

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 708**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013 PCT/EP2013/062293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13731064 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2861713**

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

30 Prioridad:

14.06.2012 ES 201230933

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

13.12.2018

73 Titular/es:

**AGLARIS CELL S.L. (100.0%)
C/ Madrid 47 1ºB
28901 Getafe, ES**

72 Inventor/es:

**HORNA TOMÁS, DAVID y
COSTA FERRANDO, MIQUEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 693 708 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

Método y sistema de cultivo celular

5 Objeto de la invención

La invención está comprendida dentro de dispositivos automatizados para el cultivo celular. La invención se refiere a un método y sistema de cultivo celular que permite modificar de forma controlada la densidad y el número de células en un cultivo. Específicamente, la presente invención se refiere a un método iterativo cuyo número de pasos de iteración se modifica dependiendo de la demanda de densidad y el número de células necesarias para la duración del cultivo.

Antecedentes de la invención

15 Los biorreactores automatizados fabricados por compañías como Caridian BCT, PAN-systech, o el "biorreactor de onda" de General Electric, se pueden encontrar en el estado de la técnica.

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

25 La solicitud de patente internacional WO 2011/135339 A2 describe un reactor que comprende una plataforma que define un depósito de fluido dispuesto para recibir fluido, una pluralidad de cámaras de reacción, en donde las cámaras de reacción se diferencian entre sí, una pluralidad de canales de suministro para transportar fluido desde el al menos un depósito de fluido a una o más de la pluralidad de cámaras de reacción, y medios de bombeo dispuestos para bombear fluido a través de uno o más de una pluralidad de canales de suministro.

30 El documento US 2007/134790 A1 describe un biorreactor de cultivo celular que tiene una cámara de cultivo para el crecimiento celular, un depósito de medio de cultivo montado externamente a la cámara de cultivo, un mecanismo de circulación de fluido para mover el medio de cultivo desde el depósito a través de la cámara de cultivo, y un mecanismo de aireación para introducir aire en y retirar aire de la cámara de cultivo. El biorreactor de cultivo celular comprende un mecanismo múltiple montado en el extremo superior de la cámara de cultivo, un mecanismo de circulación de fluido conectado de manera fluida al depósito del medio de cultivo, para recibir el medio de cultivo del depósito del medio de cultivo y distribuir el medio de cultivo en la cámara de cultivo.

35 La solicitud de patente internacional WO 2010/121601 A2 se refiere a un dispositivo para cultivar automáticamente células en paralelo en recipientes de cultivos celulares, en particular placas de microtitulación (placas MT), que tienen un alojamiento en el que se dispone una unidad de observación que comprende un microscopio y una cámara, un dispositivo de receptáculo para recibir los recipientes de cultivo celular, y una unidad de distribución de fluido para llenar y/o vaciar automáticamente los recipientes de cultivo celular, en particular los pocillos de las placas MT, con líquido, en donde las condiciones climáticas en el dispositivo, en particular la composición de gas y temperatura, se puede regular al menos en el área de los recipientes de cultivo celular.

45 Sin embargo, los dispositivos y métodos conocidos en el estado de la técnica tienen el problema técnico de no ser lo suficientemente versátiles en el sentido de que no permiten realizar múltiples expansiones celulares dentro de un mismo biorreactor por demanda, lo que conduce a la incapacidad de controlar y modificar con precisión la densidad celular y el número total de células a medida que avanza en el proceso de amplificación, y en un rango estrecho de valores en los que se puede realizar el trabajo.

50 Estas limitaciones complican enormemente la utilización de biorreactores para la terapia celular.

Descripción de la invención

55 Se ha desarrollado un método de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1 y un sistema de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 10 para resolver los problemas considerados en el estado de la técnica. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones particulares de la invención.

El primer aspecto inventivo de la invención consiste en el método de cultivo celular mencionado y se caracteriza por que se implementa en un sistema que comprende:

- 60 • al menos un dispositivo adecuado para el cultivo celular, comprendiendo el dispositivo:
- ✓ al menos una cámara de biorreactor que comprende al menos una superficie interna adecuada para el cultivo celular,
 - ✓ medio de entrada y salida de fluido, y
 - 65 ✓ al menos una precámara en conexión con la al menos una cámara de biorreactor que comprende una entrada para introducir células,

y por que comprende los siguientes pasos:

- a) llenar la precámara con un medio de cultivo bajo condiciones fisicoquímicas iniciales con un volumen predeterminado de líquido,
 - 5 b) introducir células a través de la entrada de células para introducir células en la precámara,
 - c) pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara de biorreactor,
 - d) dejar que las células se asienten y dejarlas en reposo durante un tiempo predeterminado hasta que se adhieran a la al menos una superficie interior adecuada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que se comporte de tal manera que favorezca la adhesión celular bajo una o varias condiciones fisicoquímicas iniciales,
 - 10 e) dejar circular el medio de cultivo a través del dispositivo y a través de los medios de entrada y salida de fluido
 - f) una vez que se obtiene un número objetivo de células o se alcanza una densidad crítica en la al menos una cámara de biorreactor utilizada para el cultivo, cambiar al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales del medio de cultivo a condiciones fisicoquímicas modificadas bajo las que se previene la adhesión celular, de manera que el volumen restante dentro del dispositivo bajo condiciones fisicoquímicas modificadas se ubique en las cámaras que se han utilizado para la amplificación celular,
 - 15 g) transferir el medio de cultivo con las células a la precámara, y
- si se ha alcanzado el número objetivo de células, introducir un volumen adicional del medio de cultivo en la precámara y extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de medios de salida, o
- 20 si no se ha alcanzado el número objetivo de células, introducir medio de cultivo adicional en la precámara y repetir los pasos a partir del paso c).

El objeto del método de la invención es permitir modificar de forma controlada la densidad y el número de células en un cultivo. Específicamente, la invención se refiere a un método iterativo cuyo número de pasos de iteración se modifica dependiendo de la demanda de densidad y el número de células necesarias para la duración del cultivo.

Específicamente, el método iterativo comienza con la introducción del medio de cultivo en la precámara del dispositivo, de manera que el medio se separa de la al menos una cámara de biorreactor. Se introducen luego las células objeto de la amplificación y se transfiere luego la mezcla completa formada por el medio y las células a la al menos una cámara de cultivo a través de la conexión entre la precámara y la cámara. A lo largo de este documento, los términos "amplificación celular" y "cultivo celular" se entienden como sinónimos. Por otro lado, cuando se hace mención de condiciones fisicoquímicas, se refiere a las condiciones particulares de al menos un parámetro, tal como la temperatura, el nivel de pH o la concentración salina o similares.

