elemento soporte. A modo de ejemplo, la superficie circunferencial en la segunda área puede estar diseñada de forma hexagonal a modo de un tornillo.

20 Para facilitar el posicionamiento del elemento soporte, en el lado externo de la carcasa puede proporcionarse una hendidura cuyo contorno corresponde al diámetro externo de la primera área del soporte de la sonda, en donde se encuentra conformada la abertura para la sonda.

25 Si el elemento soporte se encuentra sujeto en la carcasa, entonces el soporte de la sonda puede ser conducido por la segunda perforación, de manera que la superficie circunferencial externa de la primera área del soporte de la sonda se encuentra en contacto con la superficie circunferencial de la segunda perforación y un lado frontal del soporte de la sonda, convenientemente el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto a la primera área, se encuentra en contacto con el lado externo de la carcasa. Si se proporciona una hendidura en el lado externo de la carcasa, entonces el lado frontal del soporte de la sonda se sitúa de forma adyacente con respecto a esa hendidura. En una forma de ejecución, de manera adicional, entre el lado frontal del soporte de la sonda y el lado externo de la carcasa se encuentra dispuesto un anillo de obturación que hermetiza la abertura de la sonda con respecto al exterior de la carcasa.

35 Preferentemente, el sensor de la sonda se encuentra protegido con respecto a la pared de la carcasa, así como con respecto al área externa del material estructural que se encuentra en la cámara de cultivo, mediante un elemento de protección, por ejemplo un tubo flexible de silicona, el cual se extiende desde el lado externo de la carcasa hasta un área que se sitúa de forma adyacente con respecto a la punta del sensor, pero que no cubre la punta del sensor. Asimismo, el elemento de protección facilita la introducción del sensor a través de la abertura para la sonda en la perforación prevista para ello del material estructural que se encuentra en la cámara de cultivo.

40 De manera preferente, la medición de la presión parcial del oxígeno en el material estructural se efectúa en su centro geométrico. Si el material estructural está colocado en la cámara de cultivo, entonces el sensor de la sonda puede ser introducido mediante la abertura para la sonda con el elemento de protección, por ejemplo hasta que la punta del sensor se encuentre en el centro geométrico del material estructural. Después del tratamiento del material estructural en la cámara de cultivo y antes de retirar el material estructural de la cámara de cultivo la sonda es sacada del elemento soporte.

45 En una forma de ejecución de la invención en la carcasa se proporcionan además uno o más elementos de mediación que respectivamente se encuentran dispuestos entre un lado frontal de la cámara de cultivo y los elementos de cierre que se encuentran orientados hacia ese lado frontal. Los elementos de mediación sirven para guiar el medio de cultivo entre el lado frontal de la cámara de cultivo y las aberturas a modo de canales de los elementos de cierre. Éstos se consideran especialmente convenientes cuando el diámetro de la abertura a modo de canal en el lado frontal de un elemento de cierre que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo es menor que el diámetro del material estructural en la cámara de cultivo y/o cuando ese lado frontal del elemento de cierre se encuentra distanciado del material estructural que se encuentra en la cámara de cultivo, de manera que se producen ángulos muertos en la carcasa, los cuales no son atravesados de manera laminar por el medio de cultivo. De este modo se mejora el comportamiento de flujo del medio de cultivo en la cámara de cultivo. Convenientemente los elementos de mediación se encuentran dispuestos en las segundas secciones de la carcasa.

Preferentemente, el diámetro interno de un elemento de mediación disminuye desde el lado frontal de la cámara de cultivo en la dirección del elemento de cierre orientado en este sentido, donde el diámetro interno del elemento de mediación anular en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al lado frontal de la cámara de cultivo corresponde al diámetro en ese lugar de la cámara de cultivo y en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al elemento de cierre corresponde al diámetro en ese lugar de la abertura a modo de un canal.

De manera preferente, todos los componentes del biorreactor de perfusión acorde a la invención se encuentran realizados de un material plástico que puede ser autoclavado. De forma alternativa, la carcasa, los elementos de cierre y, en caso de estar previsto, las juntas y los elementos de mediación, deben estar realizados de un material plástico que puede ser autoclavado. De manera especialmente preferente, también el elemento soporte, el soporte de la sonda (incluyendo la junta), el elemento de protección y los elementos de conexión se encuentran realizados de un material plástico que puede ser autoclavado. Un material plástico adecuado del que pueden estar fabricadas las juntas y/o los elementos de mediación, es una metil-vinil-silicona, como VMQ70 de la empresa Eriks GmbH, Bielefeld, Alemania. Un material plástico adecuado del que pueden estar realizados los componentes restantes, es un copolímero de polioximetileno, como POM-C de la empresa KTK Kunststofftechnik Vertriebs GmbH, Germering, Alemania.

De acuerdo con la invención se prevé además un sistema de biorreactor de perfusión que, junto con el biorreactor de perfusión acorde a la invención, comprende una bomba para transportar un medio de cultivo a través del biorreactor de perfusión, así como al menos una célula de medición de flujo, por ejemplo para medir la presión parcial del oxígeno en el medio de cultivo, donde la célula de medición de flujo se encuentra dispuesta directamente aguas arriba o aguas abajo del biorreactor de perfusión, referido a la dirección de flujo del sistema de biorreactor de perfusión. El sistema de biorreactor de perfusión acorde a la invención puede comprender además otros componentes, como depósitos de almacenamiento, contenedores de residuos, depósitos de compensación y depósitos para la toma de muestras, así como válvulas. Los componentes se encuentran conectados unos a otros mediante tubos flexibles.

El biorreactor de perfusión acorde a la invención y el sistema de biorreactor de perfusión acorde a la invención son adecuados en particular para producir implantes, por ejemplo tejidos óseos de sustitución, de los tamaños más diversos. En particular posibilitan producir implantes que se determinan directamente por el tamaño del defecto óseo a ser curado y no sólo por el tamaño de la cámara de cultivo del biorreactor. Si se debe producir un tejido óseo de sustitución, entonces en la cámara de cultivo se coloca un material estructural que está poblado con células precursoras óseas. La información detallada sobre los materiales estructurales adecuados, sobre las células precursoras óseas, así como sobre las condiciones del proceso para cultivar el material estructural poblado con las células precursoras óseas en la cámara de cultivo, puede consultarse en el estado del arte, por ejemplo en Stiehler y otros, Bancroft y otros, y Volkmer y otros, respectivamente en las publicaciones antes mencionadas. Un material estructural particularmente adecuado para este fin consiste en una espuma porosa tridimensional, por ejemplo en una espuma poli(D,L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Se consideran como células precursoras óseas particularmente adecuadas las células madre mesenquimales (MSCs).

En el estado del arte la cámara de cultivo se denomina ocasionalmente también como cámara de reacción, sin que la utilización del término cámara de cultivo en la presente invención establezca una distinción con respecto a una cámara de reacción. Se escogió el término "cámara de cultivo" porque las células son cultivadas en el material estructural.

El biorreactor de perfusión acorde a la invención y el sistema de biorreactor de perfusión acorde a la invención se caracterizan en particular por las siguientes ventajas:

(a) El biorreactor de perfusión acorde a la invención posibilita un cultivo dinámico con perfusión forzada de materiales de sustitución de tejido de grandes dimensiones.

(b) Es posible integrar con facilidad sensores invasivos y no invasivos en el biorreactor de perfusión.

(c) Se alcanza fácilmente una capacidad de adaptación del biorreactor de perfusión, en particular de la cámara de cultivo, a materiales estructurales de distintos tamaños y a procedimientos de cultivo diferentes.

(d) La utilización de materiales acordes a la buena práctica médica (Good Medical Practice (GMP)) y la fabricación en plástico y silicona, así como la no utilización de piezas metálicas, entre otras cosas, posibilitan sin dificultades una combinación con otros estímulos físicos, por ejemplo con pulsos electromagnéticos.

(e) La utilización de materiales plásticos garantiza una fabricación económica en el caso de mayores cantidades de piezas.

(f) Los materiales utilizados posibilitan la esterilización del sistema en autoclaves.

A continuación, la invención se explica en detalle mediante ejemplos de ejecución que no deben restringir la invención, haciendo referencia a los dibujos. Éstos muestran:

5 Figura 1: una representación en sección, en escala, de una primera forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención;

Figura 2: una representación en despiece en perspectiva, en escala, de la primera forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención mostrada en la figura 1;

Figura 3: una vista lateral, en escala, de la primera forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención mostrada en la figura 1;

10 Figura 4: una representación en escala de una segunda forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 4a: vista superior; figura 4b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 4a);

15 Figura 5: una representación en escala de una tercera forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 5a: vista superior; figura 5b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 5a);

Figura 6: una representación en escala de una cuarta forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 6a: vista superior; figura 6b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 6a);

20 Figura 7: una representación en escala de una quinta forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 7a: vista superior; figura 7b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 7a);

Figura 8: una representación en escala de una sexta forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 8a: vista superior; figura 8b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 8a);

25 Figura 9: una representación en escala de una séptima forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 9a: vista superior; figura 9b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 9a);

30 Figura 10: una representación en escala de una octava forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 10a: vista superior; figura 10b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 10a);

Figura 11: una representación en escala de una novena forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 11a: vista superior; figura 11b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 11a);

35 Figura 12: una representación en escala de una décima forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 12a: vista superior; figura 12b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 12a);

Figura 13: una representación en escala de una undécima forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención (figura 13a: vista superior; figura 13b: representación en sección a lo largo del eje del corte A--A de la figura 13a); y

40 Figura 14: una representación esquemática de una forma de ejecución de un sistema de biorreactor de perfusión acorde a la invención.

