

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 147**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/08** (2006.01)

**C12M 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2013 PCT/EP2013/053393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO2013124329**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2013 E 13706481 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2817405**

54 Título: **Separador desechable para la retención y la realimentación de células**

30 Prioridad:

**20.02.2012 EP 12001121**

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

**09.06.2017**

73 Titular/es:

**BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)**

**Kaiser-Wilhelm-Allee 1**

**51373 Leverkusen, DE**

72 Inventor/es:

**PASTOR, ANDRE;**

**SELETZKY, JURI;**

**BROD, HELMUT;**

**KAULING, JOERG y**

**COMMER, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 616 147 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Separador desechable para la retención y la realimentación de células

En la presente memoria se describe un separador de sólidos de canal inclinado con paquete de láminas para la retención de sólidos de una mezcla de reactor de acuerdo con la reivindicación 1.

5 El cultivo de células vegetales y animales tiene gran importancia en la fabricación de sustancias biológicamente activas y productos farmacéuticamente activos. En particular el cultivo de células, que se realiza con frecuencia en un medio de cultivo en suspensión libre es exigente, porque las células en oposición a los microorganismos son muy insensibles en cuanto a un esfuerzo de cizallamiento mecánico y abastecimiento insuficiente de medios de cultivo.

10 En la mayoría de los casos se cultivan líneas celulares animales y vegetales intermitentemente. Esto tiene el inconveniente de que un abastecimiento de las células óptimo a consecuencia de las concentraciones de sustrato, producto y biomasa continuamente variables solamente puede alcanzarse con dificultad. Al final de la fermentación además se enriquecen productos secundarios, p.ej. componentes de células muertas, que en la mayoría de los casos han de eliminarse con gran esfuerzo en el tratamiento posterior. Por las razones mencionadas, particularmente también en la fabricación de productos inestables, que pueden resultar dañados p.ej. mediante intervenciones proteolíticas se emplean por lo tanto biorreactores accionados de manera continua.

15 Con biorreactores continuos pueden alcanzarse altas densidades celulares y puede alcanzarse una productividad alta relacionada con ello, cuando se cumplen los siguientes requisitos:

- un abastecimiento de las células suficientes y con bajo cizallamiento con sustratos, particularmente el oxígeno liberado,
- 20 • una eliminación suficiente del dióxido de carbono originado en la respiración,
- un sistema de retención celular efectivo, de bajo cizallamiento, seguro ante la obturación para el establecimiento de altas concentraciones celulares,
- la estabilidad de larga duración (esterilidad, hidrodinámica) del biorreactor y del sistema de retención.

25 Además del funcionamiento continuo puede emplearse un biorreactor con un sistema de retención celular eficiente p.ej. también para el cultivo de precultivos con densidades celulares particularmente altas. Se emplea entonces el sistema de retención celular de manera discontinua en el modo discontinuo repetido para retirar el sobrenadante de cultivo celular casi libre de biomasa. Después el reactor de precultivo puede llenarse de nuevo con medio de cultivo fresco, para llevar el cultivo de esta manera a densidades celulares superiores al funcionamiento simple intermitente.

30 Para que pueda alcanzarse una alta densidad celular (> 20 millones de células vivas por milímetro) en un biorreactor de funcionamiento continuo es necesaria una retención eficiente de las células. El grado de retención necesario depende en este caso de tasa de crecimiento de las células y de la tasa de perfusión  $q/V$  (caudal de medios  $q$  por volumen de biorreactor  $V$ ).

35 En el pasado se propusieron diferentes sistemas de retención celulares para biorreactores de funcionamiento continuo, que se disponen la mayoría de las veces fuera del biorreactor. La razón para ello es la fácil accesibilidad del sistema de retención celular para fines de mantenimiento y de limpieza.

Para que los daños de las células particularmente debido a un abastecimiento de oxígeno insuficiente y eliminación de dióxido de carbono fuera del biorreactor sean lo más pequeños posible son deseables sistemas de retención celulares con pequeños volúmenes de trabajo y periodos de permanencia relacionados con ello.

40 Además de filtros de membrana, aparatos que funcionan según el principio de la filtración de corriente transversal con membranas estacionarias y móviles, se emplean en el estado de la técnica centrifugadoras y separadores gravitacionales especiales en el estado de la técnica.

45 En el caso de la retención celular con ayuda de filtros de membrana se observan depósitos o suciedad, que pueden impedir un funcionamiento de larga duración fiable y sin mantenimiento. Los depósitos pueden reducirse cuando las superficies de membrana se cubren de flujo de manera suficientemente rápida. Esto puede alcanzarse en funcionamiento estacionario u oscilante. Un ejemplo para un sistema cubierta de flujo de manera oscilante es el sistema de flujo tangencial alternante (Alternating Tangential Flow ATF) de la empresa Refine Technologies Inc.). Sin embargo, el que las superficies de membrana se cubran rápidamente de flujo se opone a la condición básica para un cultivo celular con bajo cizallamiento.

50 Las centrifugadoras de bajo cizallamiento para la separación de células en el campo centrífugo funcionan solamente durante pocas semanas sin esfuerzo de mantenimiento y hacen necesario un cambio de los elementos de centrifugadora. Con ello se aumenta el riesgo de contaminaciones.

Los separadores gravitacionales empleados predominantemente en el cultivo de células son contenedores de

sedimentación y separadores de canal inclinado. Comparado con contenedores de sedimentación sencillos los separadores de canal inclinado en grandes escalas tienen la ventaja de un volumen considerablemente menor en relación con la superficie de separación. Una publicación previa (Henzler, H.-J., Chemie-Technik, 1, 1992, 3) describe la retención celular en separadores de canal inclinado, que pueden hacerse funcionar en contracorriente, corriente cruzada y corriente continua. La sección de canal transversal desbordada puede estar provista con placas o tubos. El documento WO1994026384 A1 reivindica el empleo de separadores de canal inclinado para la retención de células en separadores de corriente. En el documento WO2003020919 A2 se describen entre otros separadores de contracorriente y corriente cruzada, así como combinaciones con diferentes separadores previos (p.ej. hidrociclones) para la retención de células. Estos separadores de canal inclinado conocidos se fabrican de acero fino, y sus elementos se cortan, se tallan de manera laboriosa, se pulen de manera reluciente y se sueldan entre sí.

Los separadores de canal inclinado se conectan a través de un circuito externo al biorreactor. Para ello son necesarios conductos de manguera y bombas.

Para evitar la actividad metabólica y la adhesión de células en un separador gravitacional se propone enfriar el caldo de cultivo celular en su camino a los separadores gravitacionales. Una actividad metabólica reducida a baja temperatura es seguramente ventajosa en el caso de una permanencia más larga de las células fuera del biorreactor.

El documento WO2009152990(A2) describe un sistema de retención celular para la retención y realimentación de células en un recipiente por el que circula flujo que comprende una multitud de canales dispuestos unos junto a otros, en el que los canales forman un cilindro hueco vertical y están inclinados con respecto al eje longitudinal del cilindro huecos en ángulo  $\beta$  entre  $10^\circ$  y  $60^\circ$ . El recipiente por el que circula flujo puede ser un biorreactor o un recipiente conectado con un biorreactor para la retención y realimentación celular. Los canales están abiertos en el extremo inferior. En el extremo superior conducen hacia un espacio anular común, que dispone de al menos un conducto a través del cual pueden transportarse una corriente de cosecha desde el recipiente. En los canales se realiza la separación de células y solución de cultivo celular. Mediante la toma continua de la corriente de cosecha desde el biorreactor se aspira solución de cultivo celular y células hacia los canales. Las células sedimentan dentro de los canales dispuestos inclinados y resbalan como en los separadores de canal inclinado clásicos en la contracorriente hacia la corriente de cosecha de admisión de nuevo saliendo de los canales y permanecen por ello en el recipiente. La solución de cultivo celular separada de las células se transporta a través de los canales hacia el espacio anular por encima de los canales y finalmente desde el recipiente.

En el caso de la producción farmacéutica muy regulada se suprime un gran gasto de tiempo, técnico y de personal en la preparación de biorreactores y elementos de biorreactor limpios y esterilizados como p.ej. sistemas de retención celulares. Para evitar de manera segura contaminaciones cruzada en el caso de un cambio de producto en una instalación multiuso o entre dos lotes de producto, además de la limpieza se requiere una validación de limpieza muy complicada que debe repetirse dado el caso en el caso de una adaptación de proceso. Para la limpieza y esterilización de lotes convencionales, lote alimentado o fermentadores de perfusión de acero fino se emplean por lo general la técnica de limpieza in situ (Clean-in-Place CIP) en combinación con la técnica de vapor in situ (Steam-in-Place SIP) en las llamadas instalaciones firmemente entubadas. Para garantizar una estabilidad de larga duración suficiente en una dirección de proceso continua se usa también la técnica de autoclaves, que sin embargo requiere un transporte complicado de los reactores o elementos de reactor hacia la autoclave y solamente puede aplicarse en escalas de reactor comparativamente pequeñas. El peligro de la contaminación es particularmente crítico en el empleo de piezas de desgaste que envejecen, p.ej. árboles agitadores comprimidos, esterilización inadecuada o transporte de la instalación, la puesta en marcha o la unión de conductos de unión después del tratamiento en autoclave y la toma de muestras regular.

