

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 033**

21 Número de solicitud: 201830866

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**B01F 7/16** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.09.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.03.2020**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (75.0%)  
Edificio Emprendia - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y  
SEVERIANO SERVICIO MÓVIL S.A. (25.0%)**

72 Inventor/es:

**COSTOYA PUENTE, José Antonio;  
ARCE VÁZQUEZ, Víctor Manuel;  
GOLÁN CANCELA, Irene;  
PARDO VÁZQUEZ, José Luis y  
ZUMALAVE RIVAS, José Antonio**

74 Agente/Representante:

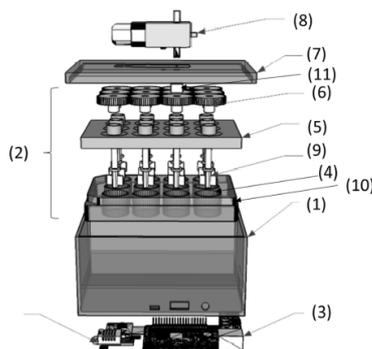
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

54 Título: **Sistema para el cultivo de organoides**

57 Resumen:

La presente invención describe un sistema para el cultivo de organoides que permite un cultivo múltiple simultáneo, el uso de equipamiento de cultivo estándar, así como la monitorización en tiempo real del crecimiento del organoide y de parámetros físico-químicos relevantes. Además, el sistema es modular y totalmente esterilizable. La presente invención también describe un método para esterilizar un sistema de cultivo de organoides.

FIG. 1



## DESCRIPCIÓN

### Sistema para el cultivo de organoides

#### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención describe un sistema para el cultivo de organoides. Además, la  
5 presente invención describe también un método para esterilizar un sistema de cultivo.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el estado de la técnica se han descrito varios sistemas para el cultivo de organoides, también conocidos como sistemas de cultivo tridimensional, en  
10 contraposición con el cultivo tradicional bidimensional en monocapa.

Qian, X. y otros describieron en un artículo científico en 2016 (Cell, 165, 1238-1254) el desarrollo de un biorreactor giratorio miniaturizado para generar organoides específicos del cerebro a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) humanas. Estos organoides incorporaron características clave del desarrollo cortical  
15 humano, incluyendo la organización de la zona progenitora, la neurogénesis, la expresión génica y una capa de células glía radiales externas específicas del ser humano. El biorreactor se denominó SpinZ y encaja en una placa de cultivo de tejido estándar de 12 pocillos, reduciendo drásticamente el consumo de medio y el espacio en la incubadora. El biorreactor también disponía de una versión apilable accionada  
20 por un motor común, lo que permitía comparar un gran número de condiciones en paralelo (para optimizar el protocolo) y reducir el espacio necesario en la incubadora. Sin embargo, el sistema no es modular ni tampoco es un sistema totalmente esterilizable. Además, SpinZ tampoco incorpora sensores que permitan medir en tiempo real parámetros importantes como pueden ser el crecimiento celular, pH,  
25 concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, temperatura.

Wilkinson y otros describieron en un artículo científico (Stem Cells Translational Medicine (2017), 6, 622-633) un método escalable para la generación de organoides pulmonares humanos auto-ensamblados. La generación de dichos organoides se consiguió mediante la combinación de microesferas de alginato funcionalizadas con  
30 colágeno y fibroblastos humanos en un biorreactor rotacional de vasos de alta relación de aspecto (HARV) de 4 ml. Además, los autores también enseñan que se puede montar una cámara GoPro en el HARV para caracterizar la cinética de la formación de

organoides. Sin embargo, dicha invención no permite usar material de cultivo estándar, ni tampoco cultivo simultáneo múltiple. El sistema tampoco es modular, y aunque permite caracterizar el crecimiento de organoides con la cámara que incorpora, no permite almacenar automáticamente esos datos ni tampoco monitorizar y almacenar  
5 otros parámetros físico-químicos de interés como pueden ser el pH, concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y la temperatura.

La solicitud de patente WO2015/184273 A1 enseña un sistema de biorreactor para la preparación de un organoide cardíaco. El sistema del biorreactor incluye un primer recipiente con un interior hueco y una parte superior abierta, además de una cánula  
10 con un lumen, un anillo poroso acoplado a la cánula y un catéter de balón. Esta invención presenta un problema de aplicabilidad, puesto que el requisito de un catéter de balón limita la producción de organoides a un único tipo cardíaco. Además, no se trata de un biorreactor modular ni tampoco permite un cultivo simultáneo de distintos tejidos y/o distintas condiciones. Este biorreactor tampoco incorpora la posibilidad de  
15 usar material de cultivo estándar. Además, tampoco permite monitorizar a tiempo real el crecimiento del organoide ni monitorizar y almacenar los datos referidos a parámetros físico-químicos de interés del cultivo.

La solicitud de patente WO2012/104437 A1 enseña un biorreactor para cultivo celular sobre un sustrato tridimensional. Se compone de una cámara de cultivo de forma  
20 cónica. El biorreactor se utiliza en la ingeniería de tejidos para la producción de injertos de tejidos, en particular un injerto óseo o de cartílago. Este biorreactor no permite el cultivo múltiple simultáneo ni tampoco el uso de material de cultivo estándar. Además, el biorreactor de dicha invención no permite tampoco monitorizar a tiempo real el crecimiento del organoide ni monitorizar y almacenar los datos referidos a parámetros  
25 físico-químicos de interés.