45 En los dibujos, los mismos símbolos de referencia indican respectivamente componentes que presentan las mismas funciones. En las representaciones en sección los componentes de goma del biorreactor de perfusión, por ejemplo las juntas, se representan completamente de color negro, mientras que el resto de los componentes del biorreactor de perfusión se representan con rayas como piezas seccionadas. El material estructural que se encuentra en la cámara de cultivo, si bien se representa de forma seccionada, se representa con un patrón de puntos.

En la figura 1, así como en las figuras 4 a 13, los dos elementos de cierre están introducidos respectivamente en las aberturas de la carcasa, debido a lo cual el espacio interno de la carcasa se encuentra hermetizado con respecto al ambiente. Sin embargo, según la necesidad, los elementos de cierre pueden ser extraídos desde las aberturas de la carcasa abriendo las mismas. Del mismo modo, en las figuras mencionadas, el elemento soporte para las sondas se encuentra fijado en la carcasa. No obstante puede retirarse en caso de ser necesario. Por último, en esas figuras el soporte de la sonda ya se encuentra introducido en el elemento soporte, aún cuando el soporte de la sonda puede ser retirado del elemento soporte en cualquier momento. La sonda, igualmente, puede ser colocada en cualquier momento.

La primera forma de ejecución del biorreactor de perfusión acorde a la invención, mostrada en las figuras 1 a 3, comprende una carcasa cilíndrica 2 que comprende una primera sección 3, en donde se encuentra conformada la cámara de cultivo 4. En la cámara de cultivo 4 se encuentra un material estructural 5 cilíndrico circular. La primera sección 3 presenta una sección transversal tubular. En su primera sección 3, la pared interna de la carcasa 2 conforma la superficie circunferencial de la cámara de cultivo 4. Segundas secciones tubulares 6, 6' se sitúan de forma adyacente con respecto a los lados frontales de la primera sección 3, donde los ejes longitudinales de las secciones 3, 6 y 6' se encuentran sobre una recta común que es el eje longitudinal A del biorreactor de perfusión 1.

Los diámetros externos de las secciones 3, 6 y 6' son iguales, los diámetros internos de las secciones 6 y 6' son iguales, pero más grandes que el diámetro interno de la sección 3. El diámetro de las aberturas de la carcasa 7, 7' corresponde al diámetro interno de las segundas secciones 6, 6'. Por ese motivo la carcasa 2 se encuentra diseñada de una pieza, puesto que el material estructural, a través de una segunda sección 6, 6', es introducido en la primera sección 3, es decir en la cámara de cultivo 4, pudiendo ser extraído nuevamente del mismo modo. Debido al diámetro interno más reducido de la primera sección 3 en comparación con las segundas secciones 6, 6'; en las superficies de contacto entre la primera sección 3 y las segundas secciones 6, 6' se produce respectivamente un saliente 3a, 3a'.

En los lados frontales de las segundas secciones 6, 6' que se encuentran distanciados de los lados frontales de la primera sección 3 y que al mismo tiempo forman los lados frontales de la carcasa 2, se encuentran aberturas de la carcasa 7, 7' en donde pueden insertarse los elementos de cierre 8, conformando una conexión hermética por inserción.

Ambos elementos de cierre 8 poseen la misma estructura. Éstos comprenden respectivamente un cuerpo base 9 esencialmente cilíndrico y un manguito 10, los cuales se encuentran atornillados el uno con el otro. En el cuerpo base 9 se encuentra conformada una abertura 11 a modo de un canal para el suministro y la descarga de un medio de cultivo. El cuerpo base 9 presenta una sección 12 que disminuye desde el lado frontal del elemento de cierre 8 que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo 4, en la dirección del lado frontal del elemento de cierre 8 que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo 4, cuando el elemento de cierre se encuentra inserto en la abertura de la carcasa 7, 7'. La abertura 11 a modo de un canal, antes de alcanzar el lado frontal del elemento de cierre que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo, se convierte en una sección 13 esencialmente cilíndrica circular que se extiende hasta ese lado frontal. Esa sección 13 presenta un roscado interno en donde está atornillado un elemento de conexión 14 tubular para un tubo flexible 102, 103 (véase la figura 14). De este modo, una parte del elemento de conexión 14 sobresale del elemento de cierre 8, donde sobre esa parte puede ser fijado el tubo flexible 102, 103. Para ello, esa parte del elemento de conexión presenta un área 15 con una superficie circunferencial externa que disminuye, la cual a lo largo del eje longitudinal del elemento de conexión se encuentra distanciado de un resalte circunferencial 16, cuya superficie circunferencial se encuentra diseñada de forma hexagonal a modo de un tornillo, de manera que se facilita el atornillado del elemento de conexión 14 en el cuerpo base 9 del elemento de cierre 8.

El manguito 10 del elemento de cierre 8 se encuentra fijado de forma separable en su cuerpo base 9, donde la superficie externa circunferencial del manguito se encuentra en contacto hermético con la pared interna de una segunda sección 6, 6' de la carcasa cuando el elemento de cierre 8 está introducido en una abertura de la carcasa 7, 7' de la carcasa 2. En este caso la superficie circunferencial externa del manguito conforma la superficie externa del cuerpo de inserción 17 del elemento de cierre 8. Esta superficie externa del cuerpo de inserción es complementaria con respecto a la abertura de la carcasa 7, 7'.

El manguito presenta una forma anular. Para la fijación del manguito 10 sobre el cuerpo base 9, el manguito 10, en su superficie circunferencial interna, presenta un roscado interno que es complementario con respecto a un roscado externo 18 que se encuentra conformado en la superficie circunferencial externa del cuerpo base 9. En la superficie circunferencial externa del manguito 10, en dirección circunferencial con respecto al eje longitudinal del manguito que se sitúa sobre el eje longitudinal A de la carcasa 2, se proporcionan dos ranuras circunferenciales para alojar anillos de obturación 19. Las ranuras se encuentran conformadas en la superficie circunferencial externa, en un área que, al insertar el elemento de cierre 8 en la abertura de la carcasa 7, 7'; entra en contacto con la superficie circunferencial interna de la abertura de la carcasa 7, 7'.

5 Sobre la superficie circunferencial externa del manguito 10 se encuentra conformado un resalte 20 circunferencial que en su superficie externa circunferencial presenta regularmente escotaduras. El cuerpo base 9 presenta además moleteados. La longitud del manguito 10, referido a su eje longitudinal que se encuentra situado sobre el eje longitudinal A de la carcasa 2, es menor que la longitud del cuerpo base 9, de manera que un área 21 de la superficie circunferencial del cuerpo 9, la cual se sitúa de forma adyacente con respecto al lado frontal del cuerpo base que se distancia de la cámara de cultivo 4, permanece expuesta. En esa área pueden proporcionarse moleteados y/o muescas.

10 En la carcasa 2, en cada una de las segundas secciones 6, 6'; se encuentra dispuesto un elemento de mediación 22 anular entre un lado frontal de la cámara de cultivo 4 y el elemento de cierre 8 que se encuentra orientado hacia ese lado frontal. Los elementos de mediación 22 sirven para guiar el medio de cultivo hacia las dos secciones de la carcasa, entre el lado frontal de la cámara de cultivo 4 y las aberturas 11 a modo de canales de los elementos de cierre 8. Dichos elementos median entre el diámetro de la abertura 11 a modo de canal en el lado frontal de un elemento de cierre 8 que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo 4, y el diámetro del material estructural en la cámara de cultivo, el cual es mayor que el diámetro de la abertura 11 a modo de canal en el lado frontal de un elemento de cierre 8. El diámetro externo del elemento de mediación anular 22 es complementario con respecto al diámetro interno de una segunda sección 6, 6'. El diámetro interno del elemento de mediación 22 disminuye desde el lado frontal de la cámara de cultivo en la dirección del elemento de cierre 8 orientado en este sentido, donde el diámetro interno del elemento de mediación anular 21 en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al lado frontal de la cámara de cultivo 4 corresponde al diámetro en ese lugar de la cámara de cultivo y en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al elemento de cierre 8 corresponde al diámetro en ese lugar de la abertura 11 a modo de un canal.

En la forma de ejecución mostrada en las figuras 1 a 3, los elementos de mediación 22 se encuentran realizados de un material de silicona, por ejemplo del mismo material que los anillos de obturación 19. Los elementos de mediación 22 no se requieren de forma obligatoria.

25 Sobre la carcasa 2 se encuentra apoyado un elemento soporte 23 para una sonda, por ejemplo para medir la presión parcial del oxígeno en la cámara de cultivo 4. El elemento soporte 23 presenta una primera perforación 24 que es complementaria con respecto al diámetro externo de la carcasa 2, y cuyo eje longitudinal se sitúa sobre el eje longitudinal A de la carcasa 2, y una segunda perforación 25, cuyo eje longitudinal se extiende de forma ortogonal con respecto al eje longitudinal de la primera perforación e intersecta el eje longitudinal de la primera perforación 24. El eje longitudinal de la primera perforación 24 y el eje longitudinal de la segunda perforación 25 se extienden a través del centro geométrico del elemento soporte 23 (véase en particular la figura 3).

