

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 580**

51 Int. Cl.:

C12M 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2006** **PCT/NL2006/000319**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2007** **WO07001173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2006** **E 06757812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020** **EP 1896564**

54 Título: **Método y aparato para cultivar células que utilizan movimiento ondulatorio**

30 Prioridad:

29.06.2005 EP 05076493

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

15.06.2021

73 Titular/es:

STRIX BEHEER B.V. (100.0%)
Bothoekweg 9
7115 AK Winterswijk Brinkheurne, NL

72 Inventor/es:

VAN DER HEIDEN, PIETER;
BUEVINK, MARC y
OOSTERHUIS, NICOLAAS MARIUS GERARD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 833 580 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 aparato para cultivar células que utilizan movimiento ondulatorio

5 La invención se refiere al campo de la biotecnología y el cultivo celular a escala industrial. En particular, ésta se refiere a un método y un aparato para cultivar células utilizando movimiento ondulatorio.

10 Un método y un aparato de este tipo se conocen por el documento US 6,190,913 B1, que divulga un método de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 y un aparato de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 6. Esta técnica conocida emplea una bolsa de plástico flexible preesterilizada en el que se cultivan las células. La bolsa se llena parcialmente con medio de cultivo y el resto de la bolsa se purga continuamente con aire u otro gas rico en oxígeno. La bolsa está asegurada a una plataforma oscilante que se balancea de un lado a otro alrededor de un eje horizontal mediante el accionamiento alternativo de pistones neumáticos. El movimiento de balanceo promueve la formación de ondas en la bolsa, lo que proporciona una mezcla líquida y mejora la transferencia de oxígeno desde el gas del espacio de cabeza a la fase líquida, donde éste es esencial para el crecimiento y el metabolismo celular.

15 El documento FR 2 353 638 A1 es otro documento que divulga un método de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 y un aparato de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 6. Similar al documento US 6,190,913 B1 mencionado anteriormente, también el documento FR 2 353 638 A1 divulga un aparato oscilante. En el documento FR 2 353 638 A1, un recipiente se balancea hacia adelante y hacia atrás alrededor de un eje horizontal.

20 La transferencia de masa gas-líquido adecuada (suministro de oxígeno y eliminación de dióxido de carbono) es uno de los parámetros importantes para el diseño y funcionamiento del biorreactor, y también juega un papel decisivo en las estrategias para mejorar los sistemas de cultivo de ampliación (ver Dhanasekharan, K., 2006, BioProcess Int. Marzo de 2006, páginas 2-6).

25 Es un objeto de la invención mejorar aún más el crecimiento celular y la productividad en el cultivo de células utilizando el movimiento ondulatorio. Entre otras cosas, es un objeto proporcionar un sistema de cultivo de células que sea adecuado para la ampliación industrial.

30 De acuerdo con la presente invención, este objetivo se logra proporcionando un método de acuerdo con la reivindicación 1. La invención también puede realizarse en un aparato de acuerdo con la reivindicación 6 y en un conjunto de acuerdo con la reivindicación 14.

35 La combinación del movimiento basculante del recipiente con respecto al eje de pivote y el movimiento cíclico del eje de pivote a lo largo de la trayectoria de bucle cerrado induce un movimiento ondulatorio del medio líquido en el recipiente, cuyo movimiento ondulatorio resulta en una transferencia de oxígeno y mezcla de líquidos mejoradas. El movimiento ondulatorio se puede optimizar para un cultivo celular dado para proporcionar suficiente transferencia de oxígeno para un cultivo celular de alta densidad sin excesiva formación de espuma o daño por cizallamiento. No se requiere mezcla mecánica. Por lo tanto, un crecimiento y productividad celular mejorados, p. ej. de una proteína producida de forma recombinante, se puede lograr.

40 Además, la invención también divulga una bolsa (recipiente) flexible mejorada para su uso en la presente invención, la mejora consiste en una bolsa cuyo volumen se puede cambiar in situ p, ej., abriendo o cerrando uno o más compartimentos y/o una bolsa que tiene esencialmente esquinas rectas.

45 Las realizaciones particulares de la invención se establecen en las reivindicaciones dependientes.

50 A continuación se describen características, efectos y detalles adicionales de realizaciones de la invención con referencia a los dibujos esquemáticos adjuntos.

La figura 1 muestra una vista lateral de un ejemplo de una realización de un aparato de acuerdo con la invención.

55 Las figuras 2A-2D muestran el ejemplo de la Figura 1 en diferentes etapas durante el movimiento de un recipiente.

La figura 3 muestra una vista lateral de un ejemplo de una segunda realización de un aparato de acuerdo con la invención.

60 La figura 4 muestra una vista lateral de un ejemplo de una tercera realización de un aparato de acuerdo con la invención.

Las figuras 5A-5H muestran el ejemplo de la Figura 4 en diferentes etapas durante el movimiento de un recipiente.

La Figura 6 muestra el ejemplo de las Figuras 4 y 5 en una vista en perspectiva.

65

La figura 7 muestra los efectos de la velocidad de agitación de un biorreactor de acuerdo con la invención en k_{ia} (componente volumétrico de transferencia de oxígeno) para dos bolsas A y B diferentes (ver figura 10).

5 La figura 8 muestra los efectos del ángulo de inclinación de un biorreactor de acuerdo con la invención en un k_{ia} para dos bolsas diferentes A y B (ver figura 10).

La figura 9 muestra el efecto del volumen de líquido de un biorreactor de acuerdo con la invención en un k_{ia} Para dos bolsas A y B diferentes (ver figura 10)

10 La figura 10 representación esquemática de la forma de la vista superior de las bolsas A y B.

La figura 11 viabilidad de las células PER.C6® durante el precultivo en un biorreactor de acuerdo con la invención.

15 La figura 12 viabilidad de las células PER.C6® durante el cultivo en tandas en un biorreactor de acuerdo con la invención.

La figura 13 densidad de células viables (VCD) en un cultivo de alimentación por tandas en un biorreactor de acuerdo con la invención en comparación con VCD en un biorreactor agitado tradicional y un biorreactor Wave.

20 La figura 14 producción de un anticuerpo de tipo IgG en un cultivo de alimentación por tandas en un biorreactor de acuerdo con la invención en comparación con la producción en un biorreactor agitado tradicional y un biorreactor Wave. (A) Concentración de anticuerpos frente al tiempo de cultivo. (B) Concentración de anticuerpo frente a la cantidad total de células viables producidas a lo largo del tiempo (IVC).

25 La figura 15 curva de crecimiento de un cultivo bacteriano de *E. coli* en un reactor discontinuo agitado de 3.5 l. Densidad celular medida a OD_{600} . (A) Eje Y lineal. (B) Eje Y logarítmico.

La figura 16 comparación de la curva de crecimiento de un cultivo bacteriano de *E. coli* en un biorreactor de 10 l de acuerdo con la invención en comparación con un biorreactor agitado de 3.5 l. (A) y (B) como en la Figura 15.

30 La figura 17A muestra un recipiente con dos abrazaderas, mediante el cual se puede obtener la reducción del volumen del biorreactor. La figura 17B muestra un detalle de una posible realización para fijar las abrazaderas en el soporte de la plataforma del recipiente desechable.

35 La figura 18 muestra una segunda realización para cambiar el volumen del biorreactor de un recipiente desechable. A través de una entrada de gas, los compartimentos separados a ambos lados de la bolsa se inflan y, por lo tanto, se reduce el volumen del compartimento interior (biorreactor).

Figura 19. Ejemplo de un recipiente para uso en la invención.

40 Primero se hace referencia a las figuras 1 y 2. Estas figuras muestran un aparato 1 (biorreactor) para cultivar células en un recipiente 2 utilizando el movimiento ondulatorio de un medio 3 líquido que comprende un cultivo celular en el recipiente. En el ejemplo mostrado, el recipiente 2 es una bolsa de plástico que tiene una única cámara interior hueca única. La bolsa de plástico se asegura a una plataforma 7 del aparato 1. Sin embargo, también se pueden aplicar otros tipos de recipientes y otros tipos de medios de retención para retener el recipiente, tales como una bandeja.

45 El aparato comprende un mecanismo de accionamiento para bascular la plataforma 7, y por lo tanto la bolsa 2, con respecto a un eje 5 de pivote sustancialmente horizontal. En el ejemplo, el eje 5 de pivote es el eje central de una articulación de bisagra entre la plataforma 7 y una viga 8 giratoria del aparato 1. Se pueden aplicar muchos tipos de conexiones de bisagra entre la plataforma y la viga 8 giratoria. La viga 8 giratoria es accionada por un motor 4 para girar alrededor de un eje 9 de rotación que está distante y paralelo al eje 5 de pivote. El mecanismo de accionamiento está dispuesto para bascular la bolsa 2 de manera que, durante dicho basculamiento, el eje 5 de pivote sigue una trayectoria 6 cíclica de bucle cerrado. La trayectoria 6 de bucle cerrado tiene una forma circular, que es fácil de realizar. Sin embargo, al elegir diferentes configuraciones del mecanismo de accionamiento, también se pueden aplicar otras formas de trayectorias de bucle cerrado.

50 En el ejemplo, la plataforma 7 es además basculante con respecto a un segundo eje 15 de pivote que está distante y paralelo al eje 5 de pivote. El segundo eje 15 de pivote es el eje central de una segunda articulación de bisagra entre la plataforma 7 y una segunda viga 18 del aparato 1. La segunda viga 18 es giratoria con respecto a un segundo eje 19 de rotación que está distante y paralelo al segundo eje 15 de pivote, de modo que el segundo eje 15 de pivote de la segunda viga 18 está libre para moverse hacia adelante y hacia atrás a lo largo de una trayectoria 16 arqueada. La orientación del primer eje 9 de rotación con respecto a la orientación del segundo eje 9 de rotación permanece igual durante el movimiento de la plataforma.

65 Las figuras 2A-2D muestran cuatro etapas diferentes durante el movimiento así obtenido de la bolsa 2.

En el ejemplo, la trayectoria 6 de bucle cerrado se encuentra en un plano transversal al eje 5 de pivote. Esto es favorable porque entonces el vector de movimiento del eje de pivote a lo largo de dicha trayectoria de bucle cerrado está en el mismo plano que el vector V de movimiento de las oscilaciones, que resulta ser muy eficiente. También se logra una alta eficiencia cuando al menos la proyección de la trayectoria de bucle cerrado sobre un plano transversal al eje de pivote tiene una forma de bucle cerrado.

Sin embargo, las trayectorias de bucle cerrado se pueden aplicar con cualquier tipo de forma en el espacio, por ejemplo, una trayectoria de bucle cerrado en un plano horizontal a través del eje de pivote o una trayectoria de bucle cerrado en un plano vertical a través del eje de pivote.

Se hace ahora referencia a la figura 3, que muestra un ejemplo de una segunda realización de un aparato de acuerdo con la invención. El aparato mostrado es un aparato 101 para cultivar células en una multiplicidad de recipientes utilizando el movimiento ondulatorio de un medio líquido. El aparato 101 comprende un aparato 1 del tipo mostrado en las Figuras 1 y 2. Este aparato 1 se muestra en la parte superior izquierda de la Figura 3, en el que se utilizan los mismos números de referencia que en las Figuras 1 y 2. Además, el aparato 101 está dispuesto para cultivar células en un recipiente cobasculante 2A, mostrado en la parte superior derecha de la figura 3. A tal efecto, el mecanismo de accionamiento está dispuesto para bascular simultáneamente tanto el recipiente 2 como el recipiente 2A cobasculante. En el ejemplo mostrado, esto se realiza de la siguiente manera.

La bolsa 2 cobasculante es retenida por una plataforma 7A, similar a la plataforma 7 del aparato 1. Esta plataforma 7A tiene una junta de bisagra con la viga 8 giratoria del aparato 1, teniendo esta junta de bisagra el eje 5 de pivote como eje central. La plataforma 7A es además basculante con respecto a un eje 15 A de pivote que está distante y paralelo al eje 5 de pivote. El eje 15A de pivote es el eje central de una articulación de bisagra entre la plataforma 7A y una viga 18A. La viga 18A es girable con respecto a un eje 19A de rotación que está distante y paralelo al eje 15A de pivote, de modo que el eje 15A de pivote de la viga 18A puede moverse libremente hacia adelante y hacia atrás a lo largo de una trayectoria 16A arqueada. La orientación respectiva de los ejes 9 y 19A de rotación permanece igual durante el movimiento de la plataforma 7A.

El cultivo de células en una multiplicidad de recipientes cobasculantes accionados simultáneamente por un mecanismo de accionamiento conjunto de un aparato, ofrece una serie de ventajas. Por ejemplo, cuando se compara con el uso de un recipiente único de mayor tamaño, una vez que se establecen las condiciones de cultivo para un recipiente, no hay necesidad de experimentos adicionales para aumentar el volumen del cultivo celular. Todo lo que se requiere es colocar varios recipientes sobre el aparato. Además, el cultivo de células en recipientes paralelos pero separados reduce el riesgo de fallos en el cultivo, p. ej., por infección o contaminación. Esto contribuye a la fiabilidad del sistema de cultivo.

En la figura 3, la bolsa 2 y la bolsa 2A cobasculante están colocadas lado a lado como se ve en un plano transversal al eje 5 de pivote. También son posibles otros tipos de posiciones lado a lado. Por ejemplo, es posible un posicionamiento lado a lado como se ve en un plano vertical a través del eje 5 de pivote, en el que las plataformas cobasculantes son basculantes con respecto al eje 5 de pivote en diferentes posiciones axiales a lo largo del eje 5 de pivote.

El aparato 101 está además dispuesto para cultivar células en dos recipientes 2B cobasculantes, mostrados en las partes inferior izquierda e inferior derecha de la Figura 3, respectivamente. De hecho, la configuración del aparato 101 mostrado en las partes superior izquierda y superior derecha de la Figura 3 se repite en las partes inferior izquierda e inferior derecha de la Figura 3. Las partes correspondientes de las configuraciones correspondientes se indican con los números de referencia correspondientes, en los que el afijo B se añade a los números de referencia, reemplazando respectivamente el afijo A del número de referencia en las partes superiores de la figura 3. En el ejemplo mostrado, esto se realiza porque el mecanismo de accionamiento está dispuesto para bascular tanto los recipientes 2 y 2A como los dos recipientes 2B simultáneamente, por ejemplo, por medio de una correa de transmisión 20 como se muestra. Por lo tanto, el aparato 101 está dispuesto para realizar la basculación simultánea en una condición en la que diferentes recipientes basculantes se colocan uno encima del otro. Una ventaja de colocar una multiplicidad de recipientes uno encima del otro es que reduce el costoso espacio de la planta; todo el conjunto de aparatos y recipientes ocupa un área de superficie mucho menor en comparación con los recipientes colocados adyacentes entre sí en el plano horizontal. Esto permite una fácil contención del conjunto en una sala de cultivo.