A la vista de los documentos anteriormente citados, resulta evidente la necesidad de un sistema para el cultivo de organoides que sea modular, esterilizable, que permita el cultivo múltiple simultáneo y que permita monitorizar a tiempo real el crecimiento celular así como también monitorizar y almacenar parámetros físico-químicos  
30 relevantes tales como el pH, concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y la temperatura. En la presente invención se describe un sistema para el cultivo de organoides que incluye las anteriores características mejorando de forma significativa los sistemas existentes en el estado de la técnica.

## RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un sistema para el cultivo de organoides que permite un cultivo múltiple simultáneo (high-throughput), la reutilización de material y  
5 equipamiento de cultivo estándar, así como la monitorización en tiempo real del crecimiento del organoide y de parámetros físico-químicos relevantes. Además, el sistema es modular y se puede esterilizar un módulo independientemente de otro.

Un aspecto de la presente invención trata de un sistema esterilizable para el cultivo de organoides que comprende

10 un motor (8) que se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6), estando dichos segundos medios de transmisión del movimiento (6) acoplados a una cubierta (7);

un módulo de cultivo (2) que comprende uno o más pocillos (4), y una cubierta (5) que  
15 comprende medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4), estando cada uno de dichos medios de agitación interna (9) configurado para acoplarse a los segundos medios de transmisión de movimiento (6);

y un módulo controlador (3) comprende uno o más medios de control y uno o más sensores;

20 caracterizado porque

dicho sistema está adaptado para estar en una configuración de funcionamiento y una configuración de reposo,

en donde en la configuración de funcionamiento el motor (8) está acoplado a los primeros medios de transmisión (11) y el módulo de cultivo (2) está  
25 acoplado al módulo controlador (3);

y en donde en la configuración de reposo el módulo de cultivo (2) está desacoplado del módulo controlador (3) y del motor (8), permitiendo la separación del módulo de cultivo (2) completo.

Por tanto, en la presente invención se describe un sistema que presenta numerosas ventajas respecto a otros biorreactores para el cultivo de organoides descritos en el estado de la técnica. El biorreactor de la presente invención permite un cultivo simultáneo múltiple, lo que permite realizar experimentos con distintas condiciones en paralelo. Además, la presente invención comprende un sistema modular, por lo que distintos módulos del sistema se pueden acoplar y desacoplar. Por lo tanto, en primer lugar, se posibilita que el módulo de cultivo sea esterilizable en su totalidad, sin necesidad de esterilizar por separado las partes del módulo de cultivo, siendo esto muy conveniente para preservar la totalidad del cultivo estéril. Es decir, el módulo de cultivo (2), compuesto por uno o más pocillos (4), los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4), y opcionalmente los segundos medios de transmisión de movimiento (6) y los primeros medios de transmisión del movimiento (11), se pueden extraer conjuntamente, sin necesidad de desmontaje de sus componentes.

Además, en segundo lugar, se permite también que el módulo controlador comprenda múltiples sensores que permiten medir y almacenar parámetros físico-químicos relevantes para el cultivo de organoides.

La presente invención también describe un método para la esterilización de un sistema para el cultivo de organoides que comprende:

proporcionar un sistema como el que se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una configuración de reposo de manera que el motor (8) y el módulo controlador (3) están desacoplados del módulo de cultivo (2);

extraer el módulo de cultivo (2);

y someter el módulo de cultivo (2) a esterilización.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un sistema para el cultivo de organoides así como un método para la esterilización de un sistema para el cultivo de organoides.

En referencia a la Fig. 1, en una realización particular, la presente invención trata de un sistema esterilizable para el cultivo de organoides que comprende

un motor (8) que se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6) estando dichos segundos medios de transmisión del movimiento (6) acoplados a una cubierta (7);

- 5 un módulo de cultivo (2) que comprende uno o más pocillos (4), y una cubierta (5) que comprende medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4), estando cada uno de dichos medios de agitación interna (9) configurado para acoplarse a los segundos medios de transmisión de movimiento (6);

10 y un módulo controlador (3) comprende uno o más medios de control y uno o más sensores;

caracterizado porque

dicho sistema está adaptado para estar en una configuración de funcionamiento y una configuración de reposo,

- 15 en donde en la configuración de funcionamiento el motor (8) está acoplado a los primeros medios de transmisión (11) y el módulo de cultivo (2) está acoplado al módulo controlador (3);

y en donde en la configuración de reposo el módulo de cultivo (2) está desacoplado del módulo controlador (3) y del motor (8), permitiendo la separación del módulo de cultivo (2) completo,

- 20 y en donde los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento mecánico (110), magnético (111), neumático y/o hidráulico.

- 25 En referencia a la Fig. 4, en una realización preferida, los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) que comprenden medios de acoplamiento magnético (111) comprenden imanes (1110) que permiten acoplar los primeros medios de transmisión del movimiento (11) a los segundos medios de transmisión del movimiento (6).

- 30 En referencia a la Fig. 6, en una realización particular, los medios de agitación interna (9) están unidos a los segundos medios de transmisión del movimiento (6) mediante imanes (1110), de modo que los medios de agitación interna (9) pueden ser

esterilizados independientemente de los segundos medios de transmisión del movimiento (6).

