



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014020120-0 B1



(22) Data do Depósito: 20/02/2013

(45) Data de Concessão: 15/09/2020

(54) Título: SEPARADOR DE SÓLIDOS DE CANAIS INCLINADOS PARA RETER E RECIRCULAR SÓLIDOS DE UMA MISTURA DE UM REATOR E UNIDADE BIORREATORA

(51) Int.Cl.: C12M 1/08; C12M 1/04.

(30) Prioridade Unionista: 20/02/2012 EP 12001121.8.

(73) Titular(es): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

(72) Inventor(es): ANDRE PASTOR; JURI SELETZKY; HELMUT BROD; JOERG KAULING; PETER COMMER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2013053393 de 20/02/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/124329 de 29/08/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/08/2014

(57) Resumo: SEPARADOR DE SÓLIDOS DE CANAIS INCLINADOS PARA RETER E RECIRCULAR SÓLIDOS DE UM MISTURA DE UM REATOR E UNIDADE BIORREATORA A invenção diz respeito à utilização de placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas em um separador de materiais sólidos, de tipo canais inclinados, com um acondicionamento lamelar.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"SEPARADOR DE SÓLIDOS DE CANAIS INCLINADOS PARA RETER E RECIRCULAR SÓLIDOS DE UMA MISTURA DE UM REATOR E UNIDADE BIORREATORA"**

[001] A invenção diz respeito à utilização de placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas em um separador de sólidos de canais inclinados, contendo uma pilha de placas para reter os sólidos provenientes de uma mistura de um reator.

[002] A criação em cultura de células de animais e de plantas tem uma grande importância na produção de substâncias biologicamente ativas e produtos farmacêuticamente ativos. Em especial, a cultura de células, frequentemente efetuada em uma suspensão livre em um meio de cultura, é exigente, uma vez que as células, contrariamente ao que sucede com os microrganismos, são muitíssimo sensíveis no que concerne aos esforços cortantes e ao insuficiente fornecimento de nutrientes.

[003] As linhas de células de animais e de plantas são criadas em cultura, normalmente em lotes. O inconveniente disto é o facto de a alimentação óptima das células apenas se conseguir com dificuldade, devido à constante alteração das concentrações do substrato, do produto e da biomassa. Além disso, no final da fermentação, há uma acumulação de subprodutos, por exemplo, constituintes de células mortas, que é necessário remover, normalmente, com grande esforço no processamento final. Pelas razões enumeradas, mas especialmente quando estão a ser produzidos produtos instáveis que podem ser, por exemplo, danificados por ataques proteolíticos, recorre-se então à utilização de biorreatores a trabalhar continuamente.

[004] Os biorreatores contínuos fazem com que seja possível obter elevadas densidades celulares e também uma elevada produtividade quando são satisfeitos os seguintes requisitos:

- fornecimento suficiente, e em regime lento de agitação, de células com substratos, especialmente com oxigénio dissolvido,

- remoção suficiente do dióxido de carbono que se forma durante a respiração,
- um sistema eficaz em regime lento e à prova de entupimento para a obtenção de elevadas concentrações de células,
- estabilidade de longa duração (esterilidade hidrodinâmica) do biorreator e do sistema de retenção.

[005] Para além do modo de funcionamento contínuo, é possível utilizar um biorreator que tenha um sistema eficiente de retenção de células, por exemplo, mesmo para a criação em cultura de preculturas que tenham, especialmente, elevadas densidades celulares. Neste caso, o sistema de retenção das células é utilizado de forma descontínua, em um modo de lotes repetidos, com a finalidade de se remover o sobrenadante da cultura celular, virtualmente isento de biomassa. Depois disso, o reator da precultura pode ser recarregado com meio de crescimento renovado para se conseguir, assim, que a cultura produza densidades celulares mais elevadas do que no caso de uma única operação por lotes.

[006] É necessária uma eficiente retenção de células, de modo a obter-se uma elevada densidade celular (> 20 milhões de células viáveis por mililitro) em um biorreator explorado de forma contínua. Neste caso, o grau de retenção necessário depende do ritmo de crescimento das células e do coeficiente de perfusão q/V (quantidade média produzida q por volume V do biorreator).

[007] No passado, foram propostos diferentes sistemas de retenção de células para biorreatores explorados de forma contínua, tendo tais sistemas sido montados, na maior parte dos casos, fora do biorreator. A razão para isto é a facilidade de acesso ao sistema de retenção de células, para efeitos de manutenção e limpeza.

[008] Para se minimizar a danificação de células, especialmente devido ao insuficiente fornecimento de oxigénio e à remoção do dióxido de carbono para fora do biorreator, é desejável dispor de sistemas de retenção de células que tenham pequenos volumes de trabalho e também tempos curtos de residência

das células.

[009] Na técnica anterior, para além dos filtros membranares, nos aparelhos que funcionam de acordo com o princípio da filtração transmembranar, com membranas fixas e móveis, recorre-se a separadoras específicas centrífugas e por gravidade.

[010] No caso da retenção de células com utilização de filtros membranares, observa-se a formação de depósitos ou contaminações que podem impedir o funcionamento fiável e duradouro sem manutenção. Os depósitos podem ser reduzidos quando há um fluxo suficientemente rápido através das superfícies membranares. Isto pode ser conseguido se a exploração for estacionária ou oscilatória. Como exemplo de um sistema membranar em que há um fluxo oscilatório através dele refere-se o caso concreto 'Alternating Tangential Flow (ATF) System' da Refine Technologies Inc. No entanto, o fluxo rápido através das superfícies membranares é contrário ao pré-requisito básico de uma cultura de células em regime lento de agitação.

[011] No âmbito do funcionamento centrífugo, os separadores centrífugos de células em regime lento funcionam sem manutenção apenas ao longo de algumas semanas, sendo necessário substituir os elementos centrífugos. Isto aumenta o risco de contaminação.

[012] Os separadores por gravidade, utilizados essencialmente nas culturas de células, são separadores de canais inclinados e reservatórios de sedimentação. Comparativamente com os reservatórios de sedimentação simples, os separadores de canais inclinados, nas produções em grande escala, têm a vantagem de permitirem um volume consideravelmente inferior em relação à área da superfície de separação. Há uma publicação (Henzler, H.-J., Chemie-Technik, 1, 1992, 3) que descreve a retenção de células em separadores de canais inclinados que podem ser explorados em fluxo de contracorrente, fluxo transversal e fluxo co-corrente. A secção transversal do canal através da qual passa o fluxo pode estar equipada com placas ou tubos. O documento WO1994026384 A1 reivindica a utilização de separadores de

canais inclinados para reter células em separadores de fluxo em contracorrente. O documento WO2003020919 A2 descreve, *inter alia*, separadores de fluxo em contracorrente e de fluxo transversal e descreve também combinações de diversos pré-separadores (v.g., hidrociclones), para a retenção de células. Estes separadores conhecidos, de canais inclinados, são feitos de aço inoxidável e os seus elementos são cortados e afagados com esforço, recebem um polimento de grau elevado e são soldados entre si.

[013] Os separadores de canais inclinados são ligados ao biorreator por meio de um circuito externo. Para tal, são necessários tubos flexíveis e bombas.

[014] Para se reduzir a atividade metabólica e a aderência das células em um separador gravítico, sugere-se o arrefecimento do caldo de cultura das células no seu trajeto para o separador gravítico. Uma atividade metabólica reduzida a uma baixa temperatura é certamente vantajosa no caso de um período de residência extenso das células fora do biorreator.

[015] O documento WO2009152990 (A2) descreve um sistema de retenção de células para reter e recircular células em um reservatório através do qual passa o fluxo, constituído por um conjunto de canais dispostos uns ao lado dos outros, formando esses canais um cilindro oco vertical e estando dispostos com uma inclinação que define um ângulo β entre 10° e 60° em relação ao eixo longitudinal do cilindro oco. O reservatório por onde passa o fluxo pode ser um biorreator ou um reservatório ligado ao biorreator para retenção e recirculação das células. Os canais são abertos na extremidade inferior. Na extremidade superior terminam em um espaço anelar comum que possui pelo menos um tubo por onde é possível fazer passar uma corrente de fluido de colheita proveniente do reservatório. A separação entre células e solução da cultura de células tem lugar nos canais. Como resultado da remoção contínua da corrente de fluido de colheita para fora do biorreator, a solução da cultura de células e as próprias células são aspiradas para dentro dos canais. As células vão sedimentar dentro dos canais inclinados e deslizar,

tal como sucede nos separadores de canais inclinados, segundo um fluxo em contracorrente relativamente à corrente afluyente de fluido de colheita que volta a sair dos canais novamente e assim permanece no reservatório. A solução da cultura de células separada das células é transportada pelos canais para dentro do espaço anelar por cima dos canais e finalmente sai para fora do reservatório.

[016] Na produção farmacêutica, fortemente regulamentada, a necessidade de se dispor de biorreatores e de elementos de biorreatores limpos e esterilizados, tais como, por exemplo, os sistemas de retenção de células, implica procedimentos morosos e tecnicamente complicados e o recurso a uma grande quantidade de mão-de-obra. Para se evitar, com segurança, a contaminação de um produto para o outro durante a mudança de produtos em uma unidade para vários fins, ou entre dois lotes de produtos, para além da limpeza é necessário executar um procedimento bastante complexo de validação da limpeza, sendo necessário, possivelmente, repetir tal procedimento de validação no caso de um processo de adaptação. Para a limpeza e esterilização de um lote convencional, de um lote de enriquecimento progressivo ou de um fermentador de perfusão feito de aço inoxidável recorre-se, de um modo geral, à tecnologia de limpeza no local (CIP) em combinação com a tecnologia de vapor no local (SIP), nas chamadas unidades de acessórios permanentes. Para se garantir uma esterilidade duradoura suficiente, no caso do controlo de processos contínuos, também se recorre à utilização da tecnologia das autoclaves, sendo no entanto necessário, neste caso, o transporte inconveniente dos reatores ou de elementos dos reatores para a autoclave e sendo isso apenas aplicável para reatores a trabalharem em escalas comparativamente pequenas. O risco de contaminação é especialmente crítico no caso de se utilizar componentes dispendiosos estabilizados, por exemplo, veios estanques de agitação, inadequada esterilização do equipamento de transporte, montagem ou ligação de tubos de união após o tratamento em autoclave e a colheita regular de amostras.

[017] No caso de se utilizar as tecnologias CIP/SIP no modo de funcionamento por lotes ou de enriquecimento progressivo, o tempo não produtivo do reator, originado pelos procedimentos de preparação, pode afetar, de forma significativa, a disponibilidade do reator, especialmente no caso de mudanças frequentes de produto, devido aos períodos curtos de utilização.

[018] Os modelos de concepção de reatores descartáveis têm vindo a ter um interesse cada vez maior no mercado, para satisfazer a reposição de unidades de produção rápidas e flexíveis e que garantam, simultaneamente, uma limpeza e uma esterilidade máximas.

[019] Prosseguindo a partir da técnica anterior, constitui um objeto da presente invenção proporcionar um método eficiente para reter e recircular células de plantas e de animais, em especial de seres humanos, em um processo explorado continuamente ou de forma descontínua por lotes, levando esse método em consideração a sensibilidade das células no que diz respeito aos esforços cortantes e ao suficiente fornecimento de nutrientes às células, sendo tal método susceptível de ser ampliado à escala para se trabalhar em escalas grandes, satisfazendo tal método os requisitos de manutenção, limpeza e esterilização próprios da indústria farmacêutica, reduzindo tal método a complexidade e o risco de erro e permitindo tal método, com uma utilização mínima de recursos, uma utilização óptima, sob os pontos de vista económico e ambiental (produção e eliminação), de sistemas descartáveis.

[020] O objetivo mencionado *supra* é conseguido mediante a utilização de placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas em um separador de sólidos de canais inclinados, o qual contém uma pilha de placas para reter os sólidos de uma mistura do reator.

