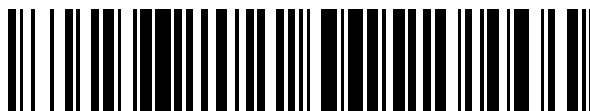


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 930**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)  
**C12M 1/32** (2006.01)  
**C12M 1/00** (2006.01)  
**C12M 1/12** (2006.01)  
**C12M 3/04** (2006.01)  
**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/IB2014/059740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141136**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14713597 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2970854**

54 Título: **Biorreactor rotatorio de cámara doble: métodos y usos del mismo**

30 Prioridad:

**13.03.2013 PT 10683613**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2017**

73 Titular/es:

**ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF  
TISSUE ENGINEERING AND CELL BASED  
TECHNOLOGIES & THERAPIES (A4TEC) (100.0%)  
Universidade do Minho-Departamento de  
Engenharia de Polimeros 3B's Research group  
Campus de Gualtar  
4710-057 Braga, PT**

72 Inventor/es:

**FAUSTINO CANADAS, RAPHAËL;  
ANTUNES DE OLIVEIRA, JOAQUIM MIGUEL;  
PINTO MARQUES, ALEXANDRA MARGARIDA y  
GONÇALVES DOS REIS, RUI LUÍS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 632 930 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 rotatorio de cámara doble: métodos y usos del mismo

Descripción del campo técnico

5 La presente divulgación describe un biorreactor rotatorio de cámara doble que se utiliza en aplicaciones de ingeniería de tejidos (IT) y de medicina regenerativa. El aparato está automatizado y puede controlarse a diferentes caudales, induciendo diferentes esfuerzos de cizalla, así como diferentes velocidades rotatorias a 180°, permitiendo la difusión ajustable del medio de cultivo en los armazones, la perfusión del flujo, así como un estímulo diferente inducido por el movimiento rotatorio. Este nuevo sistema de biorreactor posibilita un cultivo celular controlado y homogéneo en armazones bicapa o multicapa, permitiendo el potencial desarrollo conjunto *in vitro* de tejidos compuestos/en capas.

Antecedentes

15 Un biorreactor puede referirse a un dispositivo o sistema destinado a sembrar células en armazones y a cultivar células o tejidos en condiciones bioquímicas y/o mecánicas específicas, en el contexto del cultivo celular. Por lo tanto, con estos biorreactores se facilita el desarrollo de tejido. En este contexto, los biorreactores son dispositivos obtenidos por ingeniería para suministrar el adecuado transporte espacial y temporal de nutrientes que también puede incorporar la estimulación mecánica o de otra forma física en un entorno bien definido y controlado. Los biorreactores que proporcionan entornos bien definidos y controlables son útiles para estudios fundamentales y para optimizar el cultivo de tejido y estos pueden actuar como unidades de producción para la fabricación de tejido y bioprocesos a gran escala. Los sistemas de biorreactor pueden proporcionar sistemas de modelo fiables para estudios fundamentales de biología celular y tienen un papel clave en la mejora de la calidad de los tejidos obtenidos por ingeniería. En la bibliografía se ha hablado de diferentes biorreactores, incluyendo frascos mixtos [Vunjak-Novakovic *et al.*, 1996], recipientes de rotación [Freed *et al.*, 1998; Freed *et al.*, 2000], cartuchos perfundidos [Carrier *et al.*, 2002] y biorreactores con diferente estimulación mecánica [Altman *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2002].

25 Los biorreactores de cámara doble y los biorreactores oscilantes también se han descrito para su aplicación en la IT osteocondral [Wendt *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Valonen *et al.*, 2010]. La principal limitación de los biorreactores actuales para la IT OC (ingeniería de tejidos osteocondrales) es que el/los nuevo(s) tejido(s) formado(s) no se distribuyen homogéneamente en el interior de los armazones bicapa [Chen *et al.*, 2013]. Así mismo, no existen biorreactores adaptados para los armazones bicapa que soporten diferentes medios de cultivo para cada capa de las construcciones bicapa, permitiendo al mismo tiempo, la inducción del estímulo rotatorio, la compresión y el movimiento vertical para evitar la sedimentación celular y la indeseada malformación de tejidos OC.

30 Se han concedido varias patentes en función del uso de los biorreactores para diferentes aplicaciones. Los siguientes ejemplos deberían tenerse en cuenta por su relevancia en el área de la presente invención:

35 La patente US2006141623 (A1) del 23 de junio de 2006 describe de manera general sistemas, módulos, un biorreactor y los métodos para el cultivo, proliferación, diferenciación, producción y mantenimiento automatizados de los productos de tejido obtenidos por ingeniería. Sin embargo, esta descripción del sistema no se refiere a una cámara doble (una cámara con dos compartimentos), ni a los movimientos de rotación independientes de cada cámara, ni al movimiento de giro de todo el sistema.

40 El documento WO 2007/012071 del 25 de enero de 2007 se refiere a un dispositivo de biorreactor y a un método y sistema para fabricar tejidos y cultivar células y tejidos en el dispositivo del biorreactor. El dispositivo de biorreactor incluye una cámara de biorreactor para contener una muestra, donde el cultivo de la muestra en respuesta a la estimulación mecánica, eléctrica y del biofactor se monitoriza a través de uno o más puertos ópticos. Se proporcionan sensores integrados para medir la presión del fluido, el pH, la temperatura y la tensión del oxígeno. El dispositivo del biorreactor puede recibir diferentes tipos de cargas mecánicas, incluyendo el cizallamiento de fluido, la presión hidrostática, la compresión de la matriz y la rotación. El sistema no presenta una cámara doble para estructuras bicapa.

45 La patente WO 2008/098165 del 14 de agosto de 2008 se refiere a un biorreactor de cultivo celular oscilante. El biorreactor tiene una cámara permeable al gas y de lazo cerrado para el cultivo celular o de tejido y un medio oscilante para mover la cámara permeable al gas y de lazo cerrado bidireccionalmente a lo largo de un eje horizontal con respecto a un eje normal de la cámara de lazo cerrado, y así forzar la convección de las células y del fluido en la cámara permeable al gas y de lazo cerrado. El biorreactor incluye opcionalmente un armazón de ingeniería de tejidos, un medio de entrada, un medio de salida y sensores integrados. Otro aspecto proporciona un biorreactor que tiene una pluralidad de cámaras permeables al gas y de lazo cerrado para el cultivo de células o tejidos.