Para realizar con éxito un proceso de amplificación celular, es conveniente que las células se adhieran a una superficie donde comienzan los procesos de división celular. Para ese fin, el siguiente paso del método comprende dejar las células en reposo de manera que se adhieran a una superficie interna del dispositivo en la al menos una cámara de biorreactor adecuada para el cultivo celular. Esta superficie está adaptada para cambiar su idoneidad para la adhesión celular en función del valor de al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales, por ejemplo, la temperatura, el pH o la concentración salina, ya sea debido a la naturaleza del material con el que estaba fabricado, o al hecho de que está recubierto con un gel o un producto cuyas propiedades cambian con la al menos una condición fisicoquímica inicial seleccionada, por ejemplo, la temperatura. La al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales del medio de cultivo, por ejemplo, una primera temperatura T1, se selecciona de manera que la característica de la superficie interna a esa temperatura sea tal que permita la adhesión celular.

45 Cuando las células se adhieren a la superficie, se inicia un flujo continuo de medio de cultivo bajo condiciones fisicoquímicas iniciales. Este flujo continuo proporciona a las células los nutrientes necesarios, como los aminoácidos y las vitaminas, de manera continua y renovada, de modo que la tasa de crecimiento es constante y óptima. Por lo tanto, la amplificación celular se lleva a cabo hasta obtener una densidad celular específica, a partir de la cual la calidad del cultivo no es la requerida, o un número objetivo de células.

50 Una vez que se ha obtenido esta densidad o este número objetivo de células, al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales del medio se cambia a condiciones fisicoquímicas modificadas, para las cuales la superficie adecuada para el cultivo celular tiene una característica fisicoquímica que permite que las células vuelvan a estar en suspensión en el medio.

En una realización no limitante, la forma de cambiar al menos una de las condiciones fisicoquímicas es vaciar las cámaras de biorreactor de medio de cultivo a temperatura T1 y luego llenar las cámaras de cultivo que contienen células con medio a temperatura T2. En un ejemplo particular, el volumen del medio que se introduce en cada cámara bajo las condiciones fisicoquímicas modificadas es el volumen que se ha introducido en cada cámara al inicio del proceso. Las células bajo estas condiciones fisicoquímicas modificadas se desprenden de las superficies adecuadas para la adhesión celular. El medio líquido con las células en suspensión se transfiere luego a la precámara.

65 Una vez que el medio líquido bajo condiciones fisicoquímicas modificadas y las células en suspensión están en la precámara, existen dos opciones:

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

5 El método proporciona la ventaja técnica de ser capaz de controlar *in vivo* el número de células requeridas a lo largo del método, con la versatilidad subsiguiente de ser capaz de modificar el número objetivo final de células de acuerdo con los requisitos del método aplicado.

10 En un segundo aspecto inventivo, la presente invención se refiere a un sistema de cultivo celular que comprende;

- al menos un dispositivo adecuado para el cultivo celular, comprendiendo el dispositivo:
 - ✓ al menos una cámara de biorreactor que comprende al menos una superficie interna adecuada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada y salida de fluido
 - ✓ al menos una precámara en conexión con la al menos una cámara de biorreactor que comprende una entrada para introducir células,
- sensores de concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura para controlar los niveles de estas variables, y
- una unidad de control que comprende un sistema de control óptico, estando adaptada la unidad de control para llevar a cabo el método de control para controlar el cultivo celular de acuerdo con el primer aspecto inventivo.

25 El sistema también se puede utilizar de manera versátil para diferentes usos, por ejemplo, para la reprogramación de células o la expansión de células mediante el intercambio de dispositivos desmontables, cada uno de los cuales está adaptado para el tipo de trabajo que realiza.

30 Todas las características descritas en esta especificación (incluidas las reivindicaciones, la descripción y los dibujos) se pueden combinar en cualquier combinación, excepto las combinaciones de tales características mutuamente exclusivas.

35 Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se realizará a continuación y con el fin de ayudar a comprender mejor las características de la invención de acuerdo con una realización práctica preferida de la misma, se adjunta un conjunto de dibujos como una parte integral de dicha descripción, en la que se muestra lo siguiente con un carácter ilustrativo y no limitativo:

40 la Figura 1 muestra una realización de un sistema de acuerdo con la invención.

La Figura 2.1, la Figura 2.2, la Figura 2.3 y la Figura 2.4 muestran un ejemplo particular de una secuencia de pasos del método de acuerdo con la invención aplicado a un ejemplo particular del sistema.

45 La Figura 3 muestra un ejemplo particular de una cámara (2) de biorreactor con superficies adicionales (39) para la adhesión celular.

50 Descripción detallada de la invención

Sistema de cultivo celular

El sistema de cultivo celular propuesto por la invención es un sistema que comprende:

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

65 El medio de cultivo está contenido en una cámara (7) para contener medio de cultivo celular que se mantiene en la condición de presión, condición de temperatura, condición de pH, nivel de oxígeno y nivel de dióxido de carbono deseada. Para ese fin, en una realización, esta cámara (7), para contener medio de cultivo, está provista de sensores para estas condiciones y está conectada a un cilindro de oxígeno, a un cilindro de dióxido de carbono, a un

dispensador de NaOH, a un cilindro de nitrógeno que controla la presión (todas estas conexiones con sus correspondientes válvulas) y, en un ejemplo particular, a un intercambiador de calor (11) que permite cambiar la temperatura, la condición fisicoquímica particular en este ejemplo.

5 La cámara (7), para contener medio de cultivo celular, está en conexión con un dispositivo (1) por medio de al menos un primer conducto (9) para transportar medio de cultivo; al menos un segundo conducto (10) para transportar gases que además conecta un sistema de alimentación de gas, N₂ en la realización de la Figura 1, con el dispositivo (1). Estos al menos un primer y segundo conducto de transporte (9, 10), en el ejemplo representado en la Figura 1, también tienen válvulas para controlar el flujo del medio y del gas; una de las válvulas para controlar el flujo del medio permite seleccionar, en el ejemplo de la Figura 1, donde la al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales que cambian es la temperatura, entre dos vías alternativas para el medio de cultivo, una de las cuales pasa por un intercambiador de calor (11) que permite acondicionar su temperatura antes de alcanzar el dispositivo (1).

