

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 318**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2005 PCT/IB2005/001210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2005 WO05108550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2005 E 05735750 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 1745121**

54 Título: **Biorreactor para ingeniería de tejidos**

30 Prioridad:

06.05.2004 US 568255 P

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HOSPITAL OF BASEL (100.0%)
Hebelstrasse 30
4031 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JAKOB, MARCEL;
JAKOB, KARL;
MARTIN, IVAN y
TIMMINS, NICHOLAS, EION**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 733 318 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 para ingeniería de tejidos.

5 **Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención

La presente invención es un biorreactor para sembrar y cultivar células en un entorno tridimensional.

10

2. Antecedentes de la técnica

Existe un interés creciente en estudiar la función celular, no en cultivos bidimensionales (2D) (por ejemplo, monocapas), sino en entornos tridimensionales (3D) (por ejemplo, los proporcionados por andamios porosos, del inglés "porous scaffolds"). El cultivo celular en andamios 3D también puede ser útil en terapia celular para la expansión de células funcionales y en ingeniería de tejidos para la generación de estructuras de tejido implantables. Las dificultades intrínsecas con los cultivos 3D en andamios 3D son (i) la siembra uniforme y eficaz de células a lo largo de los poros del andamio, y (ii) transferencia de masa limitada a las células en la parte central del andamio. Los presentes inventores han comunicado recientemente que la perfusión de suspensiones celulares y, subsiguientemente, el medio de cultivo a través de los poros del andamio, es una posible solución para ambos problemas (Wendt *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 84: 215-214, 2003). El documento WO 01/21760 A2 describe un procedimiento de cultivo de células *in vitro*. De esta forma, las células se introducen en una matriz tridimensional que se mueve en un medio de cultivo celular líquido. El documento US 2003/0143727 A1 describe un procedimiento y un dispositivo para el cultivo *in vitro* de células con una mortalidad mínima y para la recolección de productos celulares producidos a partir de las mismas, mediante el plaqueo de células y causando la máxima adherencia de las células de interés. El documento US 5.071.766 A describe un aparato para aislar y cultivar microorganismos que mantiene una muestra biológica en un soporte en contacto con un medio líquido en todo momento, independientemente de la orientación del aparato.

15

20

25

30

35

La presente invención se refiere al desarrollo de un sistema de biorreactor, en el que el movimiento de un soporte que contiene [z] unos andamios porosos genera la perfusión de una suspensión celular o medio de cultivo a través de los mismos andamios en direcciones alternativas. El soporte podría estar completamente fabricado de material de andamio poroso, maximizando así la utilización de la superficie. Paralelamente, o antes de mover el soporte, dentro del recipiente se puede mover una barra de agitación, para que las células se puedan cultivar en suspensión en el recipiente con o sin mezclado.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un biorreactor para ingeniería de tejidos y a un procedimiento para hacer funcionar dicho biorreactor.

40

Una primera forma de realización preferida de la invención es un procedimiento para cultivar células en cultivo, que comprende las etapas de proporcionar un andamio poroso tridimensional dispuesto en una cámara de cultivo, comprendiendo la cámara de cultivo un espacio entre una primera tapa terminal y una segunda tapa terminal; proporcionar una o más células vivas; proporcionar un medio de crecimiento líquido; y causar un movimiento relativo entre el andamio y por lo menos una tapa terminal, moviendo así el medio de crecimiento a través del andamio. El procedimiento de la primera forma de realización preferida está caracterizado por que un soporte configurado para sostener el andamio tridimensional poroso para el cultivo o el mantenimiento de las células forma una sola pieza con dicha una tapa terminal, una varilla hueca, en un extremo, está fijada al centro de dicha una de entre dichas tapas terminales y, en el otro extremo, a un punzón que sirve como dicho soporte y que se ajusta a un diámetro interior de la cámara de cultivo y, durante la etapa de causar un movimiento relativo entre el andamio y por lo menos una tapa terminal, dicho andamio se mueve junto con la dicha tapa terminal.

45

50

En una forma de realización preferida adicional, el andamio de la primera forma de realización puede estar dispuesto alternativamente en una de entre (1) una posición superior fuera de dicho medio de crecimiento, o (2) una posición inferior en dicho medio de crecimiento; comprendiendo el procedimiento asimismo las etapas, antes de la etapa de causar un movimiento relativo, de: cultivar dichas células en una suspensión en dicho medio de crecimiento mientras dicho andamio está dispuesto en la posición superior y hacer descender dicho andamio a la posición inferior.

60

En otra forma de realización preferida, la cámara de cultivo de la primera forma de realización comprende además conectores para hacer fluir dicho medio de crecimiento dentro y fuera de dicha cámara de cultivo.

En otra forma de realización preferida, la cámara de cultivo de la primera realización comprende asimismo una barra agitadora.

65

Otra forma de realización preferida más incluye una etapa, antes de la etapa que consiste en causar un movimiento relativo, de cultivo de dichas células en una suspensión en dicho medio de crecimiento.

5 La segunda forma de realización preferida de la invención es un biorreactor para cultivar células en cultivo, que comprende una cámara de cultivo que incluye una primera tapa terminal y una segunda tapa terminal conectadas para definir un espacio, y un soporte configurado para sostener un andamio tridimensional poroso para el cultivo o el mantenimiento de células, en el que el soporte está dispuesto entre las tapas terminales y está dispuesto de manera que pueda producirse un movimiento en vaivén entre el soporte y por lo menos una de entre dichas tapas terminales. El biorreactor según la segunda forma de realización preferida está caracterizado por que dicho soporte
10 forma una sola pieza con una de entre dichas tapas terminales y una barra hueca, en un extremo, está fijada al centro de dicha una de entre dichas tapas terminales y, en el otro extremo, a un punzón que sirve como dicho soporte y que se ajusta a un diámetro interior de la cámara de cultivo.