[021] Para a retenção de células, em particular provenientes de uma mistura de um biorreator, o separador de sólidos de canais inclinados de acordo com a invenção possui os elementos seguintes:

- uma região superior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover uma corrente

de colheita (70) separada das células (=colheita) provenientes de uma região de recolha (56) da corrente de colheita, ligada a

- uma região de separação formada por uma pilha (1) de placas constituída por placas reticulares de plástico de uma só amada ou de várias camadas, em que a referida pilha é inclinada quando está a funcionar, definindo um ângulo (10) desde 30° até 80° em relação à horizontal, ligada a

- um segmento inferior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem ou acessórios (84) para distribuição do fluxo da mistura (74) do reator, sobre

- uma região (57) de recolha de sólidos que é afilada para baixo, assumindo especialmente uma forma cônica ou piramidal, para recolha de células por meio de gravidade.

[022] De preferência, a região (57) de recolha de sólidos, que é afilada para baixo, assumindo especialmente uma forma cônica ou piramidal, define um ângulo (58, 59) desde 10° até 60° em relação à vertical. Os ângulos 58 e 59 podem ser escolhidos separadamente.

[023] Para permitir a recirculação, a região (57) de recolha de sólidos possui um ou vários alimentadores de passagem (89) ou, eventualmente, acessórios (88) para remover as células. Como exemplo de um acessório refere-se uma peça com orifício de admissão central.

[024] As placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas formam canais e a pilha 1 de placas é constituída, preferencialmente, por diversos canais dispostos uns a seguir aos outros.

[025] Cada canal é aberto na extremidade inferior e na extremidade superior. Na extremidade inferior, os canais conduzem a uma região comum 57 de recolha de sólidos, a qual é afilada para baixo, assumindo uma forma cônica. Na extremidade superior, os canais conduzem a uma região comum 56 de recolha da corrente de colheita, a qual possui pelo menos um alimentador de passagem 80 através do qual a corrente de colheita pode ser transferida para fora do reservatório.

[026] Nos canais do separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, tem lugar a separação entre células e solução da cultura de células. Como resultado da remoção contínua da corrente de colheita para fora do biorreator, as células e a solução da cultura de células são aspiradas para dentro dos canais. Os sedimentos de células dentro dos canais inclinados deslizam, tal como sucede nos separadores clássicos de canais inclinados, segundo um fluxo em contracorrente em relação à corrente de colheita afluyente, saem dos canais outra vez e são colhidos na região 57 de recolha de sólidos, conicamente afilada. Normalmente, a região 57 de recolha de sólidos possui um ou vários alimentadores de passagem / acessórios 88/89 ligados ao biorreator para aspirar para o exterior as células colhidas e para fazerem a recirculação dentro do biorreator.

[027] Os canais da pilha 1 de placas podem ter uma secção transversal poligonal, elíptica, circular ou semicircular (figura 4).

[028] O dimensionamento dos canais (número, diâmetro, comprimento) depende, em todos os casos, da natureza e da quantidade das células que se pretende reter e do tamanho do biorreator.

[029] De preferência, os canais têm uma largura $d \geq 3$ mm para se evitar o entupimento dos canais. De acordo com uma forma de realização preferencial, são utilizados canais que possuam uma largura compreendida entre 3 mm e 100 mm, de preferência entre 4 mm e 20 mm, sendo particularmente preferível uma largura entre 3-7 mm, para se conseguir, em primeiro lugar, evitar, com segurança, situações de entupimento e, em segundo lugar, minimizar a razão volumétrica entre espaço no separador e espaço no biorreator, redutora da produção no espaço e no tempo.

[030] A área necessária da superfície de separação A_{erf} resulta da velocidade de sedimentação w_s , do coeficiente de perfusão q/V (quantidade média q produzida por volume V de biorreator) e do volume do biorreator, em conformidade com a equação 1. Utiliza-se um coeficiente η que toma em consideração a redução de eficiência dos separadores de canais inclinados por

comparação com os separadores verticais (equação 2).

[031] A área da superfície de separação teórica A_{th} , no caso das secções transversais retangulares e cilíndricas, pode ser determinada com aproximação a partir das equações 3 e 4, de acordo com metodologias publicadas na literatura (H.-J. Binder, Sedimentation aus Ein- und Mehrkornsuspensionen in schräg stehenden, laminar durchströmten Kreis- und Rechteckrohren [sedimentação a partir de suspensões de um só tipo de grânulo e de vários tipos de grânulos em tubos inclinados circulares e retangulares, com escoamento laminar], Dissertação Berlin, 1980):

$$A_{erf} = \frac{\text{coeficiente de perfusão} \cdot V}{ws} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$A_{th} = \frac{A_{erf}}{\eta} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Retângulo: } A_{th} \approx Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Cilindro: } A_{th} \approx \frac{3 \cdot \pi}{16} Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{Eq. 4})$$

[032] Nestas equações, Z indica o número de canais, β indica o ângulo de inclinação dos canais em relação à direção de atuação da gravidade, d indica o diâmetro interno e L o comprimento dos canais; π é o número pi ($\pi = 3,14159...$).

[033] O dimensionamento do comprimento dos canais implica que sejam satisfeitas as condições de escoamento laminar (número de Reynolds $Re < 2300$).

[034] A propósito disto, a pressão dinâmica no local de remoção da corrente de colheita (=alimentadores de passagem/acessórios 80) deve ser pelo menos 5 a 10 vezes inferior à queda de pressão nos canais, para assim se eliminar o fenómeno de distribuição imperfeita que reduz a eficiência. Considera-se que é tecnicamente possível obter quedas de pressão suficientes com canais de comprimentos de 0,1 m, sendo preferível utilizar canais com comprimentos entre 0,2 m e 5 m, e sendo particularmente preferíveis canais

com comprimentos entre 0,4 m e 2 m.

[035] Devido às reduzidas quedas de pressão, os canais curtos de comprimentos L podem dar origem a problemas de distribuição e isso, especialmente ao ser feita a remoção da corrente de colheita da parte superior da região 56 de recolha da corrente de colheita, pode exigir um dispositivo de distribuição para reduzir os ritmos de remoção. Por isso, facultativamente, os alimentadores de passagem/acessórios 80 possuem inversores de fluxo 81 para se fazer uma remoção homogeneizada da corrente de colheita 70 separada das células (=colheita), proveniente de uma região de recolha 56 da corrente de colheita.

[036] Normalmente, o separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, pode ter entre 1 e 10^6 canais, de preferência entre 10 e 100 000, sendo particularmente preferível um número entre 10 e 10 000. Os canais são distribuídos, quando necessário, através de uma ou várias placas reticulares em uma pilha 1 de placas, para efeitos de optimização de requisitos de espaço. De preferência, a pilha 1 de placas tem entre 1 e 400 placas reticulares, sendo particularmente preferível um número entre 1 e 50 placas reticulares, consoante a escala.

[037] É possível ajustar a razão entre largura e altura da pilha 1 de placas, constituída por placas reticulares de uma só camada ou de várias camadas, incluindo a placa de suporte. De preferência, são utilizadas pilhas de placas com secção transversal quadrada, cilíndrica, retangular ou elíptica, com uma razão entre altura e largura H/D tal que $0,005 \leq H/D \leq 1,5$, de preferência $0,02 \leq H/D \leq 1,2$, sendo particularmente preferível $0,1 \leq H/D \leq 1,0$.

[038] De preferência, a região de separação possui várias placas reticulares de plástico que são empilhadas umas sobre as outras e que formam um corpo de base.

[039] Em alternativa, a pilha 1 de placas pode ser feita a partir de uma placa perfilada 340 ou 320 (ver a figura 4). Uma placa perfilada possui, de preferência, uma face lisa e uma face que tem uma sucessão de contrafortes e

sulcos a intervalos constantes. Os canais são formados ao fazer o empilhamento das placas em uma ou várias camadas, por exemplo, sobre uma placa de suporte 30. Neste caso, os sulcos na face aberta são fechados pela face lisa de uma camada adjacente ou pela parede da placa fixa. Também é possível extrusar uma pilha ou subpilha de placas, sob a forma de uma só camada ou várias camadas, e uni-las para formarem uma pilha 1 de placas.

[040] As placas reticulares são unidas, de preferência, por meio de cola ou por soldadura. Em primeiro lugar, a pilha de placas deve ser espacialmente fixada em consequência da junção. Um outro objetivo consiste em minimizar as chamadas zonas mortas (espaços não utilizados para a separação, em torno das superfícies exteriores das placas reticulares). No entanto, neste caso, não é absolutamente necessário evitar a totalidade das referidas zonas mortas. As colas adequadas são colas conhecidas por um especialista na matéria, sendo especialmente produzidas para as propriedades dos materiais e superfícies dos canais. Mais particularmente, considera-se que é preferível utilizar uma cola existente no mercado, nas classes de qualidade exigida pela instituição FDA. Para a soldadura é possível praticar técnicas de junção térmica, tais como calor, laser e ultrassons. Uma técnica de junção particularmente preferível é a soldadura por laser que também pode ser utilizada, especialmente, em combinação com o corte da placa de pilhas para montagem em um dispositivo adequado para este efeito. A tecnologia de soldadura tem a vantagem de não fazer aumentar o número de peças de plástico introduzidas no processo farmacêutico, quando se utiliza esta tecnologia de junção.

[041] A geometria dos canais é definida pela razão entre a altura dos contrafortes h_s e a largura do canal d . Os cocientes h_s/d tecnicamente realizáveis estão no intervalo $0,01 \leq h_s/d \leq 5$, consoante as características (maleabilidade, elasticidade, capacidade para extração profunda). Faz-se observar aqui que as duas dimensões h_s e d devem ser ambas superiores ou iguais a 3 mm ou, de preferência, superiores ou iguais a 5 mm. Os cocientes h_s/d preferíveis estão compreendidos entre 0,5 e 5. As larguras b_s dos

contrafortes são determinadas pela estabilidade mecânica do material pelicular. As larguras bs dos contrafortes devem ser minimizadas para permitirem áreas elevadas das superfícies de separação por volume de separador. Ao mesmo tempo, não devem ser escolhidas demasiadamente baixas, de modo a permitir uma união por encaixe forçado com a camada inferior, sem que haja uma alteração de forma. No caso das pilhas 1 de placas extrusadas, ou no caso das pilhas de placas construídas a partir de subpilhas de placas extrusadas ou placas reticulares, é possível obter uma rigidez bastante elevada com contrafortes de larguras pequenas, sem grandes perdas de área das superfícies de separação, pelo que esta forma de produção é preferível.

[042] A placa perfilada pode ser feita por moldagem, diretamente durante a produção das placas, ou unindo (v.g., por meio de cola) uma placa gofrada, feita a quente ou a frio, a uma placa lisa. As propriedades do material da placa gofrada e da placa lisa podem ser ajustadas, de forma óptima, em função das suas diferentes funcionalidades (boas propriedades de deslizamento e boa estabilidade de forma para a placa gofrada e boas propriedades vedantes para a placa lisa), ou seja, é possível selecionar um material adequado, conhecido pelos especialistas na matéria, que tenha uma qualidade superficial conveniente.

[043] As placas reticulares de plástico, existentes nos circuitos comerciais, baratas e adequadas para os processos farmacêuticos, por exemplo, feitas de policarbonato, sob a forma de subpilhas de placas, são normalmente cortadas ou produzidas com um comprimento conveniente e unidas umas às outras para se produzir a pilha 1 de placas.

[044] Estas placas reticulares são extrusadas sob a forma de um produto contínuo que irá ser cortado, possuindo uma geometria de canais acabados (uma área superficial de sedimentação) e uma qualidade superficial fácil de obter. O corte com as dimensões convenientes, mais particularmente o corte com o comprimento pretendido, faz-se normalmente por meio de uma serra, por exemplo, uma serra circular. Normalmente, os contrafortes longitudinais

servem, em primeiro lugar, como encaixe do separador e, em segundo lugar, para estabilizar os canais de escoamento, servindo os contrafortes transversais, em primeiro lugar, como encaixe do separador e, em segundo lugar, para formar a área da superfície de separação.