En referencia a la Fig. 7, en otra realización, los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento neumático. En esta realización, el motor (8) se acopla a un compresor (12) y éste, a su vez, a unos primeros medios de conexión (1120) que se acoplan a unos segundos medios de conexión con cierre para la esterilización (1121), que permiten acoplar los primeros medios de transmisión del movimiento (11) a los segundos medios de transmisión del movimiento (6).

En referencia a la Fig. 8, en otra realización, los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento hidráulico. Esta realización comprende un depósito de fluido hidráulico (13) acoplado a una bomba hidráulica (14). Dicha bomba hidráulica está acoplada también al motor (8) el motor se acopla a un compresor (12) y éste, a su vez, a unos primeros medios de conexión (1120) que se acoplan a unos segundos medios de conexión con cierre para la esterilización (1121), que permiten acoplar los primeros medios de transmisión del movimiento (11) a los segundos medios de transmisión del movimiento (6).

En otra realización preferida, los segundos medios de transmisión del movimiento (6) comprenden medios mecánicos. Más preferiblemente, estos segundos medios de transmisión del movimiento (6) comprenden ruedas dentadas.

En referencia a la Fig. 9, en otra realización, el sistema esterilizable para el cultivo de organoides comprende un motor (8) que se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6) estando dichos segundos medios de transmisión del movimiento (6) acoplados a una cubierta (7);

en donde dicha cubierta (7) comprende unos terceros medios de transmisión del movimiento (19) que se pueden acoplar a otra cubierta (7), de modo que el movimiento del motor (8) se transmite a varios módulos de cultivo (2) que pueden ser acoplados acordemente a varios módulos controladores (3).

En una realización particular, los terceros medios de transmisión del movimiento (19) comprenden medios de acoplamiento mecánico (ver Fig. 9A), magnético, neumático (ver Fig. 9B) y/o hidráulico.

5 En una realización preferida, el motor (8) puede estar comprendido en el módulo controlador (3), y desde el módulo controlador (3), dicho motor (8) se acopla a una tapa (7) que comprende unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6).

10 En una realización preferida, los medios de agitación interna (9) están provistos de un rotor.

En una realización particular, la tapa (7) comprende los primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente del motor (8).

En otra realización particular, un contenedor (1) comprende el módulo de cultivo (2) y el módulo controlador (3).

15 El sistema descrito en la presente invención, en otra realización particular, comprende los pocillos (4) dispuestos sobre un medio de soporte (10). El medio de soporte (10) permite la manipulación de forma solidaria de todos los pocillos usados para el cultivo de organoides. Preferiblemente, el sistema descrito en la presente invención puede ser usado en combinación con una placa de cultivo estándar. En una placa de cultivo  
20 estándar, el medio de soporte (10) y los pocillos (4) forman una misma unidad.

En una realización preferida, el número de pocillos (4) es de 1 a 1000.

En otra realización preferida, el número de pocillos (4) es un número par.

25 En otra realización preferida, el número de pocillos (4) es 6, 8, 10, 12, 48 o 96. Preferiblemente, el número de pocillos se corresponde con el número de pocillos de una placa de cultivo estándar.

Así, en una realización preferida, se pueden utilizar placas de cultivo estándar en el sistema de cultivo de organoides descrito en la presente invención, de modo que el biorreactor tiene una gran aplicabilidad y su uso no precisará de dispositivos especiales para el cultivo de organoides, a diferencia de otros sistemas descritos en el  
30 estado de la técnica. Además, el uso de placas de cultivo estándar permite un cultivo

múltiple simultáneo, permitiendo, por lo tanto, el cultivo celular en distintas condiciones físico-químicas en una misma placa, en un mismo experimento.

En una realización según la presente invención, el motor (8) es de corriente continua.

5 En otra realización preferida, en el sistema según la presente invención, el módulo controlador (3) comprende uno o más medios de control y uno o más sensores que miden parámetros físicos tales como el crecimiento celular, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura.

10 El módulo controlador (3) según la invención puede además comprender un sistema que da información a tiempo real de los parámetros físicos mencionados anteriormente: crecimiento celular, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura.

15 En referencia a la Fig. 10, el módulo controlador (3) preferiblemente comprende un microcontrolador (16) conectado al motor mediante un regulador de velocidad ajustable. El microcontrolador también puede estar conectado con una serie de sensores que miden los parámetros físicos relevantes mencionados anteriormente (crecimiento celular, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura). En una realización particular, el microcontrolador (16) está conectado a un sensor de temperatura (180) y a un sensor de gases (181). En otra realización particular, el microcontrolador (16) está conectado a un sistema de adquisición de  
20 imágenes (17).

25 La medición a tiempo real de los parámetros anteriormente citados, como son el crecimiento celular, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura, resulta muy ventajosa para determinar el correcto crecimiento del organoide bajo unas condiciones adecuadas. Además, el módulo controlador no sólo mide la temperatura, sino que es capaz de mantener una temperatura concreta que el usuario puede determinar. Es decir, en el módulo controlador (3) se incorpora preferiblemente un termostato.

30 En referencia a la Fig. 10, en una realización particular, los pocillos (4) están separados del módulo controlador (3) por una base transparente (15). Esta base transparente (15) permite aislar el módulo controlador en caso de un derrame de

medio de cultivo y/o muestra contenida en los pocillos (4). La base transparente (15), en una realización preferida, es de cristal.