La patente EP 1990402 del 12 de noviembre de 2008 describe un biorreactor para aplicar fuerzas mecánicas como

estímulo anabólico. La invención describe un biorreactor diseñado para utilizarse en el campo de la citomecánica. El sistema comprende un accionador de polímero electroactivo, también conocido como músculo artificial, que se une a un sustrato/matriz biocompatible, impermeable al agua y deformable. Esta estructura en capas es la membrana flexible del biorreactor.

5 La patente US 7604987 del 20 de octubre de 2009 se refiere a un biorreactor que presenta una cámara para contener cultivos de células o tejido en el interior de un medio de cultivo. El biorreactor también comprende un detector capaz de detectar un cambio en uno o más metabolitos asociados al cultivo de cultivos de células o tejido en el interior de la cámara y un regulador de cámara capaz de rotar la cámara a una primera velocidad sobre un primer eje y a una segunda velocidad sobre un segundo eje, estando dispuesto el segundo eje en un ángulo con respecto al primer eje. En uso, la magnitud de la primera velocidad y de la segunda velocidad son independientemente variables entre sí. Sin embargo, este biorreactor solo está compuesto por una cámara para todas las muestras de estructura, impidiendo el cultivo conjunto de células con dos medios diferentes, por separado en cada estructura y sin tener cada estructura un depósito de cámara independiente.

15 La patente WO 2010/040699 del 15 de abril de 2010 se refiere a un sistema de biorreactor multicultivo que puede mantener las células madre y diferentes tipos de células en entornos físicamente aislados, pero que puede permitir la comunicación bioquímica entre estas células. A pesar de que el sistema permite el cultivo conjunto y la interacción bioquímica entre varias cámaras, estas diferentes cámaras están físicamente aisladas, y en consecuencia, no permiten la obtención de armazones de cultivo bicapa o multicapa integrados en entornos optimizados individuales.

20 La patente WO 2010/064943 del 11 de junio de 2010 describe un biorreactor de perfusión continua bidireccional para el cultivo tridimensional de sustitutos de tejido de mamífero. El biorreactor induce estímulos celulares mecánicos creando fuerzas de cizalla producidas por la perfusión del flujo utilizando diferentes gradientes de presión, controlados por dos bombas, una de vacío y otra peristáltica, situadas en el interior de un sistema de flujo circular diseñado para el biorreactor, y también mediante motores rotatorios situados en ubicaciones específicas. Este biorreactor es capaz de cultivar tejidos de grandes dimensiones a través del control de la perfusión y del gradiente de flujo en el interior de los armazones, obteniendo de este modo la posibilidad de que los nutrientes accedan al interior y de retirar los productos metabólicos del interior del material.

25 La patente EP 2236597 A1 del 6 de octubre de 2010 presenta un biorreactor sensorizado de alto rendimiento para aplicar estímulos de presión hidrodinámica y de esfuerzo de cizalla sobre los cultivos celulares. Esta presión hidrodinámica se genera dentro de al menos una cámara de cultivo, mediante la variación de la distancia media, con una velocidad controlada, de una superficie con respecto a la superficie sobre la que se sitúa el cultivo y por la que el medio de cultivo puede fluir libremente.

30 La patente CN 101899393 (A) del 1 de diciembre de 2010 pertenece al campo de la ingeniería de tejidos óseos y a la mecánica celular, y se refiere a una carga dinámica y a un biorreactor de perfusión recirculante y de carga dinámica, que comprende un cuerpo principal, un módulo de manguito deslizante y un módulo de cabina de cultivo tridimensional. La invención comprende una cerámica piezoeléctrica que penetra en la cabina de cultivo tridimensional a través de un orificio. El extremo móvil de la cerámica piezoeléctrica está conectado a una varilla de carga y el cuerpo principal de la cabina de cultivo también está provisto de una entrada de líquido y una salida de líquido que están conectadas externamente a una bomba peristáltica. El biorreactor ni realiza movimientos rotatorios ni está adaptado para una cámara doble.

35 La patente EP 2151491 A3 del 23 de noviembre de 2011 divulga un biorreactor multicámara. Sin embargo, este sistema no tiene movimiento rotatorio, lo que es una limitación en cuanto a la homogeneización del cultivo, ya que puede producirse sedimentación celular debido a la gravedad.

40 La patente CN102796664 del 28 de noviembre de 2011 se refiere a un biorreactor de ingeniería de tejidos y ligamentos del cuerpo humano que puede llevar a cabo la tensión/compresión y la carga de esfuerzo multidimensional de torsión bidireccional. Así mismo, puede detectar automáticamente la condición de aflojamiento de la abrazadera y realizar la compensación en línea del aflojamiento de la abrazadera; y además, presenta las características de una estructura simple y compacta y una gran comodidad de uso. Este biorreactor no realiza la inversión de la cámara de cultivo y no se aplica a estructuras bicapa.

45 La patente US2012035742 (A1) del 9 de febrero de 2012 describe métodos, dispositivos y sistemas para la ingeniería de tejidos óseos utilizando un biorreactor para cultivar injertos óseos humanos. Este biorreactor está compuesto de una única cámara sin movimientos de rotación.

50 La patente WO 2013103306 A1 del 11 de julio de 2013 se refiere a un biorreactor compuesto de una cámara hermética al agua y de una matriz interna para generar implantes médicos celularizados. Las matrices internas y la cámara externa del biorreactor están fabricadas simultáneamente, preferentemente mediante un rápido proceso de definición de prototipos. El sistema también se caracteriza por disponer de una cámara externa que tiene una forma

que se adapta a la forma del implante a celularizar (matriz interna), posibilitando una mayor eficacia en la colonización celular y en el cultivo del implante. El biorreactor no está adaptado, ni para llevar a cabo el estímulo mecánico, ni para la monitorización en tiempo real.