En el ejemplo de la figura 3, la dirección de basculación de la bolsa 2 con respecto al eje 5 de pivote de la articulación es opuesta a la dirección de basculación del recipiente 2A cobasculante con respecto al eje 5 de pivote de la articulación. Esto da como resultado el vector V de movimiento de las ondulaciones en la bolsa 2 y el vector VA de movimiento de las ondulaciones en la bolsa 2A que tienen componentes horizontales opuestos. Esto resulta favorable con respecto al ahorro de energía y las vibraciones del aparato en funcionamiento.

Esto también es válido para la configuración inferior mostrada en la Figura 3. Es decir, las direcciones de basculación de las dos bolsas 2B mostradas con respecto a sus ejes 5B de pivote de articulación son mutuamente opuestas, lo que da como resultado vectores VB de movimiento de las ondulaciones en las bolsas 2B que tienen componentes horizontales mutuamente opuestos. La ventaja así obtenida con respecto a la economía de energía y las vibraciones

se mejora al disponer el aparato de tal manera que el vector VB de movimiento en la parte inferior izquierda de la Figura 3 tiene una componente horizontal que es opuesto al componente V horizontal.

El efecto combinado del posicionamiento uno al lado del otro y el posicionamiento uno encima del otro de los recipientes, permite la disposición bidimensional y tridimensional de los recipientes en un solo aparato. Esto es favorable con respecto a los requisitos de espacio para llevar a cabo métodos de cultivo celular. También es favorable con respecto a los costes de los aparatos para el cultivo de células, porque se puede disponer una única estructura motriz para impulsar el movimiento basculante de muchos recipientes.

Se hace ahora referencia a las Figuras 4-6. Estas figuras muestran un ejemplo de una tercera realización de un aparato de acuerdo con la invención. Las figuras muestran un aparato 51 para cultivar células en un recipiente utilizando el movimiento ondulatorio de un medio líquido en el recipiente. Por razones de claridad, no se muestra el recipiente. Similar a los ejemplos mostrados en las Figuras 1-3, el recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico que tiene una única cámara interior hueca. Tal bolsa puede fijarse a la plataforma 57 mostrada del aparato 51.

También similar a los ejemplos mostrados en las Figuras 1-3, el aparato 51 comprende un mecanismo de accionamiento para bascular el recipiente con respecto a un eje 55 de pivote sustancialmente horizontal. En el ejemplo, el eje 55 de pivote es el eje central de una conexión de bisagra entre la plataforma 57 y una viga 58 giratoria del aparato 51. La viga 58 giratoria es accionada por un motor 54 para girar alrededor de un eje 59 de rotación que está distante y paralelo al eje 55 de pivote. El mecanismo de accionamiento está dispuesto para girar el recipiente de tal manera que, durante dicho basculamiento, el eje 55 de pivote sigue una trayectoria 56 cíclica de bucle cerrado.

El mecanismo de accionamiento del aparato 51 está además dispuesto para bascular el recipiente de tal manera que durante dicho basculamiento el recipiente lleva a cabo un segundo basculamiento con respecto a un segundo eje 65 de pivote que está distante y paralelo al eje 55 de pivote sustancialmente horizontal, durante el cual el segundo basculamiento, el segundo eje 65 de pivote sigue una segunda trayectoria 66 cíclica de bucle cerrado. El segundo eje 65 de pivote es el eje central de una segunda conexión de bisagra entre la plataforma 57 y un conjunto de tijera-viga. En el ejemplo, el conjunto de tijera-viga comprende una segunda viga 68 y una tercera viga 78 cuyas vigas están interconectadas a través de un eje 77 de bisagra. La segunda viga 68 es girable con respecto a un segundo eje 69 de rotación que está distante y paralelo al segundo eje 65 de pivote. La rotación de la segunda viga 68 es accionada por un motor 64. Durante la rotación de la segunda viga 68, el eje 77 de bisagra del conjunto de tijera-viga sigue una trayectoria 76 de bucle cerrado que tiene forma circular. Como ejemplo, las Figuras 4 y 5 muestran la segunda trayectoria 66 cíclica de bucle cerrado que será seguida por el segundo eje 65 de pivote cuando la primera y la segunda vigas 58 y 68 se accionan con la misma velocidad de rotación, pero en direcciones de rotación opuestas. La orientación del primer eje 59 de rotación con respecto a la orientación del segundo eje 69 de rotación permanece igual durante el movimiento de la plataforma 57. Se observa que, en lugar de usar dos motores 54 y 64, también un motor podría ser aplicado accionando la rotación tanto de la primera viga 58 como de la segunda viga 68, utilizando medios de transmisión adecuados.

Una ventaja de tal aparato basado en tal segundo basculamiento con respecto a un segundo eje 65 de pivote que está distante y paralelo al eje 55 de pivote sustancialmente horizontal, es que en el funcionamiento del mecanismo de accionamiento un amplio rango de pendientes variables del recipiente puede obtenerse con un pequeño requerimiento de espacio vertical por el mecanismo de accionamiento. En el ejemplo de las Figuras 4-6, sólo las longitudes cortas de la primera y segunda vigas 58 y 68 son suficientes para crear un rango de pendiente tan amplio. Cuando se accionan mecanismos como los descritos con referencia a las Figuras 4-6 están incorporados en aparatos en los que los recipientes están colocados uno encima del otro, tal como se divulga con referencia a la figura 3, dicho pequeño requisito de espacio vertical se beneficiará en una extensión aún mayor.

Como ya se discutió en la introducción, la transferencia de masa gas-líquido es uno de los aspectos importantes en el diseño y operación de biorreactores. La tasa de transferencia de oxígeno (OTR) depende de la diferencia entre la concentración real de oxígeno en el medio y la concentración máxima alcanzable de oxígeno (concentración de saturación) en dicho medio y un factor k_1a que representa la transferencia de masa del gas desde el área interfacial gas-líquido en el medio como en la siguiente fórmula: $OTR = k_1a (c^* - c)$, donde k_1a es el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, c^* es la concentración de oxígeno saturado y c es la concentración de oxígeno medida en cierto punto de tiempo. Se puede elaborar la misma fórmula para la transferencia de dióxido de carbono. En la sección experimental se muestra que el método y el aparato de acuerdo con la presente invención aumentan drásticamente el k_1a , proporcionando así condiciones de crecimiento óptimas. Los experimentos también muestran que la aplicación del método y aparato de la invención da como resultado de hecho un aumento de los rendimientos de los cultivos, medidos en masa celular o en productos (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos) excretados por las células.

Como se ha dicho, la invención se puede poner en práctica utilizando muchos tipos de recipientes. En una realización, el recipiente es un recipiente desechable. Una vez completado el cultivo celular, el cultivo celular puede simplemente recogerse del recipiente y se desecha el recipiente usado. Un nuevo recipiente, provisto de un nuevo cultivo celular, puede colocarse inmediatamente sobre la plataforma del aparato. En una realización preferida, el recipiente es un recipiente desechable preesterilizado ya que esto elimina la limpieza, la esterilización y la validación asociadas que requieren mucho trabajo. Tales recipientes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento US 6,190,913 B1

divulga una bolsa de plástico flexible preesterilizada en la que se cultivan células. Estos biorreactores de un solo uso están disponibles comercialmente en Wave Biotech LLC, Nueva Jersey, EE.UU. El recipiente puede estar provisto de medios adicionales, tales como medios que facilitan la adición o eliminación de una sustancia, p. ej., medio líquido o una muestra, del recipiente (ver, por ejemplo, US2003/0036192)

La invención también se puede poner en práctica usando un recipiente de cultivo celular flexible o ajustable. En la actualidad, es una práctica común comenzar un cultivo celular introduciendo un cultivo celular de inoculación en un recipiente relativamente pequeño que comprende un volumen relativamente pequeño de medio de crecimiento, como 200 mililitros, de modo que la densidad celular esté dentro de un rango óptimo para la replicación celular. Posteriormente, el cultivo de partida se expande mediante una transferencia escalonada a recipientes de tamaño creciente, por ejemplo, hasta un volumen de cultivo celular de 20 litros o incluso más, asegurando que la densidad celular se mantenga dentro del rango requerido. Los recipientes actualmente conocidos no permiten realizar la expansión del cultivo celular desde un cultivo de inoculación pequeño a un cultivo “de trabajo” grande en un solo recipiente. Las dimensiones de un recipiente que puede acomodar el volumen de un cultivo de trabajo, p. ej., los cultivos de 20 o 30 litros, obviamente, no son adecuados para adaptarse al cultivo de partida inicial. Cada paso de la transferencia por etapas de un cultivo celular a un recipiente más grande es un procedimiento crítico, ya que conlleva el riesgo de introducir una infección o contaminación en el cultivo. Además, requiere mucha mano de obra. Para superar estos problemas, la invención da a conocer un recipiente “flexible”, que puede compartimentarse y que, por lo tanto, permite modular o ajustar el volumen efectivo del recipiente durante el cultivo celular. El término “volumen efectivo” pretende indicar el volumen del recipiente que puede ocupar el cultivo celular. Modular o restringir el volumen efectivo implica en particular la restricción de una o más paredes flexibles del recipiente al inicio del proceso de cultivo, mientras se libera gradual o escalonadamente la restricción junto con la expansión del volumen de cultivo celular. Por supuesto, ajustar el volumen efectivo también puede implicar reducir el volumen efectivo del recipiente. Como regla general, el volumen efectivo inicial es aproximadamente el 10 % del volumen máximo del recipiente. Típicamente, durante el cultivo celular, del 10 al 80 % del volumen efectivo del recipiente que, como se dijo, se puede ajustar de acuerdo con el volumen del cultivo, se llena con medio líquido y células. Hay muchas formas de realizar la modulación del volumen efectivo de un recipiente. El recipiente tiene preferiblemente una o más paredes flexibles. Se trata, por ejemplo, de una bolsa de plástico cuyas paredes laterales se pueden empujar hacia abajo o una hacia la otra por medios externos, como abrazaderas, de manera que se reduce el volumen de la bolsa. Un sistema más elegante es integrar (una de) las abrazaderas con el recipiente desechable. De esta forma se fija la posición que determina el volumen. Con una posición fija, una parte del sistema de sujeción podría incluso utilizarse para montar el recipiente desechable en la plataforma. El sistema de sujeción se puede integrar con la bolsa de tal forma que la parte inferior de las abrazaderas forme una parte con la parte inferior de la bolsa. La abrazadera inferior puede, por ejemplo, estar pegada a la parte inferior de la bolsa. La abrazadera se puede fijar en la bandeja de soporte del sistema de biorreactor, p. ej., colocando la abrazadera en una ranura en la parte inferior de la bandeja (ver Figura 17B). Esta figura muestra una parte de la sección transversal de una bolsa sujeta con abrazaderas, donde el lado inferior del sistema de sujeción encaja dentro de la plataforma del sistema de biorreactor.

Es posible sujetar la bolsa entre las abrazaderas de tal manera que la bolsa se cierre herméticamente al agua en diferentes lugares antes de su uso. Para sujetar las abrazaderas entre sí se pueden utilizar diferentes mecanismos: sujeción magnética, sujeción mecánica mediante tornillos o pernos, etc. Un experto en la técnica es capaz de encontrar formas alternativas de sujetar la bolsa de forma hermética al agua. El lado superior de la abrazadera se puede quitar fácilmente para aumentar el volumen. Después de retirar la abrazadera superior, la abrazadera inferior puede permanecer en su lugar, lo que permite sujetar la bolsa en una posición fija en el recipiente.

Una alternativa para el uso de abrazaderas sólidas es el uso de un cierre tipo pelar-sellar, en el que el sello está integrado en la bolsa, p. ej. como una ranura en la que se sujeta un reborde del lado opuesto de la bolsa. Alternativamente, el sello en ambos lados de la bolsa consiste en tiras de adhesivo débil. El sello se abrirá aplicando fuerza de tracción desde el exterior o aplicando fuerza de empuje desde el interior. En las dos realizaciones mencionadas anteriormente, el montaje de una tira de plástico en el exterior de la bolsa hace que el sello se cierre y se impide que se abra por fuerzas internas o externas. Quitar la tira hace que el sello se abra por la presión del aire y del líquido del compartimiento interno.

Otra forma de implementar un sistema de volumen flexible es utilizar la flexibilidad de la bolsa desechable. Cuando en el exterior de la bolsa los compartimentos inflables están sellados, el llenado de estos compartimentos con gas reducirá el volumen de cultivo en la bolsa. Dependiendo del volumen deseado, estos compartimentos se pueden llenar y vaciar (parcialmente). Debido a la presión proporcionada por estos compartimentos inflables, se efectúa el control del volumen del recipiente. Es posible utilizar el flujo de gas, que normalmente se conduce al recipiente para proporcionar gas para inflar los compartimentos separados (ver Figura 18). Para utilizar el suministro de gas para controlar el volumen de trabajo, la entrada del gas debe dividirse entre los compartimentos a inflar y el biorreactor. Un puerto va directamente al filtro de entrada del biorreactor, el otro puerto está equipado con una válvula de control, que controla la abertura y el cierre del flujo de gas a los compartimentos inflables. En la posición cerrada, no fluye gas hacia los recipientes inflables, pero habrá gas presente en el biorreactor, lo que obligará al biorreactor a expandirse hasta su volumen máximo. La apertura de la válvula inflará los compartimentos, que luego forzarán la pared del biorreactor hacia adentro, disminuyendo así el volumen del biorreactor. Debido a la salida de gas del biorreactor, la presión dentro de las cámaras infladas, cuando la válvula está en la posición abierta, siempre será mayor que la presión dentro del

biorreactor. La liberación de gas de las cámaras infladas se puede realizar utilizando un interruptor de escape en la válvula.

5 En todas las realizaciones, es ventajoso disponer también de una compartimentación en las esteras calefactoras, que están situadas entre el soporte de la plataforma del aparato y el recipiente, para permitir un control de temperatura diferenciado de las diferentes secciones del recipiente.