15 Ventajosamente, en una realización particular del sistema de acuerdo con la invención, el dispositivo (1) es desmontable y proporciona al sistema un elemento que se puede adquirir independientemente y se adapta a diferentes cultivos celulares, tales como, por ejemplo, células de mamífero, células bacterianas, etc. Por lo tanto, el dispositivo adapta el sistema para diferentes fines solo mediante el intercambio del dispositivo (1) desmontable dependiendo del método a realizar.

20 Método de cultivo celular

El método presentado por la invención se caracteriza por que se implementa en un sistema que comprende:

- 25 • al menos un dispositivo (1) adecuado para el cultivo celular, comprendiendo el dispositivo (1):
 - ✓ al menos una cámara (2) de biorreactor que comprende al menos una superficie interna (22, 3, 39) adecuada para cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada y salida de fluido (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24),
 - 30 ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara (2) de biorreactor que comprende una entrada (5) para introducir células,

y por que comprende los siguientes pasos:

- 35 a) llenar la precámara (4) con un medio de cultivo bajo condiciones fisicoquímicas iniciales con un volumen predeterminado de líquido, colocándose la precámara (4) de tal manera que el medio de cultivo no pase a la al menos una cámara (2) de biorreactor,
- b) introducir células a través de la entrada (5) de células para introducir células en la precámara (4),
- c) pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara (2) de biorreactor,
- 40 d) dejar que las células se asienten y dejarlas en reposo durante un tiempo predeterminado hasta que se adhieran a la al menos una superficie interior (22, 3, 39) adecuada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que se comporte de tal manera que favorezca la adhesión celular bajo varias condiciones fisicoquímicas iniciales,
- e) dejar circular el líquido a través del dispositivo (1) y a través de los medios de entrada y salida de fluido (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24) hasta obtener un número objetivo de células o hasta alcanzar una densidad crítica en la al menos una cámara (2) de biorreactor llena de medio de cultivo,
- 45 f) una vez que se obtiene un número objetivo de células o se alcanza una densidad crítica en la al menos una cámara (2, 2', 2'') de biorreactor utilizada para el cultivo, cambiar al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales del medio de cultivo a condiciones fisicoquímicas modificadas bajo las que se previene la adhesión celular, de manera que el volumen restante dentro del dispositivo (1) bajo condiciones fisicoquímicas modificadas se ubique en las cámaras (2, 2', 2'') de biorreactor que se han utilizado para la amplificación celular,
- 50 g) pasar el medio de cultivo con las células a la precámara (4), y
 - si se ha alcanzado el número objetivo de células, extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de medios de salida (24), o
 - 55 si no se ha alcanzado el número objetivo de células, introducir medio de cultivo adicional en la precámara (4) y repetir los pasos a partir del paso c).

En una realización en el primer paso, solo se llena una cámara (2) de biorreactor para cultivo celular. En un ejemplo particular, la precámara (4) del dispositivo (1) se llena con medio de cultivo a través de una válvula (13), como se observa en las Figuras 1 y 2. La cantidad de medio de cultivo que se acumula en la precámara (4) antes de cerrar esta válvula (13) suele ser, pero no siempre, igual al volumen de la primera cámara (2) de biorreactor. En este ejemplo, solo una cámara (2) de biorreactor se llena en el primer paso. Antes de llenar la cámara de biorreactor, se introducen las células en la precámara (4) a través de la entrada (5) para introducir las células de modo que estén en suspensión en el medio de cultivo.

65 En el ejemplo particular de la Figura 1, el medio de cultivo con las células en suspensión se pasa a la primera

cámara (2) de biorreactor mediante el movimiento del dispositivo (1) y la introducción de nitrógeno a través de la válvula (15), ya que es inerte para las células. El dispositivo (1) se mueve mediante un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1). El ejemplo particular de la Figura 1 muestra un dispositivo (1) con tres cámaras (2, 2', 2'') de biorreactor:

5 En un ejemplo particular, la precámara (4) está en conexión con la primera cámara (2) de biorreactor por medio de una segunda válvula (14) que está ubicada en la parte de la pared cerca de la esquina de la precámara que separa las cámaras.

10 En el ejemplo particular representado en la Figura 2.2, el dispositivo (1) cambia su posición de horizontal a vertical, entendiéndose así la posición vertical, por lo que la pared más larga del dispositivo (1) se ubica en una dirección vertical, y entendiéndose así la posición horizontal, por lo que la pared más larga del dispositivo (1) está ubicada en una dirección horizontal, por medio de un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1), como se ve en la Figura 1, que en esta realización particular es un motor capaz de transferir un movimiento de rotación.

15 La segunda válvula (14) está en una posición tal que el medio de cultivo con las células en suspensión está ubicado en la precámara (4) a una altura igual o mayor que la válvula, por lo que puede pasar a través de la misma. Para facilitar la transferencia del medio fluido entre la precámara (4) y la cámara (2) de biorreactor, en un ejemplo particular, la precámara (4) comprende una válvula (15) de entrada de gas conectada a un cilindro de nitrógeno y la última cámara (2'') de biorreactor, que en este ejemplo es la tercera cámara de biorreactor, comprende una segunda
20 válvula (19) de salida de gas. Por lo tanto, la transferencia del medio de cultivo con las células en suspensión se facilita mediante la inyección de, en este caso particular, nitrógeno, ya que es inerte para las células.

25 Una vez que el medio de cultivo con las células en suspensión ha pasado a la primera cámara (2) de biorreactor, el mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) mueve el dispositivo (1) a una posición tal que la segunda válvula (14) entre la precámara (4) y la primera cámara (2) de biorreactor está, en este ejemplo particular, a una altura igual o mayor que la del medio de cultivo con las células en suspensión, y el medio de cultivo se ubica así en la cámara (2) de biorreactor sin la posibilidad de tener una vía de escape hacia la precámara (4). Este paso se muestra en la
30 Figura 2.3.

35 En una realización mostrada en la Figura 3, la cámara (2) de biorreactor comprende internamente una serie de superficies (39) adicionales para la adhesión celular, que pueden ser de forma esférica o tubular, entre otras formas, de modo que la superficie útil para el cultivo es mayor que la permitida por las superficies internas (22, 3) adecuadas para el cultivo celular de la cámara (2) de biorreactor. En un ejemplo particular, las superficies adicionales (39) para la adhesión celular son una pluralidad de biomoléculas, preferentemente proteínas, péptidos o moléculas sintéticas biológicamente activas comprendidas en al menos una superficie interna del dispositivo.