En el caso de instalaciones CIP/SIP utilizadas en el modo discontinuo o discontinuo alimentado, la avería en el uso de un reactor condicionada por los procedimientos de provisión, particularmente en el cambio de producto frecuente a consecuencia de los cortos periodos de utilización puede situarse en la magnitud de la disponibilidad de reactor.

Para cumplir con el requisito de un reequipamiento rápido y flexible de la instalación de producción, garantizando máxima limpieza y esterilidad, los conceptos para reactores desechables gozan en el mercado de un interés constantemente creciente.

Por lo tanto, partiendo del estado de la técnica se plantea el objetivo de facilitar un método eficiente para la retención y realimentación de células animales, particularmente humanas, y vegetales en un procedimiento de funcionamiento continuo o intermitente, que considere la sensibilidad de la células en cuanto al esfuerzo de cizallamiento mecánico y el suficiente abastecimiento de la células con medios de cultivo, que sea escalable a escalas muy grandes que cumpla con los requisitos de la técnica de mantenimiento, limpieza y esterilización de la industria farmacéutica, cuyo uso rebaje la complejidad y el riesgo de errores, y que posibilite con una utilización mínima de recursos un uso óptimo desde el punto de vista económico y ecológico (fabricación y eliminación) como sistemas desechables.

El objetivo anteriormente mencionado se resolvió mediante un separador de sólidos de canal inclinado con paquete de láminas para la retención de sólidos de una mezcla de reactor de acuerdo con la reivindicación 1.

El separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención comprende para la retención de particularmente células de una mezcla de biorreactor los siguientes elementos:

- 5 - una zona superior del separador de sólidos con uno o varios pasajes/instalaciones (80) para retirar una corriente de cosecha separada de las células (70) (=Harvest) de una zona de recolección de corriente de cosecha 56, conectada con
- una zona de separación formada por un paquete de láminas (1) de una placa con nervios de plástico con una o varias capas, que durante el funcionamiento está inclinada con un ángulo (10) de 30° a 80° con respecto a la horizontal, conectada con
- 10 - un segmento inferior del separador de sólidos con uno o varios pasajes o instalaciones (84) para la distribución de flujo de la mezcla de reactor (74), a través de una zona de recolección de sólidos (57) reducida hacia abajo de forma cónica o piramidal para recoger las células con ayuda de la gravedad.

De manera preferente la zona de recolección de sólidos (57) reducida hacia abajo, particularmente de forma cónica o piramidal, presenta un ángulo (58, 59) de 10° a 60° hacia la vertical. Los ángulos 58 y 59 pueden seleccionarse por separado.

- 15 Para posibilitar la realimentación la zona de recolección de sólidos (57) presenta uno o varios pasajes (89) o dado el caso instalaciones (88) para retirar las células. Ejemplo para instalaciones es una aspiración central.

Las placas con nervios de plástico de una capa o multicapas forman canales y el paquete de láminas 1 se compone preferentemente de una multitud de canales dispuestos unos junto a otros.

- 20 Los canales están abiertos en el extremo inferior y en el extremo superior. En el extremo inferior los canales conducen hacia la zona de recolección de sólidos 57 común reducida cónicamente hacia abajo. En el extremo superior conducen hacia una zona de recolección de corriente de cosecha 56 común, que dispone al menos de un pasaje 80 a través del cual la corriente de cosecha puede transportarse desde el recipiente.

- 25 En los canales de los separadores de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención se realiza la separación de células y solución de cultivo celular. Mediante la extracción continua de la corriente de cosecha del biorreactor se aspiran la solución de cultivo celular y células hacia los canales. Las células sedimentan dentro de los canales dispuestos inclinados y resbalan como en separadores de canal inclinado clásicos en la contracorriente hacia la corriente de cosecha de admisión de nuevo saliendo de los canales y se acumulan en la zona de recolección de sólidos 57 reducida cónicamente. Habitualmente la zona de recolección de sólidos 57 dispone de uno o varios pasajes/instalaciones 88/89, conectados con el biorreactor para la aspiración de las células acumuladas y
- 30 realimentación hacia el biorreactor.

Los canales del paquete de láminas 1 pueden tener una sección transversal cuadrada, elíptica, redonda o semiredonda (Fig 4).

El dimensionamiento de los canales (número, diámetro, longitud) depende en cada caso del tipo de células que van a retenerse, el tamaño del biorreactor y el caudal.

- 35 El ancho de canal  $d$  se sitúa preferentemente en  $d \geq 3$  mm, para impedir un atascamiento de los canales. En una forma de realización preferente se emplean canales con un ancho de canal de 3 mm a 100 mm, preferentemente de 4 mm a 20 mm, particularmente preferentemente de 3 -7 mm, para impedir de manera segura por un lado estados de bloqueo, pero por otro lado la relación de volumen que disminuye el rendimiento de espacio-tiempo del espacio de separador y biorreactor.

- 40 La superficie de separación  $A_{erf}$  necesaria resulta de la velocidad de sedimentación  $w_s$ , de la tasa de perfusión  $q/V$  (caudal de medios  $q$  por volumen de biorreactor  $V$ ) y el volumen de biorreactor según la ecuación 1. Un rendimiento  $\eta$  considera la disminución de potencia de separadores de canal inclinado con respecto a los separadores verticales (ecuación 2).

- 45 La superficie de separación teórica  $A_{th}$  en secciones transversales rectangulares y cilíndricas puede determinarse aproximadamente según los planteamientos publicados en la obra (H.-J. Binder, Sedimentieren aus Ein- y Mehrkornsuspensionen in schräg stehenden, laminar durchströmten Kreis- y Rechteckrohren, Dissertation Berlin, 1980) de las ecuaciones 3 y 4:

$$A_{erf} = \frac{\text{Tasa de perfusión} \cdot V}{w_s} \quad (\text{Ecuación 1})$$

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

$$\text{Rectángulo : } A_{th} \approx Z \cdot \text{sen}(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{Ecuación 3})$$

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

5 A este respecto son Z el número de los canales,  $\beta$  el ángulo, en el que los canales están inclinados con respecto a la dirección de la gravedad, d el diámetro interior y L la longitud de los canales.  $\pi$  es el número de círculo ( $\pi = 3,14159\dots$ ).

En el dimensionamiento de la longitud de canal debe considerarse el cumplimiento de condiciones de flujo laminares (número de Reynolds  $Re < 2300$ ).

10 La presión dinámica en el lugar de extracción de corriente de cosecha (=pasajes/instalaciones 80) debería ser en este caso al menos de 5 a 10 veces menor que la pérdida de presión en los canales, para descartar el fenómeno de la mala distribución que disminuye el rendimiento. Las pérdidas de presión suficientes en el caso de longitudes de canal a partir de 0,1 m pueden considerarse como técnicamente realizables, mientras que preferentemente se realizan longitudes de canal de 0,2 m a 5 m, particularmente preferentemente longitudes de canal de 0,4 m a 2 m.

15 Las longitudes cortas de canal L pueden llevar a problemas de distribución debido a las pérdidas de presión reducidas, lo que particularmente en la extracción de la corriente de cosecha desde la zona de recolección de corriente de cosecha 56 superior puede exigir un dispositivo de distribución para la reducción de las velocidades de retirada. Opcionalmente por lo tanto los pasajes/instalaciones 80 i 81 presentan para una retirada homogénea de la corriente de cosecha 70 (=Harvest) separada de las células de una zona de recolección de corriente de cosecha 56.

20 El separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención puede comprender habitualmente de 1 a  $10^6$  canales, preferentemente de 10 a 100.000, de manera particularmente preferente de 10 a 10.000. Los canales están distribuidos dado el caso a través de una o varias placas con nervios en un paquete de láminas 1 para la optimización de la demanda de espacio. De manera preferente el paquete de láminas 1 comprende de 1 a 400 placas con nervios, de manera particularmente preferente de 1 a 50 placas con nervios dependiendo de la escala.

25 La relación de ancho respecto a altura del paquete de láminas 1 que se compone de placas con nervios de una o varias capas incluyendo la placa de apoyo puede adaptarse. Los paquetes de láminas 1 con sección transversal cuadrada, cilíndrica rectangular o elíptica con una relación de altura respecto a ancho  $H/D$  de  $0,005 \leq H/D \leq 1,5$ , preferentemente  $0,02 \leq H/D \leq 1,2$ , particularmente preferentemente  $0,1 \leq H/D \leq 1,0$  se emplean de manera preferible.

De manera preferible la zona de separación presenta varias placas con nervios de plástico apiladas unas sobre otras, que forman un cuerpo base.

30 Alternativamente el paquete de láminas 1 puede formarse de una placa perfilada 340 o 320 (véase la figura 4). Una placa perfilada presenta preferentemente un lado liso y un lado con una serie de nervios y acanaladuras en distancias estables. Los canales se forman en el apilado de la placa en una o varias capas p.ej. sobre una placa de apoyo 30. En este caso las acanaladuras se cierran hacia el lado abierto en cada caso a través del lado liso de una capa adyacente o a través de la pared del estator. Existe igualmente la posibilidad de extruir un paquete de piezas o paquete de láminas en una o varias capas y unirlo a un paquete de láminas 1.