10 La modulación del volumen efectivo del recipiente durante el proceso de cultivo celular cambiando la posición de al menos una parte flexible de la pared del recipiente puede aplicarse durante los métodos de cultivo celular en los que el recipiente se mueve de la forma explicada anteriormente. Sin embargo, dicha modulación también se puede aplicar favorablemente para otros métodos de cultivo celular, en los que el recipiente se mueve de otras formas, o en los que el recipiente no se mueve en absoluto.

15 Una tercera forma de aumentar el volumen de trabajo del biorreactor y, de ese modo, alcanzar el aumento del cultivo bacteriano o celular hace uso de un aparato de la invención que aloja más de un biorreactor, es decir, más de un recipiente. En este caso, el aumento se puede alcanzar conectando los recipientes entre sí a través de un tubo (desechable). Si hay una conexión entre dos o más recipientes, se puede hacer crecer un cultivo hasta el volumen máximo en un recipiente, donde después de una válvula que cierra el tubo se puede abrir, permitiendo que el cultivo también ocupe un segundo recipiente. Se puede ejercer un flujo del contenido de los recipientes insertando una bomba en el tubo. De esta manera, los más de un recipiente se pueden caracterizar como un lote en el que el cultivo ha pasado por idénticas condiciones de proceso. Preferiblemente, en el caso de biorreactores compartimentados, primero se hace crecer el cultivo en un biorreactor minimalizado, luego se establece una conexión entre este reactor y uno o más biorreactores (minimalizados), que se han llenado con medio, y luego el volumen de trabajo de todos los biorreactores se incrementa gradualmente (por ejemplo, quitando las abrazaderas o desinflando los compartimentos inflables). De esta forma se puede establecer una ampliación completa del cultivo, desde un cultivo de menos de 100 ml hasta cultivos de más de 200 l, sin la necesidad de cambiar repetidamente los recipientes.

30 Otro fenómeno importante es la estrategia de ampliación basada en principios de transferencia de masa. Mientras el coeficiente de transferencia de masa k_L se mantenga igual en diferentes escalas, la capacidad de transferencia de oxígeno y eliminación de CO_2 permanecerá igual en las diferentes escalas. De esta forma, las condiciones ambientales de las células son las mismas. En reactores de tanque agitado y/o columnas de burbujas, esto no es posible debido al impacto de la geometría del agitador en, por ejemplo, el cizallamiento, la velocidad superficial del gas (flujo de gas/superficie del reactor) en la coalescencia de las burbujas y, por lo tanto, el daño por cizallamiento en las células y la superficie del líquido específico inferior para la aireación de la superficie.

35 El biorreactor ondulatorio (US 6,190,913) se amplía en tres dimensiones (ancho, largo y altura del líquido de la bolsa), cambiando así las características de transferencia de masa.

40 Manteniendo constante la longitud de onda (L) en la bolsa, así como manteniendo la velocidad de oscilación y el ángulo de oscilación iguales cuando se amplía, las características de transferencia de masa no cambiarán. Importante es que la forma de la bolsa sea tal que los bordes midan aprox. 90° (+/- 15°) (ver figura 10).

45 Otro enfoque para mantener las mismas propiedades de transferencia de masa iguales en la ampliación es reducir la longitud de onda, pero compensar esto cambiando también el ángulo (a longitudes de onda más largas, el ángulo disminuirá). La altura del líquido debe mantenerse igual, ya que esto determina principalmente el área específica de contacto gas-líquido.

50 Si se cambia el ángulo, también se debe ajustar la velocidad de oscilación. Esto para crear la misma frecuencia de ondulación. Sin embargo, el rango entre el cual se puede variar la velocidad de oscilación puede ser grande.

55 El control del volumen del recipiente mediante sujeción o de otro modo se realiza preferiblemente de tal manera que el pequeño volumen inicial se localiza en el centro de la bolsa. De esta manera, todas las entradas y salidas necesarias se pueden colocar en el centro y acomodar tanto las bolsas en un volumen mínimo como en un volumen máximo. Además, ventajosamente, el volumen de la bolsa aumenta sin cambiar el valor de k_L . Esto se puede lograr haciendo que el volumen disminuya y aumente junto con la dirección del movimiento de ondulación que realiza el biorreactor de acuerdo con la invención, es decir, paralelo al plano del recipiente en la Figura 1, ver figura 17A. De este modo, se consigue que, durante el aumento de volumen, el parámetro L, que representa la longitud de onda dentro del recipiente y que influye en el k_L , permanezca inalterado.

60 Un ejemplo de una bolsa como se muestra esquemáticamente en la Figura 17A se muestra en la Figura 19. La posición de las abrazaderas es claramente visible, por lo que la bolsa con las abrazaderas cerradas tiene un volumen de trabajo de aproximadamente la mitad del volumen final. Quedará claro que agregando abrazaderas o tomando otras posiciones para las abrazaderas más al centro de la bolsa, se puede disminuir el volumen inicial. También debe tenerse en cuenta la disponibilidad de múltiples entradas y/o salidas de la bolsa en la posición central. Estas entradas y/o salidas pueden servir como entrada para medio y/o inóculo, pero también para entrada/salida de gas (es decir, aire u oxígeno). Además, como se describió anteriormente, los tubos desechables, como es visible en la figura 19, pueden

conectarse a estas entradas/salidas para proporcionar una conexión con otra bolsa. Además, las entradas/salidas se pueden usar para tomar muestras del cultivo y/o para proporcionar la temperatura u otras medidas del líquido de cultivo. Por lo tanto, las entradas y/o salidas también permiten el acoplamiento con otros dispositivos. Estos dispositivos se pueden colocar fuera de la bolsa o se pueden integrar con la bolsa. Tal dispositivo puede ser, por ejemplo, una bomba para proporcionar un flujo de cultivo líquido entre una o más bolsas, un dispositivo de aireación, como una fibra hueca, una membrana plana o un mezclador estático, un filtro o cualquier otro dispositivo que permita el aislamiento de productos y/o desechos. De esta manera, p. ej. la entrada continua de medio fresco y otros elementos esenciales para el cultivo, y la salida continua de células y/o productos podrían proporcionar un cultivo continuo.

También se ha demostrado que la forma del recipiente puede mejorar los efectos del movimiento ondulatorio de la presente invención. Del Ejemplo 1 se puede aprender que las bolsas idealmente tendrían esencialmente esquinas rectas, es decir, esquinas de $90^\circ \pm 20^\circ$ (ver Figura 10), más preferiblemente esquinas de $90^\circ \pm 15^\circ$, más preferiblemente esquinas de $90^\circ \pm 10^\circ$. Debido a las esquinas esencialmente cuadradas, la ondulación que crea el aparato de la invención "oscila" contra el extremo de la bolsa y rueda sobre su parte superior. De este modo se establece una intensa mezcla de aire y medio. Cuando se redondean las esquinas de la bolsa, la ondulación desaparece rápidamente debido a que le da a la ondulación una dirección de velocidad hacia la línea media de la bolsa y se produce una mezcla menos intensa. En todos los experimentos realizados en el Ejemplo 1, es decir, con diferentes velocidades de basculación, diferentes ángulos de inclinación y diferentes volúmenes, la bolsa con las esquinas cuadradas se comportó mejor.

Ejemplos

Ejemplo 1 medidas de k_{ia}

Se realizaron varios experimentos para investigar el comportamiento real del método y el aparato de acuerdo con la invención con respecto a la velocidad de transferencia (oxígeno). Primero, estos experimentos se realizaron con agua corriente como medio, luego se utilizó una mezcla con propiedades fisiológicas comparables al medio real.

Experimento: determinación del valor k_{ia}

Materiales:

Aparato "Shocker" de acuerdo con la reivindicación 8

Bolsa de celda WAVE/bolsa de medio Applikon

Sensor de oxígeno disuelto (OD) Presents, transmisor

N_2 , aire comprimido

Propósito:

Determinación del rendimiento del sistema Shocker, en cuanto a los valores k_{ia} , mediante la variación de varios parámetros, como la velocidad de agitación y el ángulo de inclinación.

Procedimiento de operación:

Para calcular el valor k_{ia} , se utiliza el método dinámico clásico. Esto significa llenar el espacio de cabeza con un gas inerte, N_2 , para expulsar el oxígeno disuelto en el agua.

Cuando el valor de OD indica un 10 % o menos, el espacio de cabeza se llena de aire, se pone en marcha la máquina y se registra el valor de OD. Después de cambiar los parámetros deseados, puede comenzar la siguiente medición.

Después de las mediciones, los valores de OD se exportan a Microsoft Excel, donde se pueden graficar los datos.

Con dos puntos del gráfico (C_{L1} , t_1) y (C_{L2} , t_2) el valor k_{ia} se puede calcular con la fórmula

$$k_L \cdot a = \ln \left(\frac{C_L^* - C_{L1}}{C_L^* - C_{L2}} \right) \cdot (t_2 - t_1)^{-1} ,$$

donde (C_{L1} , t_1) es el valor de DO en el momento t_1 , (C_{L2} , t_2) el valor de DO en el momento t_2 y C_L^* la concentración de saturación (el valor de DO eventualmente alcanzado).

Trazar el gráfico en una escala semilogarítmica producirá una línea recta, en la que se eligen los dos puntos C_{L1} y C_{L2} .

Hipótesis:

El valor k_{ia} depende del área de intercambio en la interfaz de líquido y gas. Por lo tanto, aumentará para desplazamientos de fluidos más grandes, es decir,

cuando aumenta la velocidad de agitación o cuando aumenta el ángulo de inclinación. También aumentará cuando la cantidad de líquido en la bolsa se reduzca debido a una menor altura del líquido (porque en la fórmula anterior, "a" es el área de transferencia de masa específica = superficie/volumen).

Sin embargo, cuando el nivel de líquido aumenta, la ondulación creada es más turbulenta y fluye hacia atrás sobre la parte superior de la bolsa. Esto, por un lado, crea un valor "a" más alto, pero, por otro lado, también crea un valor k_L más alto. De esta manera, la transferencia de masa puede aumentar a mayores volúmenes. Este efecto es más fuerte a velocidades de oscilación mayores.

Resultados de la medición

Las mediciones han mostrado el rendimiento del sistema en función de varios parámetros. Estos parámetros, la velocidad de agitación, el ángulo de inclinación y el volumen de líquido en el desechable se cambiaron mientras se medía la concentración de oxígeno en el líquido (agua). Al graficar la concentración de oxígeno frente al tiempo, es posible determinar el valor de $k_L a$ con el "método dinámico". Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 7-9. Durante los experimentos se hace una distinción entre las bolsas usadas, denominadas "bolsa A" y "bolsa B" en las figuras. Los resultados muestran un efecto significativo sobre las características de transferencia de oxígeno de las diferentes bolsas. Como el tamaño era comparable, al igual que la cantidad de líquido durante los experimentos, la única variable era la forma de los desechables. Las vistas superiores de la figura 10 muestran estas diferencias.

Ejemplo 2 Resultados en cultivos de células de mamíferos

Se han realizado tres experimentos diferentes para investigar el crecimiento y comportamiento de un clon productor de anticuerpos de células PER.C6® en el aparato de la presente invención (en lo sucesivo también indicado por el nombre CELL-tainer™).

Todos los experimentos se han realizado en bolsas de cultivo disponibles comercialmente (estándar) y en medios y protocolos estándar que se han utilizado para el cultivo de PER.C6®.

Se utilizó el mismo régimen de alimentación (tanda de alimentación) y precultivos en los experimentos de comparación.

Experimento 1

Precultivo (ver Figura 11)

Después de descongelar, las células se mantuvieron en precultivo y el cultivo se dividió dos veces. El cultivo se ha mantenido viable durante 12 días a viabilidades > 98 %. En conclusión, el CELL-tainer™ se puede utilizar para precultivo.

Experimento 2

Cultivo por tandas (ver Figura 12)

Se ha realizado un cultivo por tandas ordinario. La comparación se realizó con un cultivo por tandas de referencia en un agitador (densidad de células viables máxima de 5×10^6 células/ml, línea azul), un biorreactor de 5L agitado (densidad de células viables máxima de $7,5 \times 10^6$ células/ml, línea verde) y el CELL-tainer™, volumen de trabajo de 10 l (densidad celular viable máxima $8,0 \times 10^6$ células/ml).

La viabilidad se mantuvo > 98 % durante todo el experimento, lo que es ligeramente mejor que en un biorreactor agitado.

Durante el experimento, la velocidad de agitación se ha aumentado hasta un 80 % (35 rpm) en el ángulo de agitación más bajo, lo que muestra que la velocidad de oscilación no afecta a las células.

Experimento 3

Cultivo de tandas de alimentación (consulte la Figura 13)

Se realizó un cultivo de alimentación por tandas en el CELL-tainer™ (volumen de trabajo 10 l) en comparación con un biorreactor agitado estándar de 10 l y un biorreactor Wave de 20 l (volumen operativo 10 l). Durante el funcionamiento del CELL-tainer™, el espacio superior se gaseó con una mezcla de gas que contenía un 5 % de CO₂. No se ha utilizado

ningún control de pH. El pH se mantuvo constante debido a la capacidad tampón del medio, así como debido al intercambio con el gas de recubrimiento. Aquí el rendimiento fue diferente del STR (biorreactor agitado), donde se necesita el control del pH y la eliminación de CO₂ para mantener el pH constante.

- 5 El CELL-tainer™ da como resultado una densidad celular viable (viabilidad > 98 %) de $13,0 \times 10^6$ células/ml después de ocho días (CT1). Durante los días 7-8 de la segunda corrida (CT2), hubo problemas operativos con el suministro de gas, lo que resultó en una disminución del crecimiento durante estos días.

- 10 El equipo STR da como resultado una densidad celular de aprox. $11,0 \times 10^6$ células/ml después de ocho días. El biorreactor Wave proporciona un máximo de $7,0 \times 10^6$ células/ml y el crecimiento se detiene después de 7 días.

Durante todo el experimento, el sistema CELL-tainer™ funcionó a una velocidad de oscilación del 50 al 70 % en el ángulo mínimo.

- 15 Datos de productividad

La producción de un tipo de anticuerpo IgG en el CELL-tainer™ se ha comparado con la producción en un biorreactor agitado tradicional y un biorreactor Wave.