40 En una realización particular, para hacer posible la adhesión, las superficies adicionales (39) para la adhesión celular y las superficies internas (22, 3) adecuadas para el cultivo celular de la cámara (2) de biorreactor se recubren con un gel que cambia sus propiedades fisicoquímicas con la temperatura. En un ejemplo particular, este gel es poli(n-isopropil acrilamida). A 37 °C, este gel es adecuado para la adhesión celular y permite que las células se adhieran a las superficies (3, 22, 39) cubiertas por el gel para facilitar la amplificación celular. En un ejemplo particular, no se utiliza un gel sino que las superficies internas (3, 22, 39) adecuadas para el cultivo celular de la cámara (2) de
45 biorreactor están adaptadas para cambiar sus propiedades dependiendo de la temperatura para permitir la adhesión celular.

50 Cuando ha tenido lugar la adhesión celular, un nuevo medio de cultivo circula de forma continua a través del dispositivo a una temperatura tal que la superficie interna (3, 22, 39) adecuada para el cultivo mantiene las condiciones fisicoquímicas que facilitan la adhesión celular, que entra, en el ejemplo particular mostrado en la Figura 1, a través de la válvula (13) de entrada de medio de la precámara (4) y que sale a través de las válvulas (14, 17, 18, 23) de salida de medio. Ventajosamente, al hacer que el medio fluya de forma continua, el medio se renueva a las condiciones requeridas para el cultivo celular.

55 En una realización, el sistema comprende sensores para la concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura ubicados después de la válvula (17) de salida para controlar los niveles de estas variables durante el proceso de amplificación.

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

65 En esta realización, el dispositivo (1) que se coloca horizontalmente en este paso del proceso tiene una superficie (22) transparente; debajo de esta superficie (22) transparente, que se puede cubrir con un gel y sobre la cual las células pueden adherirse y multiplicarse en este paso, se ubica al menos un microscopio que mide el número de células y la densidad celular. Este microscopio óptico transmite esta información a la unidad de control (20) y el sistema funciona así automáticamente.

Una vez que se ha obtenido el número objetivo de células o la densidad celular alcanza un valor a partir del cual la calidad del cultivo es inferior a la requerida, las condiciones fisicoquímicas del medio que circula en un flujo continuo se cambian a condiciones fisicoquímicas modificadas para las cuales la superficie interior (3, 22, 39) adecuada para el cultivo celular tiene una característica fisicoquímica tal que permite que las células estén nuevamente en suspensión en el medio. Para ese fin, una vez que el dispositivo (1) ha alcanzado condiciones fisicoquímicas modificadas, por ejemplo, una temperatura T2 debido a la entrada de flujo a esta temperatura, el flujo continuo del medio se detiene y se deja reposar en el dispositivo (1) hasta que las células están nuevamente en suspensión. El medio líquido con las células en suspensión se transfiere luego a la precámara (4). En el ejemplo particular de la Figura 1, cuando se alcanza el número objetivo de células o la densidad máxima, que se detectan automáticamente en la realización particular que se muestra en la Figura 1 por medio de la unidad de control (20) que tiene un sistema de control óptico (21), el medio de cultivo que circula de forma continua circula a una temperatura T2 lo suficientemente larga como para permitir que esta temperatura sea uniforme en todo el dispositivo (1). A esta temperatura, las superficies internas (3, 22, 39) adecuadas para el cultivo celular tienen propiedades que no son adecuadas para la adhesión celular, por lo que las células se suspenden nuevamente, perdiendo su adhesión a la superficie o superficies adecuadas para el cultivo. En un ejemplo particular, el medio de cultivo pasa desde la salida de la cámara (7) para contener medio de cultivo celular a través de conductos de transporte (9) que comprenden un intercambiador de calor (11); así la temperatura cambia de T1 a T2.

En un ejemplo particular, la temperatura T2 es de 24 °C, ya que el gel de poli(n-isopropil acrilamida) utilizado en esta realización se comporta de tal manera que la adhesión celular no se produce a esta temperatura.

Luego se interrumpe el flujo continuo del medio de manera tal que el volumen restante dentro del dispositivo es igual al de la cámara (2) de biorreactor utilizada para la amplificación, y que todo el volumen del medio a la temperatura T2 se encuentra en la primera cámara (2) de biorreactor.

Cuando las células se han separado y están nuevamente en suspensión en el medio de cultivo, el medio de cultivo con las células en suspensión se transfiere a la precámara. En el ejemplo de las figuras 1, 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, el dispositivo (1) gira, en un ejemplo particular, con la ayuda de un mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) en una dirección opuesta a la dirección del paso anterior de la Figura 2.3 hasta alcanzar la posición que se muestra en la Figura 2.4, de modo que se encuentre en posición vertical, con la segunda válvula (14) al mismo nivel o por debajo del medio de cultivo con las células en suspensión. En esta posición, y con la ayuda de los cambios de presión causados por las válvulas (15, 19) de entrada y salida de gas para la entrada y salida de un gas, en un ejemplo particular, nitrógeno, se transfiere el medio de cultivo con las células en suspensión a la precámara (4).

Si el cultivo se lleva a cabo en la primera cámara para obtener un mayor número de células totales, la calidad del cultivo disminuiría a medida que se acumula un gran número de células, que comparten una superficie de crecimiento limitada. La ventaja proporcionada por el método iterativo de acuerdo con la invención es que el número de células cultivadas aumenta en la medida en que se necesitan más células, pero no a expensas de una densidad tal que la calidad del cultivo se vea afectada negativamente. Para ese fin, una segunda cámara (2') de biorreactor se llena, lo que resulta en una nueva iteración del método de acuerdo con la invención, ya que no se ha alcanzado el número objetivo final de células y la calidad de las células amplificada en la primera cámara (2) de biorreactor se ve afectada por la densidad adquirida por el medio de cultivo con las células. La realización de la invención es como se describe a continuación:

La precámara (4) se llena con una cantidad adicional de medio de cultivo que llega a través de los conductos de transporte (9) desde la cámara (7) para contener el medio de cultivo celular y entra a través de la válvula (13). Esta cantidad adicional de medio de cultivo tiene un volumen generalmente igual al de la segunda cámara (2') de biorreactor. Por lo tanto, en este paso de esta realización, el volumen total del medio de cultivo en la precámara (4) es igual a la suma de la capacidad de la primera cámara (2) de biorreactor más la segunda cámara (2') de biorreactor.