5 La patente CN203269948 del 6 de noviembre de 2013 describe un dispositivo para la construcción de un cultivo conjunto *in vivo* de tendones y vainas de tendones. El dispositivo comprende un biorreactor de cultivo conjunto de tendones y vainas de tendones de ingeniería de tejidos, una unidad de control y una unidad de medida, donde el biorreactor de cultivo conjunto de tendones y vainas de tendones de ingeniería de tejidos comprende unidades de cultivo de tendones y vainas de tendones de ingeniería de tejidos y un mecanismo de deslizamiento neumático de tendones. El sistema comprende también sensores de monitorización de la presión y el flujo. El sistema no presenta  
10 diferentes velocidades de rotación para las distintas cámaras.

El documento US2014030762 (A1) del 30 de enero de 2014 se refiere a un biorreactor para el cultivo celular sobre una estructura tridimensional, que comprende una cámara de cultivo, cuyas paredes internas forman un conducto vertical, con un diámetro que se ensancha regularmente desde la entrada del conducto hasta la salida del conducto, hecho que posibilita que el medio de cultivo fluya en dicho conducto vertical. La invención también se refiere al uso  
15 ventajoso de estos biorreactores en el campo de la ingeniería de tejidos para la producción de injertos de tejido, en particular, de injertos óseos o de cartílago. Esta patente no describe ni cámaras dobles, ni movimientos rotatorios, ni cultivos de estructuras bicapa.

#### Sumario

La presente divulgación proporciona un biorreactor rotatorio de cámara doble adaptado para el cultivo conjunto de  
20 células en armazones bicapa o multicapa. Por primera vez se permite el cultivo en cámara doble, lo que desarrolla tejidos homogéneos bicapa o multicapa mediante la aplicación del movimiento rotatorio en un eje horizontal y vertical. El movimiento horizontal con dos o más velocidades distintas programables, que oscilan desde cero hasta 0,12 seg/grados sin carga, puede aplicarse de manera independiente en cada cámara doble, lo que puede utilizarse como una estimulación mecánica sobre las células cultivadas en un armazón colocado en esa cámara, a la vez que  
25 se aplica movimiento vertical con un retardo temporal programable en todas las cámaras dobles a la vez, para evitar la sedimentación celular debido a la gravedad. Este biorreactor, que también puede inducir diferentes flujos de cizalla de dos medios de cultivo diferentes que circulan por cada cámara de manera independiente, acoplando dos o más bombas de flujo diferentes al biorreactor, es útil para el desarrollo simultáneo de diferentes tejidos maduros *in vitro*, es decir, tejidos osteocondrales. Así mismo, puede acoplarse una placa superior que encaja con las tapas superiores de cada cámara doble, proporcionando la compresión y la torsión mecánicas automáticas de acuerdo con el movimiento rotatorio realizado por cada cámara. El movimiento rotatorio programado también ajustará directamente la velocidad de compresión.

Así, la presente divulgación describe un biorreactor que comprende una placa de agitación magnética multiposición sobre la que se colocan al menos dos cámaras dobles, una placa superior que encaja con la tapa superior de cada  
35 cámara doble y al menos dos bombas de flujo independientes.

En una realización preferente de la presente invención, las cámaras dobles se fijan a la placa de agitación por atracción magnética y la mencionada placa de agitación presenta un movimiento rotatorio, que es un movimiento rotatorio horizontal y/o vertical.

En otra realización de la presente invención, el movimiento rotatorio horizontal se aplica de manera independiente en  
40 cada cámara doble, oscilando de 0° a 180°.

En una realización preferente de la presente invención, el movimiento rotatorio comprende dos o más escalas de velocidad programables que oscilan de cero a 0,12 seg/grados.

En otra realización de la presente invención, el movimiento rotatorio vertical se aplica a todas las cámaras a la vez, oscilando de 0° a 180°.

45 En una realización preferente de la presente invención, la cámara doble comprende una barrera central con un orificio en el que se insertan los armazones multicapa, las entradas y salidas independientes del medio de cultivo; un imán en la parte inferior de la cámara; tapas superiores comprimibles y/o desmontables; y microsensores para registrar parámetros bioquímicos y físicos.

En otra realización de la presente invención, la cámara doble es una cámara de cultivo doble cuya dimensión está adaptada a la dimensión de la placa de cultivo, preferentemente de 38,4 mm de diámetro y de 17,5 mm de alto.  
50

También es un objetivo de la presente invención describir el uso del biorreactor anteriormente descrito en el contexto de la medicina o la medicina regenerativa, en particular, en los campos de la biotecnología, la industria farmacéutica,

la biología o la ingeniería de tejidos.

Otro objeto de la invención es describir el uso del biorreactor anteriormente descrito para el desarrollo de modelos de tejido *in vitro* y para la ingeniería de tejidos de diferentes órganos, la identificación de fármacos y/o para imitar el movimiento articular de las articulaciones y otros estímulos mecánicos del cuerpo.

## 5 Descripción general

La tecnología representa un biorreactor más realista que imita los diferentes estímulos físicos. El sistema está adaptado para armazones multicapa cultivados con dos medios de cultivo diferentes. Así mismo, el biorreactor supera las desventajas del cultivo estático, pues es posible girarlo a 180°, evitando la sedimentación celular y estando tal movimiento impulsado por un servomotor.

10 Con respecto a la dinámica del biorreactor, este sistema se proyecta hacia las cámaras dobles, realizando la compresión y torsión de la tapa superior sobre los armazones, y en consecuencia, sobre las células, añadiendo la placa superior al sistema. Estas cámaras tienen dos compartimentos para los armazones bicapa o multicapa. Cada posición de la cámara puede realizar una agitación horizontal de 180° para imitar, por ejemplo, el movimiento articular de las articulaciones y mejorar la difusión del medio de cultivo. Además, las cámaras dobles de cultivo  
15 presentan dos entradas y salidas de un medio de cultivo independientes, que permiten la inducción de flujos de cizalla independientes y diferentes. Todas las piezas que componen las cámaras dobles pueden esterilizarse en autoclave. La placa de agitación está controlada por un teclado vinculado a una placa Arduino (Atmel®) y a una pantalla LCD. La placa Arduino también está vinculada a un módulo de servocontrol. La placa de agitación también puede incorporar un sistema WiFi para controlar la agitación a distancia, utilizando un soporte lógico informático.