[045] A pilha de placas, construída a partir de placas reticulares de plástico, assume quer a forma de um cuboide reto (figura 3), em que o plano das aberturas dos canais define um ângulo reto com a superfície de suporte da pilha 1 de placas, quer a forma de um cuboide inclinado (figura 2), em que as aberturas dos canais, com todas as peças montadas, ficam em um plano horizontal. A última solução é preferível para evitar que haja um gradiente de concentração, induzido pela sedimentação, orientado para as aberturas inferiores dos canais. Os canais recebem um fluxo homogeneizado da mistura do reator, facultativamente com o auxílio de distribuidores horizontais 85.

[046] De acordo com uma primeira forma de realização (figuras 1 a 13), os elementos do separador de sólidos de canais inclinados, de tipo descartável, de acordo com a invenção, são instalados em um saco de plástico esterilizável por meio de radiação γ , através do qual pode passar o fluxo de fluido. A pilha 1 de placas, constituída por placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas, é introduzida no segmento superior da região central do saco de plástico. O saco de plástico também delimita a região 56 de recolha da corrente de colheita e a região de recolha de sólidos conicamente afilada, definindo a região 57 de recolha de sólidos, preferencialmente, um ângulo 58, 59 de 10° a 60° em relação à vertical. No segmento inferior da região central do saco de plástico, os alimentadores de passagem ou acessórios 84 dispõem de um distribuidor horizontal 85 para que haja uma distribuição uniforme de fluxo horizontal da solução de cultura de células (=alimentação) 74 através de uma área da superfície de admissão 510.

[047] Nesta forma de realização, o objetivo mencionado *supra* é conseguido por meio de um separador de sólidos de canais inclinados, de tipo descartável, para reter e recircular células de uma mistura de um biorreator, o

qual compreende um saco de plástico, esterilizável por meio de radiação γ , por onde pode passar um fluxo de fluido e o qual possui os seguintes acessórios:

- na região superior do saco de plástico há um ou vários alimentadores de passagem/acessórios 80 para remover uma corrente de colheita 70 separada das células (= colheita), proveniente de uma região 56 de recolha da corrente de colheita,

- no segmento superior de uma região central do saco de plástico há uma região de separação formada por uma pilha 1 de placas, constituída por placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas, ficando a pilha inclinada, quando está a funcionar, segundo um ângulo ($10 = \beta$) entre 30° e 80° relativamente à horizontal,

- no segmento inferior da região central do saco de plástico há um ou vários alimentadores de passagem ou acessórios 84 para a distribuição de fluxo da mistura 74 do reator, possuindo facultativamente distribuidores horizontais 85 que determinam uma distribuição de fluxo horizontal uniforme da solução 74 de cultura de células (= alimentação) através de uma área 510 da superfície de admissão,

- na região inferior do saco de plástico há uma região 57 de recolha de sólidos que é afilada para baixo, especialmente de uma maneira cónica ou piramidal, para recolha das células por meio de gravidade. Normalmente, a região 57 de recolha de sólidos possui um ou vários alimentadores de passagem 89 ou acessórios 88 para remoção das células.

[048] A região superior do saco de plástico também pode ser afilada para cima.

[049] O saco de plástico é feito, normalmente, de um material polimérico transparente de uma só camada ou de várias camadas, permitindo que o interior do dispositivo seja visto quando está a funcionar. No caso da película habitual de pequena espessura $s \ll 1$ mm, o material polimérico permite que os aparelhos tenham uma fracção de massa comparativamente pequena. A sua aquisição e transformação é económica e é muitíssimo conveniente para a

construção de sistemas descartáveis. Deitar fora os separadores utilizados e utilizar novos separadores descartáveis é pois mais económico do que limpar os dispositivos de separação utilizados, especialmente porque não são necessários os procedimentos dispendiosos de limpeza com água para injeções (WFI) nem os de validação da limpeza que são morosos, quando se utiliza os separadores descartáveis. De preferência, o separador de acordo com a invenção é acondicionado em ambiente estéril.

[050] Os materiais particularmente convenientes para fazer o saco de plástico são os materiais e as combinações de materiais que constam da memória descritiva da patente de invenção US 6 186 932 B1, colunas 2 e 3, para os sacos de transporte (sacolas) ali mencionados. As resistências das paredes ali citadas também podem ser transpostas para o dispositivo de separação de acordo com a invenção.

[051] De acordo com uma forma de realização preferencial, as paredes do saco de plástico são constituídas por um película de material misto, conhecido pelos especialistas na matéria, o qual possui duas ou mais camadas (laminadas ou coextrusadas), com a finalidade de melhorar as propriedades do saco de plástico em termos de comportamento ao desdobramento, comportamento à tração, difusão de gases, estabilidade, compatibilidade de processos (adsorção mínima de produtos e células) e aptidão para soldadura.

[052] O dimensionamento do comprimento dos canais implica que sejam tomadas em consideração e observadas as condições de escoamento laminar (número de Reynolds $Re < 2300$). O comprimento L dos canais está condicionado pelo comprimento do interior do saco disponível (= comprimento do saco LK). O comprimento do saco LK que se pretende obter é condicionado pelos níveis de enchimento que se pretende conseguir no saco de plástico e pelas pressões hidrostáticas que irão ser observadas no saco de plástico. Se necessário, é possível transmitir pressões hidrostáticas excessivamente elevadas a invólucros convenientemente dimensionados e que não estabeleçam contato com o produto, podendo por isso ser reutilizados.

[053] Os comprimentos L dos canais correspondem, normalmente, a um valor entre 30% e 95%, sendo particularmente preferível um valor entre 60% e 90%, do comprimento LK do saco de plástico.

[054] O separador de sólidos de acordo com a invenção, que contém um saco de plástico feito de películas poliméricas, pode ser produzido, por exemplo, de acordo com o método descrito no documento US 6 186 932 B1, sendo necessário ajustar as costuras de soldadura. Adiante descreve-se melhor formas de realização exemplificativas para a produção de casos preferenciais do dispositivo de separação de acordo com a invenção.

[055] Os alimentadores de passagem são produzidos, normalmente, com o mesmo material com que é feita a película que entra em contato com o produto, de modo a permitir, com a referida película, uma soldadura sem defeitos em termos de esterilidade e resistência. O material preferível para a película que entra em contato com o produto é um polietileno de diversos graus de reticulação, conhecido pelos especialistas na matéria. Consoante os requisitos de aplicação e de processo, assim será possível utilizar películas para os revestimentos exteriores feitas de diversos materiais conhecidos pelos especialistas na matéria, as quais possuem um ponto de fusão maior, comparativamente com o da película interior, para a prática de métodos de soldadura térmica e/ou para conferir melhor resistência e/ou propriedades de difusão.

[056] As placas reticulares são unidas, normalmente, a uma placa de suporte 30 que proporciona uma base de apoio e que pode ser ligada ao saco de plástico por meio de cola ou soldadura, para um posicionamento exato.

[057] Em sacos 3D (sacos soldados entre si a partir de 4 retículos peliculares ao mesmo tempo) é possível, favoravelmente, utilizar pilhas 1 de placas que tenham uma secção transversal quadrada, cilíndrica, retangular ou elíptica, com uma razão entre altura e largura H/D tal que $0,3 < H/D < 1,5$, de preferência $0,6 < H/D < 1,2$, sendo particularmente preferível $0,9 < H/D < 1,0$.

[058] No caso dos sacos 2D, mais simples e menos dispendiosos (sacos

soldados entre si a partir de 2 retículos peliculares ao mesmo tempo), são convenientes as pilhas de placas planas que têm uma secção transversal retangular, com quocientes H/D tais que $0,005 < H/D < 1$, de preferência $0,02 < H/D < 0,6$, sendo particularmente preferível $0,1 < H/D < 0,4$. Consoante a altura da pilha de placas, assim poderá existir uma determinada distância entre a pilha de placas e o início dos afunilamentos para o fabrico de um saco 2D.

[059] Para a produção do separador são preparados também alimentadores de passagem e outros acessórios e, se adequado, são montados em uma película de plástico em locais apropriados.

[060] A seguir, solda-se um saco de plástico 50, a partir da película de plástico que encerra a pilha 1 de placas, para se obter um saco de plástico 50 com uma costura de soldadura 55 (figura 5).

[061] A pilha 1 de placas que contém a placa de suporte é então apertada, normalmente, contra a superfície interior do saco de plástico 50, para se evitar a penetração de células entre o saco de plástico 50 e a pilha 1 de placas, assim se evitando a formação de incrustações obstrutivas.

[062] De acordo com uma primeira forma de realização do método de produção, o saco de plástico 50 é apertado sobre a pilha 1 de placas (figura 5) e a prega 52 formada é comprimida até ficar plana e é imobilizada utilizando uma ou várias cintas de fixação 60 (figura 6). Uma película de plástico enrolada firmemente em torno do saco e da pilha de placas também é adequada como cinta de fixação. As propriedades de aperto favoráveis são as que se encontram, por exemplo, nas películas de uso doméstico ou nas películas de silicone finas e flexíveis. A soldadura da pilha 1 de placas à parede do saco também pode ser apropriada para se conseguir uma união perfeita entre o saco e a pilha de placas.

[063] Ao ser utilizado, o dispositivo de acordo com a invenção fica orientado segundo um ângulo $10 = \beta$ relativamente à horizontal. O ângulo β é condicionado pelo comportamento de sedimentação e deslizamento das células/sólidos e está compreendido entre $30^\circ \leq \beta \leq 80^\circ$, relativamente à

horizontal, durante os procedimentos de utilização. De acordo com uma forma de realização preferencial, o ângulo β está compreendido entre 35° e 75°, sendo particularmente preferível um valor entre 45° e 60°, relativamente à horizontal.

[064] Para garantir o ângulo β durante os procedimentos de utilização, o separador de sólidos de acordo com a invenção é fixado em uma armação 140 para execução de tais procedimentos (figuras 11 a 13).

[065] A armação 140 é constituída por uma base 145 da armação e um suporte 148 que faz um ângulo predefinido $10 (= \beta)$ relativamente à base de suporte. Sobre o suporte 148, a pilha 1 de placas, que compreende a placa de suporte 30, é mantida a uma altura predefinida por meio de uma saliência 142 e/ou tampa 110 e também pelos elementos de fixação 115, pelo que tanto a região 56 de recolha da corrente de colheita (*supra*) como a região 57 de recolha de sólidos podem assentar sobre o suporte com um mínimo de dobras e enrugamentos durante os procedimentos de trabalho. Isto reduz os espaços mortos e as correspondentes incrustações obstrutivas.

[066] De acordo com uma forma de realização preferencial, a armação 140 possui uma blindagem 100 e uma tampa 110 para acomodar a pilha 1 de placas.

[067] Neste caso, o processo de aperto também pode ter lugar durante a montagem do separador de sólidos, de acordo com a invenção, na armação 140 e, mais particularmente, na blindagem 100 e tampa 110 (figuras 6 e 7), possivelmente também sem se enrolar a cinta de aperto 60. Nesta situação, o saco de plástico 50 é mantido na sua posição correta na placa de suporte 30 e na pilha 1 de placas por meio da blindagem 100 e a prega 52 é apertada sobre a pilha 1 de placas por meio da tampa 110. De preferência, a tampa 110 é apertada sobre a blindagem 130, em um dos lados, por exemplo, por meio de dobradiças, e no outro lado por meio de um ou vários elementos de fixação imobilizáveis 115. Isto faz com que seja mais simples manipular a armação 140 para iniciar os procedimentos de trabalho com o separador de sólidos de

acordo com a invenção.