15 En otra forma de realización preferida más, el soporte en el biorreactor de la segunda forma de realización preferida se mueve junto con una tapa terminal.

En otra forma de realización preferida más, el biorreactor de la segunda forma de realización preferida comprende asimismo unos medios de accionamiento conectados operativamente para accionar el movimiento en vaivén.

20 En otra forma de realización preferida más, cuando un andamio poroso está alojado en dicha cámara para el cultivo celular de la segunda forma de realización, el andamio puede estar dispuesto alternativamente en una de entre (1) una posición superior fuera de un medio de crecimiento, o (2) una posición inferior en un medio de crecimiento.

25 En otra forma de realización preferida más, la cámara de cultivo de la segunda forma de realización comprende asimismo unas conexiones dispuestas para permitir el flujo de un medio de crecimiento dentro y fuera de dicha cámara de cultivo.

30 En todavía otra forma realización preferida, la segunda forma de realización comprende asimismo un puerto para gases conectado a la cámara de cultivo.

En todavía otra forma de realización preferida, la segunda forma de realización comprende asimismo un andamio tridimensional poroso para cultivar células.

35 Todavía otra forma de realización preferida es cualquiera de entre los procedimientos mencionados anteriormente en los que el andamio comprende un tejido (refiriéndose tejido tanto a tejidos vivos, como a tejidos desvitalizados/descelularizados, y equivalentes).

40 Todavía otra forma de realización preferida es cualquiera de los biorreactores mencionados anteriormente en el que dicho andamio comprende un tejido.

Todavía otra forma de realización preferida es la forma de realización del primer procedimiento mencionado, en el que la última etapa o una etapa posterior a la última etapa comprende la perfusión unidireccional de dicho medio a través de dicho andamio.

45 Todavía otra forma de realización preferida es el biorreactor de la segunda forma de realización, que comprende asimismo dos puertos para un medio de crecimiento dispuestos de manera que, cuando el biorreactor aloja un andamio, el medio de crecimiento pueda fluir a través de los puertos y dicho andamio de forma unidireccional.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra una unidad inferior, o tapa terminal, de la presente invención.

55 La figura 2 muestra una unidad superior, o tapa terminal, de la presente invención: la figura 2A muestra la unidad superior con un soporte de andamio y la figura 2B muestra la unidad sin un soporte de andamio.

La figura 3 muestra un biorreactor montado de la presente invención.

60 La figura 4 muestra un biorreactor de la presente invención. La figura 4A muestra el biorreactor solo, y la figura 4B muestra una unidad de accionamiento lineal, y la figura 4C muestra el biorreactor montado en la unidad de accionamiento.

Descripción detallada de la invención

65 Las ventajas de la presente invención sobre los biorreactores de perfusión existentes para el cultivo celular incluyen: (i) modo de operación simple pero altamente flexible, (ii) posibilidad de integrar las fases del cultivo en suspensión con la perfusión subsiguiente a través de un andamio en un sistema cerrado, y (iii) fácil ampliación.

La presente invención se puede utilizar para: (i) biorreactores "de uso sencillo" para apoyar la investigación de la función celular en un entorno 3D; (ii) biorreactores para el cultivo de células en un entorno 3D para una expansión eficaz (por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas) o para la producción especializada de proteínas específicas (por ejemplo, anticuerpos, enzimas, agonistas, antagonistas, hormonas, fármacos); (iii) biorreactores para la generación automatizada de tejidos 3D para implantación clínica o soporte vital extracorpóreo (por ejemplo, dispositivo de asistencia hepática bioartificial); y (iv) biorreactores para el mantenimiento o la revitalización de tejidos.

Una ventaja del cultivo de células en 3D es que determinadas células, por ejemplo las células madre, pueden mostrar propiedades mejoradas (por ejemplo, una mayor conservación de rasgos del progenitor) cuando se cultivan en 3D en comparación con el crecimiento convencional en una monocapa.

El biorreactor consiste en una cámara (que contiene opcionalmente una barra de agitación, en la que las células se pueden cultivar en suspensión), capaz de sostener uno o más andamios porosos que, mediante movimiento en vaivén con respecto a por lo menos un extremo de la cámara, generan la perfusión de una suspensión de células o medio de cultivo a través de los poros del andamio. Aunque el soporte del andamio, o punzón, se describe en los ejemplos como un componente separado, en algunos casos el émbolo en sí puede ser el andamio. Ni el andamio ni el soporte están limitados a ninguna forma particular. El andamio puede consistir en unos gránulos contenidos dentro de una cesta o un montaje similar. Las principales innovaciones están relacionadas con (i) cómo se aplica la perfusión a través de los andamios (no a través de ningún tipo de bomba) y (ii) la combinación de las características de un matraz giratorio con las de un sistema de perfusión directa. El biorreactor representa un único sistema cerrado que permite combinaciones de los siguientes procesos: (i) expansión celular en cultivos en suspensión; (ii) siembra celular en andamios porosos por perfusión directa de la suspensión celular; y (iii) cultivo celular en soportes 3D bajo perfusión.