35 En la carcasa 2, en el área de la primera sección 3 se encuentra conformada una abertura 27 (denominada de aquí en adelante como abertura para la sonda) en la pared de la carcasa 2, a través de la cual una sonda 28 es conducida hacia la cámara de cultivo 4. El centro de la abertura para la sonda 27 se encuentra distanciado simétricamente de los dos lados frontales de la primera sección. El diámetro de la abertura para la sonda 27 es complementario con respecto al diámetro de un elemento de protección 29 a modo de un tubo flexible, a través del cual es conducido el sensor 30 de la sonda 28. Para facilitar el posicionamiento del elemento soporte 23, en el lado externo de la carcasa 2, en la sección 3, se proporciona una hendidura 33 cuyo contorno corresponde al diámetro externo de una primera área 31 del soporte de la sonda 26, en donde se encuentra conformada la abertura para la sonda 27. El sensor 30 puede ser una fibra óptica, por ejemplo una sonda del tipo needle (aguja) de la empresa Pre-Sens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Alemania.

45 En la segunda perforación 25 se encuentra introducido un soporte de la sonda 26. El soporte de la sonda 26 consiste en un elemento tubular, a través de cuya cavidad se extiende el sensor 30 de la sonda 28. La superficie circunferencial externa del soporte de la sonda presenta la primera área 31 que se encuentra diseñada en el elemento soporte 23 de forma complementaria con respecto a la segunda perforación 25 y, cuando el soporte de la sonda 26 es introducido en el elemento soporte 23, se encuentra en contacto con la superficie circunferencial de la segunda perforación 25, debido a lo cual se logra una sujeción segura de la sonda 28 en el elemento soporte 23. La superficie circunferencial externa del soporte de la sonda 26 presenta además una segunda área 32 que se sitúa de forma adyacente con respecto a la primera área 31 y que se encuentra diseñada de forma hexagonal a modo de un tornillo para facilitar la inserción del soporte de la sonda 26 en el elemento soporte 23.

55 Si el elemento soporte 23, como se muestra en la figura 1, se encuentra sujeto sobre la carcasa 2, entonces el soporte de la sonda 26 es conducido a través de la segunda perforación 25 de manera que la superficie circunferencial externa de la primera área 31 del soporte de la sonda 26 se encuentra en contacto con la superficie circunferencial de la segunda perforación 25 y el lado frontal del soporte de la sonda 26, el cual se sitúa de forma adyacente con respecto a la primera área 31, se encuentra orientado hacia el lado externo de la carcasa 2 en el área de la hendidura 33. Entre ese lado frontal del soporte de la sonda y la hendidura 33 se encuentra dispuesto un anillo de obturación 34 que hermetiza la abertura de la sonda 27 con respecto al exterior de la carcasa. De manera conveniente, el anillo de obturación 34 se compone del mismo material que los anillos de obturación 19. Los ejes longitudinales de la segunda perforación 25, del soporte de la sonda 26, del elemento de protección 29, del sensor

30, del anillo de obturación 34, así como de la abertura para la sonda 27, se sitúan sobre una recta que en la figura 1 se representa como eje transversal B. El eje transversal B se extiende de forma ortogonal con respecto al eje longitudinal A y lo corta en el centro geométrico de la cámara de cultivo 4.

El sensor 30, en su extremo distal, referido a la carcasa 2, presenta un elemento de agarre 35.

- 5 A continuación, mediante un ejemplo se describe la utilización del biorreactor de perfusión 1 hasta la introducción del material estructural 5, donde dicho biorreactor corresponde a lo ilustrado en las figuras 1 a 3. En primer lugar el biorreactor de perfusión 1 se presenta desarmado en sus componentes, es decir que los elementos de cierre 8 aún no se encuentran introducidos en las aberturas de la carcasa 7, 7' y el elemento soporte 23 tampoco se encuentra sujeto en la carcasa 2.
- 10 El material estructural 5, mediante la abertura de la carcasa 7 y la segunda sección 6 que se sitúa de forma adyacente con respecto a la misma, en primer lugar, es introducido en la cámara de cultivo 4 en la primera sección 3. A continuación, mediante la abertura de la carcasa 7, se introduce un elemento de mediación 22 en la sección 6 contigua, de manera que el elemento de mediación 22 se apoya sobre el material estructural en la segunda sección 6. Seguidamente, un elemento de cierre 8 se introduce en la abertura de la carcasa 7, de manera que el elemento de cierre se sitúa de forma adyacente con respecto al elemento de mediación. A continuación, mediante la abertura de la carcasa 7, se introduce otro elemento de mediación 22 en la sección 6' contigua, de manera que el elemento de mediación 22 se apoya sobre el material estructural 5 en la segunda sección 6'. Seguidamente, en la abertura de la carcasa 7' se introduce un segundo elemento de cierre 8, de manera que el segundo elemento de cierre 8 se sitúa de forma adyacente con respecto al otro elemento de mediación 22.
- 20 Si debe utilizarse una sonda, entonces antes de introducir el material estructural 5 en la carcasa 2 debe realizarse una perforación en el material estructural 5, la cual debe extenderse desde la superficie circunferencial, de forma ortogonal con respecto al eje longitudinal del material estructural 5, hasta su centro geométrico. Al introducir el material estructural 5 en la carcasa, el material estructural debe ser alineado de manera que la perforación en el material estructural se sitúe de forma adyacente en la abertura para la sonda 27 en la carcasa 2. Si es éste el caso, el elemento de protección 29 puede ser introducido en la perforación del material estructural mediante la abertura para la sonda 27, de manera que el elemento de protección 29 se extiende desde la superficie circunferencial externa de la carcasa en la dirección del centro geométrico del material estructural, donde no debería extenderse hasta el centro geométrico, de manera que la punta del sensor 30 que se introduce posteriormente quede expuesta en el centro geométrico del material estructural 5. Tan pronto como las dos aberturas de la carcasa 7, 7' están cerradas el elemento de soporte 22 es colocado sobre la carcasa 2 mediante la primera perforación 24, de manera que la segunda perforación 25 del elemento soporte 22 se encuentra a la altura de la abertura para la sonda 27. A continuación el soporte de la sonda 26 es insertado en la segunda perforación 25 y es guiado en la dirección de la carcasa, de manera que éste presiona el anillo de obturación 34 contra la abertura para la sonda 27. Después el sensor 30 es conducido a través del soporte de la sonda 27, del anillo de obturación 34 y del elemento de protección 29 hasta el centro geométrico del material estructural 5, de manera que la punta del sensor queda expuesta en el centro geométrico del material estructural 5.

Finalmente, los dos elementos de conexión pueden ser ahora conectados a los tubos flexibles 102, 103 del sistema de biorreactor de perfusión 100 (véase la figura 14). Si no se proporciona una sonda entonces esto puede realizarse inmediatamente después de cerrar las aberturas de la carcasa 7, 7'.

- 40 El eje de corte E--E mostrado en la figura 1 corresponde al eje de corte A--A de la figura 8a. La vista superior de la primera forma de ejecución, mostrada en la figura 8a, corresponde a la vista superior no mostrada de la primera forma de ejecución mostrada en las figuras 1 a 3, exceptuando la reproducción del elemento de soporte y de la sonda.

- 45 Las formas de ejecución mostradas en las figuras 4 a 13 corresponden a la primera forma de ejecución mostrada en las figuras 1 a 3, con algunas excepciones que se explican a continuación. Se consideró preferente no reproducir todos los símbolos de referencia solamente para facilitar el reconocimiento de las diferencias con respecto a la primera forma de ejecución. En todas las formas de ejecución los elementos de cierre 8 presentan la misma estructura. A los fines de una simplificación se prescindió de la representación del elemento de soporte 23 y del resto de los componentes relativos a la sonda 28, incluyendo la abertura para la sonda 27. El elemento soporte y los componentes pueden proporcionarse naturalmente también en las siguientes formas de ejecución.

- 55 La carcasa 2 de la forma de ejecución mostrada en la figura 4 se compone de dos partes 2a, 2b para poder tratar un material estructural 5 de un tamaño muy grande en el biorreactor de perfusión 1 acorde a la invención. Las partes 2a, 2b se encuentran ensambladas la una a la otra de forma separable en un plano cuya normal de la superficie se extiende paralelamente con respecto al eje longitudinal A de la carcasa 2 y a través de la cámara de cultivo 4. Los diámetros internos de las secciones 3, 6, 6' son del mismo tamaño, de manera que no se conforman salientes 3a, 3a'. Para introducir en la cámara de cultivo 4 o retirar de la misma el material estructural 5, la unión de las dos partes 2a, 2b es separada. A continuación las dos partes 2a, 2b son ensambladas nuevamente conformando una unidad. El

elemento de mediación 22 presenta una primera sección 35 cuyo diámetro externo corresponde al diámetro interno de la carcasa 2 y la cual se extiende desde el lado frontal de la cámara de cultivo 4 hasta el lado frontal contiguo de la carcasa 2. A esta primera sección 35 se conecta una segunda sección 36 cuyo diámetro externo corresponde al diámetro de la abertura de la carcasa 7, 7' y la cual se extiende hasta la abertura de la carcasa 7, 7'. Allí se sitúa de forma adyacente con respecto al elemento de cierre 8.