[068] De acordo com uma forma de realização preferencial, a tampa 110 possui uma extensão 112 e/ou uma armadura 130 que mantém a forma da região 57 de recolha de sólidos conicamente afilada, e mais particularmente mantém o ângulo 59 constante, evitando a sua expansão quando se encontra cheio, durante os procedimentos de trabalho. Um recipiente deste tipo, que se adapta à forma, é vantajoso, *inter alia*, para a exploração do sistema quando sujeito a forças hidrostáticas relativamente grandes, conforme é previsível ao fazer a ligação a biorreatores de grandes dimensões.

[069] O separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, é concebido, preferencialmente, como artigo descartável para se evitar problemas de limpeza.

[070] A armazenagem dos separadores de sólidos de canais inclinados de acordo com a invenção, permite poupar espaço, uma vez que são empilhados uns sobre os outros, sem quaisquer problemas, e apenas são colocados no ângulo apropriado durante o arranque de procedimentos. Deste modo, podem ser facilmente ligados e explorados fora de um biorreator.

[071] De acordo com outra forma de realização (figuras 14 e 15), a região superior do separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, é um coletor que é feito, por exemplo, a partir de um objeto que possua uma ligação por tubo flexível, cortando uma vareta sólida de plástico constituído especialmente, por policarbonato, tal como Makrolon®, em uma máquina de torção. Um outro método, que é essencialmente adequado no caso de quantidades elevadas de objetos, é um processo de moldagem por injeção. O coletor dispõe de alimentadores de passagem, (80), pelo menos um alimentador de passagem para a remoção da corrente de colheita (70) separada das células (= colheita), ligado à região 56 de recolha da corrente de colheita. A região 56 de recolha da corrente de colheita é formada por uma reentrância no coletor, abrindo essa reentrância no interior do alimentador de passagem 80 para fazer a remoção de uma corrente de colheita (70) separada

das células. A secção transversal da referida reentrância é, normalmente, redonda ou quadrada. De preferência a secção transversal está adaptada às dimensões da abertura da placa de obturação superior e, conseqüentemente, às dimensões das arestas do corpo de base das placas reticulares. A altura da reentrância é ajustada com a finalidade de se minimizar o volume morto e de se otimizar o controlo do caudal de escoamento. Essa altura tem, normalmente, entre 1 e 5 mm. A referida reentrância também pode ter uma forma afunilada.

[072] Nesta forma de realização, as extremidades superior e inferior do corpo de base das placas reticulares são introduzidas nas chamadas placas de obturação, onde são fixadas por meio de cola. As placas de obturação também são feitas, normalmente, por meio de corte em uma fresadora de torção, ou por meio de um processo de moldagem por injeção. Tais placas são feitas, preferencialmente, com o mesmo material do coletor. Dispõem de uma abertura quadrada, de preferência segundo um ângulo predefinido, para obturar as extremidades inferior e superior do corpo de base de placas reticulares. Normalmente são redondas.

[073] De preferência, um funil forma o segmento inferior e a região (57) de recolha de sólidos, a qual possui um ou vários alimentadores de passagem 89 para remoção dos sólidos. O funil é feito, normalmente, com uma união inferior para tubos flexíveis, por meio de corte em uma máquina de torção ou por meio de um processo de moldagem por injeção. De preferência, é feito com o mesmo material das placas de obturação. A região superior do funil possui um ou vários alimentadores de passagem ou acessórios 84, para que haja uma distribuição uniforme do fluxo da solução 74 de cultura de células (= alimentação) através de uma área 510 da superfície de admissão do material afluente. O distribuidor horizontal óptimo pode ser formado por dois ou mais furos distribuídos geometricamente, normalmente dois furos opostos, em que as ligações laterais são coladas localmente. O funil é fixado por meio de cola à placa obturadora inferior.

[074] De preferência, a região (57) de recolha de sólidos, que é afilada

para baixo, assumindo especialmente uma forma cônica ou piramidal, define um ângulo (58, 59) de 10° a 60° em relação à vertical. Os ângulos 58 e 59 são escolhidos separadamente.

[075] O coletor, as placas obturadoras e o funil são normalmente resistentes à dobragem, para que haja estabilidade mecânica do separador de sólidos de canais inclinados.

[076] De preferência, o corpo de base de placas reticulares é estabilizado por meio de um suporte de reforço. O suporte de reforço é aplicado e fixado por meio de cola ao corpo de base de placas reticulares e às placas obturadoras superior e inferior e garante uma suficiente estabilidade mecânica do separador de sólidos de canais inclinados.

[077] Comparativamente com os separadores de canais inclinados feitos de aço inoxidável da técnica anterior, o fabrico complicado do corpo de base (corte, inúmeros passos de soldadura e polimento eléctrico até se obter um acabamento bastante liso) não é aplicável no caso dos separadores de sólidos de canais inclinados de acordo com a invenção (= separadores de placas de plástico). A soldadura complicada é substituída por uma simples fixação por meio de cola. A produção de separadores de canais inclinados, de acordo com a invenção, não necessita de parafusos nem de vedantes. Na globalidade, consegue-se obter vantagens consideráveis em termos de custos de tempo e materiais na produção dos separadores de placas de plástico, comparativamente com os separadores de canais inclinados feitos de aço inoxidável.

[078] Os referidos separadores de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, são produzidos, normalmente, do modo seguinte:

- a. cortar à medida, mais particularmente com uma serra, o corpo de base de placas reticulares,
- b. remoção de rebarbas e limpeza do corpo de base de placas reticulares,
- c. produção dos componentes seguintes:

- 1) funil
- 2) duas placas de obturação
- 3) coletor
- 4) preferencialmente, um suporte de reforço,
 - d. inserção bilateral do corpo de base de placas reticulares dentro das placas de obturação e fixação por meio de cola, de preferência com uma cola que endureça por ação de UV, tal como, por exemplo, Loctite 3211,
 - e. fixar, por meio de cola, a placa de obturação superior ao coletor,
 - f. fixar, por meio de cola, a placa de obturação inferior ao funil,
 - g. aplicação e fixação, por meio de cola, do suporte de reforço.

[079] Durante os procedimentos de trabalho, o separador de sólidos de canais inclinados é imobilizado, normalmente, em uma consola.

[080] Devido à construção em plástico e ao peso reduzido resultante, para a instalação é suficiente uma consola reutilizável, feita de aço inoxidável, dependendo disso do tamanho. Para um separador de canais inclinados de dimensões vulgares (área da superfície do separador igual a $0,15 \text{ m}^2$), chega-se a um peso total, incluindo a consola, de cerca de 4 kg (comparativamente com os de aço inoxidável de dimensões idênticas, com cerca de 40 kg). Isto faz com que o separador de canais inclinados descartável, de acordo com a invenção, seja facilmente transportável, sem qualquer necessidade de uma estrutura de transporte móvel.

[081] Normalmente, os separadores de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, são acoplados externamente, por meio de tubos flexíveis, a um biorreator, por exemplo, a um biorreator descartável, conforme descrito no documento US 2009-0180933. O separador de acordo com a invenção deve ser fornecido pelo menos com duas bombas, de preferência bombas peristálticas de baixo regime (figura 18). As bombas permitem a remoção da solução de cultura de células para fora do espaço do biorreator, o seu encaminhamento, após o arrefecimento através de um permutador de

calor, para o dispositivo separador, a remoção da corrente de colheita para fora do dispositivo separador e o transporte de retorno da corrente de sólidos (= retorno 70) para o biorreator. As áreas necessárias da superfície de separação são determinadas pelas propriedades de sedimentação das células, pelos caudais de perfusão e pelas concentrações celulares pretendidas. Os caudais de perfusão preferíveis estão compreendidos no intervalo entre 0,1 e 40 L/dia, sendo particularmente preferíveis valores entre 0,5 e 20 L/dia. As áreas preferíveis das superfícies de separação, por volume de biorreator, estão compreendidas no intervalo entre 0,1 e 100 m²/m³, sendo particularmente preferíveis valores entre 2 e 20 m²/m³, dependendo disso das propriedades de sedimentação das células (dependem da concentração, das dimensões e da tendência das células para se aglomerarem).

[082] Os métodos descritos permitem uma produção simples e económica do separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção, para reter e recircular células. Devido à configuração da pilha de placas, variável dentro de limites amplos, a geometria do dispositivo subsequente pode ser definida fácil e exatamente e, em contraste com os sistemas de aço inoxidável, também pode ser prevista para biorreatores muito grandes. Os métodos descritos permitem uma produção económica particular de elementos descartáveis cuja utilização faz com que seja possível reduzir ao mínimo o esforço necessário para se conseguir um sistema de retenção limpo, em conformidade com os requisitos gerais farmacêuticos.

[083] A ligação aos fermentadores é feita por meio de acopladores esterilizados, fixados na extremidade dos tubos flexíveis, produzidos por diversos fabricantes (Pall, Sartorius, Coulter), dentro ou fora de caixas de escoamento laminar, mas preferencialmente por soldadura de tubos flexíveis. Deste modo, os tubos flexíveis ligados aos separadores de sólidos, de acordo com a invenção, são preferencialmente - pelo menos em parte - dotados de um elemento tubular adequado para soldadura de tubos flexíveis. Além disso, para transportarem a suspensão, os tubos flexíveis possuem, normalmente, pelo

menos dois elementos tubulares específicos muito resistentes aos esforços mecânicos (v.g., feitos de elastômero Verderprene para tubos flexíveis, da Verder) que podem ser inseridos, de forma não invasiva, nas bombas peristálticas, sem comprometerem a esterilidade dos separadores. Não há quaisquer problemas com a ligação, o funcionamento e a manutenção. O fabrico do dispositivo de acordo com a invenção, ou de partes do dispositivo de acordo com a invenção, enquanto elemento descartável, elimina os problemas de limpeza.

[084] Para melhorar o comportamento deslizante das células nos canais da pilha de placas e nas paredes interiores da região de recolha de sólidos afilada conicamente, é possível fazer vibrar o dispositivo, utilizando meios convenientes, por exemplo, vibradores pneumáticos ou elétricos.

[085] Em princípio, é concebível a utilização direta da pilha 1 de placas em biorreatores aeróbios, se as bolhas de gás necessárias para a aplicação de gás puderem ser mantidas longe das aberturas de entrada.

[086] De preferência, o separador de acordo com a invenção destina-se, no entanto, a utilização fora de um biorreator.

[087] A presente invenção proporciona também uma unidade biorreatora constituída por um biorreator e por um dos dispositivos descritos para separação de células, de acordo com a invenção. De preferência, o biorreator é de tipo descartável, mais particularmente um reator descrito no documento US 2009-0180933.

[088] A unidade biorreatora é, por exemplo, um reator de perfusão que pode trabalhar de uma maneira conhecida. O meio de crescimento é injetado continuamente no biorreator e o sobrenadante da cultura celular, pobre em células, é purgado continuamente. O reator de perfusão pode trabalhar com elevados coeficientes de perfusão q/V (quantidade média produzida q por volume V do biorreator), quando isso for útil do ponto de vista biológico e houver uma área suficiente de superfície de separação. Neste caso, o caudal de fluido passa continuamente através do separador.

[089] O reator de perfusão também pode trabalhar de tal modo que uma cultura possa atingir inicialmente um crescimento elevado, de uma forma descontínua por lotes. Quando o meio tiver sido já fortemente consumido, até ao ponto de já não ser possível uma acumulação apreciável de biomassa, remove-se por meio do separador externo de células o sobrenadante da cultura, virtualmente isento de biomassa. O espaço ganho no biorreator pode ser então utilizado para a introdução de meio de crescimento renovado, permitindo isso mais crescimento e conseqüentemente uma maior quantidade total de biomassa produzida (modo de lotes repetidos). Neste caso, o caudal de fluido passa pelo separador de células de uma forma descontínua por lotes. Este método é adequado, por exemplo, para preculturas destinadas a inocular biorreatores muito grandes, uma vez que permite aumentar a quantidade produzida nos reatores de preculturas existentes.