La segunda válvula (14) está en una posición tal que el medio de cultivo con las células en suspensión está ubicado en la precámara (4) a una altura igual o mayor que la válvula, por lo que puede pasar a través de la misma. Para facilitar la transferencia del medio fluido entre la precámara (4) y la cámara (2, 2') de biorreactor, en un ejemplo particular, la precámara (4) comprende una válvula de entrada de gas (15) conectada a un cilindro de nitrógeno. La última cámara (2") de biorreactor, que en este ejemplo es la tercera cámara de biorreactor, comprende una válvula (19) de salida de gas. Por lo tanto, la transferencia del medio de cultivo con las células en suspensión se facilita mediante la inyección de, en este caso particular, nitrógeno, ya que es inerte para las células.

En la realización mostrada en la Figura 1, las cámaras (2, 2') de biorreactor están en comunicación por medio de una tercera válvula (18) que permite el paso del medio de cultivo entre ellas. En este paso de esta realización particular, cuando todo el medio de cultivo abandona la precámara (4), las cámaras (2, 2') de biorreactor se llenan.

Una vez que el medio de cultivo con las células en suspensión ha pasado a la primera cámara (2) de biorreactor y a la segunda cámara (2') de biorreactor, el mecanismo (16) para mover el dispositivo (1) mueve el dispositivo (1) nuevamente a una posición tal que la segunda válvula (14) entre la precámara (4) y la primera cámara (2) de

bioreactor se ubique, en este ejemplo particular, a una altura igual o mayor que la del medio de cultivo con las células en suspensión, y el medio de cultivo se ubica así en las cámaras (2, 2') de bioreactor sin la posibilidad de tener una vía de escape hacia la precámara (4).

- 5 En una realización particular, la primera cámara (2) de bioreactor y la segunda cámara (2') de bioreactor tienen una serie de superficies (39) adicionales para la adhesión celular que pueden ser de forma esférica o tubular, entre otras formas, de modo que la superficie útil para el cultivo es mayor que la permitida por las superficies internas (3, 22) adecuadas para el cultivo celular de ambas cámaras (2, 2') de bioreactor. En una realización particular, para hacer posible la adhesión, las superficies adicionales (39) para la adhesión celular y las superficies internas (3, 22)
- 10 adecuadas para el cultivo celular de la cámara (2, 2') de bioreactor se recubren con un gel que cambia sus propiedades como una condición fisicoquímica específica, en este ejemplo, la temperatura, cambia. En un ejemplo particular, este gel es un gel de poli(n-isopropil acrilamida). A 37 °C, este gel es tal que permite que las células se adhieran a las superficies (3, 22, 39) cubiertas por el gel, para facilitar la división celular. En un ejemplo particular, no se utiliza un gel sino que las superficies internas (3, 22, 39) adecuadas para el cultivo celular de las cámaras (2, 2')
- 15 de bioreactor están adaptadas para cambiar sus propiedades dependiendo de la temperatura para permitir la adhesión celular.

20 Cuando ha tenido lugar la adhesión celular, un nuevo medio de cultivo circula de forma continua a través del dispositivo a una temperatura tal que las superficies internas (3, 22, 39) adecuadas para el cultivo mantienen las condiciones fisicoquímicas que facilitan la adhesión celular, que entra, en el ejemplo particular mostrado en la Figura 1, a través de la válvula (13) de entrada de medio de la precámara (4) y que sale a través de la válvula (17) de salida de medio de la última cámara (2") para llenarse. Ventajosamente, al hacer que el medio fluya de forma continua, el medio se renueva a las condiciones requeridas para el cultivo celular.

- 25 En una realización, el sistema comprende sensores para la concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura ubicados después de la válvula (17) de salida para controlar los niveles de estas variables durante el proceso de amplificación.

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

35 En esta realización, el dispositivo (1) que se coloca horizontalmente en este paso del proceso tiene una superficie (22) transparente; debajo de esta superficie (22) transparente, que se puede cubrir con un gel y sobre la cual las células pueden adherirse y multiplicarse en este paso, se ubican una serie de microscopios que miden el número de células y la densidad celular. Estos microscopios ópticos transmiten esta información a la unidad de control (20) y el sistema funciona así automáticamente.

40 Cuando se alcanza la densidad a partir de la cual la calidad del cultivo no es la requerida o se alcanza el número de células deseadas, que se detectan automáticamente en la realización particular que se muestra en la Figura 1 por medio de la unidad de control (20) que tiene un sistema de control óptico (21), el medio de cultivo, que circula de forma continua, cambia el valor de la al menos una condición fisicoquímica inicial seleccionada, en este ejemplo, la temperatura, a una temperatura T2 lo suficientemente larga como para permitir que esta temperatura sea uniforme en todo el dispositivo (1). A esta temperatura, las superficies internas (3, 22, 39) adecuadas para el cultivo celular

45 tienen propiedades fisicoquímicas que no son adecuadas para la adhesión celular, por lo que las células se suspenden nuevamente, perdiendo su adhesión a la superficie o superficies adecuadas para el cultivo. En un ejemplo particular, el medio de cultivo pasa desde la salida de la cámara (7) para contener medio de cultivo celular a través de conductos de transporte (9) que comprenden un intercambiador de calor (11); así la temperatura cambia de T1 a T2.

50 En un ejemplo particular, la temperatura T1 es de 37 °C y la temperatura T2 es de 24 °C ya que el gel de poli n-isopropil acrilamida utilizado en esta realización se comporta de manera tal que es adecuado para la adhesión celular a 37 °C y tal que no es adecuado para la adhesión celular a 24 °C.

- 55 Luego se interrumpe el flujo continuo del medio de tal manera que el volumen restante dentro del dispositivo es igual a la suma de los volúmenes de las cámaras (2, 2') de bioreactor utilizadas para la amplificación, y que todo este volumen del medio a la temperatura T2 está ubicado en estas dos cámaras (2, 2') de bioreactor.