20 El biorreactor presenta la posibilidad de disponer de un número determinado de muestras en un número igual de posiciones de cultivo o cámaras independientes. Estas cámaras de dos compartimentos permiten el flujo de dos medios de cultivo diferentes y su rotación independiente con dos o más velocidades programables distintas. Así mismo, todo el sistema tiene un movimiento de giro de 180° impulsado por el servomotor para evitar la sedimentación celular.

25 En cuanto a la recopilación de datos y las características intuitivas, el tamaño de la cámara doble está adaptado para cumplir con los requisitos del usuario en cuanto a los tamaños de las placas de cultivo existentes que se colocan por atracción magnética, característica que facilita la retirada y sustitución de las cámaras dobles, así como el análisis de las cámaras individuales sin afectar a las cámaras restantes en cultivo.

30 La tecnología descrita puede utilizarse para desarrollar diferentes plataformas de modelos de tejido *in vitro*, lo que permite la sustitución o disminución del uso de modelos animales para la investigación científica, y en el campo farmacéutico, para la identificación y evaluación de fármacos, haciendo que disminuya el tiempo de los procedimientos, así como el uso innecesario de animales y los costes que esto implica (descubrimiento y análisis de fármacos y desarrollo de productos de tejido obtenidos por ingeniería).

35 Hoy en día, en los campos de la biotecnología, biología e ingeniería de tejidos, la difusión del medio de cultivo en armazones porosos en 3D es un desafío que ha de superarse para desarrollar tejido en 3D que pueda ser utilizado en los centros clínicos. Aplicando la tecnología de biorreactor, como el biorreactor rotatorio de cámara doble, este problema se solucionaría. Así mismo, la tecnología de la invención podría imitar, por ejemplo, el movimiento articular de las articulaciones, lo que contribuiría a disponer de una plataforma para desarrollar la investigación de las articulaciones articulares, abriendo nuevos caminos para estudiar trastornos como la osteoartritis o la osteoporosis.

## 40 Innovaciones, ventajas y algunas aplicaciones:

- Múltiples posiciones independientes que pueden ser estimuladas por el movimiento rotatorio con hasta 10 escalas de velocidad programables.

45 Esta característica puede ser útil con dos objetivos diferentes: primero, la mejora de la difusión del medio de cultivo en los armazones de cultivo en 3D; y segundo, puede estimular, por ejemplo, el movimiento articular realizado por nuestras articulaciones, ya que la rotación es de 180° horizontalmente.

- Todo el sistema puede girar automáticamente a 180° hacia arriba y hacia abajo, con un retardo temporal específico.

50 ○ La sedimentación celular puede producirse en el cultivo celular en 3D. Con este movimiento de giro, esto se evitaría. Así mismo, en un estudio específico, si el movimiento de giro no es deseable, la presente característica puede inhabilitarse.

- Cámaras dobles adaptadas para estructuras bicapa en 3D que pueden soportar el cultivo de dos linajes celulares diferentes (o destino de células madre)

○ Hoy en día, en los campos de la ingeniería de tejidos y en la medicina regenerativa, está aumentando la

complejidad de las estructuras desarrolladas a implantar. Existe además la necesidad de imitar los tejidos nativos, tales como el movimiento articular de las articulaciones, para el desarrollo apropiado de modelos de tejido *in vitro* utilizados en la identificación de fármacos. Así, el objetivo es desarrollar estructuras más complejas que puedan incluir dos tipos de tejido diferentes (por ejemplo, en el tejido osteocondral, incluir cartílago y hueso). Para obtenerlo, han de utilizarse y cultivarse conjuntamente líneas celulares o cultivos primarios diferentes (por ejemplo, células madre adultas de origen diferente).

- Cada una de las cámaras dobles puede presentar diferentes condiciones y puede revisarse sin interferir en las otras cámaras en cultivo
  - El cultivo conjunto de células podría mejorarse estudiando el secretoma de ambas líneas celulares a lo largo del tiempo (bajo el efecto de un fármaco específico).
- Permite el flujo de dos medios de cultivo diferentes en las dos partes de cada cámara doble.
  - Las superficies de nuestro cuerpo podrían analizarse en un sistema dinámico, como por ejemplo, la barrera hematoencefálica.
  - Podrían aplicarse dos fármacos diferentes que fluyeran en la misma cámara doble o se podría analizar la difusión entre uno y otro compartimento de cada cámara doble a través de una lámina celular.
  - Utilizando el biorreactor rotatorio de cámara doble, definitivamente es posible la optimización de dos medios de cultivo diferentes utilizados en cultivos conjuntos de dos tejidos o líneas celulares diferentes que se cultivan simultáneamente. Los biorreactores existentes permiten cultivos en 3D, pero solo utilizando un medio de cultivo específico.
- El biorreactor se adaptará para realizar los movimientos de compresión cíclicos
  - En nuestro cuerpo, existen una gran variedad de estímulos físicos que afectan a nuestra salud. Por ejemplo, la osteoartritis se genera debido a mediadores químicos, pero también debido a cargas físicas. Aplicando este tipo de presión, pueden crearse modelos para este tipo de enfermedades, permitiendo el desarrollo de una plataforma más realista para estudiar los efectos de los fármacos, evitando los problemas éticos y técnicos asociados con los modelos animales.

Estos son solo algunos ejemplos de algunas de las aplicaciones interesantes que son posibles con el presente biorreactor. En resumen, se presenta un nuevo concepto de biorreactor con una gran variedad de variables que pueden habilitarse y inhabilitarse independientemente, aunque todas ellas pueden contribuir a disponer de un entorno más realista, controlado, rápido y accesible. El mayor número de características del presente biorreactor hace que sea una valiosa herramienta, tanto para estudios científicos fundamentales como para los campos farmacéutico y médico/quirúrgico aplicados.

#### Breve descripción de los dibujos

Sin intención de limitar la divulgación del presente documento, esta solicitud presenta dibujos adjuntos de realizaciones ilustradas para que sea más fácil comprenderla.