[090] Para trabalhar em biorreatores é preferível um caudal contínuo no separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a invenção.

[091] O biorreator, ou o reator de perfusão, pode ser utilizado para criar em cultura células que se desenvolvam *in vitro* e em suspensão livre ou sobre microportadores. As células preferíveis são as de protozoários e também as células eucarióticas aderentes e não aderentes de seres humanos (células de nervos, sangue ou tecidos, e também as células estaminais de origem embrionária ou de adultos), de origem animal ou vegetal que sejam capazes, por exemplo, em consequência de uma modificação genética, de produzir ingredientes farmacêuticamente ativos específicos, tais como células de vírus, proteínas, enzimas, anticorpos, neurónios, tecidos ou estruturas de diagnóstico. Em particular e preferencialmente são utilizadas células adequadas para uma produção farmacêutica de elevado rendimento, por exemplo, células de ciliados, insetos, células do rim do criceto bebé (BHK), células do ovário do criceto chinês (CHO), células HKB (resultantes da fusão da linhagem de células HEK293 humanas com a linhagem de células 2B8 humanas do linfoma de Burkitt), células de hibridomas e também células estaminais.

[092] De acordo com uma forma de realização alternativa da unidade, um dos separadores de células descritos, de acordo com a invenção, ao trabalhar em um modo descontínuo por lotes, é ligado, depois de completada a fermentação e antes da remoção das células, a um outro biorreator ou a um depósito de colheita, com a finalidade de se reduzir a massa de células que irá ser aplicada aos filtros e conseqüentemente as necessárias áreas da superfície de filtração.

[093] Um método para reter e recircular sólidos, mais particularmente células, é efetuado no separador de sólidos de canais inclinados por onde passa o fluxo, sendo o meio que contém os sólidos introduzido no separador de sólidos de canais inclinados, de uma forma contínua ou descontínua por lotes e sendo purgado o meio isento de sólidos, com uma velocidade de escoamento que permite manter o estado de escoamento laminar, mantendo um número $Re < 2300$, evitando que as células separadas sejam recolocadas em suspensão e que seja reduzida a eficiência, em presença do campo de gravidade.

[094] O número de Reynolds Re pode ser calculado de acordo com a equação 7, a partir da velocidade média de escoamento através da secção transversal, tendo em conta a viscosidade cinemática ν do meio fluido em escoamento e o diâmetro interno d de um canal:

$$Re = (w \cdot d / \nu) \text{ (Eq. 7)}$$

[095] Em canais inclinados, a velocidade de escoamento nas paredes interiores do canal é menor do que na zona central do canal. As células sedimentam nos canais e deslizam em contracorrente sobre o lado inferior dos canais em oposição ao sentido de escoamento para as extremidades inferiores dos canais. A solução de cultura de células, já sem as células, é libertada pelos canais dentro da região 56 de recolha da corrente de colheita, região esta que está por cima dos canais, sendo eventualmente transportada para fora do reservatório.

[096] O método de acordo com a invenção pode ser realizado, preferencialmente, fora de um biorreator. Para tal, a solução de cultura das

células, contendo as células, é transportada do reator para o separador de células de acordo com a invenção. De preferência, as células são arrefecidas em um reservatório externo antes de entrarem no separador, para abrandar o metabolismo, contrariando assim a subnutrição das células, redutora da produtividade. Na suspensão arrefecida não é necessário fornecer oxigénio às células em sedimentação. Na maior parte dos casos, o arrefecimento da solução de cultura de células, até à temperatura ambiente dos separadores, é perfeitamente suficiente e por isso, para além do efeito metabólico desejado, as correntes de convecção são cuidadosamente evitadas. Para monitorizar uma suficiente alimentação das células, o separador pode estar equipado pelo menos com um detector descartável, por exemplo, para medir a concentração de oxigénio e/ou o valor de pH. A instalação dos detectores pode ser feita tanto nas paredes como nos tubos de ligação ao biorreator ou nos recipientes de colheita.

[097] O método permite uma retenção eficaz e a recirculação das células em um saco de plástico esterilizado por onde passa continuamente o caudal de solução. Durante a retenção e a recirculação as células ficam sujeitas apenas a moderadas forças de agitação, normalmente bem toleradas pelas células. As células são mantidas no dispositivo de separação à temperatura de fermentação ou a um nível de temperatura reduzida e recebem o fornecimento de nutrientes.

[098] As formas de realização exemplificativas da invenção irão ser agora mais particularmente esclarecidas, tomando como referência os desenhos, sem que isso constitua qualquer limitação.

[099] Figura 1. Esquema que ilustra os separadores de sólidos descartáveis de acordo com a invenção, contendo a pilha de placas.

[100] Figura 2. Esquema que mostra uma pilha 1 de placas (corte longitudinal).

[101] Figura 3. Esquema que ilustra uma pilha 1 de placas (corte longitudinal).

[102] Figura 4. Esquema da construção de diversas pilhas de placas (corte transversal feito pelo plano AA' da figura 3).

[103] Figura 5. Esquema da aplicação do saco de plástico 50 a uma pilha 1 de placas (corte transversal feito pelo plano AA' da figura 3).

[104] Figura 6 e Figura 7. Aperto e fixação do saco de plástico 50 em uma pilha 1 de placas (corte transversal).

[105] Figura 8 e Figura 9. Aperto e fixação alternativos do saco de plástico 50 em uma pilha 1 de placas, utilizando a armadura 130 e a tampa 110 (corte transversal).

[106] Figura 10. Vistas laterais dos separadores de sólidos de acordo com a invenção, contendo a pilha 1 de placas na armação 140.

[107] Figura 11. Vistas anteriores dos separadores de sólidos de acordo com a invenção, contendo a pilha 1 de placas na armação 140.

[108] Figura 12. Cortes longitudinais dos separadores de sólidos de acordo com a invenção, contendo a pilha 1 de placas na armação 140 com a armadura 130 e a tampa 110.

[109] Figura 13. Vistas anteriores dos separadores de sólidos de acordo com a invenção, contendo a pilha 1 de placas na sua armação 140 com a armadura 130 e a tampa 110.

[110] Figura 14. Corte longitudinal do separador de sólidos de acordo com a invenção na sua consola, visto por cima, cortes transversais (A-A, C-C) e ampliações (D).

[111] Figura 15. Esquema tridimensional que mostra os separadores de sólidos de acordo com a invenção na sua consola.

[112] Figura 18. Diagrama do processo de um reator de perfusão. Para reduzir a atividade respiratória das células na saída do biorreator, reduz-se a sua temperatura para um nível inferior em um dispositivo de arrefecimento, tão rapidamente quanto possível após a remoção. Isto evita que as células permaneçam no separador de células um tempo excessivo em uma situação com oxigénio limitado, o que poderia danificar as células fisiologicamente. No

exemplo ilustrado, o separador 640 é constituído por um saco de separação 620 e por um dispositivo de arrefecimento solidário 600. Os caudais de líquido entre o biorreator 610 e o separador 640 são ajustados por bombas 630 e 631 que trabalham em regime lento. Também são concebíveis outras interligações, por exemplo, o posicionamento de uma das duas bombas 630 e 631 na saída do biorreator.

Legenda:

- 1 Pilha de placas / área da superfície separadora
- 5 Largura do contraforte
- 8 Intervalo entre placas
- 10 Ângulo
- 13 Comprimento
- 15 Largura
- 18 Altura
- 30 Placa de suporte
- 50 Saco de plástico
- 52 Excesso / prega
- 55 Costura de soldadura
- 56 Região de recolha da corrente de colheita
- 57 Região de recolha de sólidos
- 58 Ângulo
- 59 Ângulo
- 60 Cinta de aperto
- 70 Corrente de colheita (colheita)
- 74 Mistura / alimentação do biorreator
- 79 Recirculação
- 80 Alimentadores de passagem
- 81 Inversor de fluxo
- 84 Alimentadores de passagem
- 85 Distribuidor horizontal

86 Fluxo de admissão
88 Abertura central de aspiração
89 Alimentadores de passagem
90 Placa de união
100 Blindagem
110 Tampa
112 Extensão
115 Elemento de aperto
130 Armadura
140 Armação
142 Saliência
145 Suporte de armação
148 Suporte
200 Vibrador
210 Placa de montagem
Perfis de uma pilha de placas
311 Pilha de placas
320 Perfis retangulares
321 Pilha de placas
330 Perfil redondo
331 Pilha de placas
340 Perfil redondo
341 Pilha de placas
350 Perfil hexagonal
351 Pilha de placas
500 Coletor
510 Placas de obturação
520 Funil
530 Suporte de reforço
540 Corpo de base de placas reticulares

550 Consola

600 Dispositivo de arrefecimento

610 Biorreator

620 Dispositivo de separação

630, 631 Bombas

640 Separador = saco de separação + dispositivo de arrefecimento
possivelmente integrado na armação ou reservatório

650 Meio de cultura

[113] Os estudos que conduziram a esta invenção tiveram por base o acordo de concessão “Bio.NRW: MoBiDik – Modulare Bioproduktion – Disposable und Kontinuierlich” (*Bio.NRW: MoBiDik – Bioprodução modular - Descartável e Contínua*) (Número w1004ht022a de concessão), enquanto parte do Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional (FEDER).

REIVINDICAÇÕES

1. Separador de sólidos de canais inclinados para reter e recircular sólidos de uma mistura de um reator, **caracterizado por** compreender os seguintes elementos:

- uma região superior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover uma corrente de colheita (70) separada das células provenientes de uma região de recolha da corrente de colheita (56), ligada a

- uma região de separação, incluindo canais, formada por uma pilha de placas (1) constituída por uma ou mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas, em que a referida pilha é inclinada quando está a funcionar em um ângulo (10) desde 30° até 80° em relação à horizontal, ligada a

- um segmento inferior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem ou acessórios (84) para distribuição do fluxo da mistura do reator (74), sobre

- uma região de recolha de sólidos (57) que é afilada para baixo para a recolha de células por meio de gravidade,

em que as placas reticulares são unidas por meio de cola e/ou por soldadura,

em que a pilha de placas (1) é formada a partir de uma placa perfilada que possui uma face lisa e uma face que tem uma sucessão de contrafortes e sulcos a intervalos constantes, e

em que a razão entre a altura do contraforte e a largura do canal hs/d é $0,01 \leq hs/d \leq 5$, com uma restrição de que as duas dimensões hs e d são ambas superiores ou iguais a 3 mm.

2. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a região de recolha de sólidos (57) ser afilada para baixo de uma maneira cônica ou em forma de pirâmide.

3. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a

reivindicação 2, **caracterizado por** compreender um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo de fluido, em que o saco de plástico (50) compreende:

- em uma região superior, compreendendo os alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover a corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente de uma região de recolha da corrente de colheita (56),
- um segmento superior de uma região central compreendendo em uma região de separação com a pilha de placas (1), constituída por em uma ou mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas,
- um segmento inferior da região central do saco de plástico (50) compreendendo em um segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme de uma solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e
- uma região inferior do saco de plástico (50) compreendendo em uma região de recolha de sólidos (57) que é afilada para baixo, de uma maneira cônica, para recolha dos sólidos por meio de gravidade.

4. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a região de recolha de sólidos (57) possuir um ou vários alimentadores de passagem (89) ou acessórios (88) para a remoção de sólidos.

5. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** compreender em um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo de fluido, em que o saco de plástico (50) compreende:

- a região superior compreendendo nos alimentadores de passagem (89)/acessórios (88) para remover a corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente da região de recolha da corrente de colheita (56),
- um segmento superior de uma região central compreendendo na região de separação com a pilha de placas (1), compreendendo em uma ou

mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas,

- um segmento inferior da região central do saco plástico (50) compreendendo o segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme de uma solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e
- uma região inferior compreendendo a região de recolha de sólidos (57), que é afilada para baixo de uma maneira cônica para a recolha de sólidos por meio de gravidade.

6. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender em pelo menos um sensor descartável em seu interior.

7. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** compreender em um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo de fluido, em que o saco de plástico (50) compreende:

- a região superior compreendendo os alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover a corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente da região de recolha da corrente de colheita (56),
- um segmento superior de uma região central do saco de plástico (50) compreendendo uma região de separação com a pilha de placas (1) compreendendo uma ou mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas,
- um segmento inferior da região central compreendendo o segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme de uma solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e
- uma região inferior compreendendo a região de recolha de sólidos, que é afilada para baixo de uma maneira cônica para a recolha de sólidos por

meio de gravidade.

8. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a região de separação ser constituída por um conjunto de canais dispostos uns próximos aos outros na pilha de placas (1).

9. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** compreender um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo, em que o saco de plástico (50) compreende:

- a região superior compreendendo os alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover a corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente de uma região de recolha da corrente de colheita (56),

- um segmento superior de uma região central do saco de plástico compreendendo uma região de separação com a pilha de placas (1) compreendendo uma ou mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas,

- um segmento inferior da região central compreendendo o segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme da solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e

- uma região inferior compreendendo a região de recolha de sólidos (57), que é afilada para baixo de uma maneira cônica para a recolha de sólidos por meio de gravidade.

10. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por**:

- a região de separação formada pela pilha (1) de placas constituída por placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas que formam um corpo de base das placas reticulares, que é conectada em placas de conexão na parte superior e inferior,

- o segmento inferior e a região de recolha de sólidos (57), que é

afilada para baixo de uma maneira cônica, é um funil, e

todos os elementos do separador de sólidos compreendem plástico.

11. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo de fluido, e o saco de plástico (50) compreende:

- a região superior compreendendo nos alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover uma corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente de uma região de recolha da corrente de colheita (56),
- um segmento superior de uma região central compreendendo uma região de separação com a pilha de placas (1), constituída por uma ou mais placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas,
- um segmento inferior da região central do saco de plástico (50) compreendendo um segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme de uma solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e
- uma região inferior compreendendo a região de recolha de sólidos (57), que é afilada para baixo de maneira cônica para a recolha de sólidos por meio de gravidade.

12. Unidade biorreatora **caracterizada por** ser constituída por um biorreator ligado ao separador de sólidos de canais inclinados, como definido na reivindicação 1.

13. Separador de sólidos de canais inclinados para reter e recircular sólidos de uma mistura de um reator **caracterizado por** os seguintes elementos:

- uma região superior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover uma corrente de colheita (70) separada das células provenientes de uma região de recolha da corrente de colheita (56), ligada a
- uma região de separação incluindo canais formada por uma pilha

de placas (1) placas reticulares de plástico de uma só camada ou de várias camadas, em que a referida pilha é inclinada quando está a funcionar em um definindo um ângulo (10) desde 30° até 80° em relação à horizontal, ligada a

- um segmento inferior do separador de sólidos que possui um ou vários alimentadores de passagem ou acessórios (84) para distribuição do fluxo da mistura do reator (74), sobre

- uma região de recolha de sólidos (57) que é afilada para baixo para a recolha de sólidos por meio de gravidade,

em que as placas reticulares são unidas por meio de cola e/ou por acopladores,

em que o separador de sólidos de canal inclinado é compreendido em um saco de plástico (50) esterilizável por meio de radiação gama, através do qual passa o fluxo, em que o saco de plástico (50) compreende:

- a região superior compreendendo os alimentadores de passagem/acessórios (80) para remover a corrente de colheita (70) separada dos sólidos, proveniente de uma região de recolha da corrente de colheita (56),

- um segmento superior de uma região central compreendendo na região central com uma pilha de placas compreendendo em uma ou mais placas de

- um segmento inferior da região central do saco de plástico (50) compreendendo um segmento inferior do separador de sólidos, em que os alimentadores de passagem ou acessórios (84) possuem distribuidores horizontais (85) para distribuição de fluxo horizontal uniforme de uma solução de cultura de células (74) através de uma área da superfície de alimentação (510), e

- uma região inferior compreendendo uma região de recolha de sólidos (57), que é afilada para baixo de uma maneira cônica para a recolha de sólidos por meio de gravidade.

14. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado por** os canais possuírem um canal de comprimento L que corresponde a um valor entre 30% e 95% de um comprimento

LK do saco de plástico.

15. Separador de sólidos de canais inclinados, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado por** compreender ainda em um recipiente para acomodar o separador de sólidos,

em que o recipiente possui um ou mais interiores para acomodar o separador de sólidos,

em que o referido interior compreende nas paredes produzidas para um formato do separador de sólidos por meio do formato do separador de sólidos, as paredes circundam o interior e demarcam o referido interior do mundo externo, uma abertura para introdução do separador de sólidos dentro do recipiente.

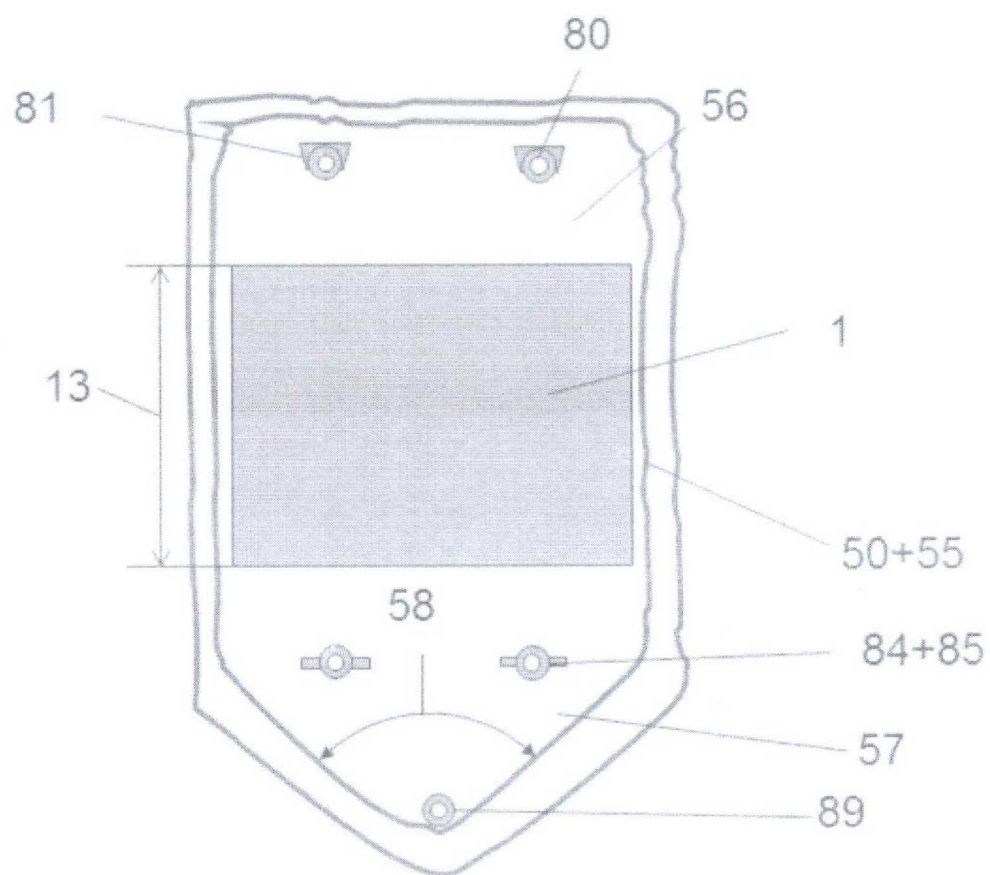


Fig. 1

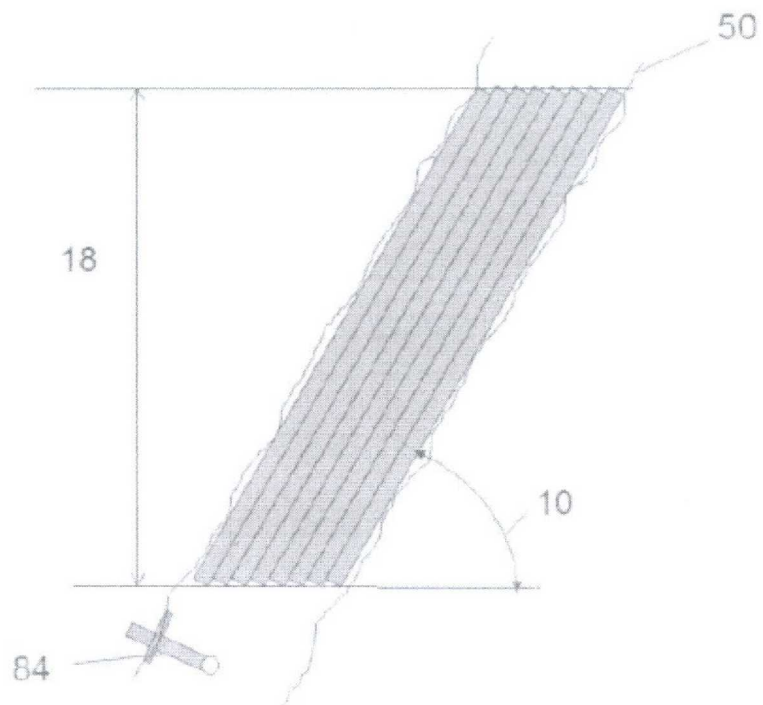


Fig. 2

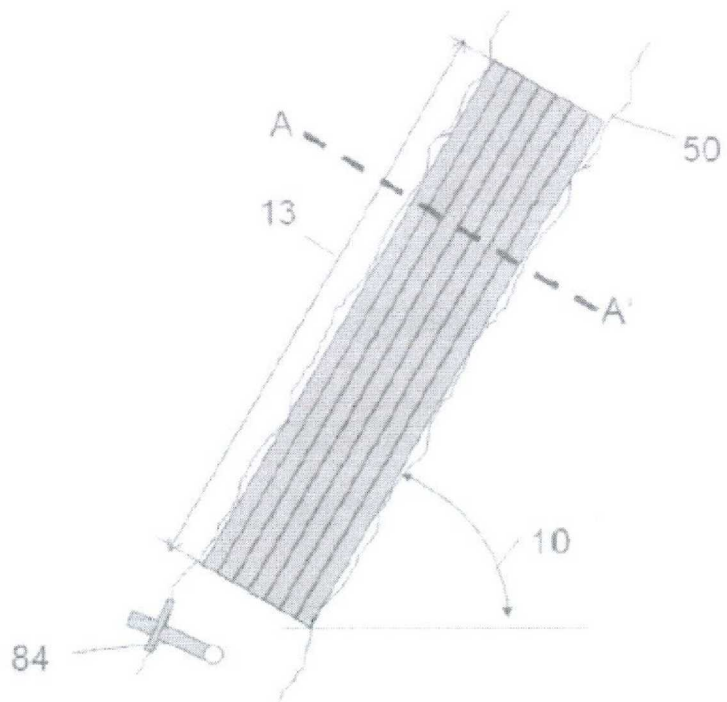
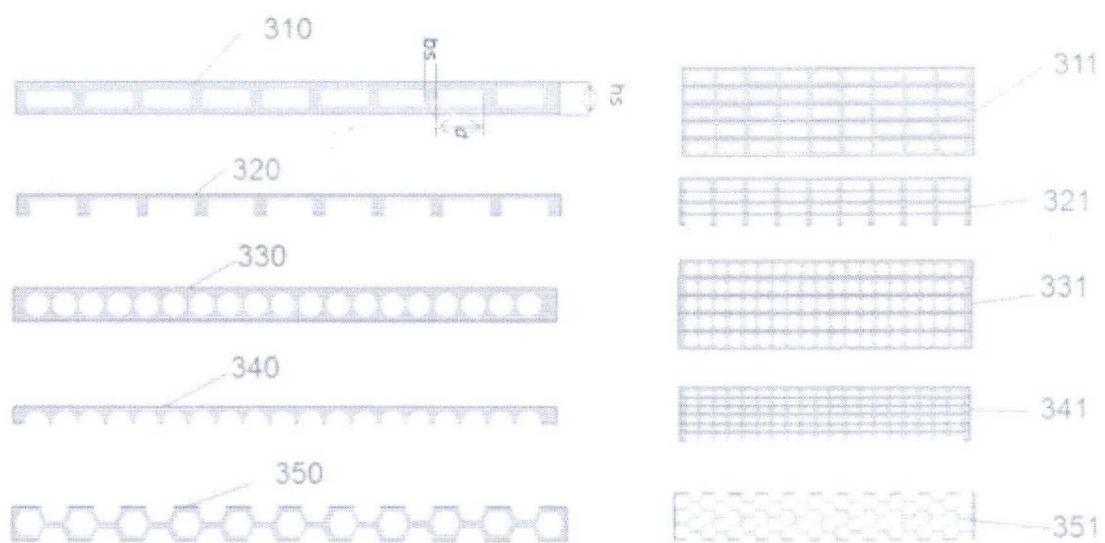