La figura 5 muestra una forma de ejecución del biorreactor de perfusión 1 acorde a la invención que fue adaptado para tratar un material estructural 5 que, a diferencia del material estructural mostrado en la figura 4, posee la mitad de la longitud, pero el mismo diámetro. La forma de ejecución mostrada en la figura 5 corresponde a la forma de ejecución mostrada en la figura 4, exceptuando el hecho de que la primera sección 35 del elemento de mediación 22, cuyo diámetro externo corresponde al diámetro interno de la carcasa 2, se extiende desde el lado frontal de la cámara de cultivo 4 en la dirección del lado frontal contiguo de la carcasa 2, pero no se sitúa de forma adyacente con respecto al mismo, sino que se encuentra distanciado de éste formando una cavidad 38 circunferencial. A la primera sección 35 se conecta la segunda sección 36 cuyo diámetro externo corresponde al diámetro de la abertura de la carcasa 7, 7' y la cual se extiende hasta la abertura de la carcasa 7, 7'. Las formas de ejecución del biorreactor de perfusión 1 acorde a la invención mostradas en las figuras 4 y 5 ilustran la sencilla capacidad de adaptación del biorreactor de perfusión 1 a materiales estructurales 5 con extensiones longitudinales diferentes.

La forma de ejecución mostrada en la figura 6 corresponde a la forma de ejecución mostrada en la figura 5, a excepción de que los elementos de mediación 22 no están realizados del mismo material que los anillos de obturación 19, 34, sino del mismo material que la carcasa 2. Por este motivo no se representan en negro en la representación en sección (figura 6b), sino con rayas.

La forma de ejecución mostrada en la figura 7 corresponde a la forma de ejecución mostrada en la figura 4, a excepción de que los elementos de mediación 22 no están realizados del mismo material que los anillos de obturación 19, 34, sino del mismo material que la carcasa 2. Por este motivo no se representan en negro en la representación en sección (figura 7b), sino con rayas.

Las formas de ejecución mostradas en las figuras 8 y 9 corresponden a la primera forma de ejecución de la invención, con la diferencia de que no se proporciona ningún elemento de mediación. Más bien, los lados frontales de la cámara de cultivo 4 se sitúan directamente de forma adyacente con respecto a los elementos de cierre 8. Sin embargo, el material estructural 5 mostrado en la figura 9 es considerablemente más largo que el material estructural 5 mostrado en la figura 8. Por ese motivo los elementos de cierre 8 en la figura 9 se encuentran menos introducidos en la carcasa 2. De este modo puede observarse que el biorreactor de perfusión acorde a la invención puede ser adaptado fácilmente a materiales estructurales con diferentes extensiones longitudinales, adecuando a la extensión longitudinal del material estructural 5 la profundidad de inserción de los elementos de cierre 8, referido al eje longitudinal A de la carcasa 2.

En las figuras 10 a 12 se ilustra igualmente la sencilla capacidad de adaptación del biorreactor de perfusión acorde a la invención a diferentes extensiones longitudinales de los materiales estructurales. Las formas de ejecución mostradas en las figuras 10 a 12 corresponden a la forma de ejecución mostrada en la figura 1. Debe observarse que una adaptación del biorreactor de perfusión a extensiones longitudinales diferentes de los materiales estructurales puede alcanzarse a través de una modificación de la profundidad de inserción de los elementos de cierre 8, referido al eje longitudinal A de la carcasa 2, del modo que se muestra comparando la figura 10 con la figura 11 o utilizando elementos de mediación 22 con una extensión diferente en dirección axial, como se muestra comparando la figura 10 con la figura 12.

La figura 13 muestra una forma de ejecución de un biorreactor de perfusión acorde a la invención que está adaptado para el tratamiento de un material estructural cuya superficie circunferencial no es cilíndrica. Con este fin, durante la fabricación de la carcasa 2, en la primera sección 3, la carcasa 2 se encuentra conformada de manera que la pared interna de la sección 3 es complementaria con respecto a la superficie circunferencial del material estructural 5.

En la figura 14 se muestra una forma de ejecución de un sistema de biorreactor de perfusión 100 que comprende un biorreactor de perfusión 101 acorde a la invención. En el biorreactor de perfusión 101 se encuentra introducido un material estructural que debe ser tratado con un medio de cultivo. El sistema 100, junto con el biorreactor de perfusión 101, comprende una bomba 104, preferentemente una bomba de tubo flexible, para transportar un medio de cultivo a través del biorreactor de perfusión 101, así como dos células de medición de flujo 105, 106 para medir la presión parcial del oxígeno en el medio de cultivo, donde una primera célula de medición de flujo 105 puede situarse aguas arriba y una segunda célula de medición de flujo 106 puede disponerse aguas abajo del biorreactor de perfusión 101, referido a la dirección de flujo del sistema 100. El sistema de biorreactor de perfusión 100 acorde a la invención comprende además un depósito de almacenamiento 107 para el medio de cultivo, un contenedor de residuos 108, un depósito de compensación y para tomas de muestras 109, así como válvulas 110, 111, 112. Los componentes se encuentran conectados unos a otros mediante tubos flexibles 102, 103, así como 13 a 120.

El medio de cultivo se encuentra primero en un depósito de almacenamiento 107 que, mediante un tubo flexible 113, una primera válvula 110, la cual se trata de una válvula de tres vías, y un tubo flexible 114, se encuentra conectado a una bomba de tubo flexible 104. Mediante la bomba de tubo flexible 104 el medio de cultivo es transportado desde el depósito de almacenamiento 107 hacia la célula de medición de flujo 105, a través del tubo flexible 113, 114 y 115, cuando la válvula 110 se encuentra abierta liberando esa vía. Desde la célula de medición de flujo 105, mediante el tubo flexible 103, el medio de cultivo alcanza el biorreactor de perfusión 101, ingresa en el mismo, atraviesa el material estructural que se encuentra allí en una perfusión forzada y sale nuevamente del biorreactor de perfusión 110, alcanzando la segunda célula de medición de flujo 106 mediante el tubo flexible 102. Esta célula de medición de flujo, mediante un tubo flexible 116, se encuentra conectada con el depósito de compensación y depósito para tomas de muestras 109, en donde ingresa el medio de cultivo mediante una entrada que se encuentra situada por encima de las salidas. El medio de cultivo, mediante el tubo flexible 117 que se encuentra conectado con la salida del depósito 109, y la válvula 111 que consiste en un grifo, puede ser extraído por ejemplo para tomar una muestra. Aparte de eso, a través del tubo flexible 118 que se encuentra conectado con otra salida del depósito 109, y de la válvula 112, la cual se trata de una válvula de tres vías, el medio de cultivo retorna a la válvula 110. Si la válvula 110 es regulada de manera que la vía hacia la bomba 104 se mantiene abierta, entonces el medio de cultivo puede circular de forma continua. No obstante, también es posible conducir una parte del medio de cultivo mediante la válvula 112 hacia un contenedor de residuos 108 y suministrar un medio de cultivo nuevo desde el depósito de almacenamiento 107 hacia el circuito de medio de cultivo. La dirección de flujo del medio de cultivo dentro de los tubos flexibles se representa en la figura 14 a través de flechas.

20 Lista de referencias

- 1 biorreactor de perfusión
- 2 carcasa
- 2a, 2b partes de la carcasa de una carcasa de dos piezas
- 3 primera sección de la carcasa
- 25 3a, 3a' saliente
- 4 cámara de cultivo
- 5 material estructural
- 6, 6' segunda sección de la carcasa
- 7, 7' abertura de la carcasa
- 30 8 elemento de cierre
- 9 cuerpo base
- 10 manguito
- 11 abertura
- 12 sección que disminuye de la abertura 11
- 35 13 sección cilíndrica circular de la abertura 11
- 14 elemento de conexión
- 15 superficie circunferencial externa que disminuye del elemento de conexión 14
- 16 resalte
- 17 cuerpo de inserción
- 40 18 roscado externo

- 19 anillo de obturación
- 20 resalte
- 21 área con moleteado
- 22 elemento de mediación
- 5 23 elemento soporte
- 24 primera perforación
- 25 segunda perforación
- 26 soporte de la sonda
- 27 abertura para la sonda
- 10 28 sonda
- 29 elemento de protección
- 30 sensor
- 31 primera área del soporte de la sonda
- 32 segunda área del soporte de la sonda
- 15 33 hendidura
- 34 anillo de obturación
- 35 elemento de agarre
- 36 primera sección del elemento de mediación 22
- 37 segunda sección del elemento de mediación 22
- 20 38 cavidad
- 100 sistema de biorreactor de perfusión
- 101 biorreactor de perfusión
- 102 conexión mediante tubos flexibles
- 103 conexión mediante tubos flexibles
- 25 104 bomba
- 105 primera célula de medición de flujo
- 106 segunda célula de medición de flujo
- 107 depósito de almacenamiento
- 108 contenedor de residuos
- 30 109 depósito de compensación y depósito para toma de muestras
- 110 primera válvula