35 Una unión preferente de las placas con nervios se realiza mediante adhesión o soldadura. El paquete de láminas debería fijarse espacialmente en primera línea mediante la unión. Además se pretende mantener las denominadas zonas muertas (espacios no utilizados para la separación alrededor de las superficies externas de las placas con nervios) lo más pequeñas posible. En este caso sin embargo no es absolutamente necesario el evitar completamente estas zonas muertas. Como adhesivos son adecuados los componentes adhesivos adaptados a las propiedades de material y de superficie de los canales conocidos por el experto. En particular se emplean preferentemente adhesivos que están disponibles en el mercado en la categoría FDA requerida. Para la soldadura pueden aplicarse técnicas de unión térmicas como calor, láser, ultrasonido. Una técnica de unión particularmente preferida es la soldadura con rayo láser que puede aplicarse particularmente también en combinación con el recorte del paquete de láminas en un dispositivo adecuado para ello. La técnica de la soldadura posee la ventaja de que el número de los plásticos introducidos en el proceso farmacéutico no se aumenta mediante esta técnica de unión.

40 La geometría de los canales se fija mediante la relación de la altura de nervio  $h_s$ , con respecto al ancho de canal d. Las relaciones técnicamente realizables  $h_s/d$  - se sitúan según la propiedad (plasticidad, elasticidad, capacidad de embutición profunda) en el intervalo  $0,01 \leq h_s/d \leq 5$ . A este respecto ha de considerarse que ambas dimensiones  $h_s$  y d en cada caso deberían ser mayores que o iguales a 3 mm, o preferentemente son mayores que o iguales a 5 mm. Las relaciones preferidas  $h_s/d$  se sitúan en 0,5 a 5. Los anchos de nervios  $b_s$  se determinan mediante la estabilidad mecánica del material de lámina. Los anchos de nervios  $b_s$  deberían ser lo más pequeños posible para posibilitar elevadas superficies de separación por volumen de separador. Al mismo tiempo no deberían seleccionarse demasiado reducidas para poder permitir una unión por arrastre de forma con la capa inferior sin

variar la forma. En el caso de paquetes de láminas 1 extruidos, o en el caso de paquetes de láminas, que están contruidos de paquetes de piezas de láminas extruidos o placas con nervios pueden realizarse rigideces muy altas con anchos de nervios pequeños sin gran pérdida de la superficie de separación, de manera que esta forma de fabricación es preferida.

5 La placa perfilada puede realizarse mediante conformación directamente en la fabricación de placas o mediante unión (p.ej. con la técnica de adhesión) de una placa estampada o conformada en caliente o frío con una placa lisa. Las propiedades de material de la placa estampada y lisa pueden adaptarse a su diferente funcionalidad (buenas propiedades de deslizamiento y estabilidad de forma de la placa estampada, buenas propiedades de densidad de la placa lisa) de manera óptima, es decir mediante la selección de un material adecuado, conocido por el experto en la materia con calidad de superficie correspondiente.

10 Habitualmente se cortan en la longitud adecuada o se fabrican y después se fijan unas sobre otras placas con nervios de plástico disponibles en el mercado, asequibles, y adecuadas para procesos farmacéuticos p.ej. de policarbonato como paquetes de piezas de láminas para la fabricación del paquete de láminas 1. Estas placas con nervios se extruyen como género al metro con geometría de canal acabada (superficie de sedimentación) y calidad de superficie lista para el uso. El recorte particularmente tronzado a la medida de longitud necesaria se realiza habitualmente mediante cortado por sierra p.ej. sobre una sierra circular. Habitualmente los nervios longitudinales sirven por un lado como carcasa del separador y por otro lado para la estabilización de los canales de flujo, y los nervios transversales sirven por un lado como carcasa del separador y forman por otro lado la superficie de separador.

15 El paquete de láminas construido de placa con nervios de plástico está realizado o bien como paralelepípedo recto (Fig.3), siendo el plano de las aberturas de canal en ángulo recto con respecto a la superficie de apoyo del paquete de láminas 1, o como paralelepípedo no perpendicular (Fig. 2), situándose las aberturas de canal en el estado montado en un plano horizontal. La última solución es preferida para impedir un gradiente de concentración provocado por la sedimentación hacia las aberturas inferiores de canal. Los canales se alimentan de corriente por la mezcla de reactor de manera equilibrada, dado el caso con ayuda de distribuidores horizontales 85.

20 En una primera forma de realización (Fig. 1 a 13) los elementos del separador de sólidos de canal inclinado desechable de acuerdo con la invención están montados en una bolsa de plástico que puede esterilizarse por rayos gamma, por la que puede circular el flujo. En el segmento superior de la zona central de la bolsa de plástico está introducido el paquete de láminas 1 de una placa con nervios de plástico con una o varias capas. La bolsa de plástico delimita además la zona de recolección de corriente de cosecha 56 y zona de recolección de sólidos reducida cónicamente, presentando la zona de recolección de sólidos 57 preferentemente un ángulo 58, 59 de 10° a 60° hacia la vertical. En el segmento inferior de la zona central de la bolsa de plástico los pasajes o instalaciones 84 presentan un distribuidor horizontal 85 para la distribución de flujo horizontal homogénea de la solución de cultivo celular (=feed) 74 a través de una superficie de introducción 510.

25 El objetivo anteriormente mencionado se resuelve en esta forma de realización mediante un separador de sólidos de canal inclinado desechable para la retención y realimentación de células desde una mezcla de biorreactor que comprende una bolsa de plástico por la que puede circular el flujo, que puede esterilizarse con rayos gamma con las siguientes instalaciones:

- 30 - en la zona superior de la bolsa de plástico uno o varios pasajes/instalaciones 80 para retirar de una zona de recolección de corriente de cosecha 56 una corriente de cosecha 70 separada de las células (=Harvest)
- 35 - en el segmento superior de una zona central de la bolsa de plástico una zona de separación formada por un paquete de láminas 1 de placas con nervios de plástico con una o varias capas, que durante el funcionamiento está inclinada con un ángulo ( $10 = \beta$ ) de 30° a 80° con respecto a la horizontal,
- 40 - en el segmento inferior de la zona central de la bolsa de plástico uno o varios pasajes o instalaciones 84 para la distribución de flujo de la mezcla de reactor (74) de manera opcional con distribuidores horizontales 85 para la distribución de flujo horizontal homogénea de la solución de cultivo celular (=Feed) 74 a través de una superficie de introducción 510,
- 45 - en la zona inferior de la bolsa de plástico una zona de recolección de sólidos 57 reducida hacia abajo de forma cónica o piramidal para la recolección de las células con ayuda de la gravedad. Habitualmente la zona de recolección de sólidos 57 presenta uno o varios pasajes 89 o instalaciones 88 para retirar las células.

50 La zona superior de la bolsa de plástico puede estar también reducida hacia arriba.

Habitualmente la bolsa de plástico se realiza de un material de polímero transparente de una o varias capas de manera que se hace posible mirar dentro del dispositivo durante el funcionamiento. El material de polímero permite, en el caso de grosores de película habitualmente bajos de s «1 mm aparatos con un porcentaje en masa comparativamente pequeño. Es rentable de crear y de tratar, lo que es muy adecuado para la construcción de sistemas desechables. La eliminación de los separadores usados y el uso de un nuevo separador desechable son por tanto más económicos que la limpieza de dispositivos de separación usados, particularmente dado que durante el uso de separadores desechables se omite una limpieza cara con agua para inyecciones (Water for Injections, WFI) y se omite la validación de limpieza que requiere mucho tiempo. El separador de acuerdo con la invención se

embala preferiblemente de manera estéril.

5 Como materiales para la bolsa de plástico son adecuados particularmente los materiales y combinaciones de material empleados para las bolsas de transporte (sachets) mencionadas en el documento de patente US 6,186,932 B1 en las columnas 2 y 3. También los espesores de pared allí expuestos pueden transferirse al dispositivo de separación de acuerdo con la invención.

En una forma de realización preferente las paredes de la bolsa de plástico se componen de un material de compuesto de lámina conocido por el experto de dos o más capas (laminado o co-extruido), para mejorar las propiedades de la bolsa de plástico en cuanto a comportamiento de apertura, comportamiento de expansión, difusión de gas, estabilidad, compatibilidad de proceso (absorción mínima de productos y células) y soldabilidad.

10 En el dimensionamiento de la longitud de canal ha de considerarse el cumplimiento de condiciones de flujo laminares (número de Reynolds  $Re < 2300$ ). La longitud de canal L se rige según la longitud de la dimensión interior de bolsa disponible (= longitud de la bolsa LK). La longitud LK de la bolsa que va a realizarse se rige según el estado de carga que va a realizarse en la bolsa de plástico y según las presiones hidrostáticas que van a realizarse en la bolsa de plástico. Las presiones hidrostáticas demasiado grandes pueden reproducirse dado el caso en alojamientos dimensionados de manera correspondiente, sin contacto con el producto y por lo tanto reutilizables.

Habitualmente la longitud de los canales L asciende de 30 % a 95%, particularmente preferentemente de 60% a 90% de la longitud LK de la bolsa de plástico.

20 El separador de sólidos de acuerdo con la invención con bolsa de plástico de láminas de polímero puede fabricarse por ejemplo según el procedimiento descrito en el documento US 6,186,932 B1, en el que deben adaptarse las costuras de soldadura. Ejemplos de realización para la fabricación de formas de realización preferidas del dispositivo de separación de acuerdo con la invención están descritas adicionalmente más adelante.