- 20 Como se mencionó anteriormente, el cultivo de CT1 se detuvo después de ocho días. El segundo experimento en el CELL-tainer™, CT2, dio como resultado una IVC de 160×10^6 (células x día/ml) y una concentración final de anticuerpo de 1.5 g/l. (vea la Figura 14A y B)

Ejemplo 3 Resultados en cultivos de células bacterianas

- 25

Materiales y métodos

Fermentación

- 30 Los experimentos de laboratorio se realizaron en un biorreactor agitado por tandas estándar de 3.5 l (Applikon 5L tipo Z61100005), con control de temperatura externo (criostato). La temperatura se controló a 37 °C. Para los estudios de crecimiento se utilizó la cepa EC1000 de E. coli. El medio utilizado fue medio TY estándar (Trypton (Becton, Dickinson y co.) 1 g/100 ml (concentración final al 1 %); extracto de levadura (polvo LS ferm DSM) 0.5 g/100 ml (concentración final al 0,5 %); cloruro de sodio (Merck) 0.5 g/100 ml (0.5 % concentración final); pH 7.2

- 35

El crecimiento se monitorizó durante 24 h midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en muestras de 2-3 ml.

El biorreactor se inoculó con 50 ml de cultivo en matraz de agitación de precultivo utilizando el mismo medio.

- 40 Resultados y conclusión

Fermentación en TY en un biorreactor agitado de 3.5 l

- 45 Las características de crecimiento de los experimentos se resumen en la Tabla 1. En la Figura 15 se presenta la curva de crecimiento, la Figura 15A representa una escala lineal de los valores de DO₆₀₀ medidos, la Figura 15 B proporciona los mismos datos en una escala logarítmica.

Tabla 1. Características de la fermentación de E. coli EC1000 en TY en un biorreactor agitado

	Rendimiento de crecimiento (OD ₆₀₀)	Velocidad de crecimiento Max. (h ⁻¹)
	6.5	1.4

- 50 Fermentación en TY en CELL-tainer™ en comparación con 3.5 STR

Las curvas de crecimiento y las características de crecimiento como se muestran en la Figura 16A y B y en la Tabla 2 fueron al menos similares, se observó una tasa de crecimiento máxima más alta en el CELL-tainer™.

- 55 Tabla 2. Características de fermentación de E. coli EC1000 en TY en un reactor de tanda y Cell-tainer™.

	Rendimiento de crecimiento (OD ₆₀₀)	Velocidad de crecimiento Max. (h ⁻¹)
Biorreactor agitado	6.5	1.4
Cell-tainer™	6.9	1.75

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar células utilizando el movimiento ondulatorio, que comprende los pasos de:

5 - proporcionar un recipiente (2; 2A; 2B), medios (7; 7A; 7B; 57) de retención para retener el recipiente y un mecanismo (4, 8; 4, 8, 8B, 20; 54, 58, 64, 68, 78) de accionamiento para bascular el recipiente con respecto a un eje (5; 5B; 55) de pivote; sustancialmente horizontal

- introducir un gas que contenga oxígeno, un medio (3) líquido y un cultivo celular en el recipiente;

10 - mover el recipiente de manera que el recipiente bascule con respecto a dicho eje (5; 5B; 55) de pivote sustancialmente horizontal para inducir así un movimiento ondulatorio al medio (3) líquido en el recipiente, cuyo movimiento ondulatorio contribuye a la transferencia de oxígeno necesaria y mezcla requerida para el crecimiento celular,

15 caracterizado porque dicho eje (5; 5B; 55) de pivote se define como un eje central de una articulación de bisagra ubicada en una unión de los medios (7; 7A; 7B; 57) de retención a una viga (8; 8B; 58) giratoria del mecanismo 4, 8; 4, 8, 8B, 20; 54, 58, 64, 68, 78) de accionamiento, y porque durante dicho basculamiento del recipiente dicho eje (5; 5B; 55) de pivote sigue una trayectoria (6; 6B; 56) cíclica de bucle cerrado

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proyección de la trayectoria en bucle cerrado sobre un plano transversal al eje (5; 5B; 55) de pivote tiene una forma de bucle cerrado.

25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la trayectoria (6; 6B; 56) cíclica de bucle cerrado tiene una forma circular.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que

30 - el recipiente (2; 2A; 2B) comprende una bolsa de plástico preesterilizada que tiene una única cámara interior hueca;

- la introducción del gas, el medio líquido y el cultivo celular en el recipiente se realiza mediante:

- llenar parcialmente la bolsa con gas para así inflar parcialmente la bolsa;

35 - introducir el medio líquido y el cultivo celular en la bolsa, en el que el medio líquido y el cultivo celular comprenden entre el 10 y el 80 % del volumen de la bolsa;

- llenar el resto de la bolsa con gas de manera que la bolsa se vuelva rígida;

40 - la bolsa está retenida por medios (7; 7A; 7B; 57) de retención;

- el movimiento del recipiente (2; 2A; 2B) se realiza moviendo los medios (7; 7A; 7B; 57) de retención.

45 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el volumen efectivo del recipiente (2; 2A; 2B) se modula durante el proceso de cultivo celular.

50 6. Un aparato para cultivar células en un recipiente (2; 2A; 2B) que utiliza el movimiento ondulatorio de un medio líquido en el recipiente, que comprende medios (7; 7A; 7B; 57) de retención para retener el recipiente y un mecanismo (4, 8; 4, 8, 8B, 20; 54, 58, 64, 68, 78) de accionamiento para bascular el recipiente con respecto a un eje (5; 5B; 55) de pivote sustancialmente horizontal, caracterizado porque dicho eje (5; 5B; 55) de pivote se define como un eje central de una articulación de bisagra ubicada en una unión de los medios (7; 7A; 7B; 57) de retención a una viga (8; 8B; 58) giratoria del mecanismo (4, 8; 4, 8, 8B, 20; 54, 58, 64, 68, 78) de accionamiento, y porque el mecanismo de accionamiento está dispuesto para bascular el recipiente de tal manera que durante dicho basculamiento dicho eje (5; 5B; 55) de pivote sigue una trayectoria (6; 6B; 56) cíclica de bucle cerrado.

55 7. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 6, dispuesto para cultivar células en un recipiente (2A; 2B), cobasculante estando dispuesto el mecanismo de accionamiento para bascular tanto el recipiente como el recipiente cobasculante simultáneamente.

60 8. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 7, dispuesto para realizar el basculamiento simultáneo en una condición en la que el recipiente (2) y el recipiente (2A) cobasculante están colocados uno al lado del otro.

9. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 8, dispuesto para realizar el basculamiento simultáneo en una condición en la que el recipiente (2) y el recipiente (2B) cobasculante están colocados uno encima del otro.

65

10. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, dispuesto para realizar el basculamiento simultáneo de tal manera que dicho eje (5) de pivote sustancialmente horizontal funcione como eje de pivote de articulación tanto para el basculamiento del recipiente como para el basculamiento del recipiente cobasculante.
- 5 11. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 10, dispuesto para realizar el basculamiento simultáneo de modo que la dirección de basculamiento del recipiente con respecto al eje (5) de pivote de la articulación sea opuesta a la dirección de basculamiento del recipiente cobasculante con respecto al eje de pivote de la articulación.
- 10 12. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 6, dispuesto para cultivar células en al menos dos recipientes (2A, 2B), cobasculantes estando dispuesto el mecanismo de accionamiento para bascular tanto el recipiente (2) como los al menos dos recipientes (2A, 2B) cobasculantes simultáneamente en una condición en la que el recipiente (2) y al menos uno (2A) de los al menos dos recipientes cobasculantes están colocados uno al lado del otro y en el que el recipiente (2) y al menos otro (2B) de los al menos dos recipientes cobasculantes están colocados uno encima del otro.
- 15 13. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-12,
- en el que el mecanismo de accionamiento está dispuesto para bascular el recipiente de modo que durante dicho basculamiento el recipiente lleve a cabo un segundo basculamiento con respecto a un segundo eje (65) de pivote que es distante y paralelo al eje (55) de pivote sustancialmente horizontal, durante cuyo segundo basculamiento el segundo eje de pivote sigue una segunda trayectoria (66) cíclica de bucle cerrado
- 20 14. Un conjunto para cultivar células, que comprende un aparato (1; 51; 101) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13, y un recipiente (2) para cultivar células cuando son retenidas por los medios (7; 7A; 7B; 57) de retención de dicho aparato.
- 25 15. Conjunto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho recipiente es un recipiente desechable, preferiblemente un recipiente preesterilizado.
- 30 16. Conjunto de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que el recipiente tiene una pared al menos parcialmente flexible, y en el que el conjunto comprende además medios para modular el volumen efectivo del recipiente durante el proceso de cultivo celular cambiando la posición de al menos una parte flexible de dicha pared.
- 35 17. Conjunto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicho recipiente es una bolsa de plástico esterilizable desechable que tiene al menos una entrada y una salida, caracterizado porque tiene esquinas esencialmente rectas de $90^\circ \pm 20^\circ$, preferiblemente esquinas de $90^\circ \pm 15^\circ$, más preferiblemente esquinas de $90^\circ \pm 10^\circ$.
- 40 18. Conjunto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en el que dicho recipiente es una bolsa de plástico esterilizable desechable que tiene al menos una entrada y una salida, caracterizado porque se puede cambiar el volumen efectivo de la bolsa.
- 45 19. Conjunto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el cambio puede efectuarse inflando compartimentos cerrados que contienen cultivos no tisulares.
20. Conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el cambio se puede efectuar cerrando y/o abriendo uno o más compartimentos de dicho recipiente, en el que dicho cierre se efectúa mediante una o más abrazaderas o sellos.