111 segunda válvula

112 tercera válvula

113 a 120 tubos flexibles

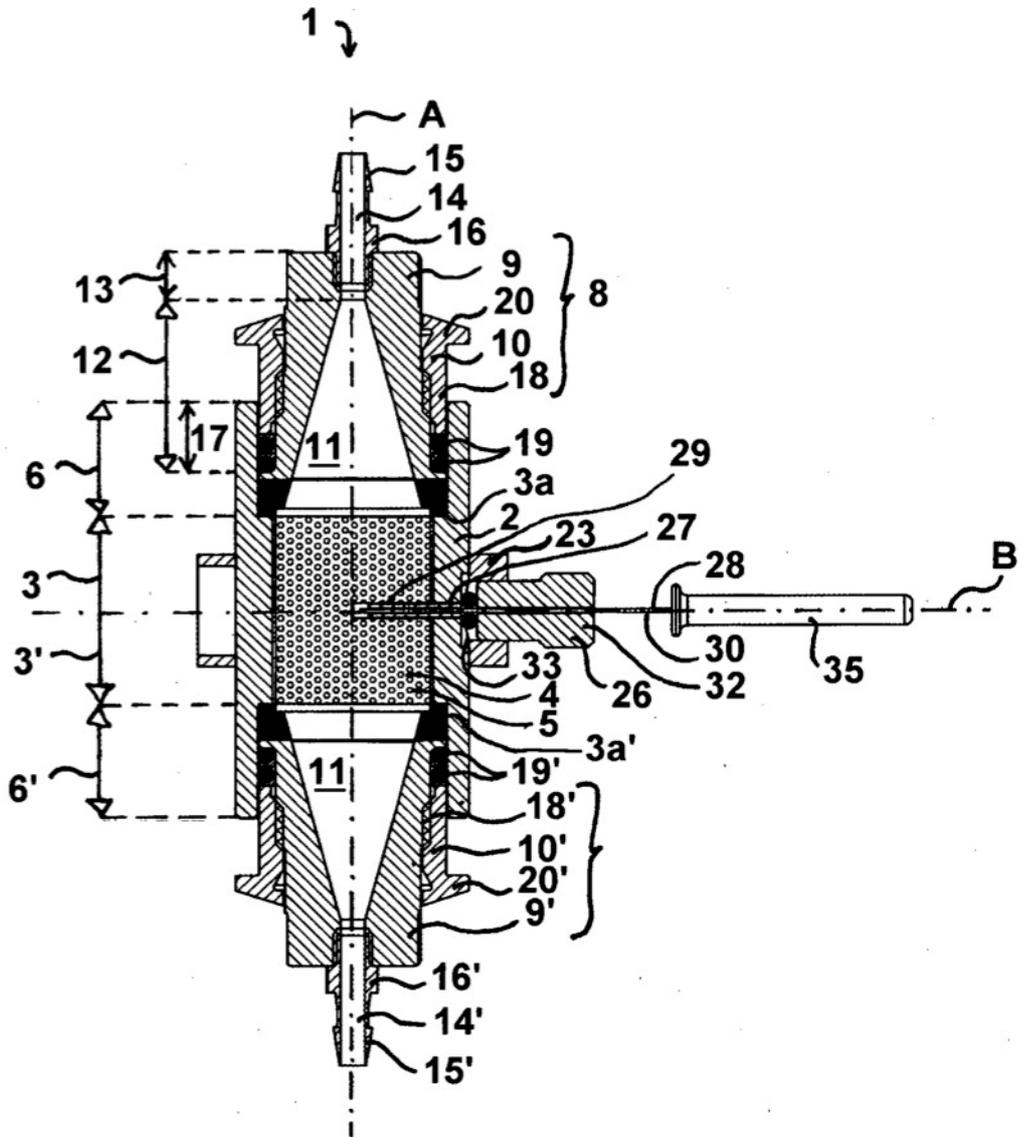
REIVINDICACIONES

1. Biorreactor de perfusión (1) para cultivar células en materiales sólidos de estructura con una cámara de cultivo (4) para alojar el material estructural, donde
- 5 - la cámara de cultivo (4) se encuentra conformada en una carcasa (2) y la superficie circunferencial de la cámara de cultivo (4) se encuentra formada desde la pared interna de la carcasa (2) y en los lados frontales de la carcasa (2) se encuentran formadas aberturas de la carcasa (7,7') para alojar elementos de cierre (8) que pueden ser insertados en las aberturas de la carcasa (7,7') de manera hermética,
- 10 - los elementos de cierre (8) presentan aberturas (11) a modo de canales para suministrar y descargar un medio de cultivo y la abertura (11) a modo de canal de uno de los dos elementos de cierre (8) presenta una sección que disminuye desde el lado frontal del elemento de cierre (8) que se encuentra orientado hacia la cámara de cultivo (4), en la dirección del lado frontal del elemento de cierre (8) que se encuentra distanciado de la cámara de cultivo (4); y la carcasa (2) presenta una primera sección cilíndrica (3) y segundas secciones tubulares (6, 6') que se sitúan de forma adyacente con respecto a la primera sección cilíndrica (3), donde en la primera sección cilíndrica (3) se encuentra conformada una cavidad abierta en sus lados frontales, cuya pared forma la superficie circunferencial de la cámara de cultivo (4), y donde los elementos de cierre (8) pueden ser insertados en las segundas secciones tubulares (6, 6') mediante las aberturas de la carcasa (7, 7').
- 15
2. Biorreactor de perfusión según la reivindicación 1, caracterizado porque los ejes longitudinales de la primera sección cilíndrica (3) y las segundas secciones tubulares (6, 6') se sitúan sobre una línea recta, los diámetros internos de las segundas secciones tubulares (6, 6') son iguales o desiguales con relación al de la primera sección (3).
- 20
3. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al menos uno de los elementos de cierre (8) presenta un cuerpo de inserción (17) con una superficie externa que se encuentra diseñada de forma complementaria con respecto a una abertura de la carcasa (8) y soporta al menos un elemento de junta (19) para hermetizar la superficie delimitadora entre la superficie externa del cuerpo de inserción (17) y la superficie circunferencial interna de la abertura de la carcasa (7, 7").
- 25
4. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al menos uno de los elementos de cierre (8) se encuentra diseñado de dos piezas, donde la primera pieza consiste en un cuerpo base (9) esencialmente cilíndrico, en donde se encuentra conformada la abertura (11) a modo de un canal para el suministro y la descarga de un medio de cultivo, y la segunda pieza consiste en un manguito (10) que se encuentra fijado de forma separable al cuerpo base (9) y cuya superficie circunferencial se encuentra en contacto hermético con la carcasa (2) cuando el elemento de cierre (8) está inserto en la carcasa (2).
- 30
5. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque éste comprende además un elemento soporte (23) para una sonda (28), donde el elemento soporte (28) puede insertarse en la carcasa (2) de manera que la sonda (28) puede ser introducida en la cámara de cultivo (4) a través de una abertura para la sonda (27) en la carcasa (2).
- 35
6. Biorreactor de perfusión según la reivindicación 5, caracterizado porque el elemento soporte (23) presenta una primera perforación (24) que es complementaria con respecto a la pared externa de la carcasa (2) al menos en el área de la cámara de cultivo (4), y una segunda perforación (25), cuyo eje longitudinal se extiende de forma ortogonal con respecto al eje longitudinal de la primera perforación, donde un soporte de la sonda (26) es conducido a través de la segunda perforación (25).
- 40
7. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la carcasa (2) se encuentra conformada de una o de dos piezas, donde una carcasa (2) de dos piezas comprende un primer elemento de la carcasa (2a) y un segundo elemento de la carcasa (2b), los cuales pueden conectarse uno con otro de forma separable en el área de la cámara de cultivo (4).
- 45
8. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en la carcasa (2) se encuentran dispuestos uno o más elementos de mediación (22) anulares, respectivamente entre un lado frontal de la cámara de cultivo (4) y el elemento de cierre (8) que se encuentra orientado hacia ese lado frontal, los cuales sirven para guiar el medio de cultivo entre el lado frontal de la cámara de cultivo (4) y las aberturas (11) a modo de canales de los elementos de cierre (8).
- 50
9. Biorreactor de perfusión según la reivindicación 8, caracterizado porque el diámetro interno de un elemento de mediación (22) disminuye desde el lado frontal de la cámara de cultivo (4) en la dirección del elemento de cierre (8) orientado en este sentido, donde el diámetro interno del elemento de mediación (22) anular en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al lado frontal de la cámara de cultivo (4) corresponde al diámetro en ese

lugar de la cámara de cultivo (4), y en el lado frontal que se sitúa de forma adyacente con respecto al elemento de cierre (8) corresponde al diámetro en ese lugar de la abertura (11) a modo de un canal.

5 10. Biorreactor de perfusión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al menos la carcasa (2), los elementos de cierre (8) y, en caso de estar previsto, las juntas (19) y los elementos de mediación (22), se encuentran realizados de un material plástico que puede ser autoclavado.

10 11. Sistema de biorreactor de perfusión (100), el cual comprende un biorreactor de perfusión (101) según una de las reivindicaciones 1 a 10, una bomba (104) para transportar un medio de cultivo a través del biorreactor de perfusión (101) , así como al menos una célula de medición de flujo (105) para medir la presión parcial del oxígeno en el medio de cultivo, donde la célula de medición de flujo (105) se encuentra dispuesta inmediatamente aguas arriba o aguas abajo del biorreactor de perfusión (101), con respecto a la dirección de flujo del reactor (105).