Figura 1. Vista en perspectiva de la cámara doble (con una vista abierta al interior), donde a) hay una tapa superior para cada cámara doble, b) se representa la parte central de la cámara doble donde están comprendidos los dos compartimentos con el orificio central para la inserción de la estructura, y c) se representa la parte inferior adaptada para la inserción de una barra magnética que fije la cámara doble a la placa de agitación gracias a la atracción magnética.

Figura 2. Sección transversal de la cámara doble. Figura 3. Vista lateral del retenedor del biorreactor, constituido por d) el tornillo del soporte para fijar la placa de agitación y e) el empalme de la placa de agitación. Figura 4. Vista en perspectiva del retenedor del biorreactor.

Figura 5. Vista en perspectiva (desde la parte inferior) de la placa superior que se utiliza para permitir la compresión mecánica. La placa comprende las siguientes características: f) adaptadores que entran en las tapas superiores de las cámaras dobles y g) soportes que se acoplan elásticamente a la plataforma dinámica.

Figura 6. La plataforma dinámica del biorreactor que realiza los movimientos rotatorios (horizontales y verticales). Esta plataforma está acoplada a y suspendida por el retenedor.

Figura 7. Estructuras bicapa de goma gellan-goma gellan/hidroxiapatita; a la derecha: hidratadas y teñidas con carmín alizarina. En la estructura teñida con carmín alizarina, la parte inferior se tiñó de rojo (opaco en la imagen) debido a la presencia de partículas de hidroxiapatita. La parte superior y más clara se refiere a la parte transparente de goma gellan.

Figura 8. Perfil de estructuras bicapa para el % de distribución y porosidad de la hidroxiapatita. La parte izquierda de cada estructura se refiere a la parte de goma gellan, y la parte derecha, a la goma gellan con partículas de hidroxiapatita. Figura 9. Células madre procedentes de tejido adiposo de conejo de bolsas de grasa cultivadas sobre

estructuras bicapa con gelatina en la composición. DAPI/faloidina y tinción viva/muerta de las células en los puntos temporales de 24 h y 21 días de cultivo. A la izquierda, es posible observar las células teñidas con faloidina (partes blancas de la imagen). A la derecha, es posible observar las células sanas vivas (color blanco).

Descripción de las realizaciones preferentes

- 5 La presente invención se refiere a un biorreactor rotatorio de cámara doble que está compuesto de un conjunto de cámaras de cultivo dobles, una placa de agitación magnética multiposición y bomba(s) de flujo.

10 Las cámaras de cultivo dobles presentan dos entradas y salidas de medio de cultivo independientes que permiten la inducción de flujos de cizalla independientes y diferentes, y un separador central con un orificio para la inserción del armazón, de modo que las dos cámaras se intengren. Las cámaras dobles tienen una barra magnética acoplada en la parte inferior.

La placa de agitación magnética multiposición tiene 12 posiciones adaptadas para dos placas de cultivo de tejido de 6 pocillos, que controlan el movimiento horizontal independiente de cada posición y el movimiento vertical de toda la placa.

Biorreactor rotatorio de cámara doble:

- 15 El biorreactor de cámara doble está compuesto de una placa de agitación que puede rotar verticalmente hasta 180°. Además, la placa de agitación tiene 12 posiciones donde pueden colocarse, por atracción magnética, 12 cámaras dobles. Cada una de las 12 posiciones puede controlarse de manera independiente para que roten hasta 180° a 10 velocidades distintas, que oscilan de 0 a 0,12 seg/grados sin carga.

Cámaras dobles de cultivo:

- 20 El biorreactor puede incorporar 12 cámaras de cultivo dobles. Las cámaras de cultivo dobles tienen una barrera central con un orificio para insertar el armazón bicapa. Este tipo de pocillo sirve para cultivar células con diferentes condiciones en cada cámara. El diseño de las cámaras de cultivo dobles permite evitar que se mezclen los medios de cultivo. En la parte inferior de la cámara de cultivo doble hay acoplada una barra magnética que se atrae con la posición de rotación de la placa de agitación. Cada cámara tiene tapas desprendibles para las partes superior e inferior de las cámaras. La tapa superior presenta la posibilidad de comprimir el armazón, lo que permite analizar un estímulo de compresión. Las cámaras dobles tienen dimensiones para adaptarse a las placas comerciales de cultivo de tejido de 6 pocillos (38,4 mm de diámetro, 17,5 mm de altura). De esta manera, y siendo desprendible la parte superior e inferior de las cámaras, el cultivo puede observarse por microscopia. Pueden añadirse microsensores al sistema para monitorizar varios parámetros bioquímicos, tales como la tensión del oxígeno, el pH, la temperatura o la concentración de glucosa y urea, y parámetros físicos como la presión. Todas las piezas que componen las cámaras dobles pueden esterilizarse en autoclave.

Placa de agitación:

- 35 La placa de agitación de 12 posiciones múltiples está adaptada dimensionalmente a dos placas estándar de cultivo de tejido de 6 pocillos. En cada una de las 12 posiciones se puede insertar una de las cámaras de cultivo dobles por atracción magnética. En cada posición, pueden rotar hasta 180° (horizontal), estando controladas las rotaciones por minuto de manera independiente. La rotación está impulsada por la agitación magnética, ejerciendo los imanes la atracción entre la parte inferior del pocillo y la posición de agitación de la placa.

El movimiento vertical a 180° también puede aplicarse a todas las cámaras de manera conjunta.

- 40 La placa de agitación está controlada por un teclado vinculado a una pantalla LCD. El sistema está coordinado por una placa Arduino (Atmel®) sincronizada con un módulo de servocontrol. La placa de agitación también puede incorporar un sistema WiFi para controlar la agitación a distancia, utilizando un soporte lógico informático.

Todo el sistema puede colocarse dentro de una incubadora.

Desarrollo del tejido osteocondral utilizando el biorreactor rotatorio de cámara doble

- 45 Para desarrollar un análogo OC, que puede utilizarse además como un modelo tisular en 3D *in vitro*, se cultivan células madre sin diferenciar obtenidas a partir de tejido adiposo (ASC, por sus siglas en inglés) aisladas de las bolsas de grasa en un armazón bicapa, procurando diferenciar *in situ* las células de tipo condrocito y osteoblasto. Los armazones bicapa comprenden las capas de tipo cartílago y hueso, que están compuestas de goma gellan (GG) y de GG con partículas de hidroxiapatita (HAP) dispersadas, respectivamente.