Toda la información recabada desde el módulo controlador (3) es accesible en cualquier momento en que el sistema está funcionando, pero puede ser también  
5 almacenada para análisis posteriores y/o control de calidad. La forma de almacenaje de la información puede ser de forma local, preferiblemente en una tarjeta de memoria, y/o de forma remota, en la nube (cloud) usando cualquier conexión de red estándar.

El sistema incluye también preferiblemente un protocolo de alarma que continuamente alerta de un fallo del sistema o de una alteración inesperada de los parámetros físicos  
10 medidos por el módulo controlador (3).

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1**

El módulo de cultivo (2) se acopla/desacopla del módulo controlador (3) tal y como se  
15 detalla en la Fig. 2.

### **Ejemplo 2**

El módulo de cultivo (2) se esterilizó de la siguiente manera:

1. Autoclavado en autoclave STERIVAP 669 - 1 ED (BMT) a 134°C durante 7 minutos .
- 20 2. 4 fases de secado intensivo de 3 minutos cada una.

### **Ejemplo 3**

Los organoides fueron desarrollados de dos líneas celulares tumorales previamente obtenidas de astrocitos primarios RbloxP/loxP HRasV12 (T653) y cRb-/- HRasV12 (T731) en ratón SCID. Estas células fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco modified  
25 Eagle medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para establecer el cultivo de neuroesferas derivado del cultivo primario del tumor, las células T653 y T731 se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se tripsinizaron y se recuperaron por centrifugación en PBS a 1000 rpm durante 5

minutos. Las células se resuspendieron en la mezcla de nutrientes DMEM/F-12, GlutaMAX suplementado con 1X B-27 (50X) y factores de crecimiento 0.02 µg/ml EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico humano) y 0,02 µg/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Las células se sembraron en placas de 60 mm y se cultivaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada durante 48 h, y después de este tiempo se recuperaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en medio de inducción neuronal (DMEM/F-12 + GlutaMAX suplementado con 1% de N2 (100X) , MEM-NEAA al 1% (Solución de aminoácidos no esenciales MEM 100X) y 1 µg / ml de heparina, sembradas en placas de 60 mm y mantenidas en este medio de cultivo durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de esto, las células se cultivaron en Matrigel en placas de 60 mm y en presencia de medio de cultivo de diferenciación. La composición de este medio fue 50% DMEM / F12 + GlutaMAX y 50% de medio neurobasal (1X), suplementado con 0.5% N2, 0.025% Insulina, 0.5% MEM-NEAA y 1% de penicilina-estreptomina, 0.035% de 2-Mercaptoetanol (dilución 1: 1000) en DMEM/F-12 + GlutaMAX y 1% B27-sin vitamina A. Las neuroesferas se mantuvieron en Matrigel durante 72 h antes de ser transferidas al biorreactor.

Las neuroesferas se mantuvieron en el biorreactor en presencia de medio de diferenciación suplementado con B27 con vitamina A (Lancaster MA et al., 2014). El medio fue cambiado cada 72 h.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de realización de la presente invención, en donde el sistema para el cultivo de organoides comprende

un motor (8) que se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6), estando dichos segundos medios de transmisión del movimiento (6) acoplados a una cubierta (7);

un módulo de cultivo (2) que comprende uno o más pocillos (4), y una cubierta (5) que comprende medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4), estando cada uno de dichos medios de agitación interna (9) configurado para acoplarse a los segundos medios de transmisión de movimiento (6);

- 5 y un módulo controlador (3) comprende uno o más medios de control y uno o más sensores.

En la Fig. 2 se detalla una realización particular con un mecanismo preferido por el cual el módulo de cultivo (2) se acopla al módulo controlador (3).

10

En la Fig. 3 se detalla una realización particular del sistema para cultivo de organoides en donde el motor (8) se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) que comprenden medios de acoplamiento mecánico (110), hacia los segundos medios de transmisión del movimiento (6), y los segundos medios de transmisión de movimiento (6) están acoplados a los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4).

En la Fig. 4 se detalla una realización particular del sistema para cultivo de organoides en donde el motor (8) se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) que comprenden medios de acoplamiento magnético que comprenden imanes (1110), hacia los segundos medios de transmisión del movimiento (6), y los segundos medios de transmisión de movimiento (6) están acoplados a los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4).

25

En la Fig. 5 se detallan los medios de acoplamiento magnético (111), que comprenden distinta disposición de los imanes (1110).

En la Fig. 6 se detalla una realización particular en donde los medios de agitación interna (9) están unidos a los segundos medios de transmisión del movimiento (6) proveniente del motor (8) mediante imanes (1110), de modo que los medios de

30

agitación interna (9) pueden ser esterilizados independientemente de los segundos medios de transmisión del movimiento (6). Los segundos medios de transmisión de movimiento (6) están acoplados a los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4).

5

En la Fig. 7 se ilustra una realización particular del sistema de cultivo de organoides en donde los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento neumático. En esta realización, el motor (8) se acopla a un compresor (12) y éste, a su vez, a unos primeros medios de conexión (1120) que se acoplan a unos segundos medios de conexión con cierre para la esterilización (1121), que permiten acoplar los primeros medios de transmisión del movimiento (11) a los segundos medios de transmisión del movimiento (6). Los segundos medios de transmisión de movimiento (6) están acoplados a los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4).