Fig. 3

Fig. 4

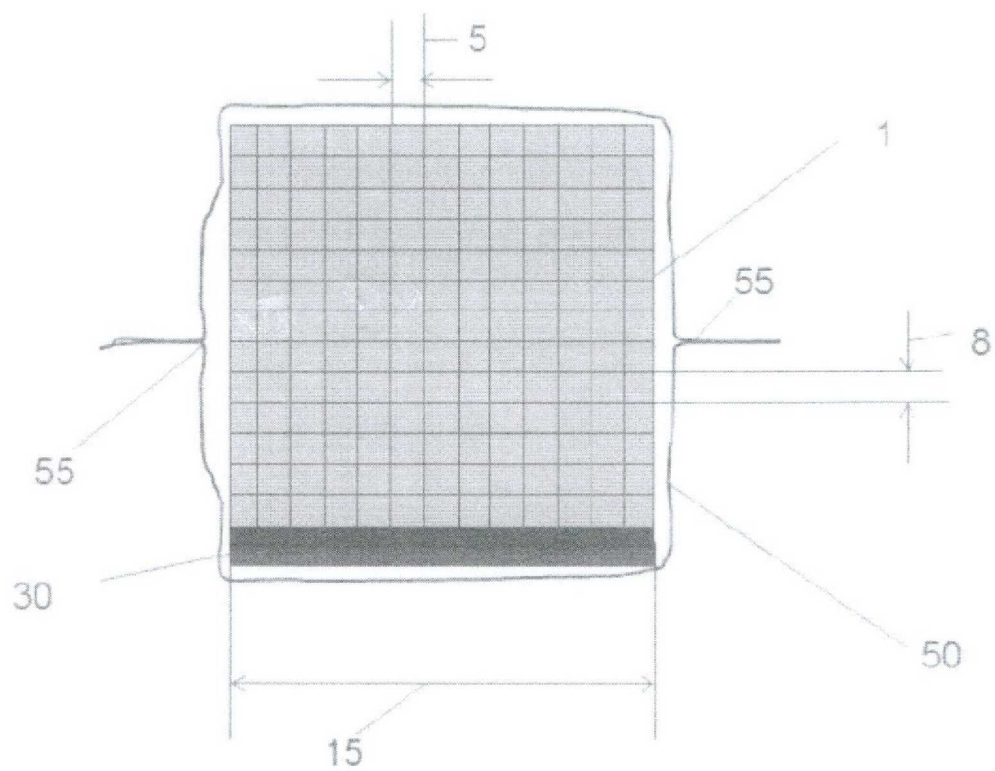


Fig. 5

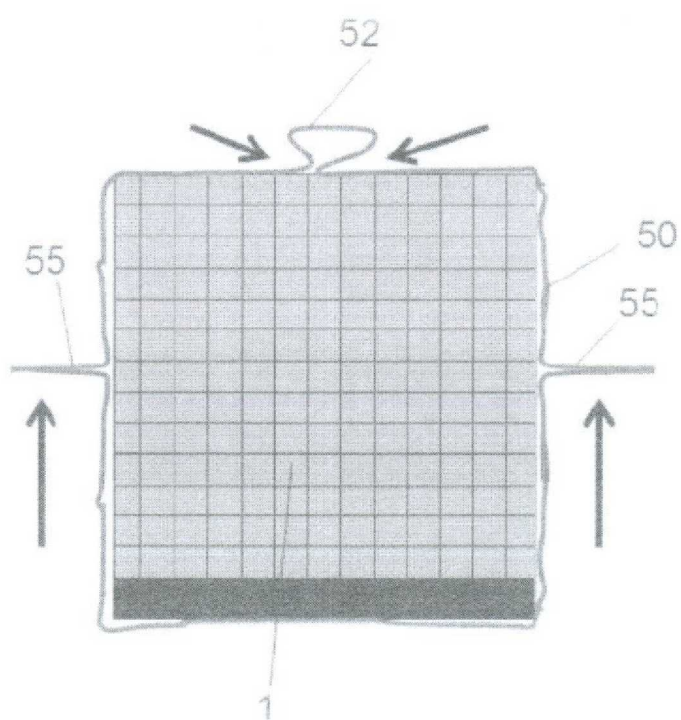


Fig. 6

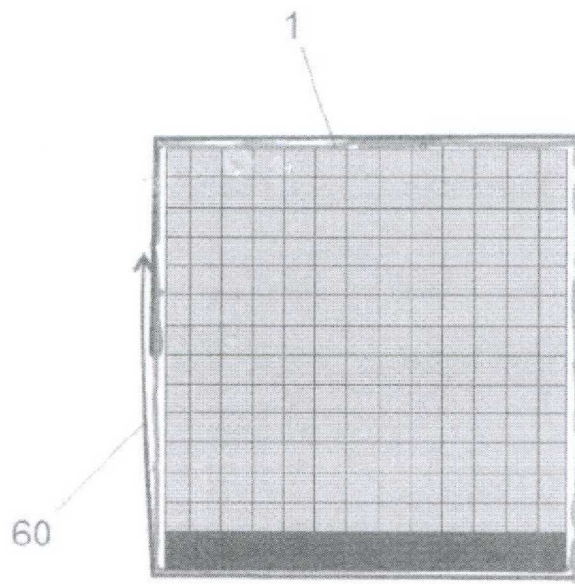


Fig. 7

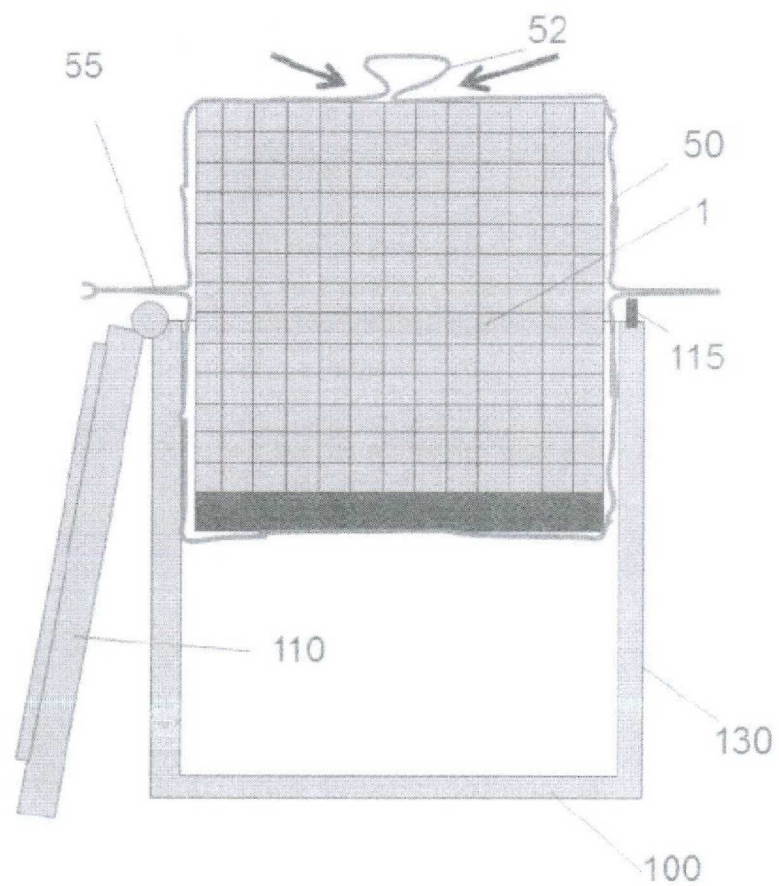


Fig. 8

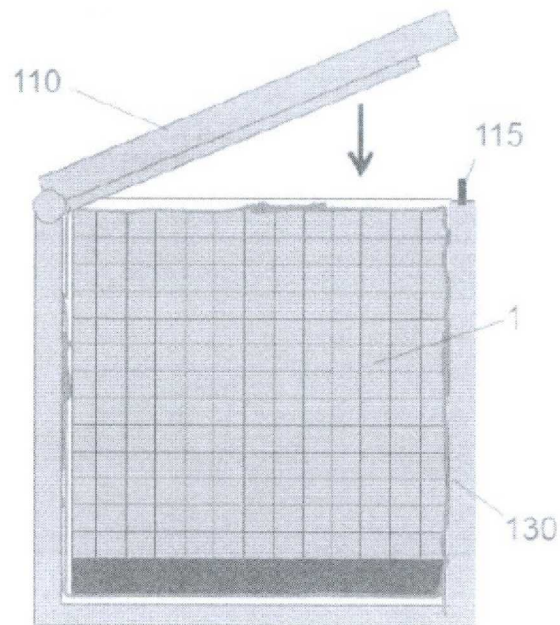


Fig. 9

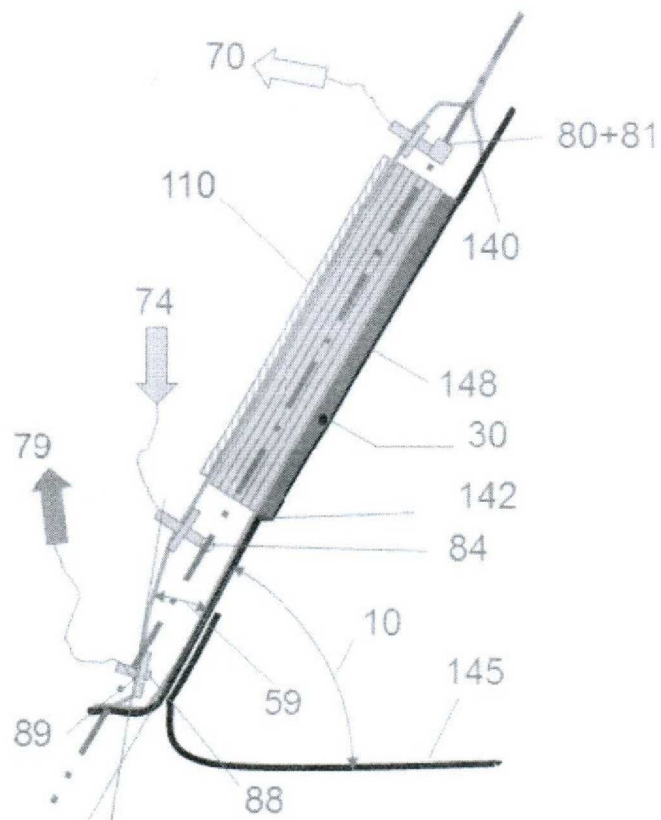