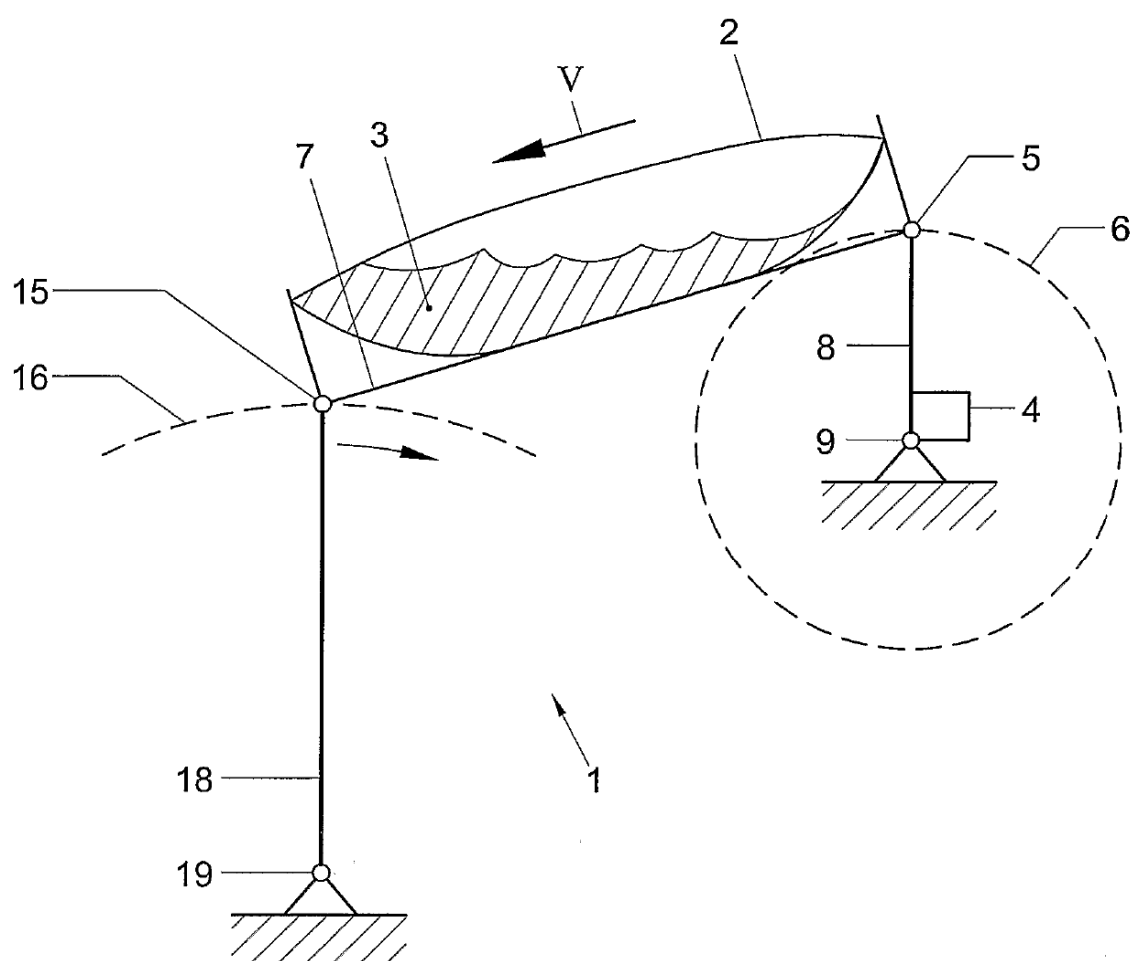


Fig. 1

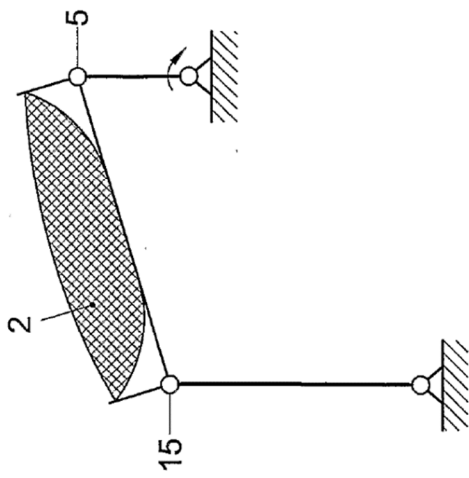


Fig. 2A

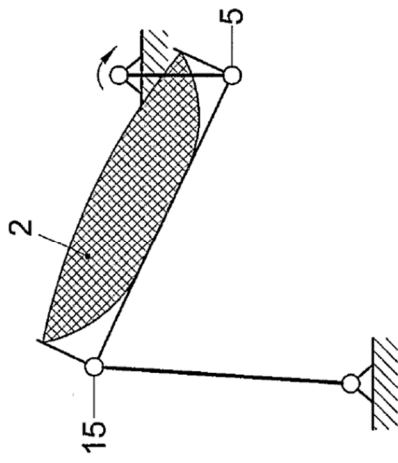


Fig. 2C

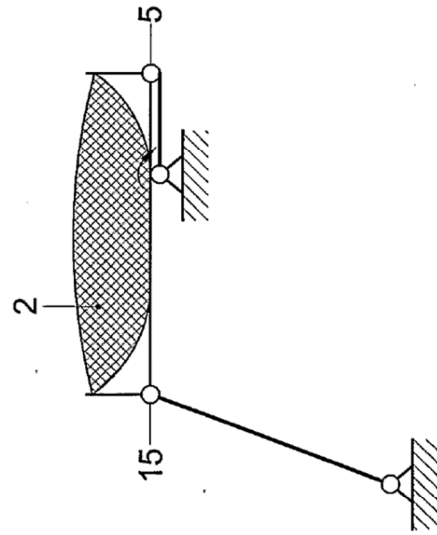


Fig. 2B

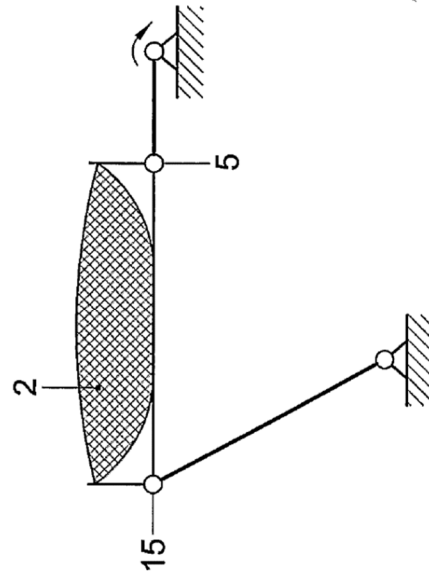


Fig. 2D

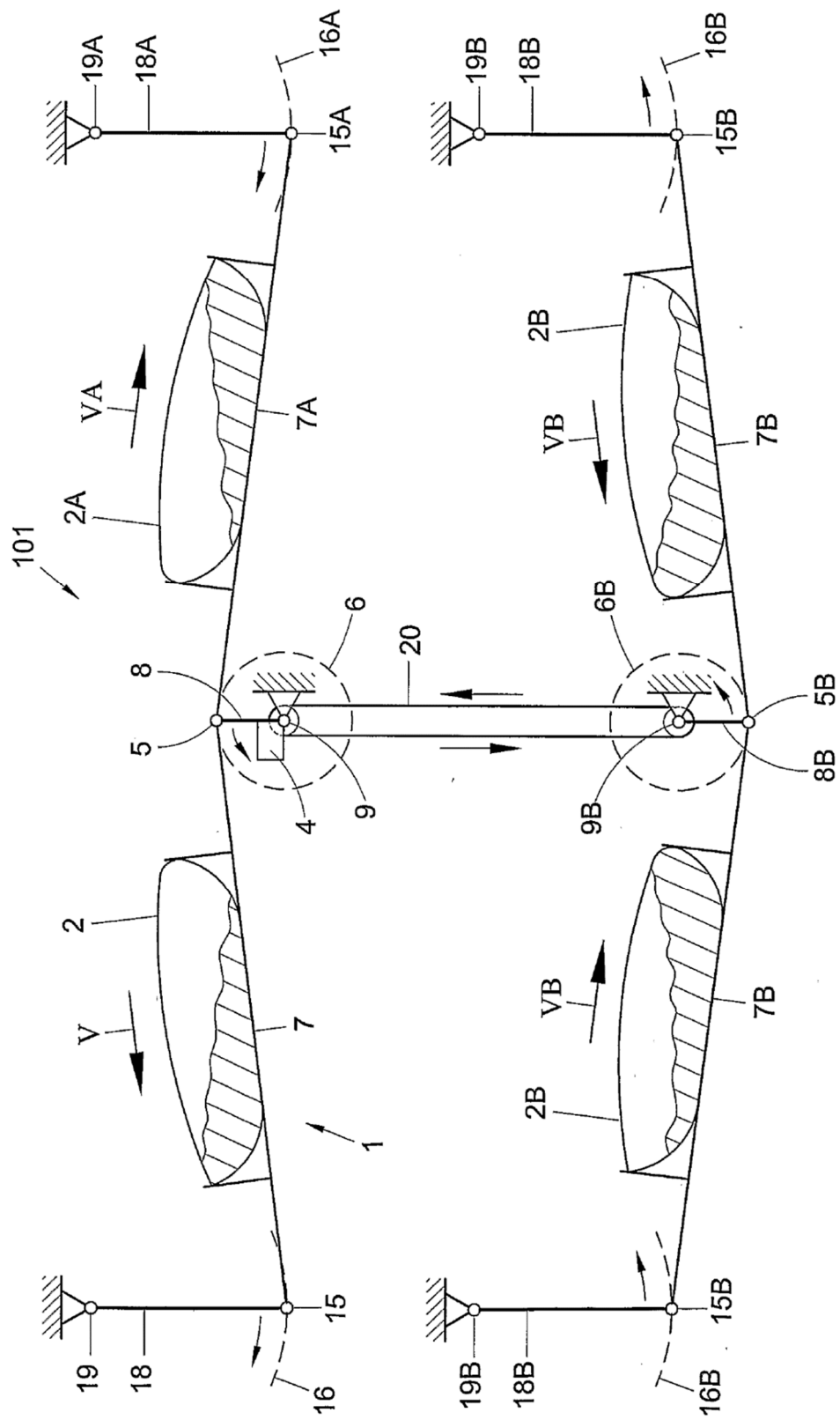


Fig. 3

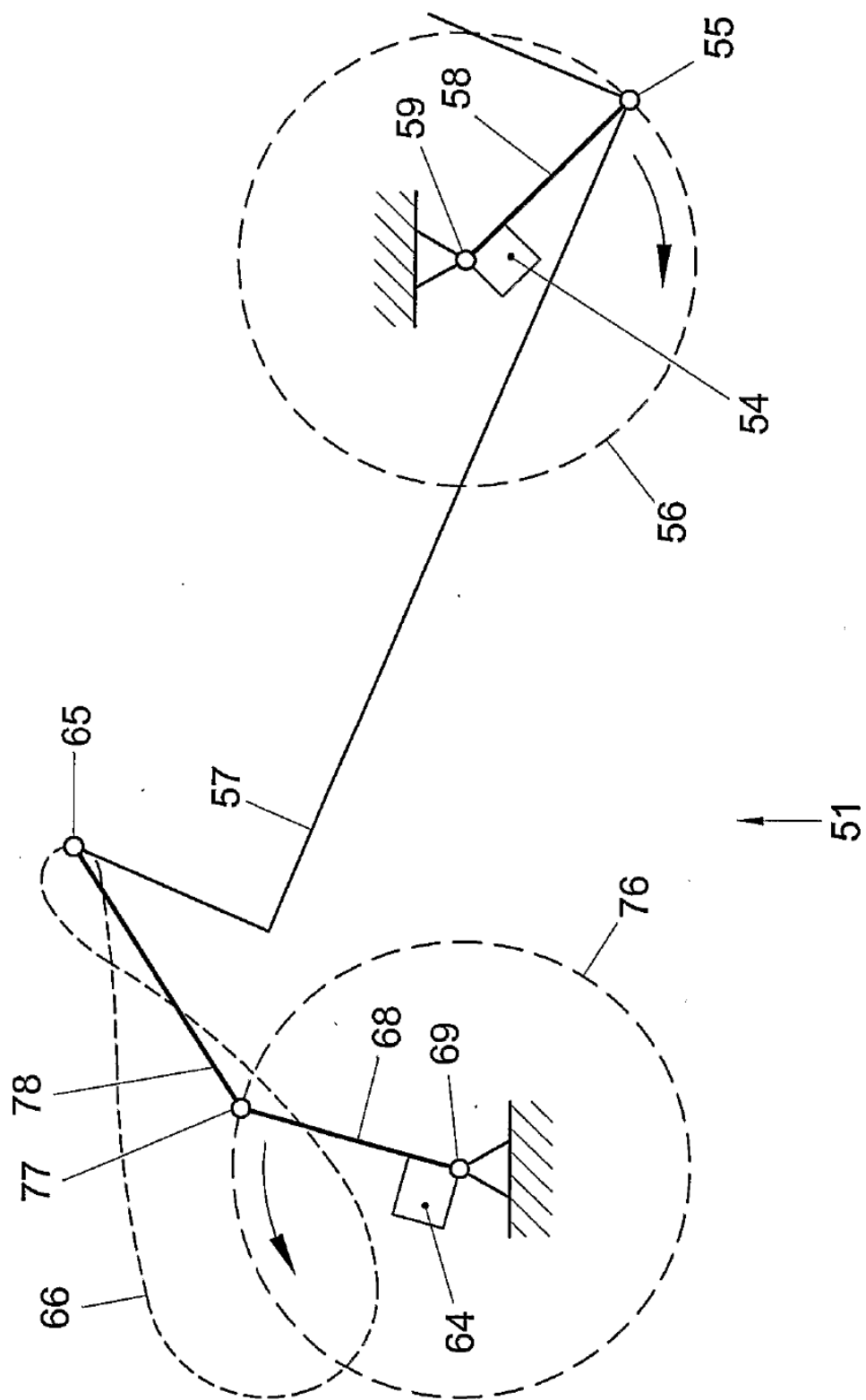


Fig. 4

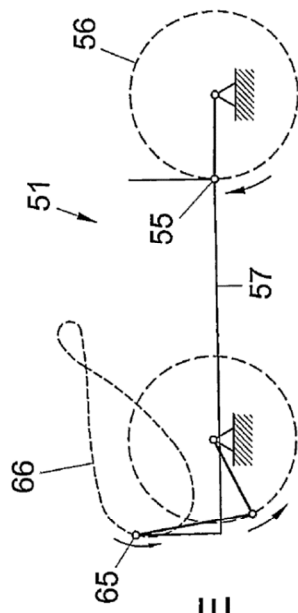


Fig. 5E