Corte E-E
 Escala 1:1

Fig.1

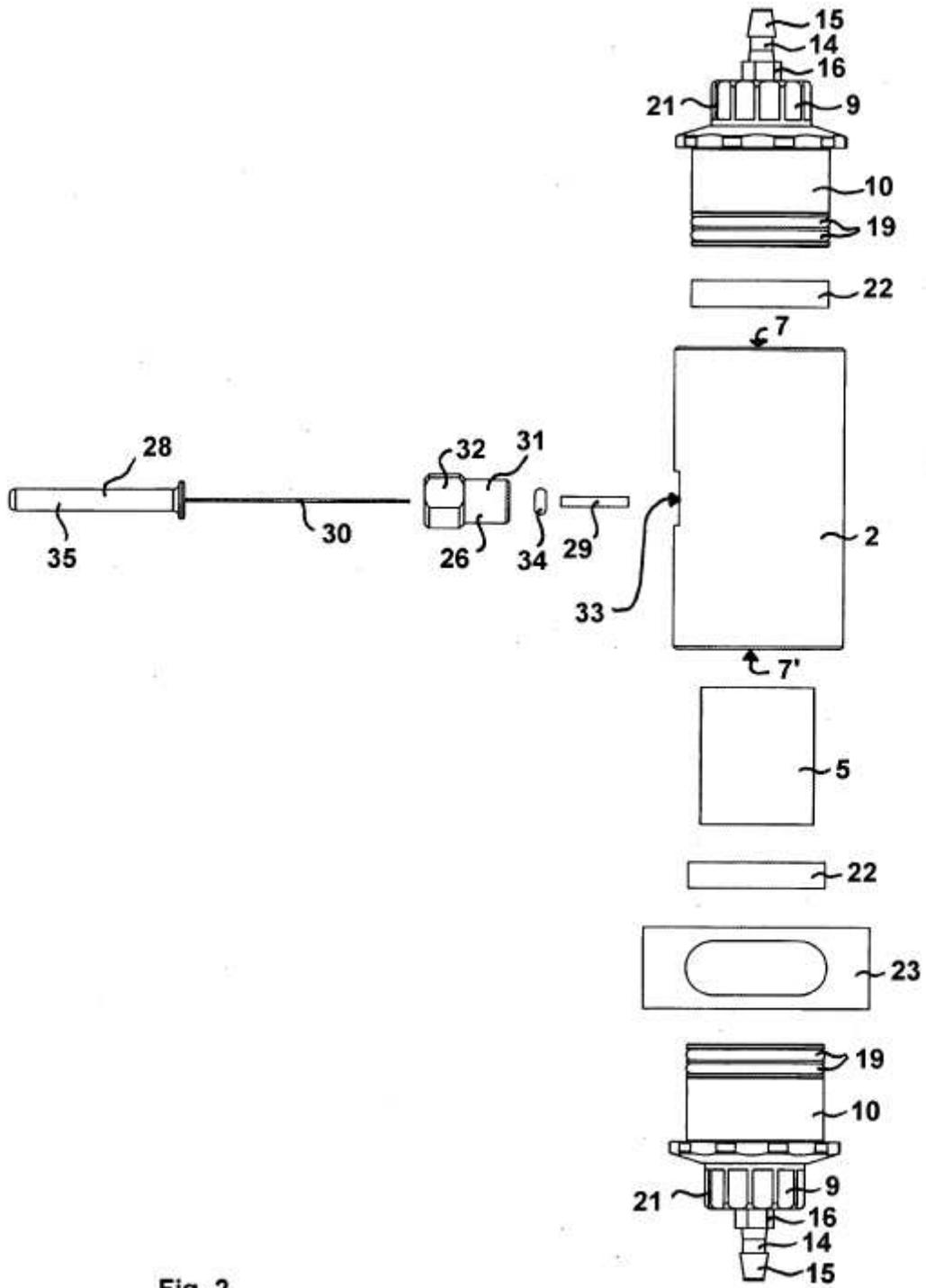


Fig. 2

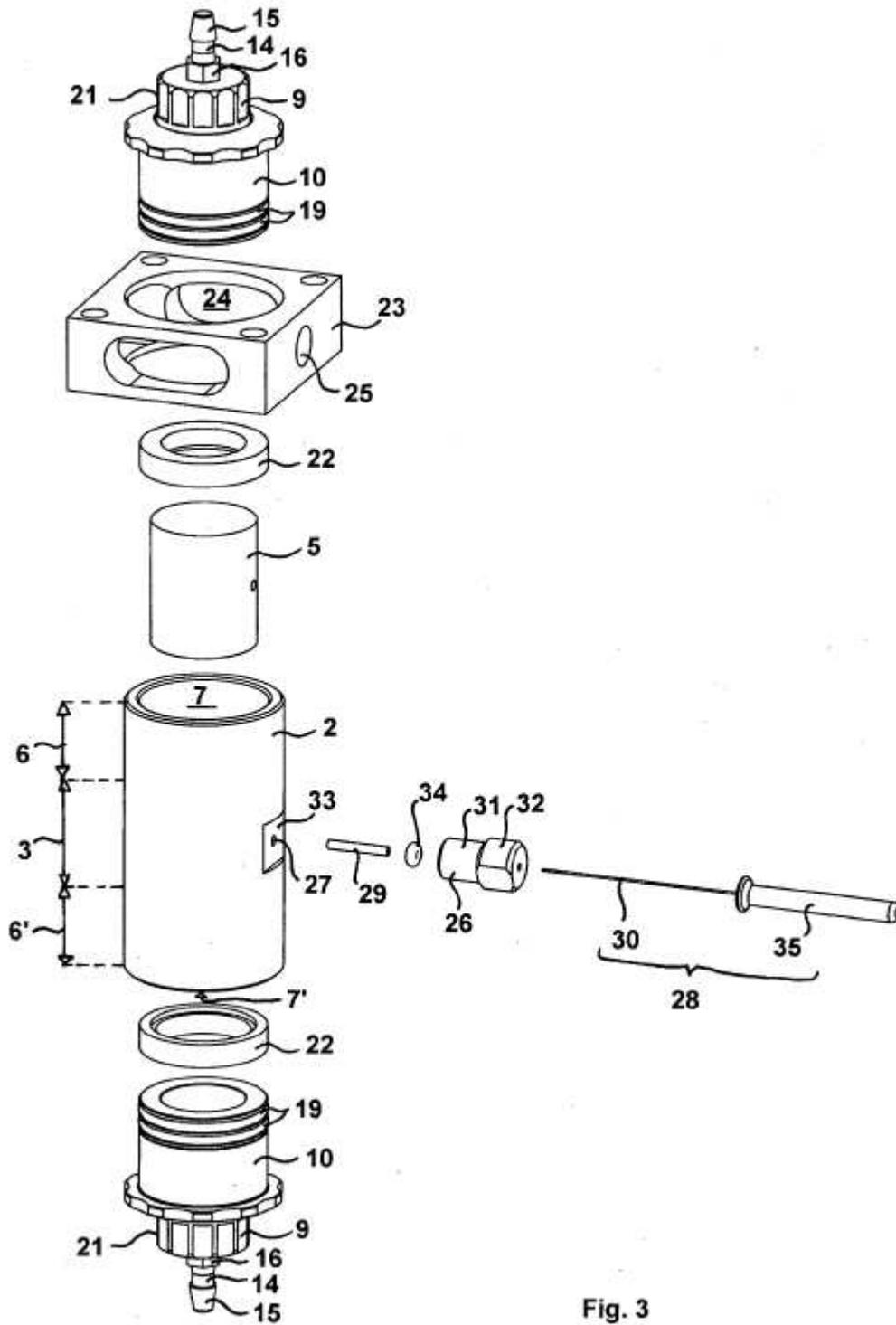


Fig. 3

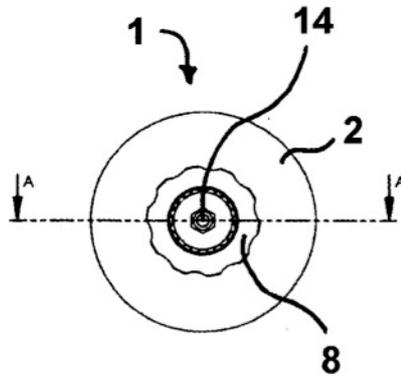


Fig. 4a

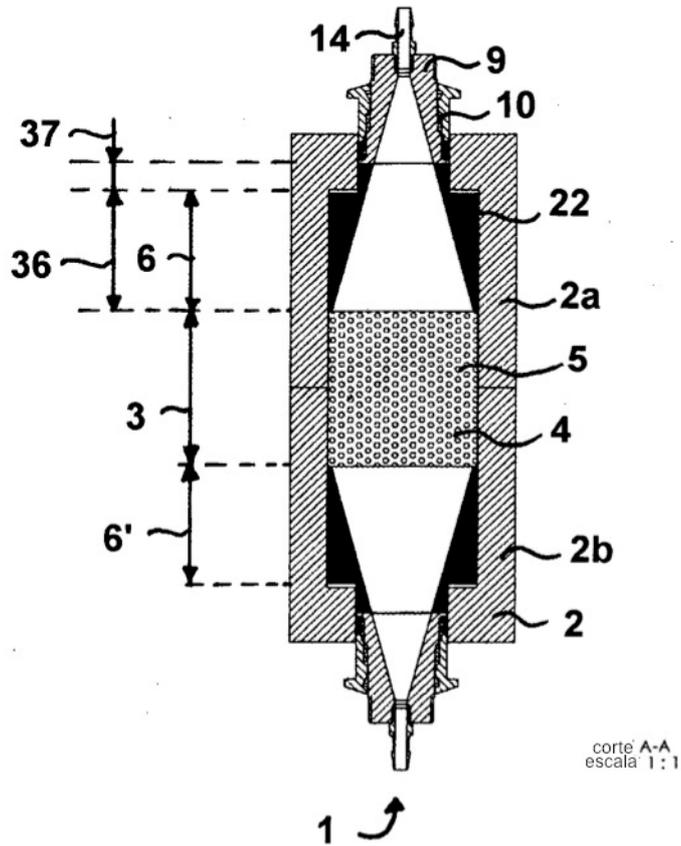


Fig. 4b

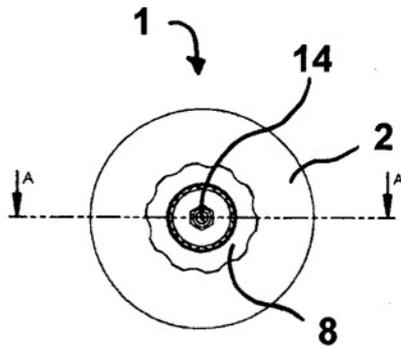


Fig. 5a

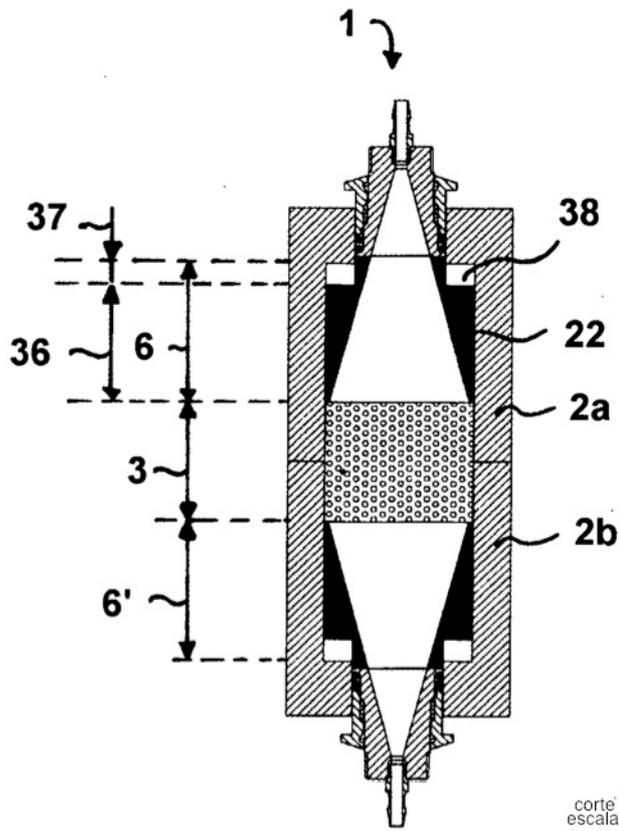


Fig. 5b

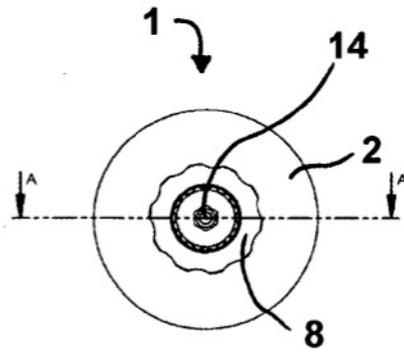