60 Cuando las células se han separado y están nuevamente en suspensión en el medio de cultivo, el dispositivo (1) se gira con la ayuda del mecanismo (16) para mover el dispositivo (1), en el ejemplo particular de la Figura 1, de modo que se ubica en posición vertical, como se indica en la Figura 2.4, con la segunda válvula (14) al mismo nivel o por debajo del medio de cultivo con las células en suspensión. En esta posición, y con la ayuda de los cambios de presión causados por las válvulas (15, 19) de entrada y salida de gas para la entrada y salida de un gas, en un ejemplo particular, nitrógeno, se transfiere el medio de cultivo con las células en suspensión a la precámara (4).

65 Si el cultivo se lleva a cabo en la primera y segunda cámara para obtener un mayor número de células totales, la calidad del cultivo disminuiría a medida que se acumula un gran número de células, compartiendo una misma

- superficie de crecimiento. La ventaja proporcionada por el método iterativo de acuerdo con la invención es que el número de células cultivadas aumenta en la medida en que se necesitan más células, pero no a expensas de una densidad tal que la calidad del cultivo se vea afectada negativamente. Para ese fin, una tercera cámara (2'') de biorreactor se llena, lo que da como resultado una nueva iteración del método de acuerdo con la invención. Los
- 5 pasos en este ejemplo son similares a los descritos anteriormente para llenar una cámara de biorreactor y para llenar dos cámaras de biorreactor, y todas las realizaciones particulares consideradas también son aplicables. Específicamente, en la realización mostrada en la Figura 1, las cámaras (2, 2', 2'') de biorreactor están en comunicación por medio de las válvulas (18, 23) que permiten el paso del medio de cultivo entre ellas.
- 10 En la realización particular mostrada en la Figura 1, que comprende tres cámaras de biorreactor, esta tercera cámara (2'') de biorreactor corresponde a la última cámara de biorreactor que se va a llenar, de manera que comprende la válvula (19) de salida de gas y la válvula (17) de salida de medio.
- 15 En esta realización particular, cuando el medio de cultivo con las células en suspensión se transfiere de la manera descrita anteriormente a la precámara (4) a través de las válvulas (14, 18, 23), el cultivo celular ya no se puede continuar sin deterioro en la calidad del cultivo.
- 20 En la realización de la Figura 1, una vez que se ha alcanzado el número objetivo de células mediante el llenado sucesivo de las tres cámaras mencionadas anteriormente, se transfiere el medio de cultivo desde la precámara (4) hacia una válvula (24) de salida final de manera que el medio de cultivo abandona el dispositivo (1).
- En una realización particular, el medio de cultivo que se transfiere desde el dispositivo (1) pasa a través de un sistema de filtración (25) en el que las células se separan del medio de cultivo de la siguiente manera:
- 25 En una realización particular, el sistema de filtración (25) comprende una cámara (26) para contener medio líquido, tal como un líquido tamponado, y conductos (27) ubicados entre dicha cámara para contener líquido y el sistema de filtración (25). Este sistema de filtración (25) comprende medios de entrada y salida de líquido y medios de entrada y salida de medio de cultivo. En ambos casos, los medios de entrada y salida son válvulas en una realización particular. En la realización particular de la Figura 1, el medio de cultivo entra en el sistema de filtración (25) a través
- 30 de una válvula (28) y sale del sistema de filtración a través de la válvula (32); el líquido a su vez entra en el sistema de filtración (25) a través de una válvula (29) y sale del sistema de filtración a través de una válvula (30).
- El sistema de filtración (25) comprende internamente un filtro (31) que, en una realización particular, comprende medios de vibración (37). El filtro (31) retiene las células en suspensión en el medio de cultivo; en la realización particular correspondiente, las células se separan del filtro (31) por medio del movimiento provocado por los medios de vibración (37) en el filtro (31). En una realización particular, el líquido que entra en el sistema de filtración (25) a través de la válvula (29) recoge las células de modo que las células que están en suspensión en el líquido; en esta realización particular, el líquido, que en una realización particular es un líquido tamponado, salen del sistema de filtración (25) a través de la válvula (30). Por lo tanto, el líquido con una concentración celular específica
- 40 (concentración C) se encuentra en la salida de dicha válvula (30). En la realización particular de la Figura 1, el medio de cultivo sale del sistema de filtración (25), sin células en suspensión, a través de la válvula (32).
- 45 En una realización particular, el sistema comprende un sistema de esterilización (33). Específicamente, en la realización particular mostrada en la Figura 1, el sistema de esterilización (33) comprende una cámara (34) para contener sustancia esterilizante, una bomba (35) para bombear la sustancia esterilizante a través de los conductos de transporte (9, 10) y una válvula (36) que regula la entrada de sustancia esterilizante al resto del sistema.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo celular caracterizado por que se implementa en un sistema que comprende:

- 5 • al menos un dispositivo (1) adecuado para el cultivo celular, comprendiendo el dispositivo (1):
- ✓ al menos una cámara (2) de biorreactor que comprende al menos una superficie interna (3, 22, 39) adecuada para el cultivo celular,
 - ✓ medios de entrada y salida (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24) de fluido, y
 - 10 ✓ al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara (2) de biorreactor, que comprende una entrada (5) para introducir células,

y por que comprende los siguientes pasos:

- 15 a) llenar la precámara (4) con un medio de cultivo bajo condiciones fisicoquímicas iniciales con un volumen predeterminado de líquido,
 - b) introducir células en la precámara (4) a través de la entrada celular (5),
 - c) pasar el medio de cultivo con las células a la al menos una cámara (2) de biorreactor,
 - 20 d) dejar que las células se asienten y dejarlas en reposo durante un tiempo predeterminado hasta que se adhieran a la al menos una superficie interior (3, 22, 39) adecuada para el cultivo celular cuyas propiedades fisicoquímicas hacen que se comporte de tal manera que favorezca la adhesión celular bajo una o varias condiciones fisicoquímicas iniciales,
 - e) dejar circular el medio de cultivo a través del dispositivo (1) y a través de los medios de entrada y salida (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24) de fluido,
 - 25 f) una vez que se obtiene un número objetivo de células o se alcanza una densidad crítica en la al menos una cámara (2, 2', 2'') de biorreactor utilizada para el cultivo, cambiar al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales del medio de cultivo a condiciones fisicoquímicas modificadas bajo las que se previene la adhesión celular, de tal manera que el volumen restante dentro del dispositivo (1) bajo condiciones fisicoquímicas modificadas se ubique en las cámaras (2, 2', 2'') de biorreactor que se han utilizado para la amplificación celular,
 - 30 g) pasar el medio de cultivo con las células a la precámara (4), y
- si se ha alcanzado el número objetivo de células, extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de medios de salida (24), o
- si no se ha alcanzado el número objetivo de células, introducir medio de cultivo adicional en la precámara y repetir los pasos a partir del paso c).
- 35

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la al menos una de las condiciones fisicoquímicas iniciales que cambian es la temperatura.