La figura 1 muestra un ejemplo de una unidad de fondo, o tapa terminal, de la presente invención, que consiste en un recipiente circular con un fondo plano, que contiene una barra agitadora. El llenado y el intercambio del medio de cultivo y de las suspensiones celulares se pueden realizar a través de un puerto de entrada/salida en la base de la cámara, equipado con un conector de cierre Luer. La cámara está dispuesta sobre una placa de agitación magnética, que permite velocidades de agitación de hasta 20 rpm. Los caracteres de referencia son los siguientes: (1) un puerto de cierre Luer de entrada/salida con apertura en el centro o en la parte inferior; (2) unos fuelles; (3) un recipiente circular (a este respecto fabricado de PTFE, para minimizar la adhesión celular); y (4) una barra de agitación magnética.

La figura 2 muestra un ejemplo de unidad superior, o tapa terminal, de la presente invención, que consiste en una tapa circular, dispuesta de forma central sobre la unidad inferior y levemente en contacto con el lado exterior del recipiente circular inferior. En el centro de la tapa hay una pequeña varilla hueca con un punzón circular en el extremo inferior. Un punzón sirve como soporte de andamio y se ajusta exactamente al diámetro interior del recipiente inferior. La figura 2A muestra la unidad superior con un soporte de andamio y la figura 2B muestra la unidad sin un soporte de andamio. La tapa y el punzón se pueden mover hacia arriba y hacia abajo, desde el borde superior hasta el fondo del recipiente inferior, deteniéndose el punzón justo encima de la barra de agitación. Dos puertos de entrada/salida (o puertos para gases, ya que también son aptos para su uso con gases de una composición controlada) con conectores de cierre de Luer permiten el intercambio de aire a través de filtros bacterianos y el llenado o el intercambio del medio de cultivo a través de la varilla hueca, con unas aberturas justo por encima del soporte de andamio.

Los caracteres de referencia de la figura 2 son los siguientes: (5) una varilla hueca; (6) conector de cierre Luer de entrada/salida para intercambio de aire; (7) un conector de cierre Luer de entrada/salida con una apertura justo encima del soporte del andamio (punzón) para intercambio de medio; (8) un punzón circular, fijado en el extremo inferior de la varilla con la función de un soporte de andamio (este ejemplo para seis andamios con un tamaño de 8 x 5 mm); y (9) una muesca circular para insertar los fuelles para un cierre hermético al aire después del ensamblaje con la unidad inferior.

Las unidades superior e inferior se ensamblan después del montaje de los andamios y la esterilización. Se logra un cierre hermético al aire externo con un fuelle elástico, lo que garantiza el movimiento libre de la tapa y la esterilidad dentro del biorreactor. La figura 3 muestra un ejemplo de una unidad de cultivo de tejidos ensamblada. Los caracteres de referencia son los siguientes: (1) entrada/salida inferior con conector de cierre Luer; (2) fuelles elásticos para una conexión hermética al aire de las unidades inferior y superior; (6) entrada/salida de aire, conectada a filtros bacterianos con un tamaño de poro de 0,2 μm para garantizar la esterilidad en el interior del biorreactor; (10) conector al motor de accionamiento lineal; (7) conector de cierre Luer de entrada/salida para el intercambio de medio a través de la varilla hueca en el centro de la tapa con un orificio justo encima del soporte del andamio; y (11) unidad superior, que puede moverse hacia arriba y hacia abajo.

El movimiento de la parte superior del biorreactor se realiza mediante un actuador lineal o una mesa de posicionamiento lineal, impulsado por un motor de pasos. Alternativamente, se puede utilizar un motor rotatorio

cuando está conectado para producir un movimiento en vaivén. Se pueden utilizar otros medios de accionamiento, por ejemplo, un accionamiento neumático o hidráulico. Una unidad de control facilita la aplicación de diferentes regímenes de movimiento (por ejemplo, frecuencia, amplitud, rampa, meseta y forma de onda). La unidad de cultivo de tejidos cerrada e internamente estéril puede fijarse en la parte inferior de la unidad de movimiento, y la tapa está conectada al accionamiento lineal. El ensamblaje completo está dispuesto sobre un agitador magnético en una incubadora a una temperatura, una humedad y un contenido de CO₂ y O₂ definidos.

La figura 4A muestra un ejemplo de una unidad de cultivo de tejidos de la presente invención; la figura 4B muestra un ejemplo de una unidad de accionamiento lineal según la presente invención, y la figura 4C muestra la unidad de cultivo de tejidos montada en la unidad de accionamiento. Los caracteres de referencia son los siguientes: (12) soporte con ajuste exacto para la parte inferior de la unidad de cultivo de tejidos; (13) interruptores ajustables de inicio y fin; (14) motor de pasos; (15) varilla roscada, dispuesta para moverse hacia arriba y hacia abajo, impulsada por el motor de pasos; (16) tapa del motor para aislar el motor del agua condensada y la humedad atmosférica; (17) unidad de cultivo de tejidos; (18) parte inferior de la unidad de cultivo de tejidos montada y fijada al soporte de la unidad de movimiento; y (19) tapa conectada a la varilla roscada, permitiendo el movimiento lineal de la parte superior de la unidad de cultivo de tejidos.

Los andamios pueden fabricarse a partir de una diversidad de materiales biocompatibles (por ejemplo, polímeros sintéticos, polímeros naturales, metales y materiales cerámicos) o tejidos. En la presente memoria, un tejido se refiere tanto a los tejidos vivos como al tejido desvitalizado/descelularizado, al tejido natural reconstituido y a equivalentes. Cuando el andamio es de material sintético, debe ser un material apto para el cultivo celular, por ejemplo, una espuma, una esponja, una malla no tejida, un gel, una cerámica o un metal. Cuando el andamio comprende un tejido, que incluye tejido desvitalizado, se pueden utilizar una gran cantidad de tejidos diferentes, tales como, por ejemplo dermis, vejiga, hueso, arterias y válvulas cardíacas.