25 Los pasajes se fabrican habitualmente del mismo material del que se compone también la lámina en contacto con el producto para posibilitar con esta una soldadura impecable con la técnica de esterilización y resistencia. El material de película preferente en contacto con el producto es polietileno de diferentes grados de reticulación conocidos por el experto en la materia. Como láminas de revestimiento externo se utilizan según la aplicación y requisitos de procesos diferentes materiales conocidos por el experto en la materia con un punto de fusión aumentado con respecto a la lámina interna para el empleo de procedimientos de soldadura térmicos y/o propiedades mejoradas de resistencia y/o difusión.

30 Habitualmente las placas con nervios se fijan a una placa de apoyo 30, que ofrece apoyo y puede unirse para la colocación exacta con la bolsa de plástico mediante adhesión o soldadura.

En bolsas 3D (bolsas unidas por soldadura de 4 hojas continuas) pueden emplearse de manera favorable paquetes de láminas 1 con sección transversal cuadrada, cilíndrica rectangular o elíptica con una relación de altura respecto a ancho  $H/D$  de  $0,3 < H/D < 1,5$ , preferentemente  $0,6 < H/D < 1,2$ , particularmente preferentemente  $0,9 < H/D < 1,0$ .

35 Para las bolsas 2D más asequibles, más sencillas (de bolsas unidas por soldadura de dos hojas continuas) son adecuados paquetes de láminas planos con sección transversal rectangular relaciones  $H/D$  de  $0,005 < H/D < 1$ , preferentemente  $0,02 < H/D < 0,6$ , particularmente preferentemente de  $0,1 < H/D < 0,4$ . Según la altura del paquete de láminas para la producción de una bolsa 2D puede dejarse una determinada distancia entre el paquete de láminas y el comienzo del o los estrechamientos.

40 Para la fabricación del separador se preparan además en una lámina de plástico los pasajes e instalaciones adicionales en los lugares apropiados y dado el caso se montan.

A continuación, se suelda una bolsa de plástico 50 de la lámina de plástico, que encierra el paquete de láminas 1 en una bolsa de plástico 50 con costura de soldadura 55 (Fig. 5).

45 El paquete de láminas 1 incluida la placa de apoyo se comprime entonces habitualmente contra las superficies internas de la bolsa de plástico 50, para impedir la penetración de células entre bolsa de plástico 50 y paquete de láminas 1 e impedir por tanto el ensuciamiento.

50 En una primera forma de realización del procedimiento de fabricación la bolsa de plástico 50 se estira contra el paquete de láminas 1 (Fig. 5) y el pliegue formado 52 se presiona y se fija mediante una o varias cintas de fijación 60 de manera plana (Fig. 6). Como cinta de fijación es adecuada también una lámina de plástico, que se enrolla de manera tensa alrededor de la bolsa y paquete de láminas. Las propiedades favorables de estiramiento poseen p.ej. láminas para uso doméstico o láminas flexibles, delgadas de silicona. También una soldadura del paquete de láminas 1 con la pared de bolsa puede ser adecuada para la fabricación de una unión compacta entre bolsa y paquete de láminas.

Para el funcionamiento el dispositivo de acuerdo con la invención se orienta con un ángulo  $10 = \beta$  respecto a la horizontal. El ángulo  $\beta$  se orienta según el comportamiento de descenso y resbalamiento de las células/sólidos y

## ES 2 616 147 T3

asciende durante el funcionamiento a  $30^\circ \leq \beta \leq 80^\circ$  con respecto a la horizontal. En una forma de realización preferente el ángulo  $\beta$  se sitúa de  $35^\circ$  a  $75^\circ$ , particularmente preferentemente de  $45^\circ$  a  $60^\circ$  con respecto a la horizontal.

5 Para garantizar el ángulo  $\beta$  durante el funcionamiento el separador de sólidos de acuerdo con la invención para el funcionamiento se fija sobre un bastidor 140 (Fig. 11 a 13).

Habitualmente el bastidor 140 comprende una base de bastidor 145 y un soporte 148 con un ángulo 10 predefinido ( $= \beta$ ) con respecto a la superficie de colocación. Sobre el soporte 148 se sujeta el paquete de láminas 1

10 Incluyendo la placa de apoyo 30 con ayuda de un saliente 142 y /o tapas 110 así como elementos de fijación 115 a una altura predefinida, para que tanto la zona de recolección de corriente de cosecha 56 (arriba) y la zona de recolección de sólidos 57 durante el funcionamiento puedan descansar lo más lisas posibles sobre el soporte. Por tanto se evitan se reducen los espacios muertos y ensuciamiento correspondiente.

En una forma de realización preferente el bastidor 140 dispone de una carcasa 100 y una tapa 110 para el alojamiento del paquete de láminas 1.

15 En este caso el proceso de estiramiento también puede tener lugar durante el montaje del separador de sólidos de acuerdo con la invención sobre el bastidor 140 y particularmente en la carcasa 100 y tapa 110 (Fig. 6 y 7) dado el caso también sin involucrarse con una cinta de fijación 60. A este respecto la bolsa de plástico 50 con ayuda de la carcasa 100 se mantiene en la posición sobre la placa de apoyo 30 y el paquete de láminas 1 y se ejerce presión sobre el pliegue 52 con ayuda de la tapa 110 contra el paquete de láminas 1. Preferiblemente la tapa 110 está fijada en la carcasa 130 en un lado p.ej. mediante bisagras y en el otro lado mediante uno o varios elementos de fijación  
20 115 que pueden cerrarse. Con ello el bastidor 140 puede accionarse de manera más sencilla para la puesta en marcha del separador de sólidos de acuerdo con la invención.

25 En una forma de realización preferente la tapa 110 dispone de una prolongación 112 y /o un marco 130, que mantiene constante la zona de recolección de sólidos 57 reducida cónicamente en su forma, particularmente el ángulo 59 e impide su expansión en el estado lleno durante el funcionamiento. Un contenedor tal adaptado a la forma es ventajoso entre otros para el funcionamiento del sistema en el caso de fuerzas hidrostáticas mayores, tal como han de esperarse en la conexión con grandes biorreactores.

El separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención está realizado preferentemente como artículo desechable para evitar la problemática de la limpieza.

30 El almacenamiento de los separadores de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención no ocupa mucho espacio dado que pueden apilarse sin problemas unos sobre otros y hasta que no se ponen en marcha pueden colocarse con el ángulo adecuado. Pueden conectarse y operarse fácilmente fuera de un biorreactor.

35 En una forma de realización adicional (Fig. 14 y 15) la zona superior del separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención es un colector, que se fabrica por ejemplo de una pieza con racor de empalme mediante mecanizado por arranque de virutas de una probeta no entallada particularmente de policarbonato como Makrolon® en un torno. Un método adicional que es adecuado en primera línea en el caso de grandes números de piezas es el procedimiento de moldeo por inyección. El colector presenta pasajes (80), al menos un pasaje para retirar una corriente de cosecha separada de las células (70) (=Harvest) conectada con la zona de recolección de corriente de cosecha 56. La zona de recolección de corriente de cosecha 56 se forma por un rebaje en el colector que desemboca en el pasaje 80 para retirar una corriente de cosecha separada de las células (70). La sección transversal de este rebaje es habitualmente redondo o cuadrangular. De manera preferente está adaptada al tamaño de la abertura de la placa de inserción superior y con ello a las dimensiones de borde del cuerpo base de la placa con nervios. La altura del rebaje se adapta por lo que respecta a minimizar el volumen muerto y optimización de la conducción de flujo. Ascende habitualmente 1 a 5 mm. Este rebaje puede tener también forma de embudo.

45 En esta forma de realización se introduce el extremo superior y el inferior del cuerpo base de placa con nervios y se pega en las denominadas placas de inserción. También las placas de inserción se fabrican habitualmente mediante mecanizado por arranque de virutas en un torno o fresadora o en el procedimiento de moldeo por inyección. Son preferiblemente del material del colector. Presentan una abertura cuadrangular preferiblemente con un ángulo predefinido para insertar los extremos inferiores y superiores del cuerpo base de placa con nervios. Son habitualmente redondas.

50 De manera preferible un embudo forma el segmento inferior y la zona de recolección de sólidos (57), que presenta uno o varios pasajes 89 para retirar los sólidos. El embudo se fabrica habitualmente con un racor de empalme inferior mediante mecanizado por arranque de virutas en un torno o en el procedimiento de moldeo por inyección. Es preferiblemente del material de las placas de inserción. La zona superior des embudos presenta uno o varios pasajes o instalaciones 84 para la distribución de flujo homogénea de la solución de cultivo celular (=Feed) 74 a través de una superficie de introducción 510. El distribuidor horizontal opcional puede formarse por dos o más talados situados enfrentados habitualmente distribuidos geoméricamente, en los que se pegan conexiones. El embudo se pega con la placa de inserción inferior.  
55



De manera preferente la zona de recolección de sólidos (57) reducida hacia abajo, particularmente de forma cónica o piramidal presenta un ángulo (58, 59) de 10° a 60° con respecto a la vertical. Los ángulos 58 y 59 pueden seleccionarse por separado.