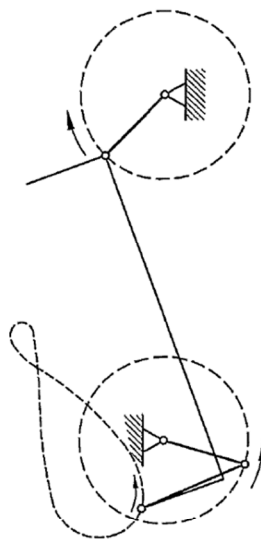


Fig. 5F

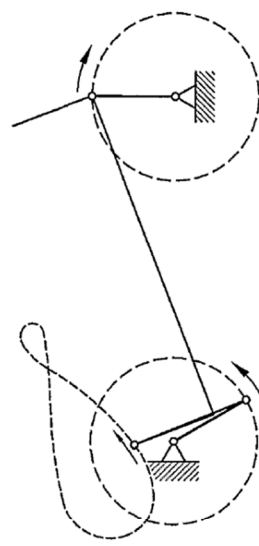


Fig. 5G

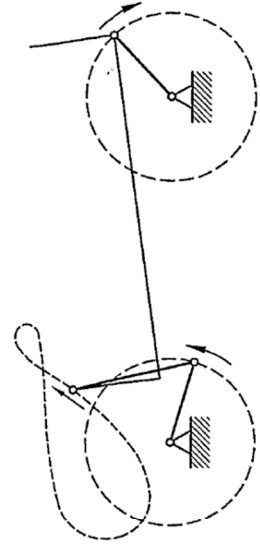


Fig. 5H

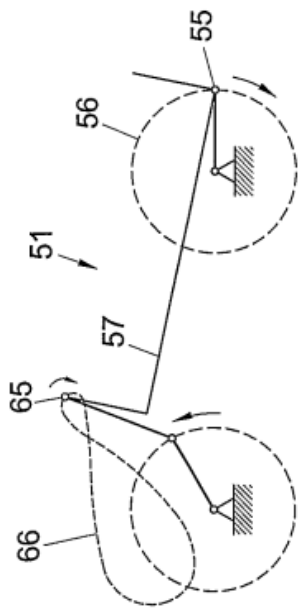


Fig. 5A

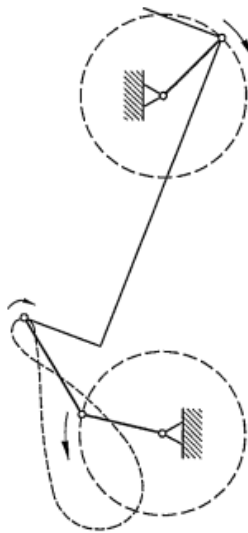


Fig. 5B

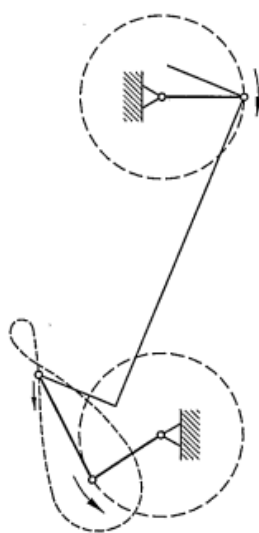


Fig. 5C

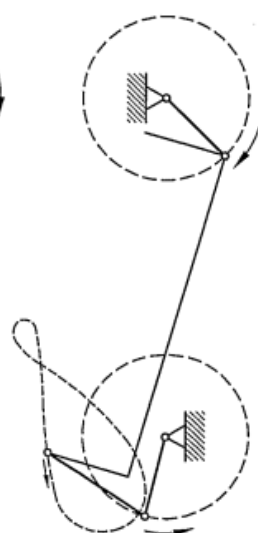


Fig. 5D

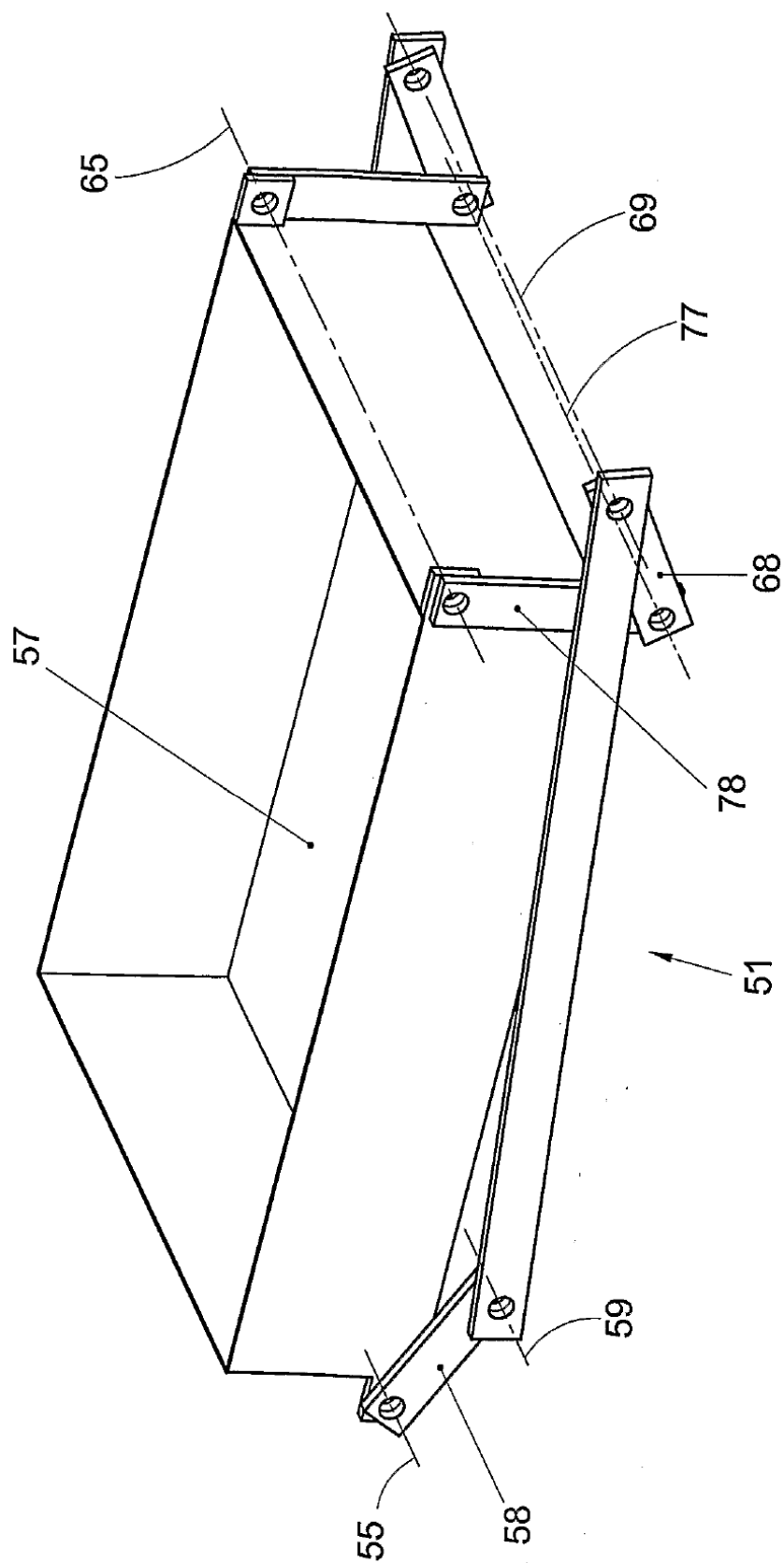


Fig. 6