40 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende controlar automáticamente el número y/o la densidad de células por medio de al menos una unidad de control (20) adecuada para controlar el cultivo celular llevado a cabo en el dispositivo (1).

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

- 50 • una vez que ha pasado el medio de cultivo a la al menos una cámara (2) de biorreactor, colocar el dispositivo (1) de manera que el medio de cultivo con las células en suspensión se ubique en la superficie (22) transparente y esta superficie (22) transparente se coloca a su vez en el sistema de control óptico (21) para controlar el número y/o la densidad de células.

55 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende un paso para esterilizar el sistema por medio de un sistema de esterilización (33) conectado con dicho sistema.

60 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la transferencia entre la precámara (4) y la al menos una cámara (2, 2', 2'') de biorreactor se realiza mediante presión de tal manera que el medio pasa a través de varias válvulas (14, 18, 23).

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que después de extraer el medio de cultivo con las células en suspensión a través de los medios de entrada y salida (24) de fluido, las células se separan del medio de cultivo por medio de:

- 65 • un medio líquido contenido en una cámara (26),
- al menos un sistema de filtración (25) conectado a dicha cámara (26), que comprende:

- medios de entrada y salida (29) de medio líquido,
- medios de entrada y salida (28, 32) de medio de cultivo,
- al menos un filtro (31),

5

y por que se implementan los siguientes pasos:

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

10

de modo que las células se separen del medio de cultivo.

15 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que las células se separan del filtro mediante agitación de dicho filtro por medio de al menos un medio de vibración (37) comprendido en dicho filtro.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones, caracterizado por que se preparan cultivos de diferentes tipos por medio de un sistema que comprende una pluralidad de dispositivos desmontables, cada uno de estos dispositivos utiliza al menos una superficie interna adecuada para el tipo de cultivo que se va a preparar.

20

10. Un sistema de cultivo celular que comprende:

25

- al menos un dispositivo (1) adecuado para el cultivo celular, comprendiendo el dispositivo (1):
 - al menos una cámara (2) de biorreactor que comprende al menos una superficie interna (3, 22, 39) adecuada para el cultivo celular,
 - medios de entrada y salida (13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24) de fluido, y
 - al menos una precámara (4) en conexión con la al menos una cámara (2) de biorreactor que comprende una entrada (5) para introducir células,

30

- sensores de concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y temperatura para controlar los niveles de estas variables, y
- una unidad de control (20) que comprende un sistema de control óptico (21), estando adaptada la unidad de control (20) para llevar a cabo el método de control para controlar el cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1.

35

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que al menos una de las superficies internas (3) del dispositivo es transparente, formando una superficie (22) transparente de manera que se implementa un método de control de acuerdo con la reivindicación 4.

40

12. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado por que comprende al menos un sistema de esterilización (33).

45

13. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que comprende:

- al menos una cámara (26) para contener un medio líquido,
- al menos un sistema de filtración (25) que comprende:
 - medios de entrada y salida (29) de medio líquido,
 - medios de entrada y salida (28, 32) de medio de cultivo,
 - al menos un filtro (31),

50

- medios (27) para transportar medio líquido entre la cámara (26) para contener un medio líquido y el al menos un sistema de filtración (25).

55

14. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado por que comprende válvulas de entrada y salida (14) desde la precámara (4) a la cámara (2) de biorreactor y/o válvulas de entrada y salida (15, 19) de gas.

60

15. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado por que comprende superficies adicionales (39) para la adhesión celular en al menos una cámara (2) de biorreactor, preferentemente proteínas, péptidos o moléculas sintéticas biológicamente activas.

65

16. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, caracterizado por que la al menos una superficie interna (22, 3, 39) adecuada para cultivo celular está recubierta con un gel.

17. El sistema de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por que el gel es un hidrogel de poli(n-isopropil acrilamida).

5 18. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizado por que el sistema de filtración (25) comprende un medio de vibración (37).

19. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, caracterizado por que el dispositivo (1) es desmontable