Fig. 10

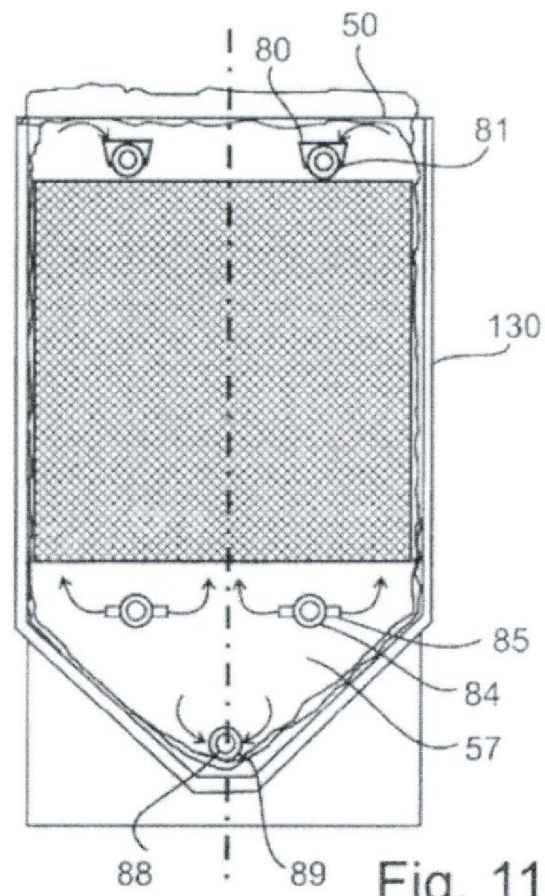


Fig. 11

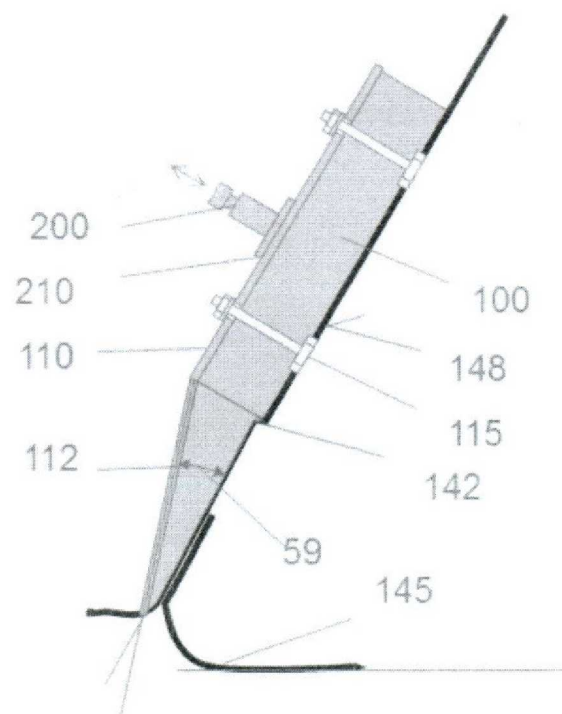


Fig. 12

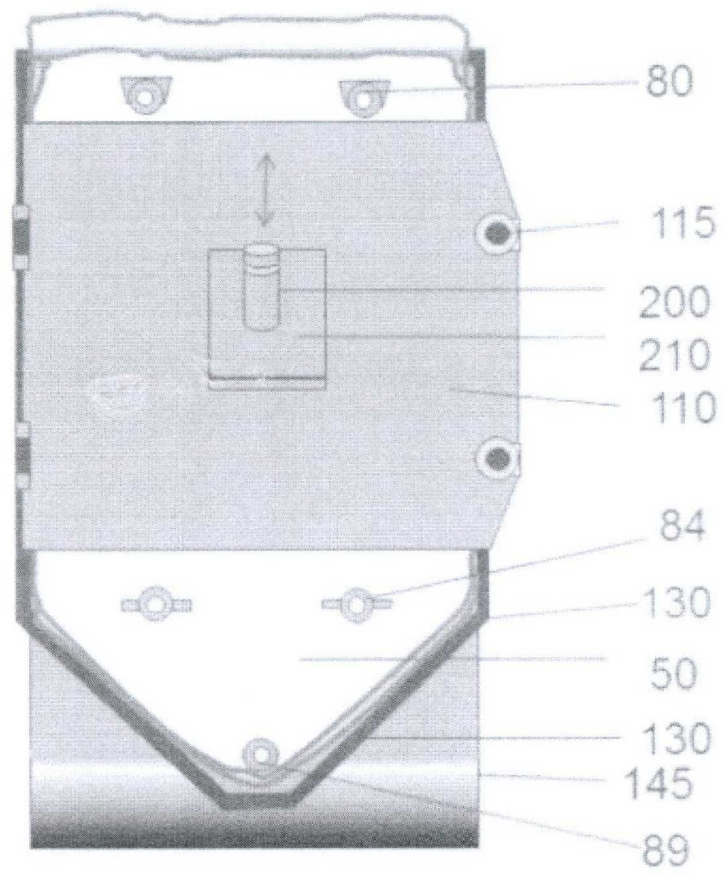


Fig. 13

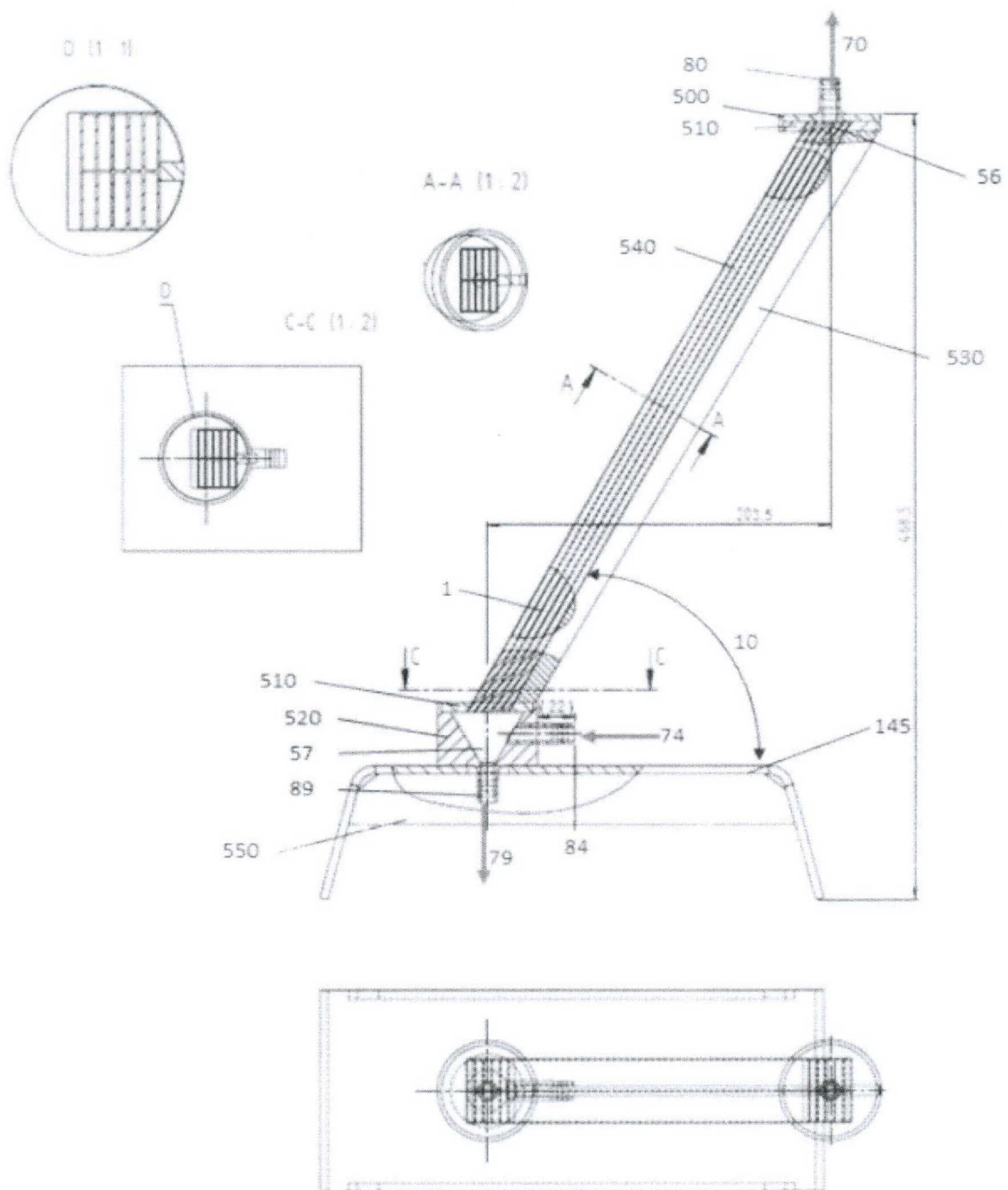


Fig. 14

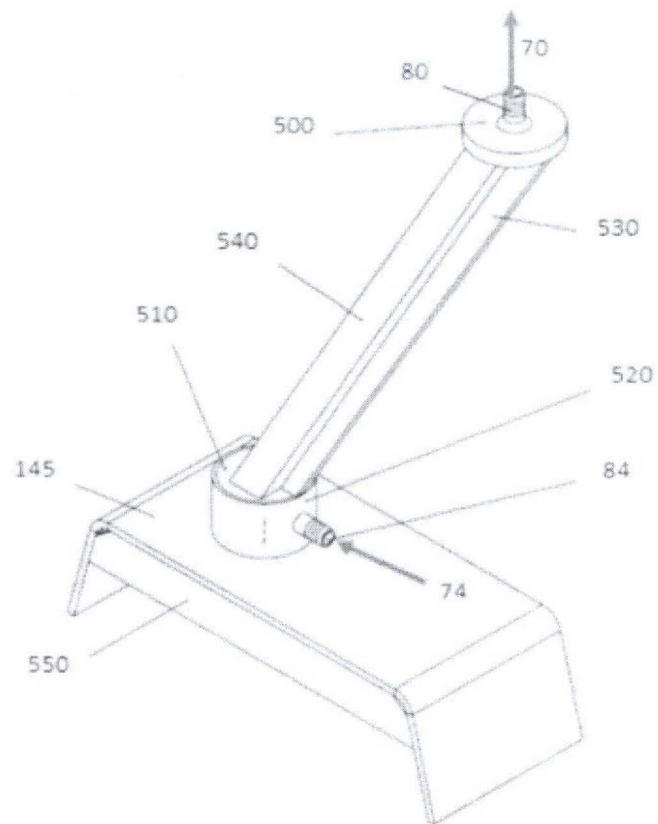


Fig. 15

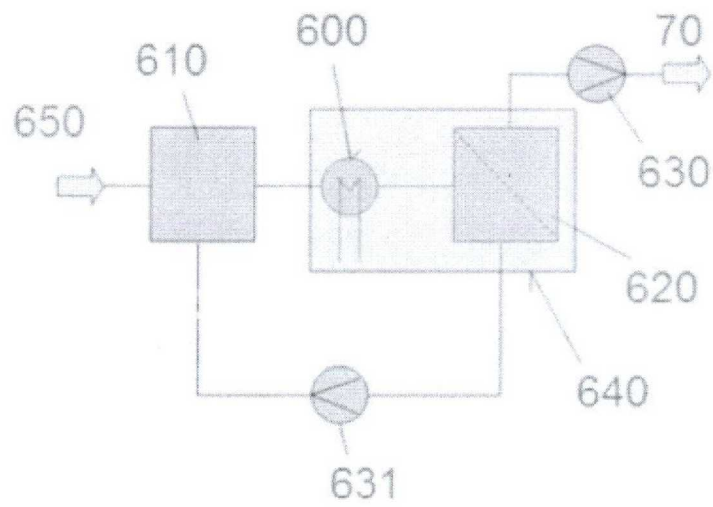


Fig. 16