5 Para la estabilidad mecánica del separador de sólido de canal inclinado habitualmente el colector, las placas de inserción y el embudo son resistentes a la flexión.

De manera preferible el cuerpo base de placa con nervios se estabiliza mediante una brida de refuerzo. La brida de refuerzo se coloca mediante adhesión con el cuerpo base de placa con nervios, así como en la placa de inserción superior e inferior y garantiza una mecánica del separador de sólidos de canal inclinados suficiente.

10 En comparación con los separadores de canal inclinado de acero fino del estado de la técnica, en los separadores de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención (=separador de placas de plástico) se omite la fabricación laboriosa del cuerpo base (mecanizado por arranque de virutas, numerosas etapas de soldadura, así como el electropulido reluciente). La soldadura complicada se sustituye por un sencillo pegado. La fabricación de acuerdo con la invención separadores de canal inclinados no requiere atornillado ni obturación. En total en la fabricación del separador de placas de plásticos se alcanza en comparación con los separadores de canal inclinado de acero fino considerables ventajas de costes de material y tiempo.

Este separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención se fabrica habitualmente de la manera siguiente:

- 20 a. recortar, particularmente serrar el cuerpo base de placa con nervios,  
 b. desbarbar y limpiar el cuerpo base de placa con nervios,  
 c. fabricar los siguientes componentes:
- 1) embudo
  - 2) dos placas de inserción
  - 3) colector
  - 4) De manera preferible una brida de refuerzo
- 25 d. introducir a ambos lados el cuerpo base de placa con nervios en las placas de inserción, y pegar preferiblemente con un adhesivo de curado UV como p.ej. Loctite 3211,  
 e. pegar la placa de inserción superior con el colector,  
 f. pegar placa de inserción inferior con el embudo,  
 g. colocar y pegar la brida de refuerzo.

30 Para el funcionamiento se realiza habitualmente una fijación del separador de sólidos de canal inclinado sobre una consola.

35 Condicionada por la construcción de plástico y el peso reducido por ello es suficiente según el tamaño para su colocación en vertical una consola de acero fino reutilizable. Para un separador de canal inclinado de tamaño habitual (superficie de separador de 0,15 m<sup>2</sup>) se alcanzó un peso total incluyendo la consola de aproximadamente 4 kg (comparado con acero fino del mismo tamaño aproximadamente 40 kg). Por tanto el separador de canal inclinado de acuerdo con la invención desechable puede transportarse fácilmente y por lo tanto no requiere ningún bastidor de transporte móvil.

40 Habitualmente los separadores de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención en un biorreactor p.ej. en biorreactor desechable como se describe en el documento US 2009-0180933 se acoplan externamente mediante conductos de manguera. El abastecimiento del separador de acuerdo con la invención se garantiza mediante al menos dos bombas, preferentemente bombas de manguera de bajo cizallamiento (Fig. 18). Las bombas posibilitan la extracción de la solución de cultivo celular del espacio de biorreactor, su alimentación tras el enfriamiento mediante un intercambiador de calor hacia el dispositivo de separación, la extracción de la corriente de cosecha del dispositivo de separación y transporte de retorno de la corriente de sólido (=Return 70) hacia el biorreactor. Las superficies de separación necesarias se orientan según las propiedades de sedimentación de las células, así como las tasas de perfusión y concentraciones celulares pretendidas. Las tasas de perfusión preferidas se sitúan en el intervalo de 0,1 a 40 1/día, particularmente preferidas de 0,5 a 20 1/día. Las superficies de separación preferidas por volumen de biorreactor se sitúan je según las propiedades de sedimentación de las células (dependiendo de la concentración, tamaño y tendencia a la aglomeración de las células) en el intervalo de 0,1 a 100 m<sup>2</sup>/ m<sup>3</sup> particularmente preferido de 2 a 20 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.

55 Los procedimientos descritos permiten la fabricación sencilla y rentable del separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención para la retención y realimentación de células. Mediante la configuración que puede variar en amplios límites de los paquetes de láminas la geometría del dispositivo posterior puede fijarse de manera sencilla y exacta y en oposición a los sistemas de acero fino también facilitan biorreactores muy grandes. Los procedimientos descritos permiten particularmente la fabricación asequible de elementos desechables mediante cuyo empleo puede reducirse a un mínimo su gasto para facilitar el sistema de retención que se limpia según los principios farmacéuticos.

5 El empalme con los fermentadores se realiza mediante acopladores de esterilización fijados al extremo de los conductos de manguera (firma Pall, firma Sartorius, firma Coulter) dentro o fuera de las cabinas de flujo laminar, preferiblemente sin embargo mediante soldadura de mangueras. Los conductos de manguera fijados a los separadores de sólidos de acuerdo con la invención por lo tanto están equipados preferentemente – al menos  
 10 parcialmente - con un elemento de manguera adecuado para la soldadura de manguera. Además habitualmente los conductos de manguera para el transporte de la suspensión contienen al menos dos elementos de manguera especiales que pueden cargarse de manera intensa mecánicamente (p.ej. de manguera de elastómero Verderprene de la firma Verder), que pueden insertarse de manera no invasiva en bombas de manguera sin poner en peligro la esterilidad de los separadores. El empalme, el funcionamiento y el mantenimiento no presentan ningún problema. La  
 15 realización del dispositivo de acuerdo con la invención o partes del dispositivo de acuerdo con la invención como elemento desechable elimina los problemas de limpieza.

Para la mejora del comportamiento de resbalamiento de las células en los canales des paquete de láminas y en las paredes internas de la zona de recolección de sólidos reducida cónicamente el dispositivo puede vibrar con medios adecuados, por ejemplo, vibradores neumáticos o eléctricos.

15 Un empleo directo del paquete de láminas 1 en biorreactores aerobios es concebible en principio cuando las burbujas de gas de las aberturas de acceso necesarias para la gasificación pueden mantenerse alejadas. De manera preferente el separador de acuerdo con la invención sin embargo está previsto para el uso fuera de un biorreactor.

20 El objeto adicional de la presente invención es una instalación de biorreactor que se compone de un biorreactor y uno de los separadores de sólidos de canal inclinado descritos de acuerdo con la invención de acuerdo con la reivindicación 1.

De manera preferente el biorreactor es un reactor desechable, particularmente un reactor descritos en el documento US 2009-0180933.

25 La instalación de biorreactor es por ejemplo un reactor de perfusión, que puede hacerse funcionar de manera conocida. El medio de cultivo se alimenta continuamente al biorreactor, y el sobrenadante de cultivo celular bajo en células se evacúa continuamente. El reactor de perfusión puede hacerse funcionar con tasas de perfusión  $q/V$  (caudal de medios  $q$  por volumen de biorreactor  $V$ ), cuando esto sea útil biológicamente y se facilite una superficie de separación suficiente. En este caso la circulación por el separador se realiza de manera continua.

30 Igualmente el reactor de perfusión puede hacerse funcionar de tal manera que un cultivo puede crecer primeramente de manera intermitente. Cuando el medio se ha utilizado tanto que ya no es posible una producción de biomasa reseñable, a través de los separadores de células externos se retira sobrenadante de cultivo, que casi no tiene biomasa. El espacio obtenido en el biorreactor espacio puede utilizarse entonces para alimentar medio de cultivo fresco, por lo que se facilitan un crecimiento posterior y por tanto una productividad de biomasa global más alta (como continuo repetido). En este caso la circulación del separador celular se realiza de manera intermitente. Este  
 35 procedimiento se ofrece por ejemplo para precultivos, con los que deben inyectarse biorreactores muy grandes, dado que puede aumentar la productividad de reactores de precultivos existentes.

Para el funcionamiento en biorreactores se prefiere un flujo continuo del separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la invención.

40 El biorreactor o reactor de perfusión puede emplearse para el cultivo de células que crecen in vitro y en suspensión libre o en microportadores. A las células preferidas pertenecen protozoos, así como células eucariotas adhesivas y no adhesivas de origen humano (neuronas, células de sangre o de tejido, así como células madre de origen embrionario o adulto), animal o vegetal, que p.ej. mediante modificación tecnogenética están capacitados para producir principios activos farmacéuticos especiales como virus, proteínas, enzimas, anticuerpos, neuronas, células de tejido o estructuras de diagnóstico. De manera particularmente preferentemente para la producción de alto  
 45 rendimiento farmacéutica se emplean células adecuadas, por ejemplo cilióforos, células de insectos, células de riñón de hámster (Baby Hamster Kidney, BHK), células de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary CHO), células HKB (mediante la fusión de línea celular humana HEK 293 con la línea celular 2B8 de linfoma de Burkitt humana), células híbridomas así como células madre.

50 En una forma de realización alternativa de la instalación, uno de los separadores de células descritos de acuerdo con la invención está conectado, en el funcionamiento realizado de manera intermitente tras la finalización de la fermentación antes de la separación celular, con un biorreactor adicional o un tanque de cosecha con el fin de reducir la masa celular que va a aplicarse sobre los filtros y por tanto sus superficies de filtro necesarias.