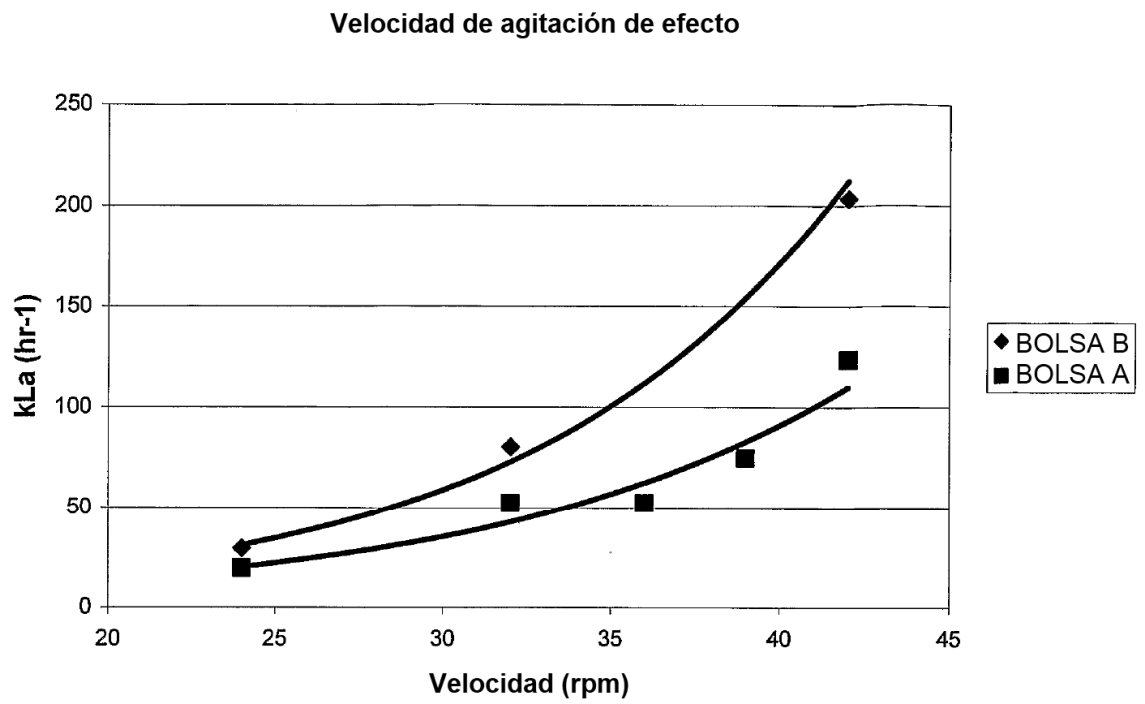


Fig. 7

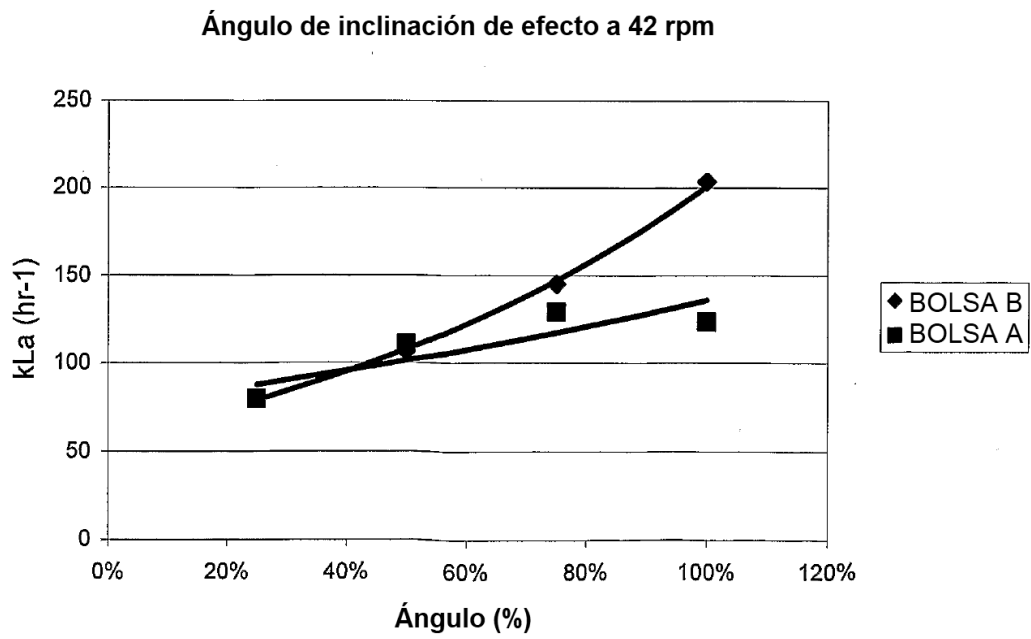


Fig. 8

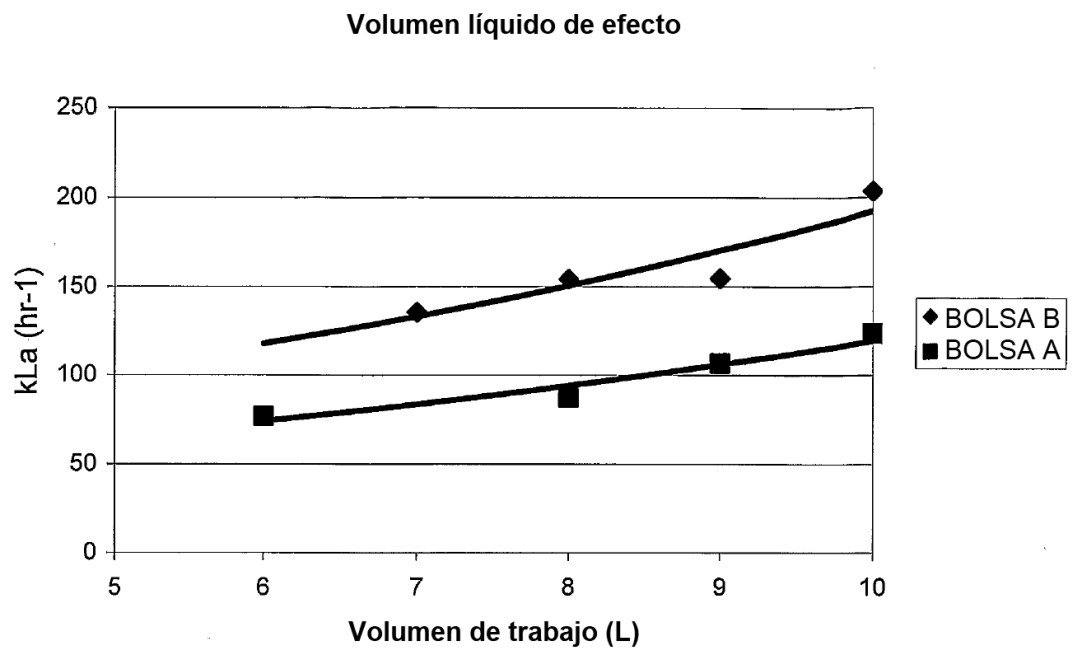


Fig. 9

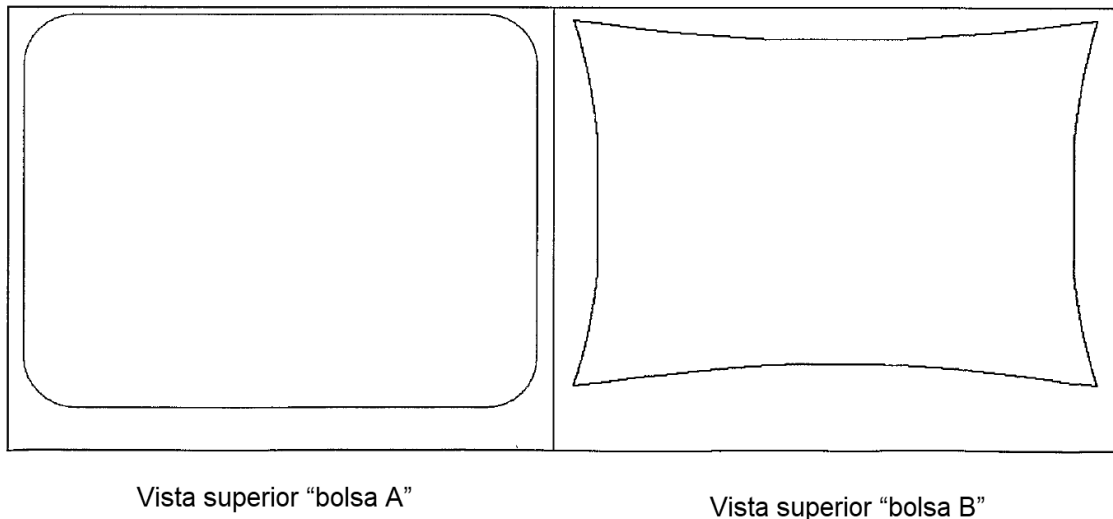


Fig. 10

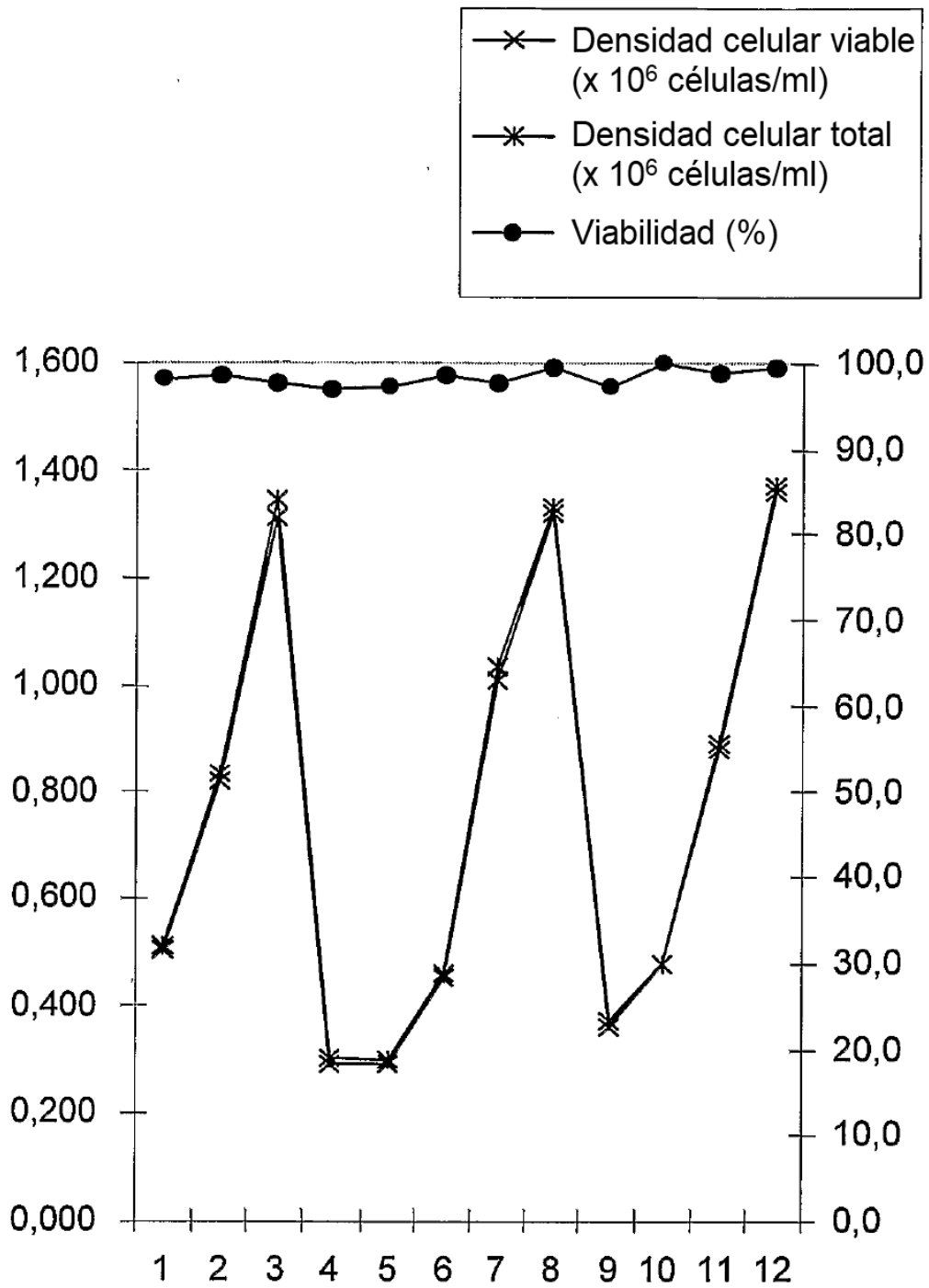


Fig. 11

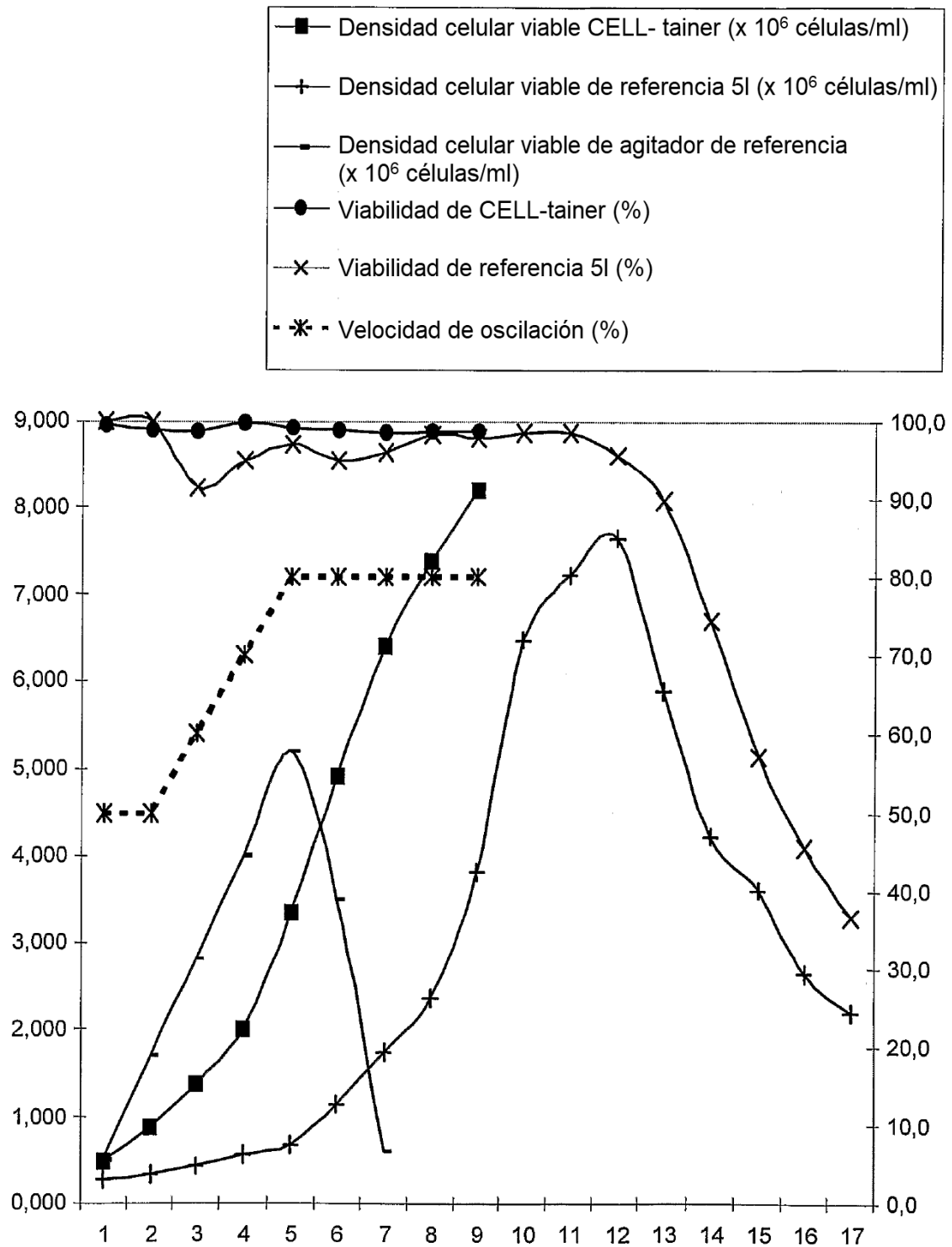


Fig. 12

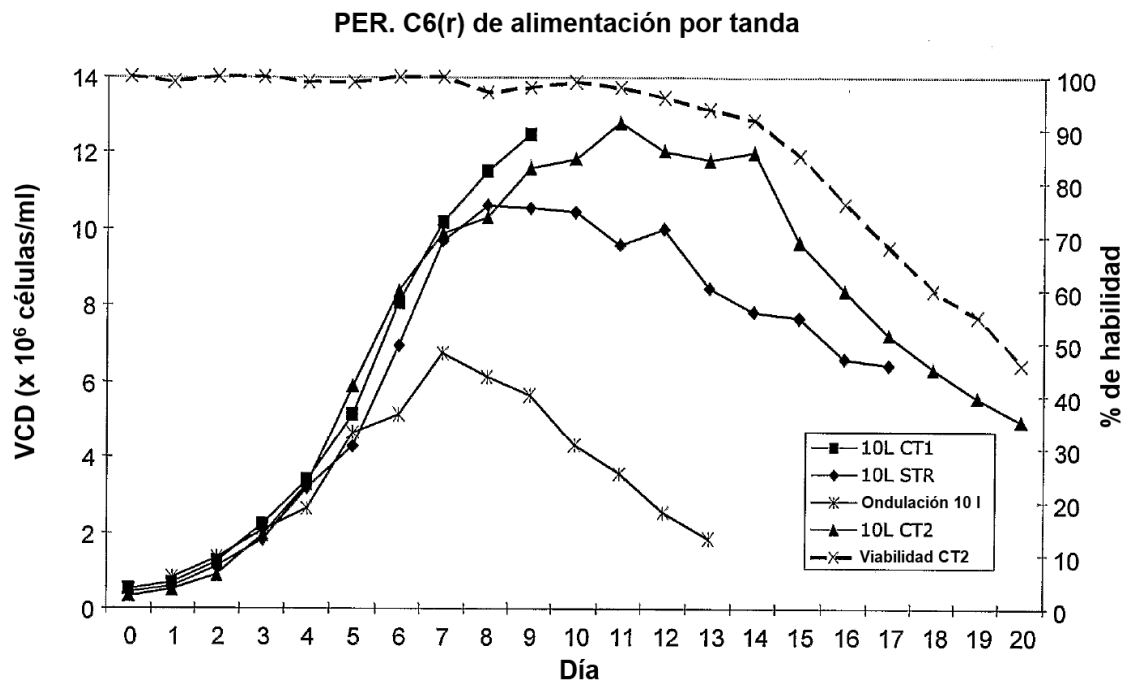


Fig. 13

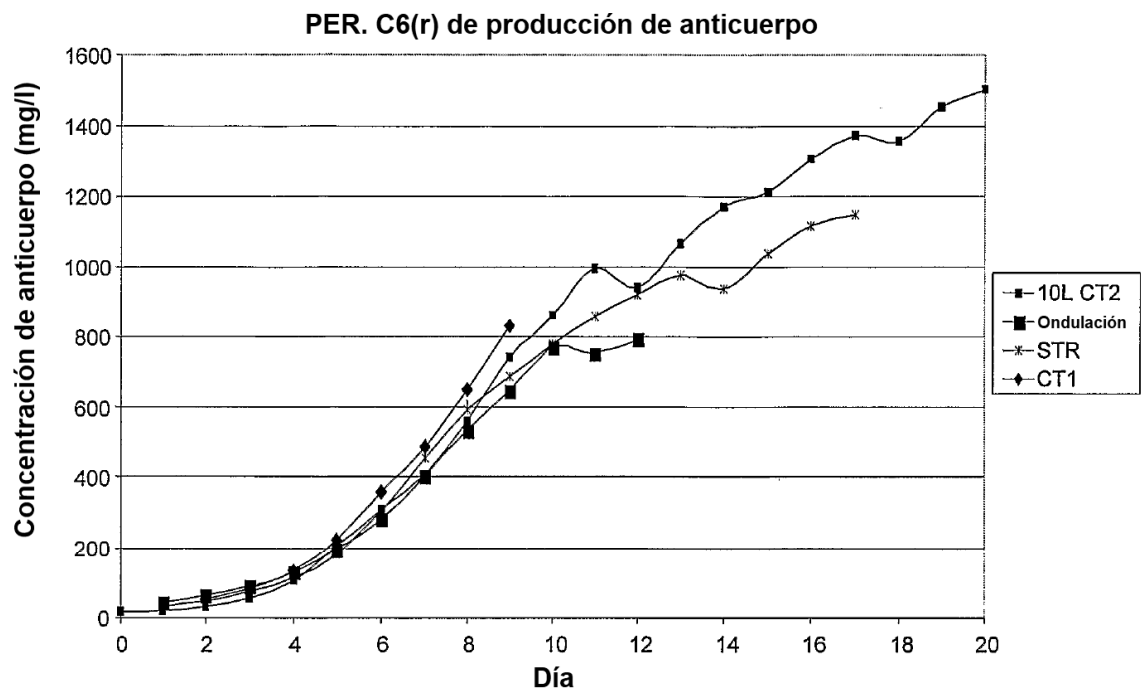


Fig. 14A