10  
15

En la Fig. 8 se ilustra una realización particular del sistema de cultivo de organoides en donde los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento hidráulico. Esta realización comprende un depósito de fluido hidráulico (13) acoplado a una bomba hidráulica (14). Dicha bomba hidráulica está acoplada también al motor (8) el motor se acopla a un compresor (12) y éste, a su vez, a unos primeros medios de conexión (1120) que se acoplan a unos segundos medios de conexión con cierre para la esterilización (1121), que permiten acoplar los primeros medios de transmisión del movimiento (11) a los segundos medios de transmisión del movimiento (6). Los segundos medios de transmisión de movimiento (6) están acoplados a los medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4).

En la Fig. 9 se muestra una realización particular del sistema esterilizable para el cultivo de organoides en donde la cubierta (7) comprende unos terceros medios de transmisión del movimiento (19) que se pueden acoplar a otra cubierta, de modo que el movimiento del motor (8) se transmite a varios módulos de cultivo (2), que comprenden los segundos medios de transmisión de movimiento (6) acoplados a los

20  
25  
30

medios de agitación interna (9) para cada pocillo, y estos módulos de cultivo pueden ser acoplados acorde a varios módulos controladores (3).

En la Fig. 10 se ilustra una realización particular del módulo controlador (3) y su acoplamiento a los pocillos (4) comprendidos en el módulo de cultivo (2). Dichos módulos controlador (3) y de cultivo (2) están delimitados por una base transparente (15). Además, el módulo controlador (3) comprende un microcontrolador (16) conectado a un sistema de adquisición de imágenes (17) y a sensores de temperatura (180) y de gases (181).

10

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema esterilizable para el cultivo de organoides que comprende:

5 un motor (8) que se acopla a unos primeros medios de transmisión del movimiento (11) proveniente de dicho motor (8) hacia unos segundos medios de transmisión del movimiento (6), estando dichos segundos medios de transmisión del movimiento (6) acoplados a una cubierta (7);

10 un módulo de cultivo (2) que comprende uno o más pocillos (4), y una cubierta (5) que comprende medios de agitación interna (9) para cada pocillo (4), estando cada uno de dichos medios de agitación interna (9) configurado para acoplarse a los segundos  
15 medios de transmisión de movimiento (6);

y un módulo controlador (3) comprende uno o más medios de control y uno o más  
20 sensores;

20 caracterizado porque:

25 dicho sistema está adaptado para estar en una configuración de funcionamiento y una configuración de reposo,

30 en donde en la configuración de funcionamiento el motor (8) está acoplado a los primeros medios de transmisión (11) y el módulo de cultivo (2) está acoplado al módulo controlador (3);

35 y en donde en la configuración de reposo el módulo de cultivo (2) está desacoplado del módulo controlador (3) y del motor (8), permitiendo la separación del módulo de cultivo (2) completo.

40 2. Sistema según la reivindicación 1 en donde los primeros medios de transmisión del movimiento (11) provenientes de un motor (8) comprenden medios de acoplamiento mecánico, magnético, neumático y/o hidráulico.

45

3. Sistema según la reivindicación 2 en donde los segundos medios de transmisión del movimiento (6) provenientes de un motor (8) comprenden medios mecánicos.
- 5 4. Sistema según la reivindicación 3 en donde los segundos medios de transmisión del movimiento (6) provenientes de un motor (8) comprenden ruedas dentadas.
- 10 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los medios de agitación interna (9) están provistos de un rotor.
- 15 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los pocillos (4) se disponen sobre un medio de soporte (10).
- 20 7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dichos uno o más medios de control y uno o más sensores del módulo controlador (3) miden parámetros físicos que se seleccionan entre el crecimiento celular, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura.
- 25 8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el motor (8) está comprendido en el módulo controlador (3).
- 30 9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el número de pocillos es de 1 a 1000.
- 35 40 10. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la cubierta (7) comprende unos terceros medios de transmisión del movimiento (19) que se pueden acoplar a otra cubierta, de modo que el movimiento del motor (8) se transmite

a varios módulos de cultivo (2) que pueden ser acoplados acordemente a varios módulos controladores (3).

5 11. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los medios de agitación interna (9) están unidos a los segundos medios de transmisión del movimiento (6) mediante imanes (1110).

10

12. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el módulo de cultivo (2) y el módulo controlador (3) están separados por una base transparente.

15

13. Método para la esterilización de un sistema para el cultivo de organoides que comprende:

20

proporcionar un sistema como el que se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una configuración de reposo de manera que el motor (8) y el módulo controlador (3) están desacoplados del módulo de cultivo (2);

25

extraer el módulo de cultivo (2);

30 y someter el módulo de cultivo (2) a esterilización.

35 14. Método según la reivindicación 13 en donde la esterilización a la que se somete el módulo de cultivo (2) es autoclavado, tratamiento con peróxido de hidrógeno o tratamiento con radiación ionizante.