55 El procedimiento para la retención y realimentación de sólidos, particularmente células, se realiza en el separador de sólidos de canal inclinado por el que se circular, alimentado al separador de sólidos de canal inclinado de manera continua o intermitente agente que contiene sólidos y evacuando agente libre de sólidos, en el que domina una velocidad de flujo que permite garantizar estados de flujo laminares según  $Re < 2300$ , con lo que se evita una resuspensión que disminuye la eficiencia de las células separadas contra el campo gravitacional terrestre.

El número de Reynolds  $Re$  puede calcularse según la ecuación 7 de la velocidad de flujo  $w$  determinada por la sección transversal, la viscosidad cinemática  $\nu$  del medio que fluye y el diámetro interior  $d$  de un canal:

$$Re = (w \cdot d / \nu) \quad (\text{Ecuación 7})$$

5 En canales inclinados, en las paredes internas de canal domina una velocidad de flujo más baja que en los centros de canal. Las células sedimentan en los canales y resbalan en el lado inferior de los canales contra la dirección de flujo de los extremos de canal inferiores. La solución de cultivo celular liberada por las células sale a través de los canales hacia una zona de recolección de corriente de cosecha 56 que está dispuesta por encima de los canales, y finalmente se transporta fuera del recipiente.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención puede realizarse preferiblemente fuera de un biorreactor. Para ello la solución de cultivo celular con células se transporta desde el biorreactor hacia el separador celular de acuerdo con la invención. De manera preferente las células se enfrían antes de la entrada en el separador en un recipiente externo para ralentizar el metabolismo y contrarrestar por tanto un abastecimiento insuficiente que disminuye la productividad de las células. En la suspensión enfriada no es necesario un abastecimiento de oxígeno de las células sedimentarias. En la mayoría de los casos un enfriamiento de la solución de cultivo celular a la temperatura ambiente de los separadores es totalmente suficiente, de manera que además del efecto de metabolismo necesario deseado se evitan de manera segura flujos de convección. Para el control del abastecimiento suficiente de las células el separador puede estar equipado con al menos un sensor desechable p.ej. para la medición de la concentración de oxígeno y/o del valor pH. Un alojamiento de los sensores es posible tanto en las paredes como en el conducto de conexión con el biorreactor o los recipientes de cosecha.

En la retención y realimentación sobre las células actúan solo fuerzas de cizallamiento moderadas que la mayoría de las veces son muy compatibles con las células. Las células en el dispositivo de separación se mantienen a la temperatura de fermentación o un nivel de temperatura rebajado y se da el abastecimiento con medios de cultivo.

25 A continuación se explican con más detalle ejemplos de realización de la invención mediante los dibujos sin limitar por ellos la invención.

Fig. 1 representación esquemática del separador de sólidos desechable de acuerdo con la invención con paquete de láminas.

Fig. 2 representación esquemática de un paquete de laminilla 1 (corte longitudinal)

Fig. 3 representación esquemática de un paquete de láminas 1 (corte longitudinal)

30 Fig. 4 esquema de la estructura de diferentes paquetes de láminas (sección transversal AA' de Fig. 3)

Fig. 5 esquema de la instalación de la bolsa de plástico 50 en un paquete de láminas 1 (sección transversal AA' de Fig. 3)

Fig. 6 y Fig. 7 estiramiento y fijación de la bolsa de plástico 50 en un paquete de láminas 1 (sección transversal)

35 Fig. 8 y Fig. 9 estiramiento y fijación alternativa de la bolsa de plástico 50 en un paquete de láminas 1 con ayuda de marco 130 y tapa 110 (sección transversal)

Fig. 10 vistas laterales de los separadores de sólidos de acuerdo con la invención con paquete de láminas 1 en el bastidor 140.

Fig. 11 vistas frontales de los separadores de sólidos de acuerdo con la invención con paquete de láminas 1 en el bastidor 140.

40 Fig. 12 cortes longitudinales de los separadores de sólidos de acuerdo con la invención con paquete de láminas 1 en el bastidor 140 con marco 130 y tapa 110.

Fig. 13 vistas frontales de los separadores de sólidos de acuerdo con la invención con paquete de láminas 1 en su bastidor 140 con marco 130 y tapa 110.

45 Fig. 14 corte longitudinal de acuerdo con la invención separador de sólidos sobre su consola, vista desde arriba, secciones transversales (A-A, C-C) y aumentos (D).

Fig. 15 representación tridimensional esquemática de los separadores de sólidos de acuerdo con la invención en su consola

50 Fig. 16 esquema de procedimiento de un reactor de perfusión. Para reducir la actividad respiratoria de las células en la salida del biorreactor su temperatura se reduce a un nivel más bajo lo más directamente posible en un dispositivo de enfriamiento tras la retirada. De esta manera se impide que las células en los separadores de células permanezcan demasiado tiempo en un estado limitado de oxígeno, lo que podría perjudicar fisiológicamente a las células. En el ejemplo mostrado el separador 640 se compone de una bolsa de separador 620 y un dispositivo de enfriamiento 600 enfriado. Las corrientes de líquido entre biorreactor 610 y separador 640 se ajustan mediante las bombas 630 y 631 de bajo cizallamiento.

55 Otras conexiones de cables, p.ej. el posicionamiento de una de las dos bombas 630 y 631 en la salida del reactor son también concebibles.

**Lista de números de referencia:**

	1	paquete de láminas / superficie de separador
	5	ancho de nervio
	8	distancia entre placas
5	10	ángulo
	13	longitud
	15	ancho
	18	altura
	30	placa de apoyo
10	50	bolsa de plástico
	52	sobrenadante / pliegue
	55	costura de soldadura
	56	zona de recolección de corriente de cosecha
	57	zona de recolección de sólidos
15	58	ángulo
	59	ángulo
	60	cinta de fijación
	70	corriente de cosecha (Harvest)
	74	mezcla de biorreactor / Feed
20	79	realimentación
	80	pasaje
	81	inversor de flujo
	84	pasaje
	85	distribuidor horizontal
25	86	corriente de entrada
	88	aspiración central
	89	pasaje
	90	placa de conexión
	100	carcasa
30	110	tapa
	112	prolongación
	115	elemento de fijación
	130	marco
	140	bastidor
35	142	saliente
	145	base de bastidor
	148	soporte
	200	vibrador
	210	placa de montaje
40	<u>Perfil de un paquete de láminas</u>	
	311	paquete de láminas
	320	perfil rectangular
	321	paquete de láminas
	330	perfil redondo
45	331	paquete de láminas
	340	perfil redondo
	341	paquete de láminas
	350	perfil de 6 esquinas
	351	paquete de láminas
50	500	colector
	510	placas de inserción
	520	embudo
	530	brida de refuerzo
	540	cuerpo base de placa con nervios
55	550	consola
	600	dispositivo de enfriamiento
	610	biorreactor
	620	dispositivo de separación
	630, 631	bombas
60	640	separador = bolsa de separador + dispositivo de enfriamiento integrado dado el caso en el bastidor o contenedor.
	650	medio de cultivo

**REIVINDICACIONES**

1. Separador de sólidos de canal inclinado para la retención y la realimentación de sólidos de una mezcla de reactor, que comprende los siguientes elementos:
- 5 - una zona superior del separador de sólidos con uno o varios pasajes/instalaciones (80) para retirar una corriente de cosecha (70) (=harvest), separada de las células, de una zona de recolección de corriente de cosecha (56), conectada a
  - una zona de separación formada por un paquete de láminas (1) de una placa con nervios de plástico de una o varias capas, que durante el funcionamiento está inclinada con un ángulo (10) de 30° a 80° con respecto a la horizontal, conectada a
  - 10 - un segmento inferior del separador de sólidos con uno o varios pasajes o instalaciones (84) para la distribución de flujo de la mezcla de reactor (74), a través de
  - una zona de recolección de sólidos (57) reducida hacia abajo para la recolección de las células con ayuda de la gravedad,
- en el que la zona de recolección de sólidos (57) está reducida hacia abajo de forma cónica o piramidal.
- 15 2. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la zona de recolección de sólidos (57) presenta uno o varios pasajes (89) o instalaciones (88) para retirar los sólidos.
3. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que comprende al menos un sensor desechable en el espacio interior.
- 20 4. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la zona de separación se compone de una multitud de canales dispuestos unos junto a otros en el paquete de láminas (1).
5. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la relación de altura de nervio con respecto al ancho de canal  $hs/d$  asciende a  $0,01 \leq hs/d \leq 5$ , con la restricción de que ambas dimensiones  $hs$  y  $d$  en cada caso son mayores de o iguales a 3 mm.
- 25 6. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende una bolsa de plástico (50) que puede esterilizarse por rayos gamma por la que pasa el flujo, y dentro de la bolsa de plástico (50):
- en la zona superior de la bolsa de plástico (50) los pasajes/las instalaciones (80) para retirar de la zona de recolección de corriente de cosecha (56) una corriente de cosecha (70) separada de los sólidos,
  - 30 - en el segmento superior de una zona central de la bolsa de plástico (50) la zona de separación con paquete de láminas (1) de una placa con nervios de plástico de una o varias capas,
  - en el segmento inferior de la zona central de la bolsa de plástico (50) los pasajes o las instalaciones (84) con distribuidores horizontales (85) para la distribución de flujo horizontal homogénea de la solución de cultivo celular (74) a través de una superficie de introducción (510),
  - 35 - en la zona inferior de la bolsa de plástico (50) la zona de recolección de sólidos (57) reducida cónicamente hacia abajo para la recolección de sólidos con ayuda de la gravedad.
7. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los canales presentan una longitud de canal  $L$  del 30 % al 95% de una longitud  $LK$  de la bolsa de plástico.
8. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 o 7, que comprende un contenedor para el alojamiento del separador de sólidos, en donde el contenedor presenta al menos un espacio interior para el alojamiento del separador de sólidos, comprendiendo este espacio interior paredes adaptadas a la forma del separador de sólidos, las paredes rodean el espacio interior y lo separan del mundo exterior, comprendiendo una abertura para introducir el separador de sólidos desde arriba en el contenedor.
- 40 9. Separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
- 45 - la zona superior del separador de sólidos es un colector con una zona de recolección de corriente de cosecha (56), conectada a
  - una zona de separación formada por un paquete de láminas (1) de placas con nervios de plástico de una o varias capas forma un cuerpo base de placa con nervios, que está insertado arriba y abajo en placas de inserción, y está conectado a
  - 50 - un segmento inferior del separador de sólidos con uno o varios pasajes o instalaciones (84) para la distribución de flujo de la mezcla de reactor (74), a través de
  - una zona de recolección de sólidos (57) reducida cónicamente hacia abajo para la recolección de las células con ayuda de la gravedad,
  - en donde el segmento inferior y la zona de recolección de sólidos (57) reducida cónicamente hacia abajo es un embudo, y
  - 55 - en donde todos los elementos del separador de sólidos son de plástico.