Para varios tipos de tejidos (por ejemplo, hepático, renal, vascular), el flujo unidireccional es importante para un desarrollo y una función adecuados. En la presente invención, esto se puede lograr fácilmente bombeando el medio directamente a través del reactor manteniendo el andamio inmóvil. Esto se puede realizar después de la siembra del andamio con perfusión alterna.

La presente invención puede revitalizar un tejido, o mantener la viabilidad de un tejido vivo. Dicho tejido, según la presente invención, puede implantarse en un paciente. El tejido puede ser alogénico o xenogénico. Clínicamente, el uso de células autólogas es frecuentemente preferido, sin embargo, no es preciso que las células sean autólogas.

Ejemplos de procedimientos de uso

Cultivo celular en suspensión

Durante el cultivo en suspensión, el punzón (soporte de andamio) del biorreactor está dispuesto sobre el cultivo en suspensión con aire entre la superficie del medio y el punzón. El punzón se mueve hacia arriba y hacia abajo sin tocar el medio, lo que garantiza el intercambio de aire (a través de filtros bacterianos) con el entorno de la incubadora. La suspensión celular se agita, lo que evita la sedimentación y la adherencia de las células a las paredes, y asimismo induce el mezclado de oxígeno y nutrientes en todo el medio. El medio se puede cambiar a través de microfiltros permitiendo el flujo de medio pero no de células. Recientemente, se ha demostrado que el cultivo en suspensión permite la expansión eficiente de células madre derivadas de la médula ósea (Baksh *et al.*, Exp. Hematol. 31: 723-732, 2003).

Siembra de células en andamios 3D

Después del cultivo de la suspensión para una posible expansión celular, la tapa con el punzón (soporte de andamio) se puede mover hacia abajo dentro de la suspensión celular, y después moverse hacia arriba y hacia abajo desde la superficie del medio hasta la parte inferior sobre la barra agitadora de agitación. La suspensión celular, de esta forma, se fuerza a través de los poros de los andamios tridimensionales (perfusión directa) y las células pueden adherirse homogéneamente a la superficie del andamio. Se pueden aplicar diferentes regímenes de movimiento (por ejemplo, frecuencia, meseta, amplitud, rampa y forma de onda) para garantizar la máxima eficacia de siembra y la distribución uniforme de células a lo largo de todo el andamio. La suspensión celular puede agitarse continuamente durante la siembra, lo que evita la sedimentación celular y asegura el mezclado de oxígeno y nutrientes. En una configuración, todo el punzón puede reemplazarse por un andamio poroso, maximizando así el volumen del material de siembra celular. Recientemente se ha demostrado que la perfusión directa de una suspensión celular a través de andamios porosos mejora la eficacia y la uniformidad de la siembra y la viabilidad de las células sembradas (Wendt *et al.*, Biotech Bioeng 84: 205-214, 2003).

Cultivo de perfusión celular dentro de andamios

5 Después de la siembra de células, el cultivo posterior de las construcciones se realiza mediante el mismo movimiento oscilante de los andamios a través del medio (ahora exento de células) que en la fase 2. Dependiendo de la arquitectura del andamio y del tejido que se va a generar, debe definirse el régimen de velocidad y movimiento del punzón para alcanzar un equilibrio cuidadoso entre la transferencia de masa de nutrientes y los productos de desecho celulares, la retención de componentes de la matriz extracelular recién sintetizados dentro de las construcciones y las tensiones de cizallamiento inducidas por el fluido dentro de los poros. Los cambios de medio se pueden realizar a través de los dos puertos disponibles (conectores) en puntos temporales específicos o de forma continua con una bomba externa. Se puede realizar una agitación adicional opcional del medio durante los cultivos de perfusión para mejorar la transferencia de masa.

15 El sistema se puede utilizar para realizar algunas o todas las tres fases de cultivo descritas anteriormente. Está previsto que la realización de las tres fases de cultivo se emplee para generar construcciones similares a los huesos a partir de células derivadas de la médula ósea expandidas en suspensión, y después sembradas y cultivadas en/sobre andamios porosos. Las construcciones similares a huesos se pueden utilizar como injertos osteoinductores o como un sistema para expandir las células madre hematopoyéticas dentro de un tejido estromal 3D.

20 Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a determinadas formas de realización preferidas, un experto en la materia reconocerá que pueden realizarse adiciones, supresiones, sustituciones, modificaciones y mejoras.

25 Las figuras se refieren a la cámara de cultivo que es aproximadamente cilíndrica con unas tapas aproximadamente circulares, sin embargo, no es necesario que las tapas terminales de la presente invención sean tapas circulares y pueden tomar otras formas dependiendo de la forma de la cámara de cultivo. Aunque se prefieren las tapas terminales amovibles para facilitar el acceso a la cámara de cultivo, la cámara de la presente invención no está limitada a una con tapas amovibles.