Fig. 6a

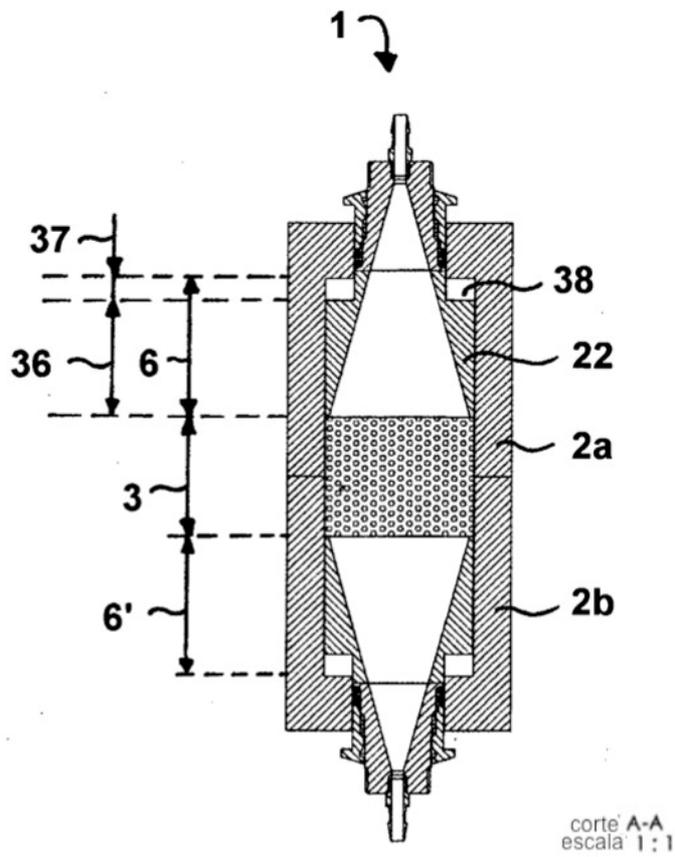


Fig. 6b

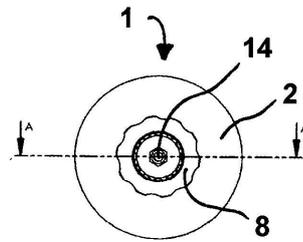


Fig. 7a

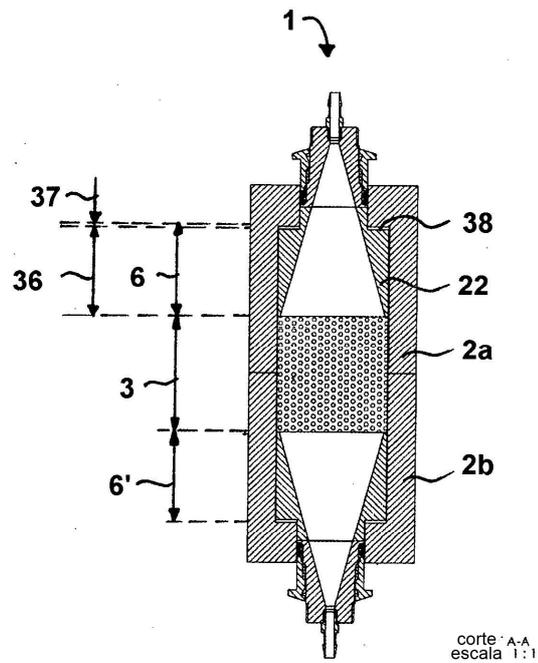


Fig. 7b

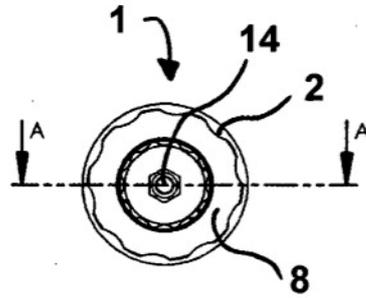
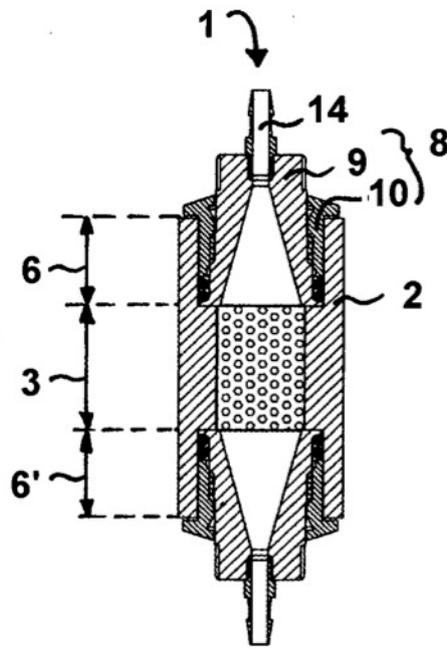


Fig. 8a



corte A-A

Fig. 8b

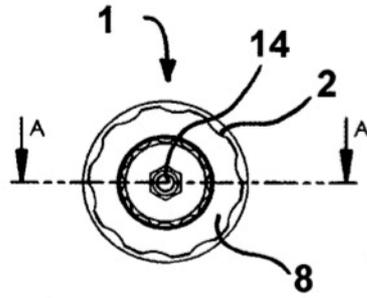
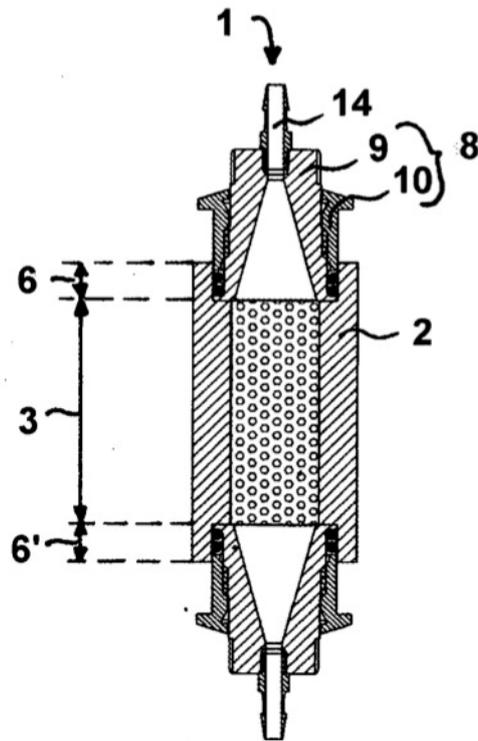