40

FIG. 1

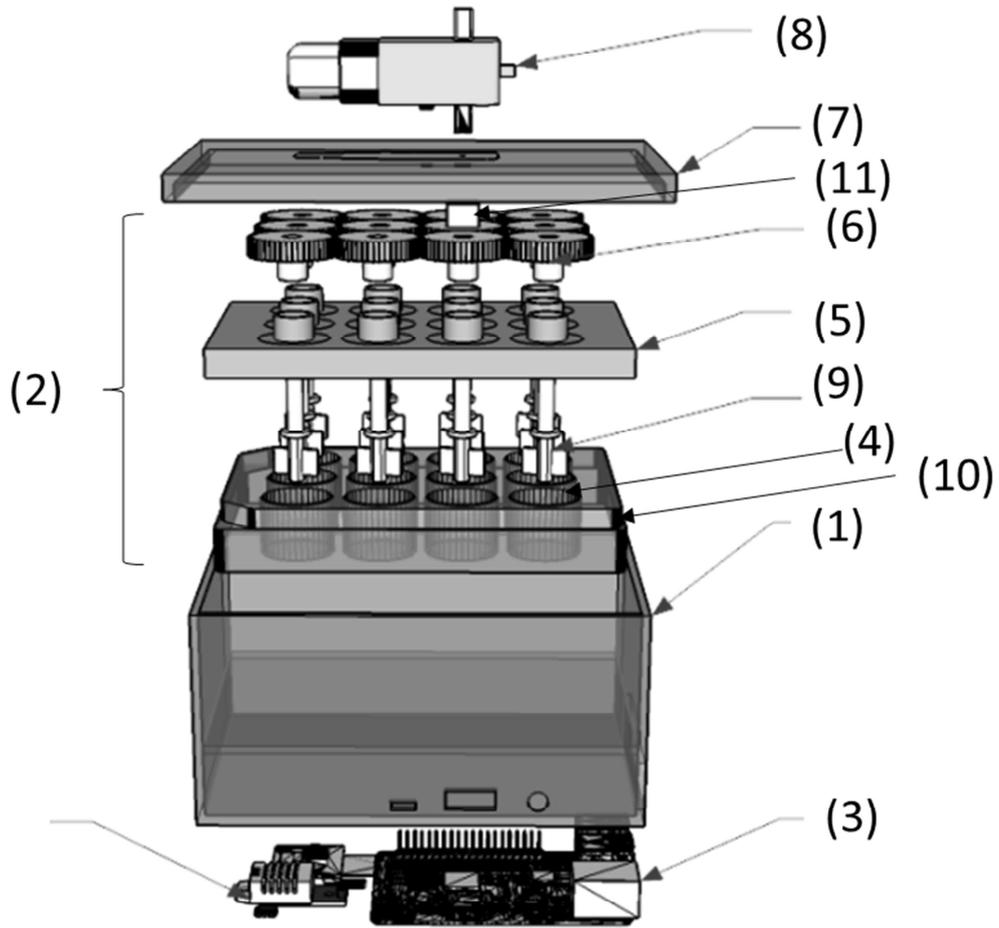


FIG. 2

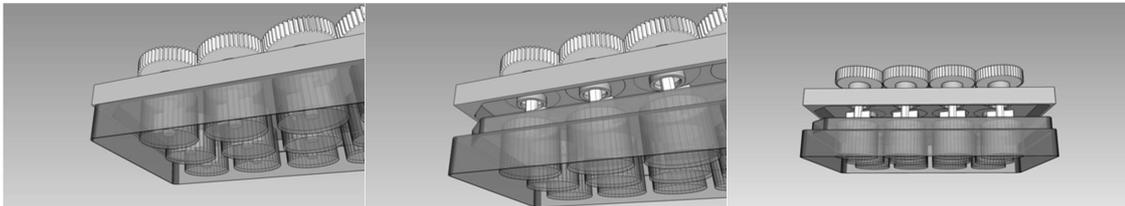


FIG. 3

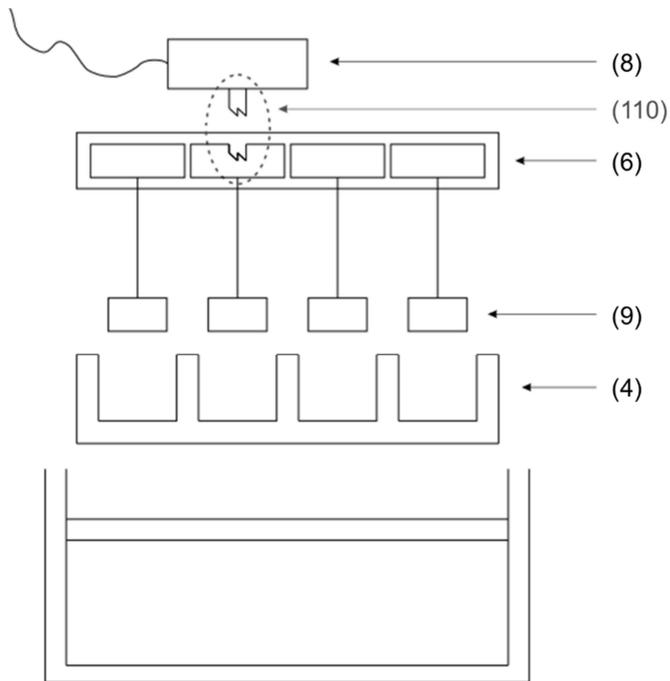


FIG. 4

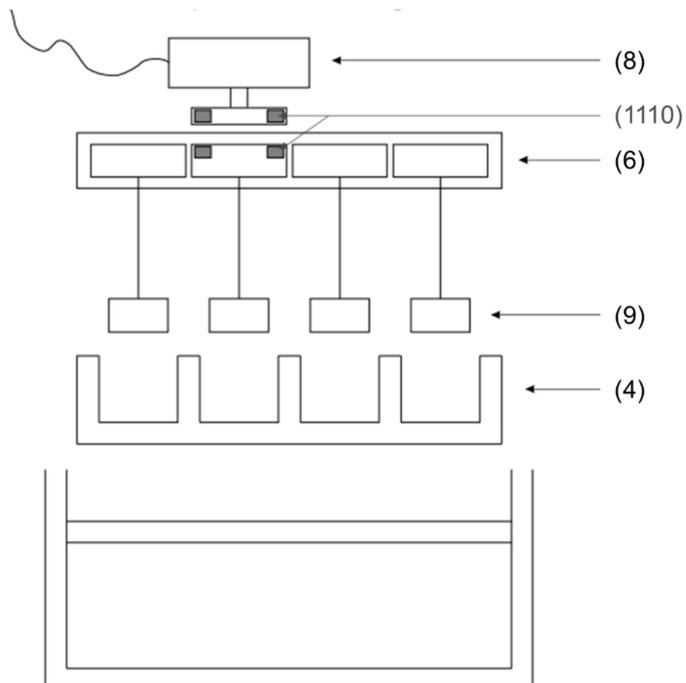


FIG. 5

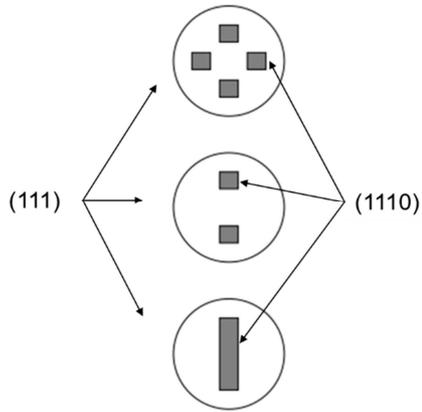


FIG. 6

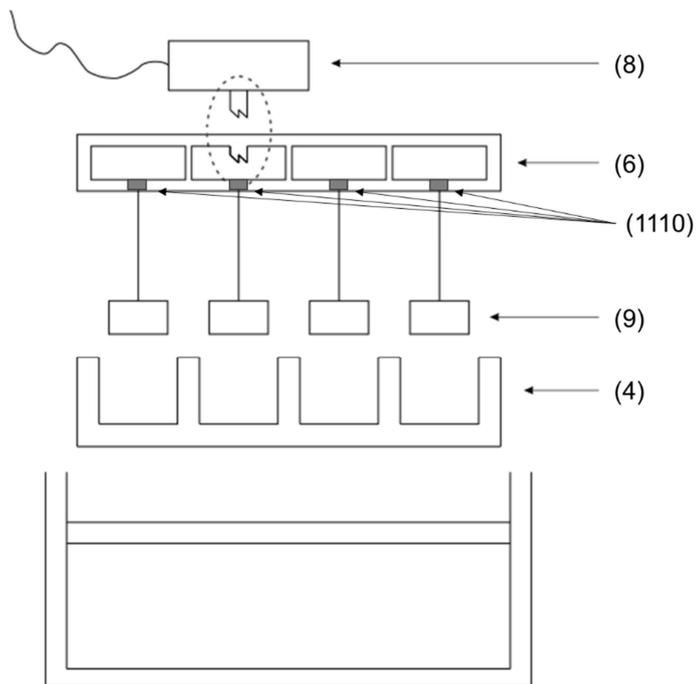


FIG. 7

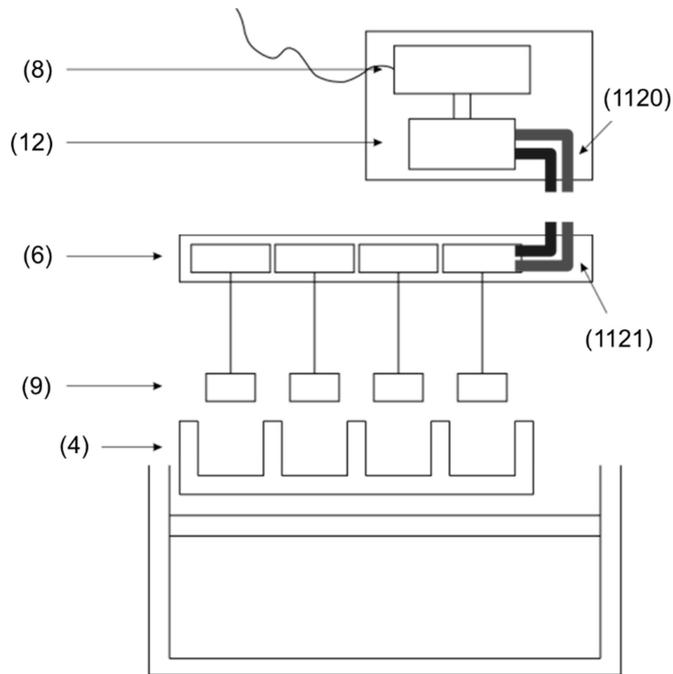


FIG. 8

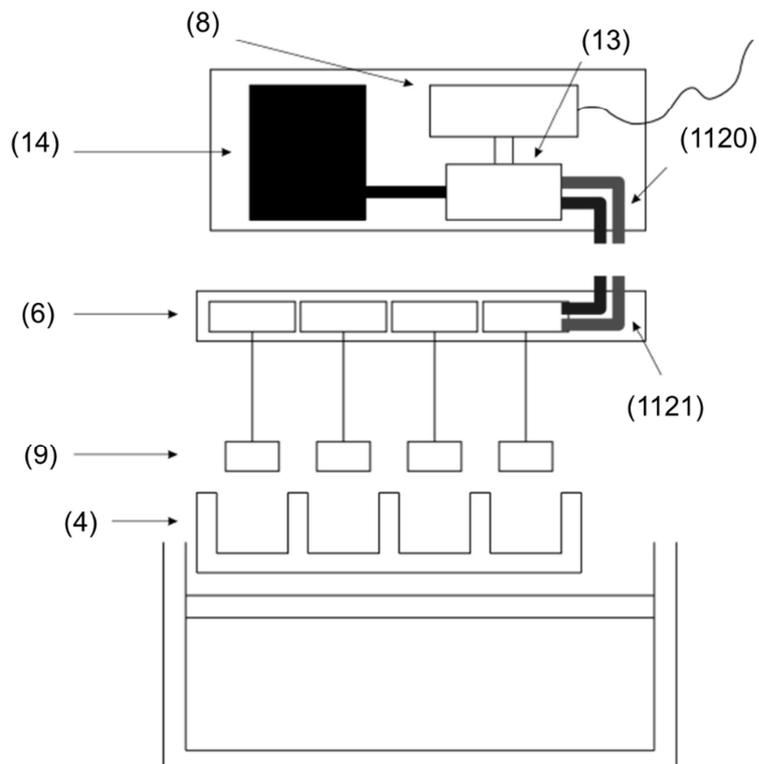


FIG. 9

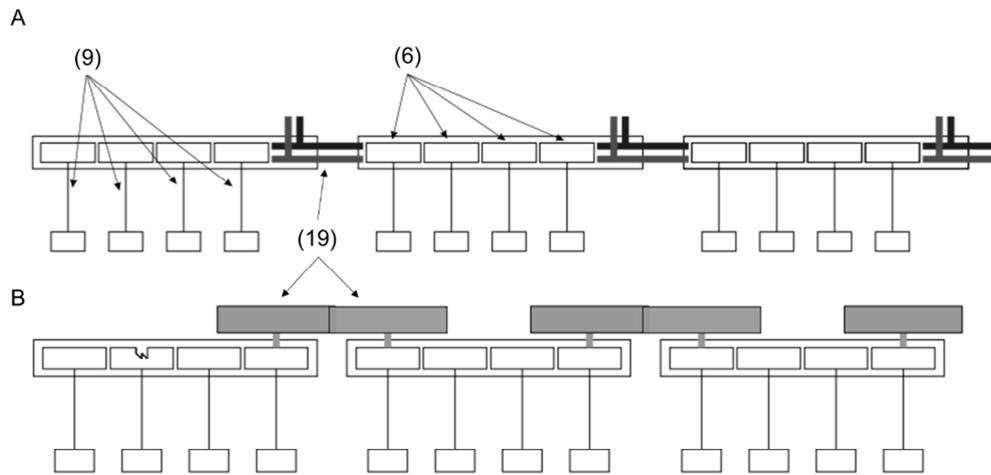
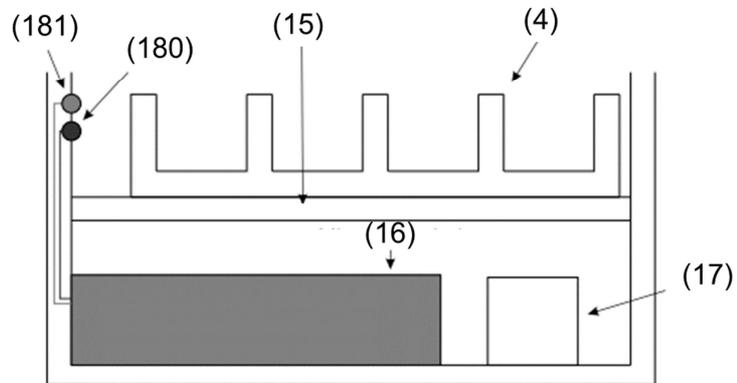


FIG. 10





- ②① N.º solicitud: 201830866  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.09.2018  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2017083705 