30 Aunque los ejemplos se refieren a una forma de realización en la que el andamio se mueve junto con una tapa terminal, la invención también se puede realizar provocando un movimiento relativo entre el andamio y por lo menos una tapa terminal, sin tener necesariamente un movimiento de las tapas terminales entre sí.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para cultivar células en cultivo, que comprende las etapas siguientes:
- 5 (a) proporcionar un andamio poroso tridimensional dispuesto en una cámara de cultivo, comprendiendo la cámara de cultivo un espacio entre una primera tapa terminal y una segunda tapa terminal;
- (b) proporcionar una o más células vivas;
- 10 (c) proporcionar un medio de crecimiento líquido; y
- (d) causar un movimiento relativo entre el andamio y por lo menos una tapa terminal, moviendo de esta forma el medio de crecimiento a través del andamio,
- 15 **caracterizado por que presenta,**
- un soporte configurado para sostener el andamio tridimensional poroso para el cultivo o el mantenimiento de células forma una sola pieza con dicha una tapa terminal,
- 20 una varilla hueca, en un extremo, está fijada al centro de dicha una de entre dichas tapas terminales y, en el otro extremo, a un punzón que sirve como dicho soporte y que se ajusta a un diámetro interior de la cámara de cultivo, y
- durante la etapa (d), dicho andamio se mueve junto con dicha una tapa terminal.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho andamio puede estar dispuesto alternativamente en una de entre (1) una posición fuera de dicho medio de crecimiento, o (2) una posición inferior en dicho medio de crecimiento; comprendiendo el procedimiento asimismo las etapas, antes de la etapa (d), siguientes:
- 30 cultivar dichas células en una suspensión en dicho medio de crecimiento mientras dicho andamio está dispuesto en la posición superior, y
- hacer descender dicho andamio a la posición inferior.
- 35 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha cámara de cultivo comprende asimismo unos conectores para hacer fluir dicho medio de crecimiento dentro y fuera de dicha cámara de cultivo.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha cámara de cultivo comprende asimismo una barra agitadora.
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende asimismo una etapa, antes de la etapa (d), de cultivo de dichas células en una suspensión en dicho medio de crecimiento.
6. Biorreactor para cultivar células en cultivo, que comprende:
- 45 (a) una cámara de cultivo que incluye una primera tapa terminal y una segunda tapa terminal conectadas para definir un espacio; y
- (b) un soporte configurado para sostener un andamio tridimensional poroso para el cultivo o el mantenimiento
- 50 de células;
- en el que el soporte está dispuesto entre las tapas terminales para permitir un movimiento en vaivén entre el soporte y por lo menos una de dichas tapas terminales, **caracterizado por que**
- 55 dicho soporte forma una sola pieza con una de dichas tapas terminales y
- una varilla hueca, en un extremo, está fijada al centro de dicha una de entre dichas tapas terminales y, en el otro extremo, a un punzón que sirve como dicho soporte y que se ajusta a un diámetro interior de la cámara de cultivo.
- 60 7. Biorreactor según la reivindicación 6, en el que dicho soporte se mueve junto con una de dichas tapas terminales.
8. Biorreactor según la reivindicación 6, que comprende asimismo unos medios de accionamiento conectados
- 65 operativamente para accionar dicho movimiento en vaivén.

9. Biorreactor según la reivindicación 6, en el que el soporte puede estar dispuesto alternativamente en una de entre (1) una posición superior para disponer un andamio sostenido fuera de un medio de crecimiento, o (2) una posición inferior para disponer un andamio sostenido en un medio de crecimiento.
- 5 10. Biorreactor según la reivindicación 6, en el que dicha cámara de cultivo comprende asimismo unas conexiones dispuestas para permitir el flujo de un medio de crecimiento dentro y fuera de dicha cámara de cultivo.
11. Biorreactor según la reivindicación 6, que comprende asimismo un puerto para gases conectado a dicha cámara de cultivo.
- 10 12. Biorreactor según la reivindicación 6, que comprende asimismo una unidad de agitación para el cultivo de células en suspensión.
13. Biorreactor según la reivindicación 6, que comprende asimismo un andamio tridimensional poroso para el cultivo o el mantenimiento de células.
- 15 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho andamio comprende un tejido.
15. Biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que dicho andamio comprende un tejido.
- 20 16. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende asimismo causar la perfusión unidireccional de dicho medio a través de dicho andamio.
- 25 17. Biorreactor según la reivindicación 6, que comprende asimismo dos puertos para un medio de crecimiento dispuesto de manera que, cuando dicho biorreactor aloja dicho andamio, el medio de crecimiento puede fluir a través de los puertos y dicho andamio de una forma unidireccional.