5 La formación *in vitro* de tejido OC homogéneo y maduro se consigue cultivando las ASC en el interior del armazón bicapa de GG-HAp/GG mediante el uso del biorreactor rotatorio de cámara doble. Se proporciona una mediación química optimizada en cada compartimento de la cámara doble, es decir, en un compartimento se proporciona el medio osteogénico y en el segundo compartimento se proporciona el medio condrogénico. La diferenciación condrogénica de la mezcla de cultivo se realiza basándose en protocolos bien establecidos. A pesar de que la diferenciación osteogénica de las ASC puede requerir factores de crecimiento adicionales, debido a la presencia de la hidroxiapatita en la parte del armazón de tipo hueso, las condiciones para mantener ambos tipos de células en el cultivo conjunto han de optimizarse. La optimización, que se beneficia del sistema de cultivo dinámico, cuenta con la presencia e influencia de mediadores osteogénicos/condrogénicos, tales como la dexametasona, ácido-2-fosfato L-ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato, proteínas BMP, FGF, GF obtenidos a partir de plaquetas y TGF- $\beta$ .

10 La mezcla de los diferentes medios de cultivo se impide debido al flujo independiente a través de los dos compartimentos de la cámara. Esto aumenta el potencial de diferenciación de las ASC hacia cada linaje en las respectivas capas del armazón. El sistema caracterizado por el biorreactor rotatorio de cámara doble y el tejido vivo producido tiene el objetivo de ser utilizado como un modelo OC *in vitro* en 3D. Estos modelos de tejido en 3D hacen posible el análisis continuo de la producción de los factores de crecimiento y permiten la optimización de las condiciones de cultivo, siendo así muy prometedores para su aplicación en la ingeniería de tejidos y en la medicina regenerativa, y para la identificación de moléculas bioactivas o fármacos (figuras 7, 8 y 9).

15

20 La presente divulgación no está restringida de ninguna manera a las realizaciones descritas, y un experto habitual en la materia preverá muchas posibilidades de modificación de las mismas sin desviarse de la idea básica de la invención, tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las siguientes reivindicaciones establecen realizaciones particulares de la invención.



**REIVINDICACIONES**

1. Un biorreactor que comprende una placa de agitación magnética multiposición sobre la que se colocan al menos dos cámaras dobles, una placa superior que se encaja a la tapa superior de cada cámara doble y al menos dos bombas de flujo independientes.
- 5 2. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cámaras dobles están fijadas a la placa de agitación por atracción magnética.
3. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la placa de agitación tiene un movimiento rotatorio.
4. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el movimiento rotatorio es horizontal y/o vertical.
- 10 5. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el movimiento rotatorio horizontal se aplica de manera independiente para cada cámara doble.
6. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el movimiento rotatorio horizontal oscila de 0° a 180°.
7. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el movimiento rotatorio comprende dos o más escalas de velocidad programables que oscilan de cero a 0,12 seg/grados.
- 15 8. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el movimiento rotatorio vertical se aplica simultáneamente a todas las cámaras dobles.
9. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el movimiento rotatorio vertical oscila de 0° a 180°.
10. El biorreactor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la cámara doble comprende:
  - 20 - una barrera central con un orificio en el que se insertan los armazones multicapa;
  - entradas y salidas de medio de cultivo independientes;
  - un imán en la parte inferior de la cámara;
  - tapas superiores comprimibles y/o desprendibles; y
  - microsensores para registrar los parámetros bioquímicos y/o físicos.
- 25 11. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, donde la cámara doble es una cámara de cultivo doble cuya dimensión está adaptada a la dimensión de la placa de cultivo, preferentemente de 38,4 mm de diámetro y 17,5 mm de altura.
12. Un uso del biorreactor descrito en las reivindicaciones 1-11 en medicina o medicina regenerativa, en particular, en los campos de la biotecnología, industria farmacéutica, biología y/o ingeniería de tejidos.
- 30 13. El uso del biorreactor de acuerdo con la reivindicación anterior, para el desarrollo de modelos de tejido *in vitro* y/o la ingeniería de tejidos de diferentes órganos.
14. El uso del biorreactor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, para el cribado farmacológico.
- 35 15. El uso del biorreactor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, para imitar el movimiento articular de las articulaciones y otros estímulos mecánicos del cuerpo.