10. Instalación de biorreactor que comprende un biorreactor conectado a un separador de sólidos de canal inclinado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9.

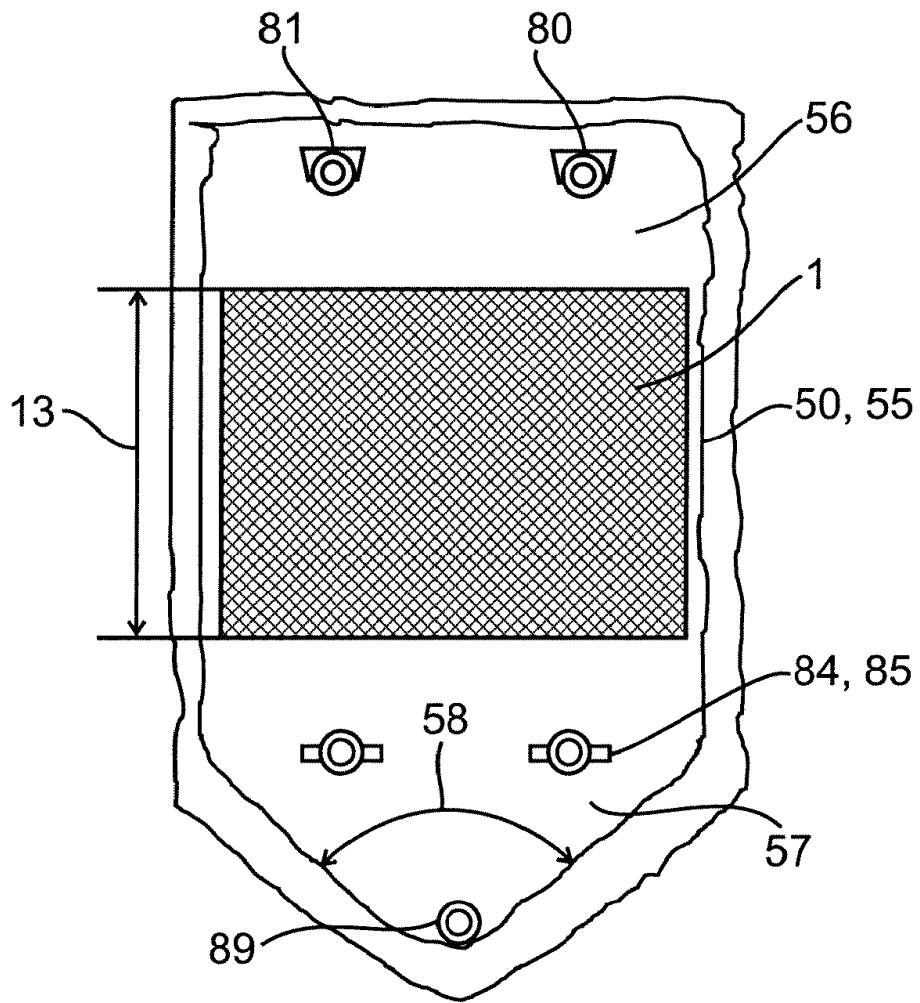


Fig. 1

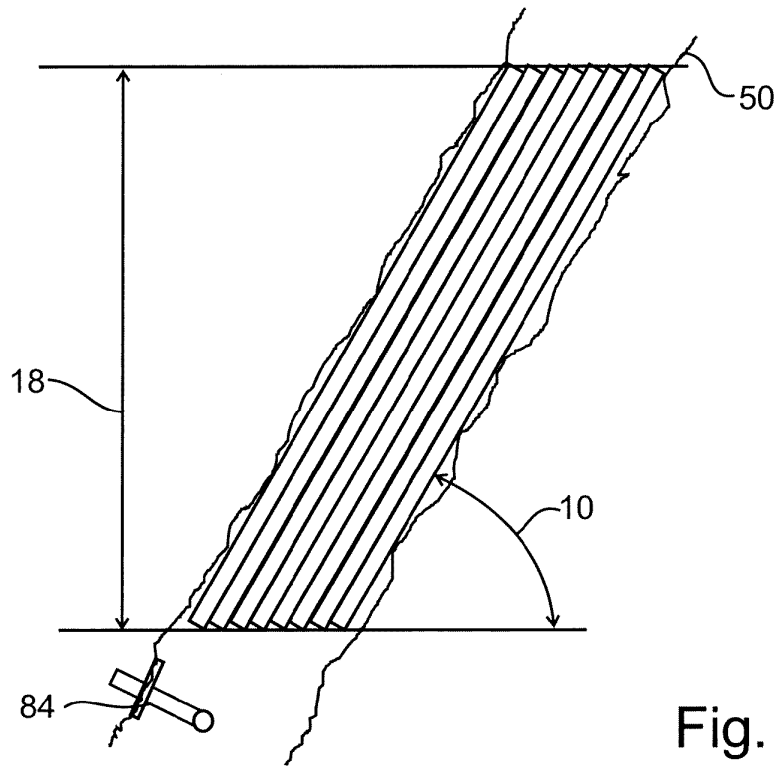


Fig. 2

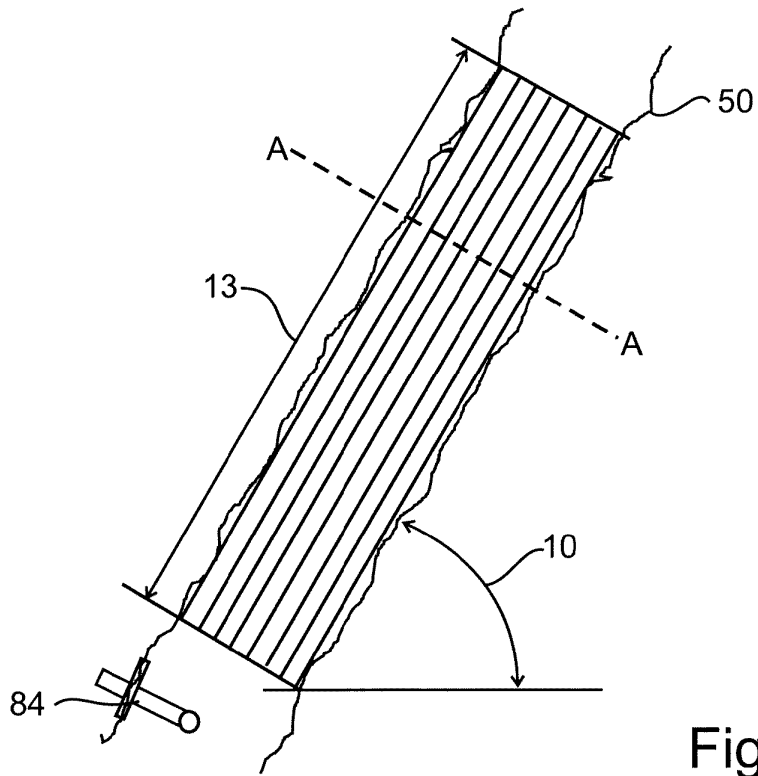