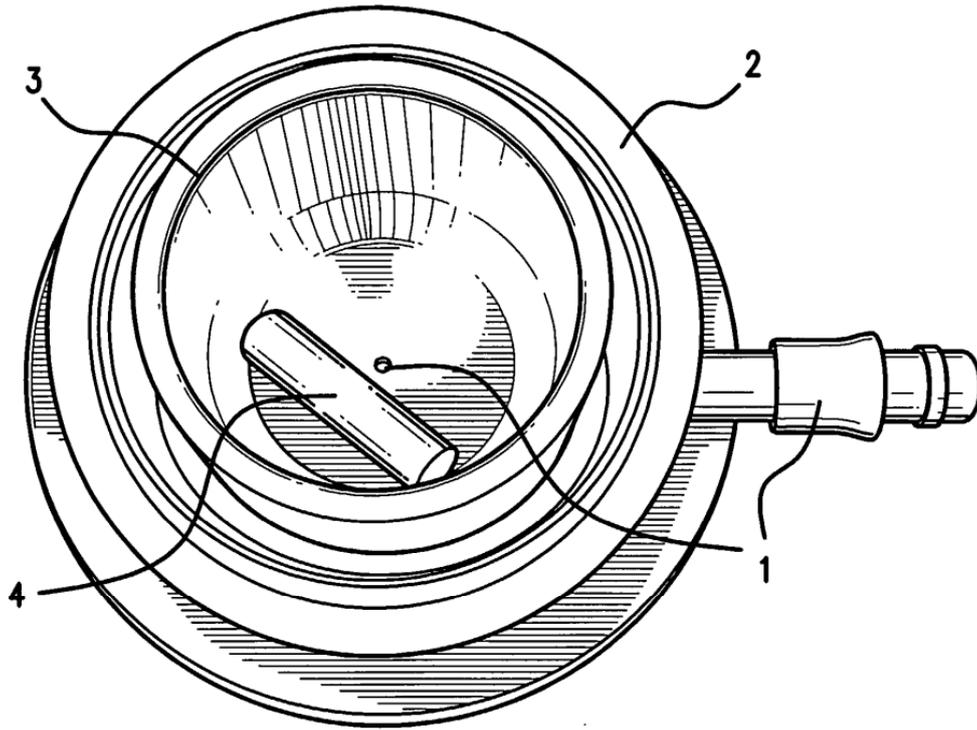


FIG. 1

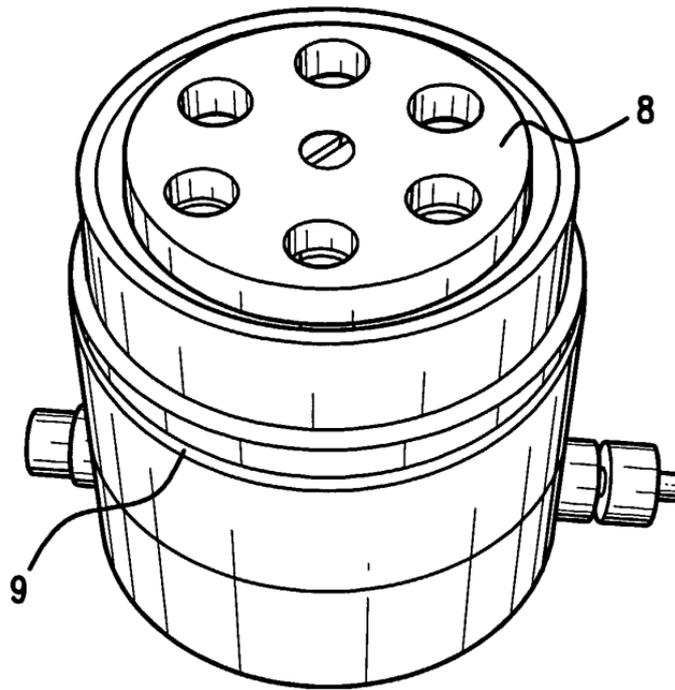


FIG. 2A