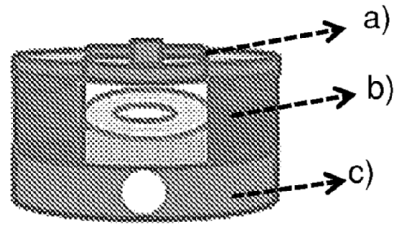


Figura 1

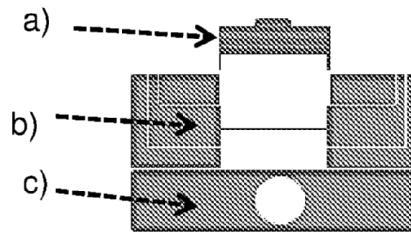


Figura 2

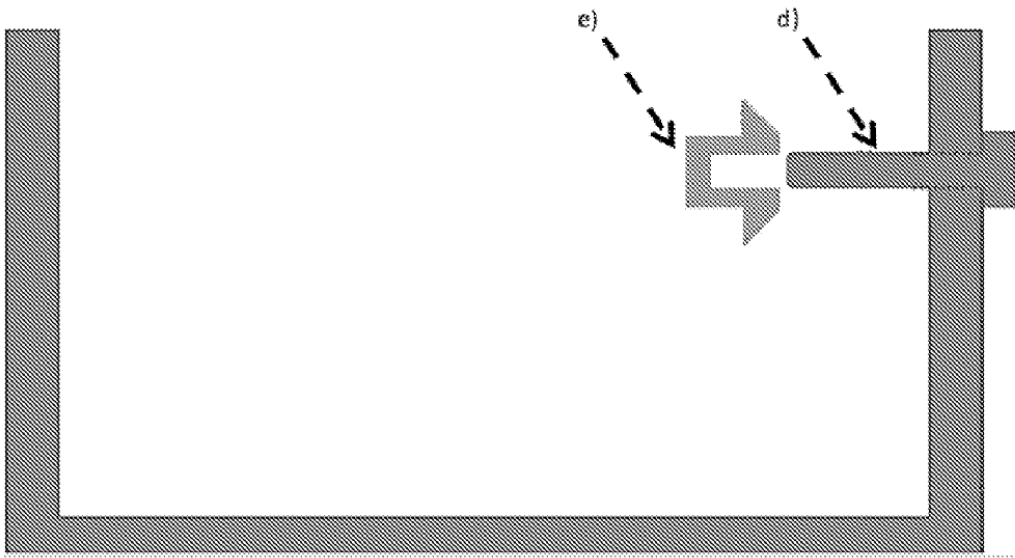


Figura 3

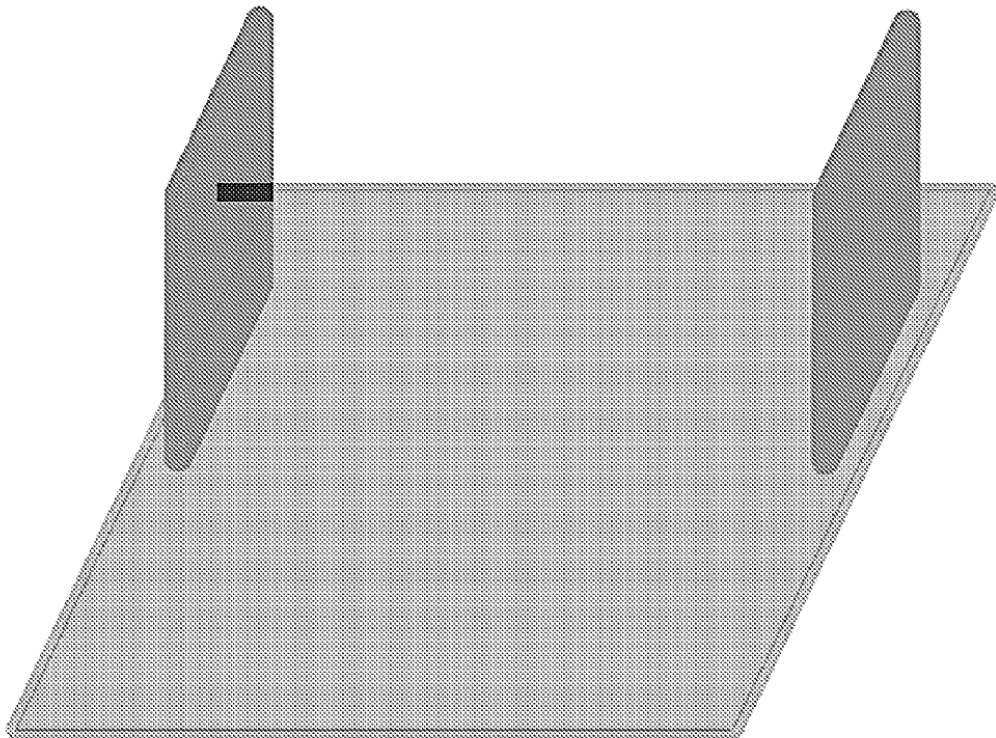


Figura 4

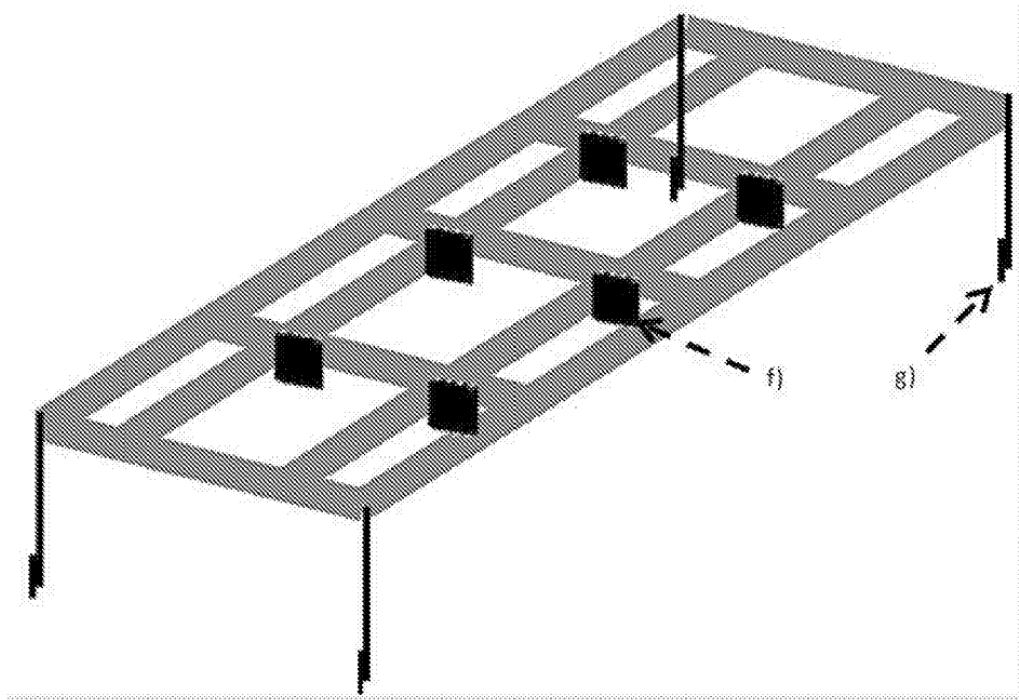