Fig. 9a



corte A-A

Fig. 9b

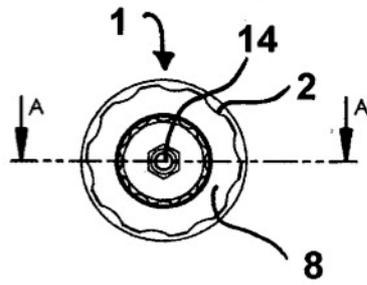
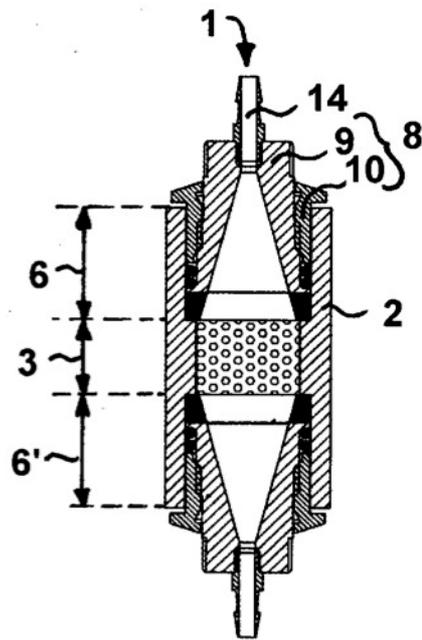


Fig. 10a



corte A-A

Fig. 10b

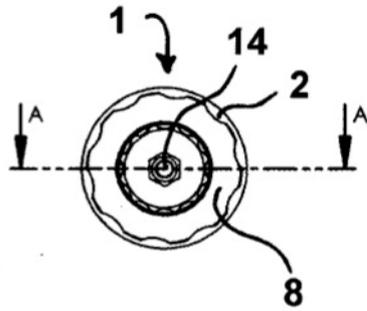
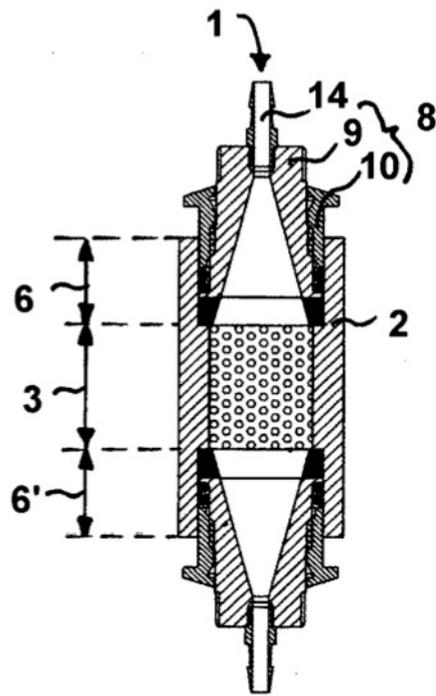


Fig. 11a



corte A-A

Fig. 11b

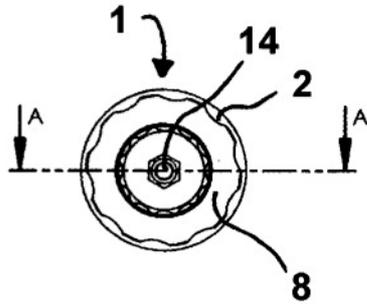
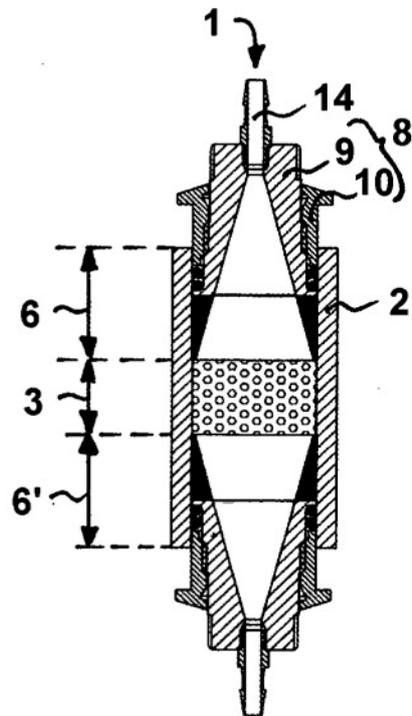


Fig. 12a



corte A-A

Fig. 12b

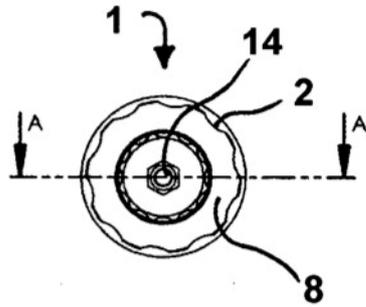
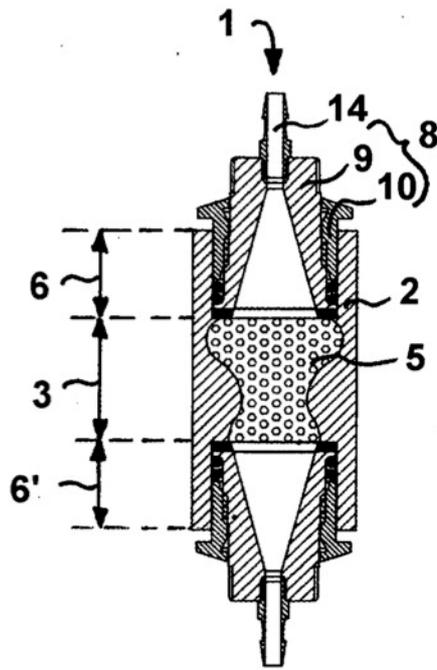


Fig. 13a



corte A-A

Fig. 13b

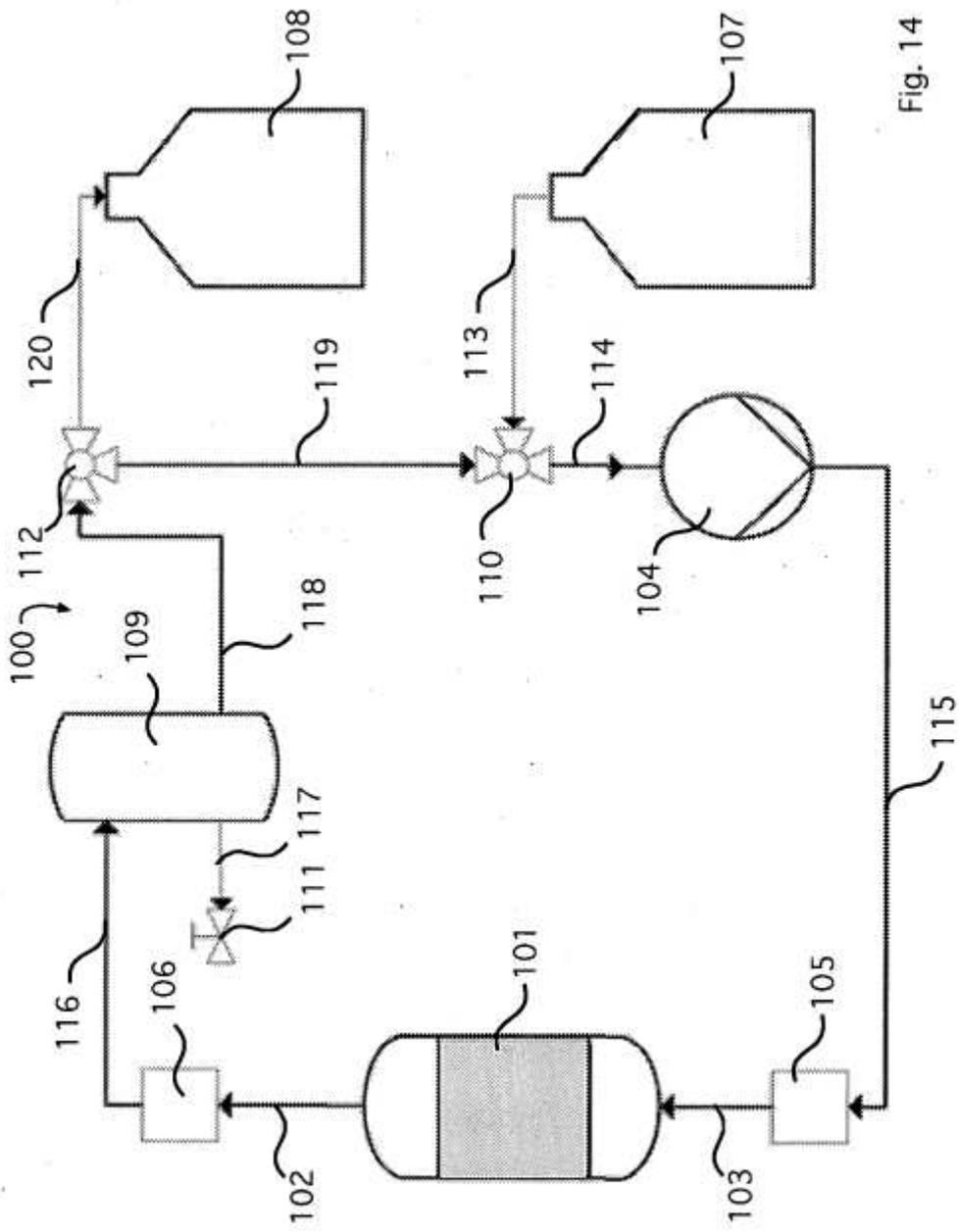


Fig. 14