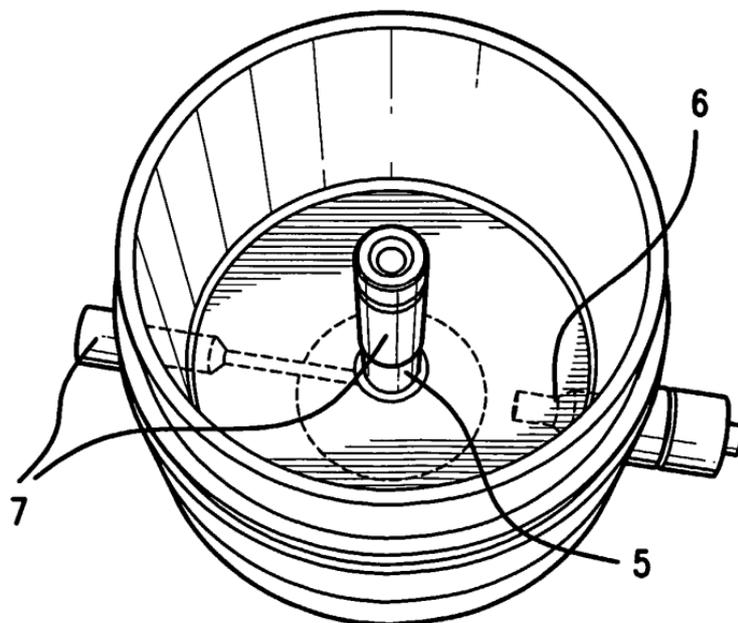


FIG. 2B

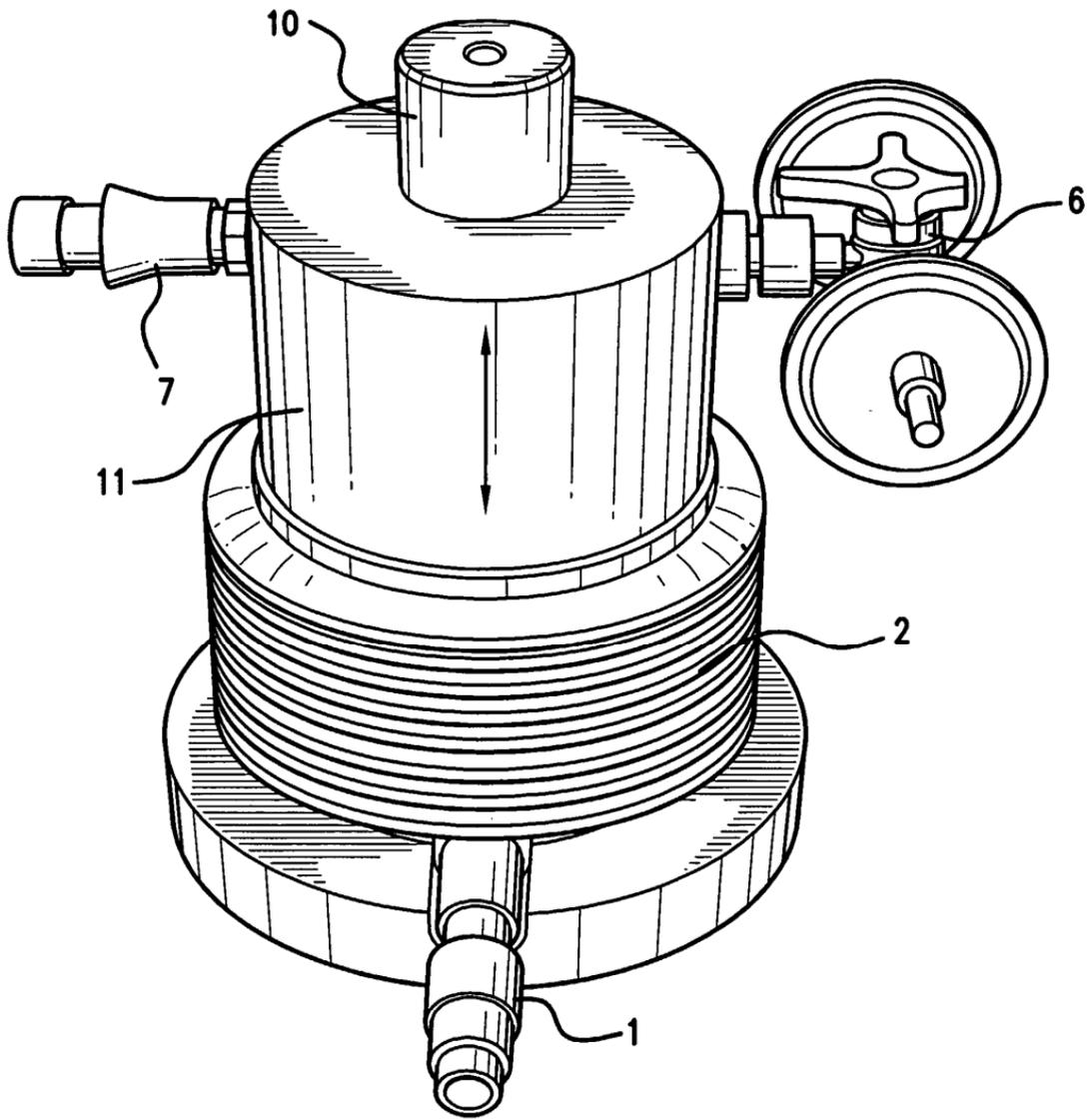


FIG.3

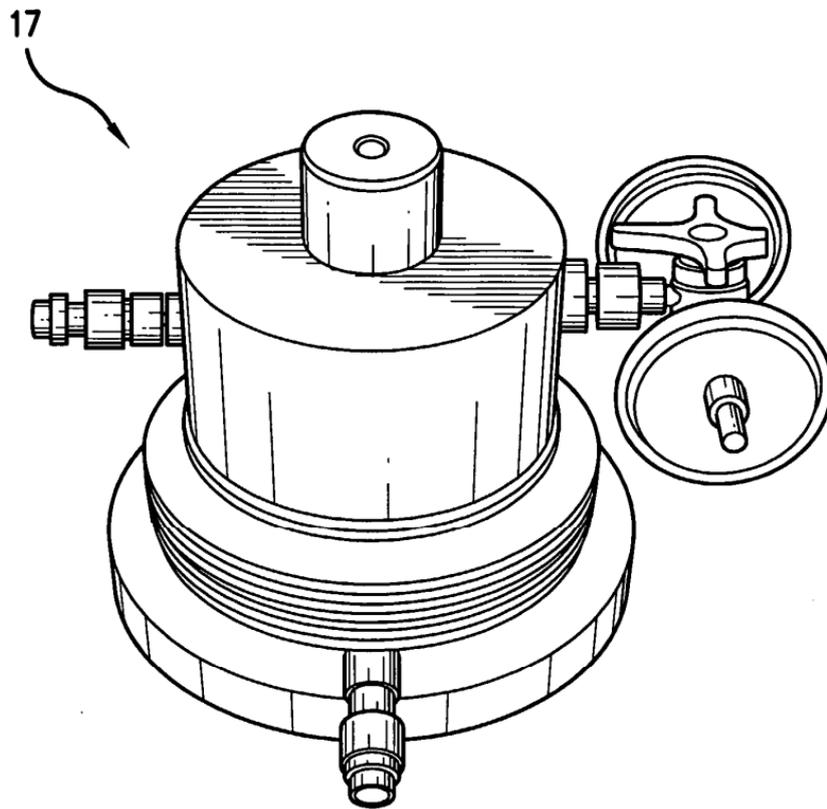