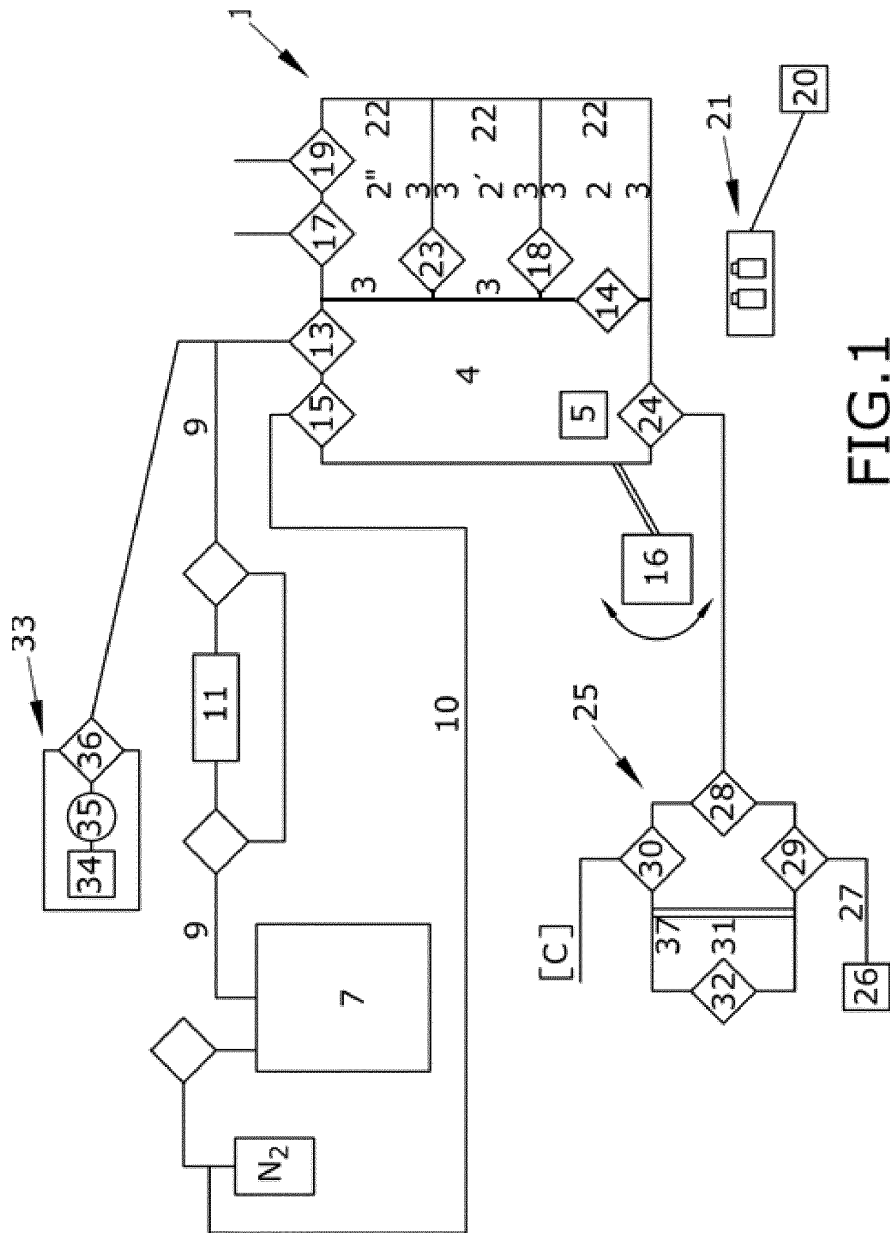


FIG.1

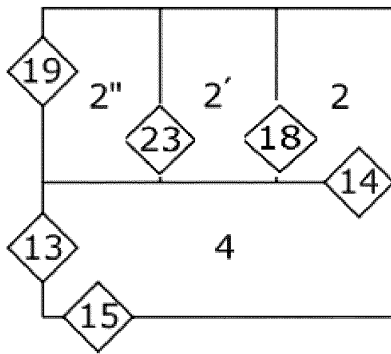


FIG. 2.1

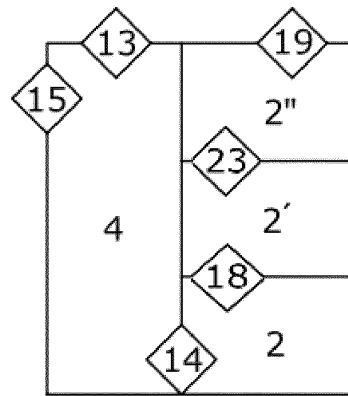
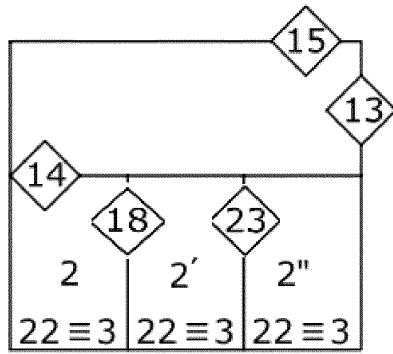


FIG. 2.2



21

FIG. 2.3

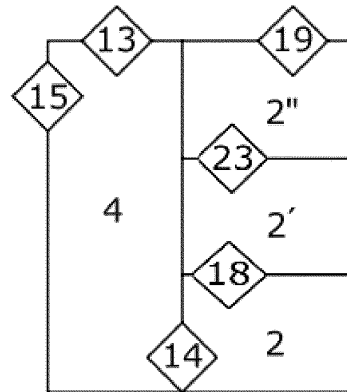


FIG. 2.4

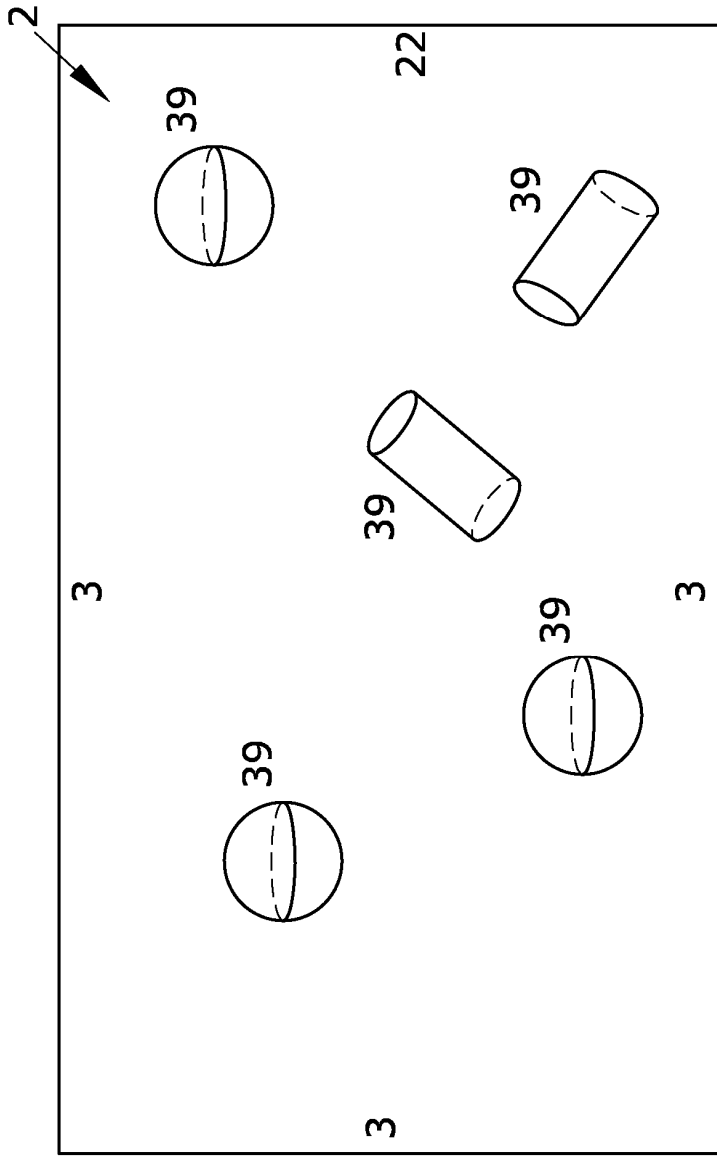


FIG. 3