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS) 18/05/2017, Figuras, reivindicaciones 1-3, 7, 19; párrafos 10, 41, 46, 54, 56, 100, 101, página 13, Último párrafo y página 14, dos primeros párrafos.	1-14
A	EP 0339824 A1 (BARNSTEAD THERMOLYNE CORP) 02/11/1989, Figuras 2 y 5; columna 3, líneas 15-46, columna 8, líneas 28-48.	1-3, 6-9, 13, 14
A	EP 2270129 A2 (AUTOMATION PARTNERSHIP CAMBRIDGE LTD THE AUTOMATION PARTNERSHIP LTD) 05/01/2011, figuras, párrafos 28-35, 48, 59, 64-66, 113.	1-3, 7, 9, 11, 13
A	QIAN XUYU et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. Nature protocols England Mar, 28/02/2018, Vol. 13, N° 3, páginas 565 - 580, ISSN 1750-2799 (Electronic), DOI: doi:10.1038/nprot.2017.152 pubmed:29470464	1-14
A	HANSON, M AND RAO, G. Biominiaturization of bioreactors. Upstream Industrial Biotechnology, 2013, Vol. 1, páginas 669-698. Editor(s): Flickinger, Michael C. Publisher: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N. J. CODEN: 69RHPM; ISBN: 978-1-118-13123-7	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
30.01.2019

Examinador  
A. I. Polo Díez

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12M3/00** (2006.01)

**C12M1/34** (2006.01)

**B01F7/16** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12M, B01F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BD-TXTE, INTERNET