FIG.4A

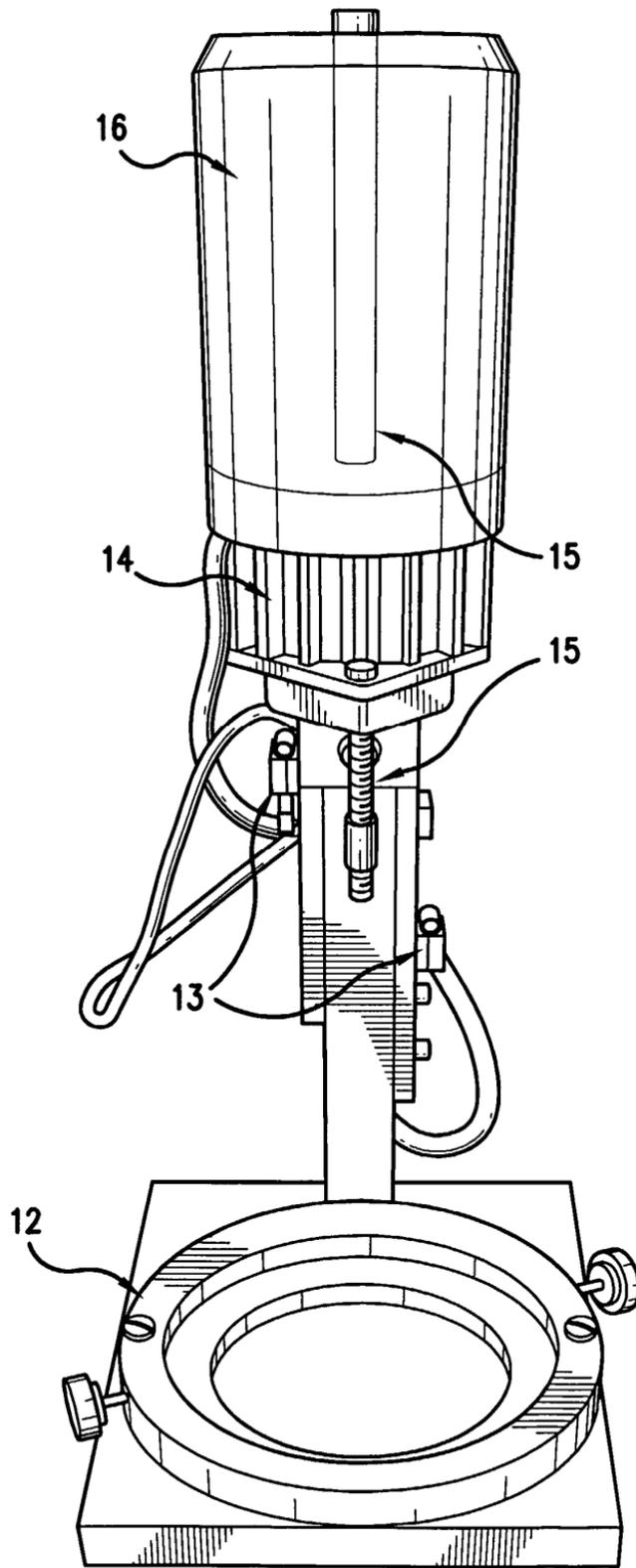


FIG.4B

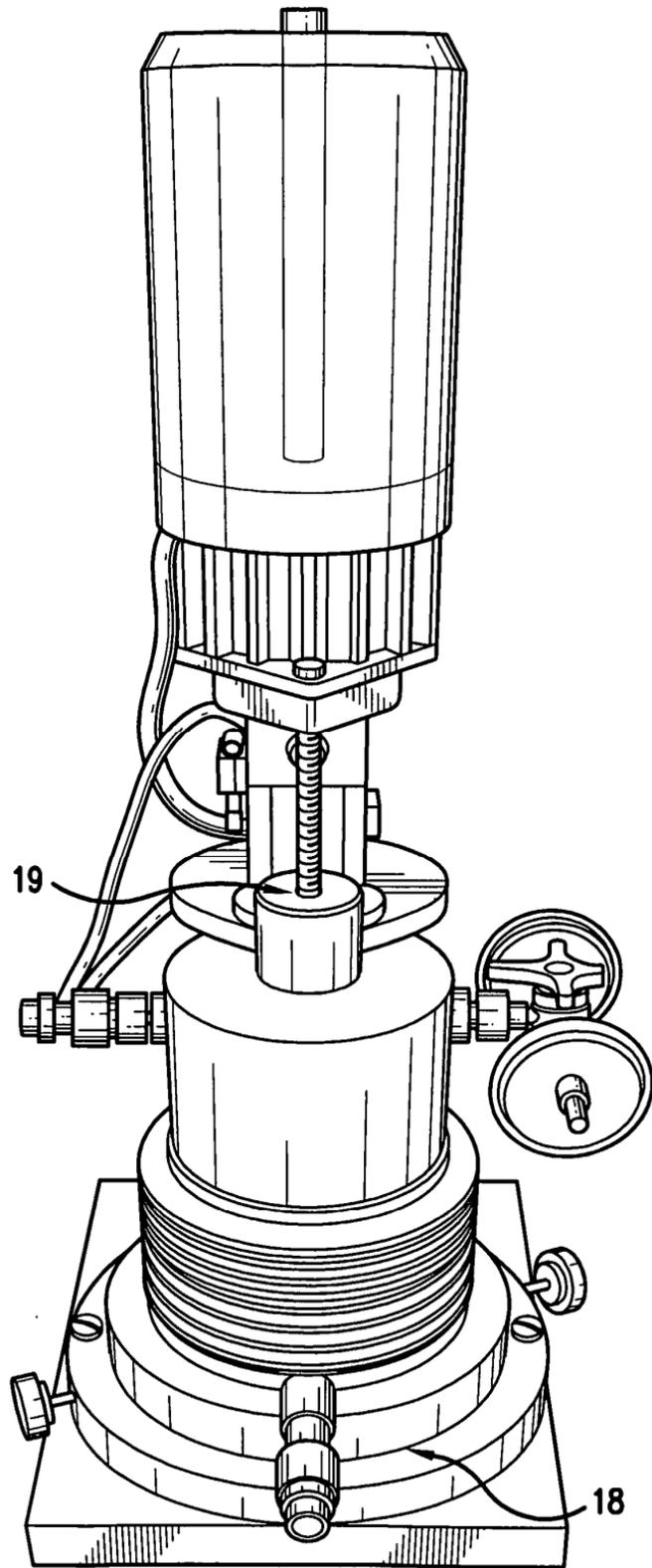


FIG.4C