Figura 5

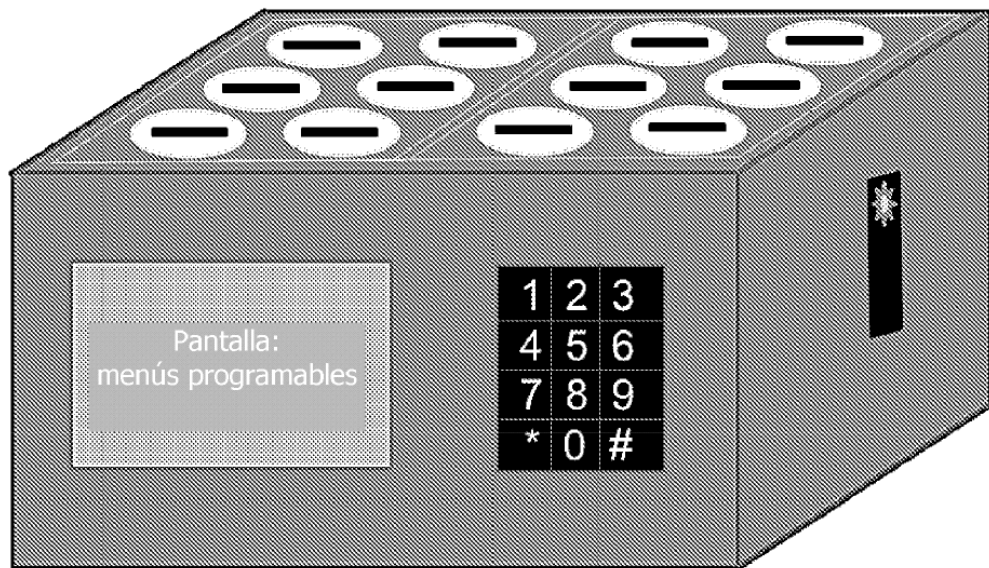


Figura 6

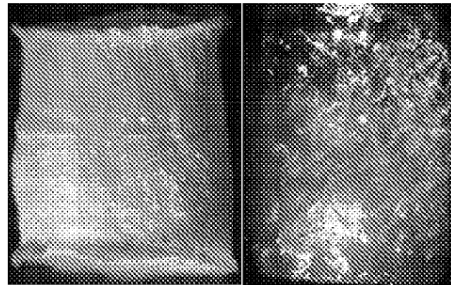


Figura 7

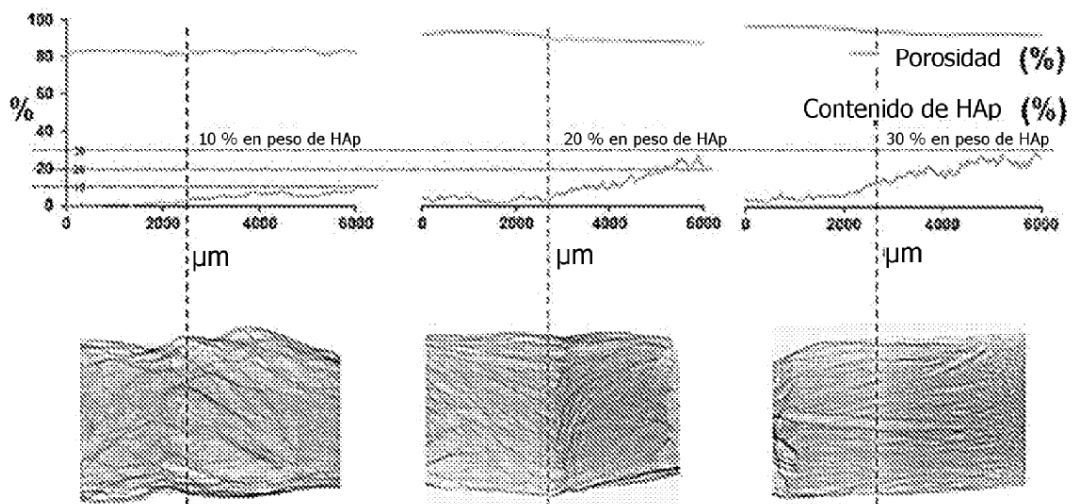


Figura 8

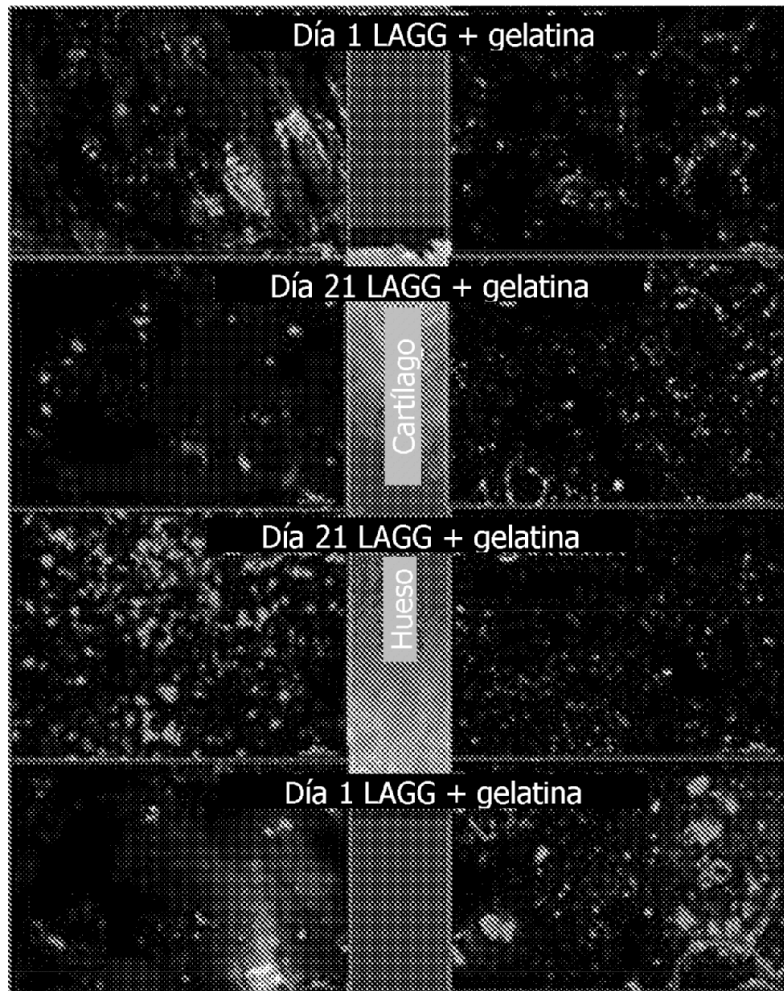


Figura 9