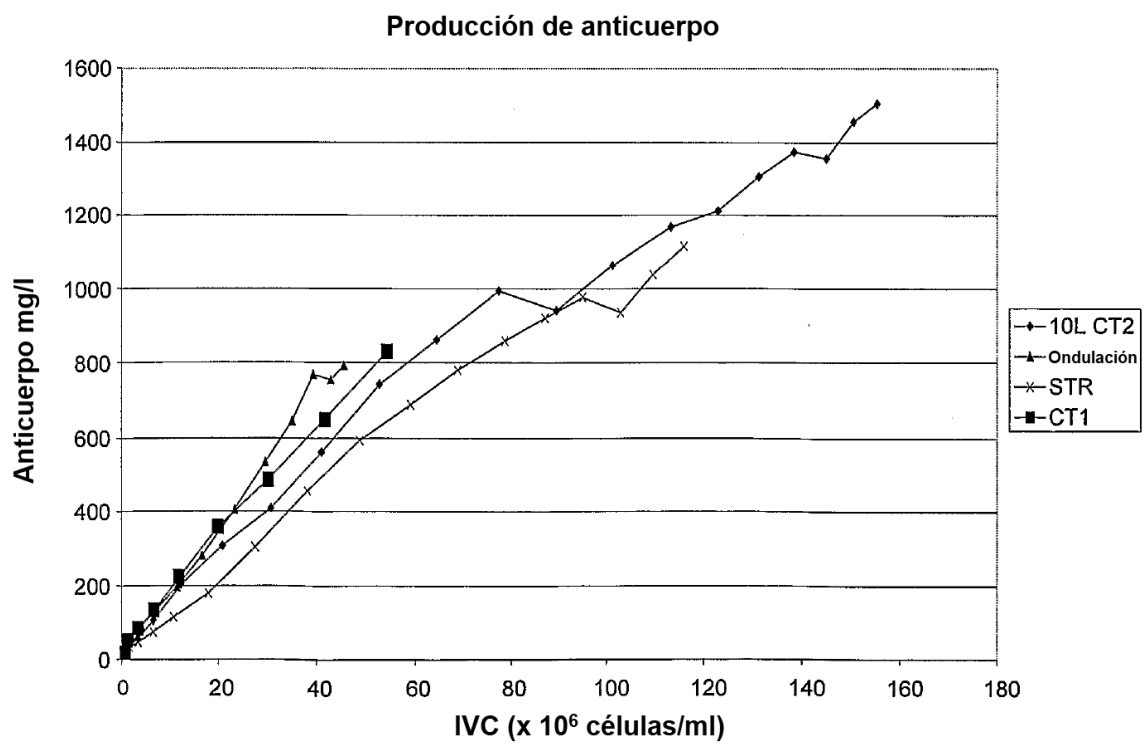


Fig. 14B

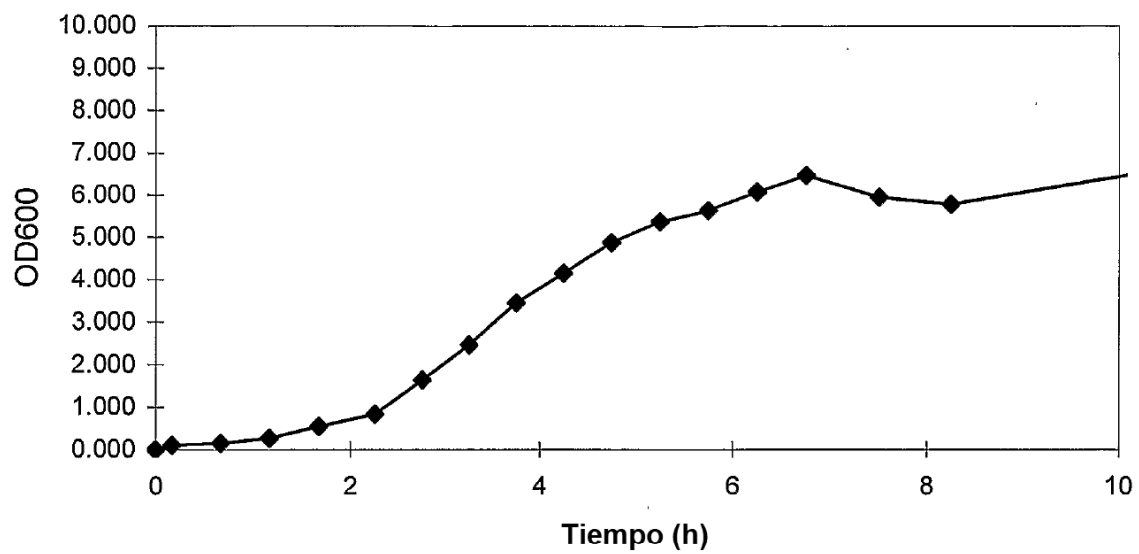


Fig. 15A

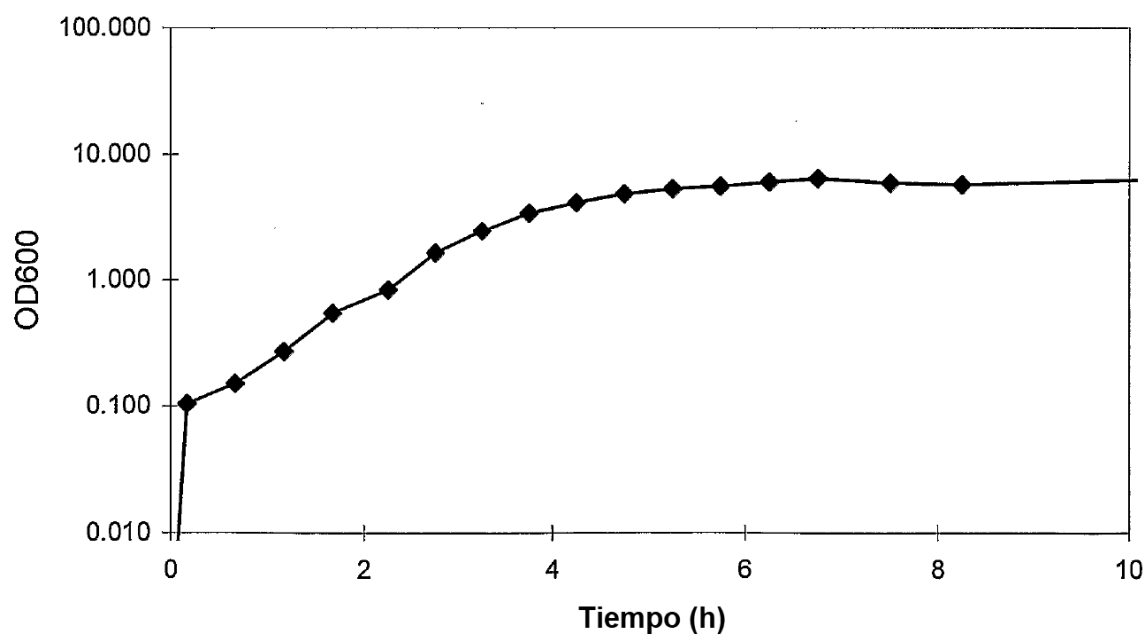


Fig. 15B

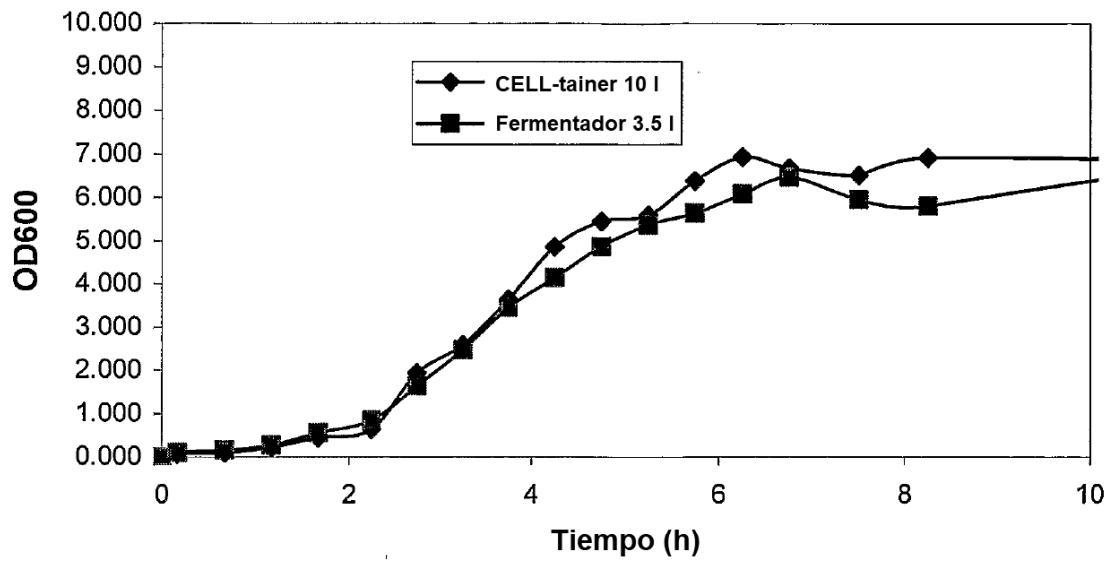


Fig. 16A

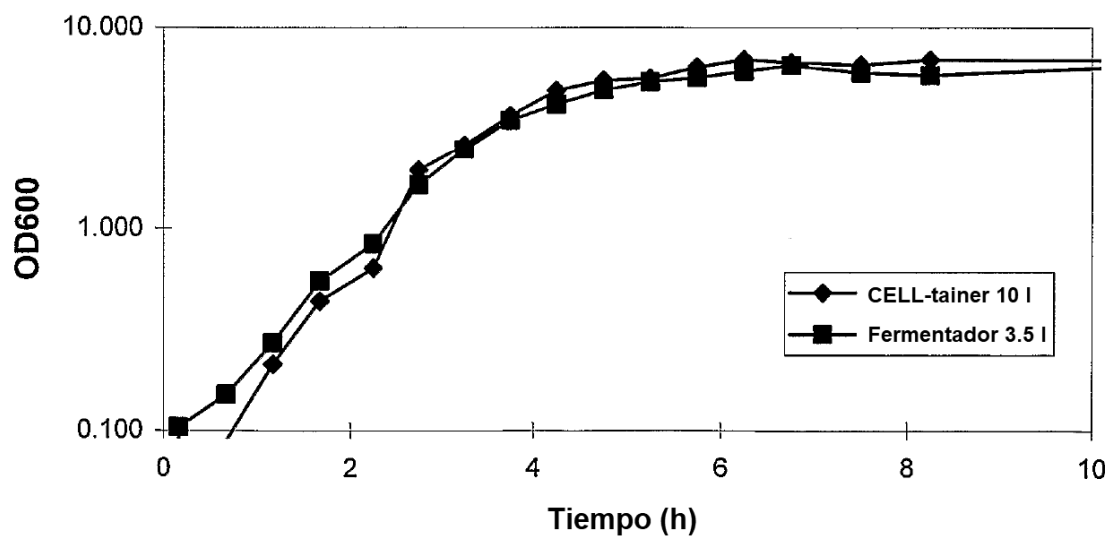


Fig. 16B

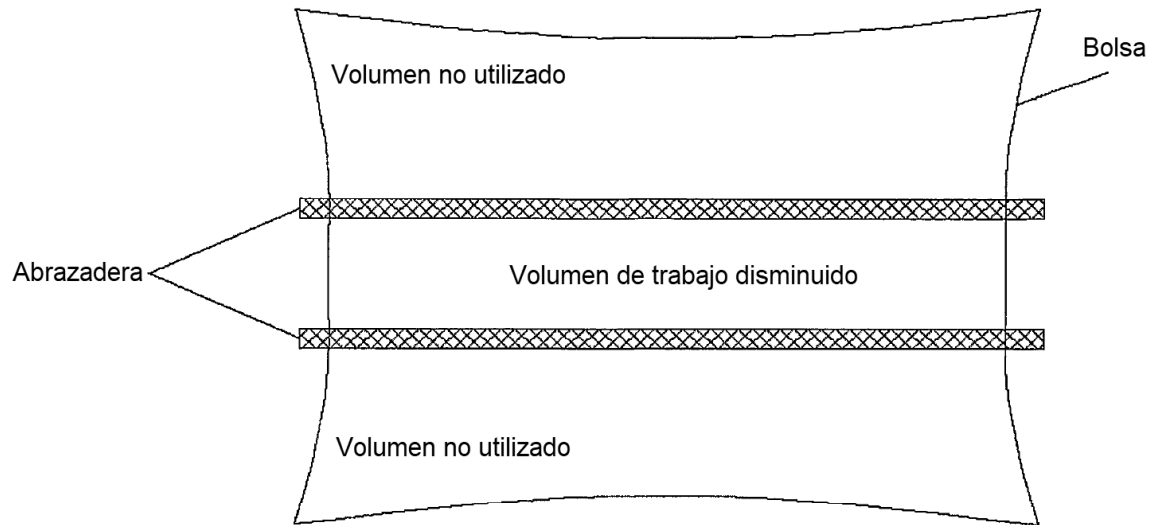


Fig. 17A

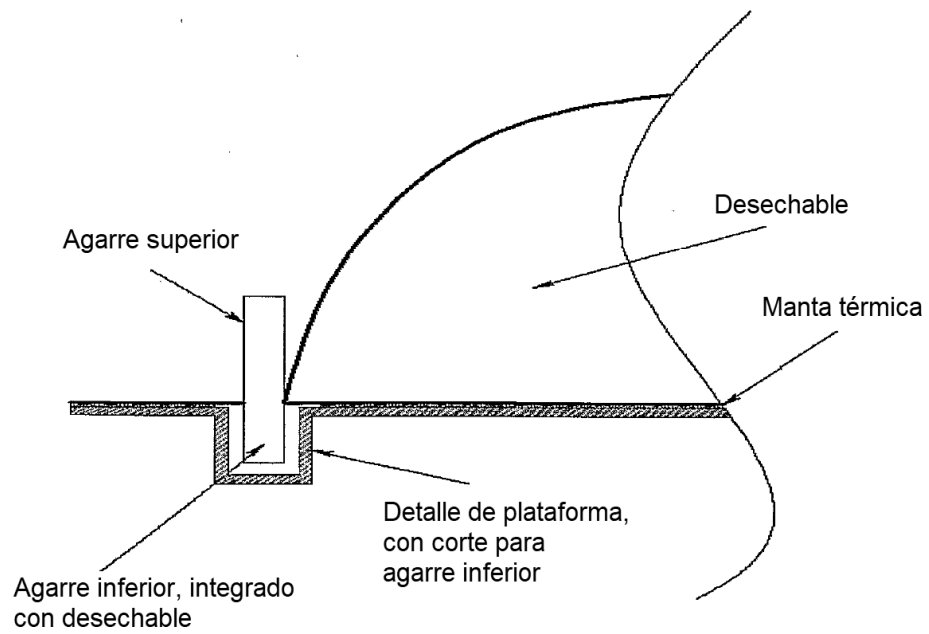


Fig. 17B

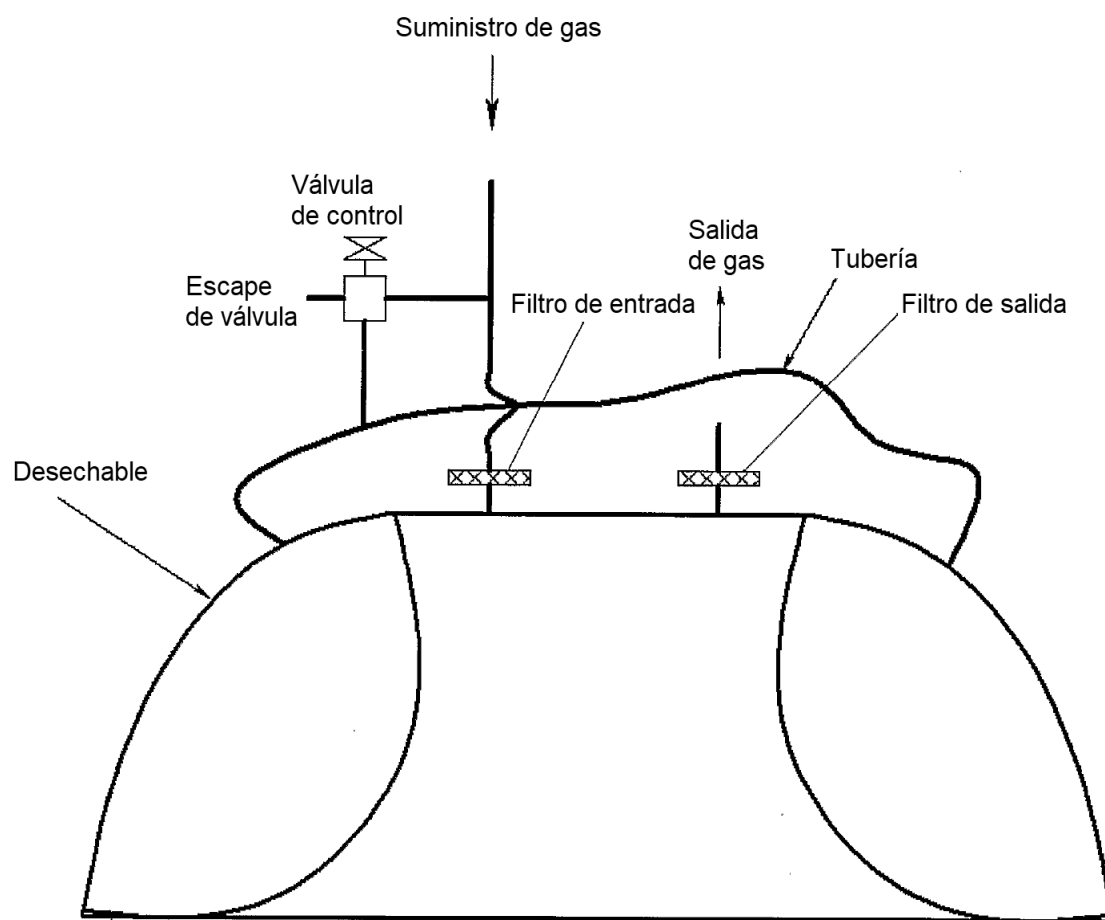


Fig. 18



Fig. 19