Fig. 3



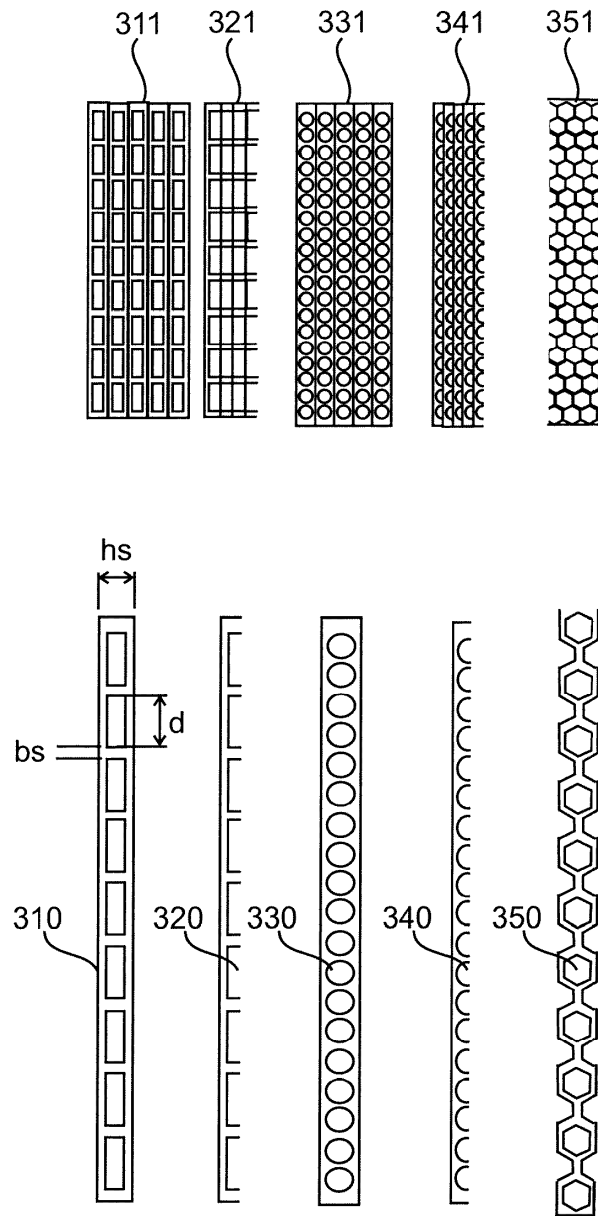


Fig. 4

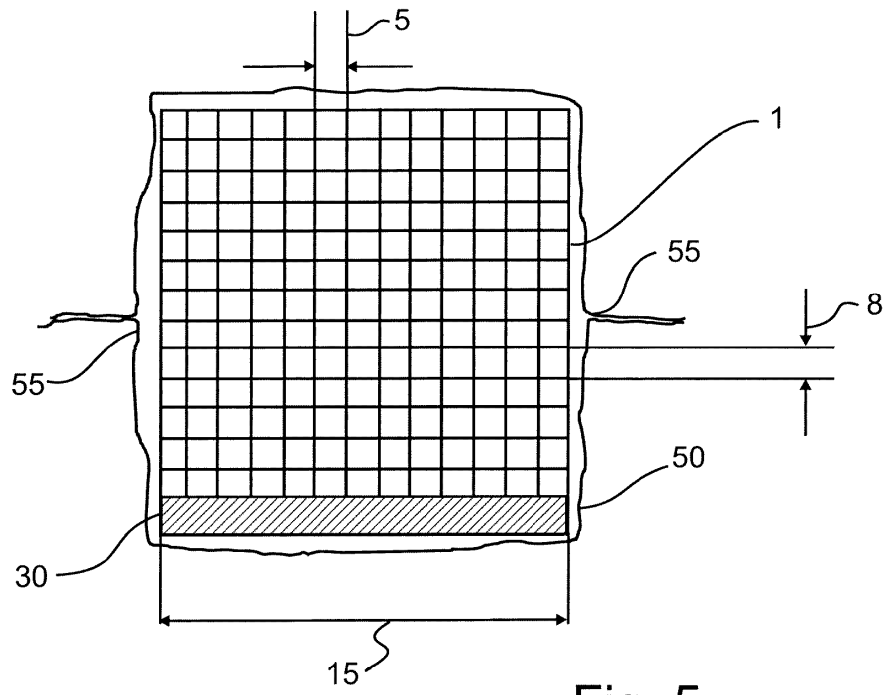


Fig. 5

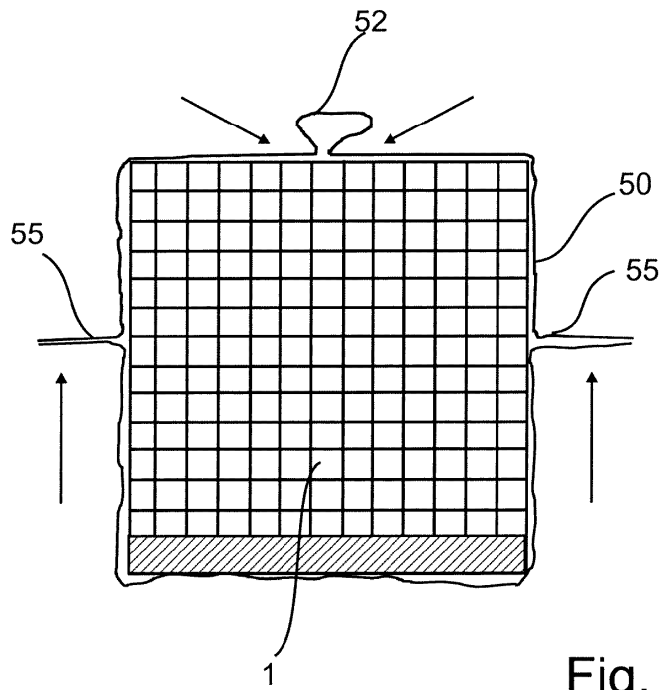


Fig. 6

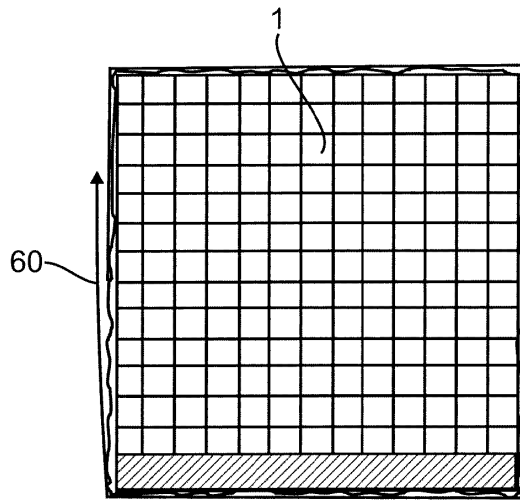


Fig. 7

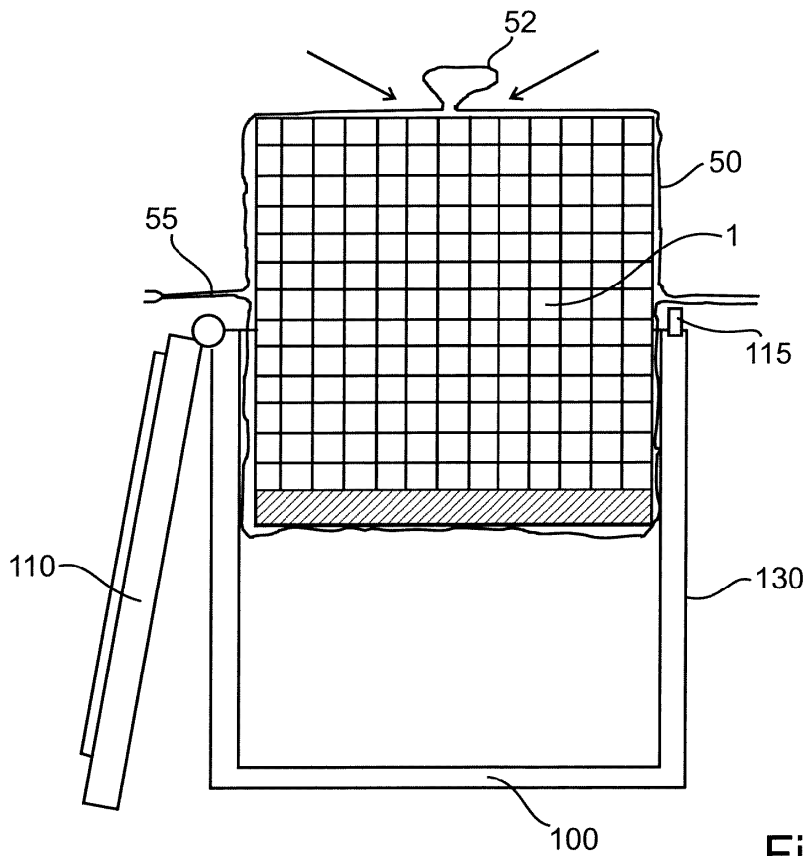


Fig. 8

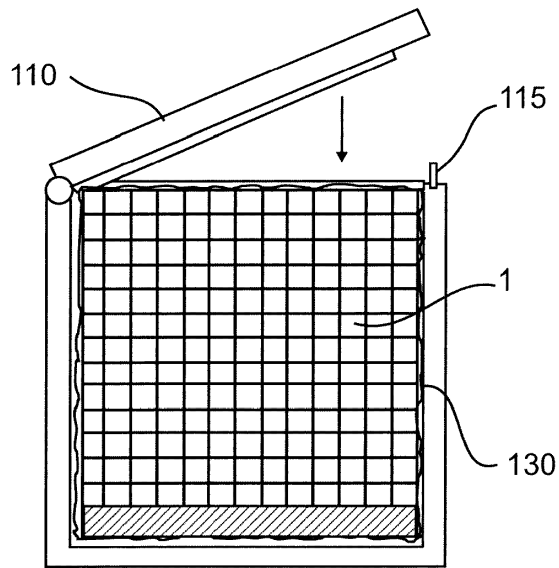


Fig. 9

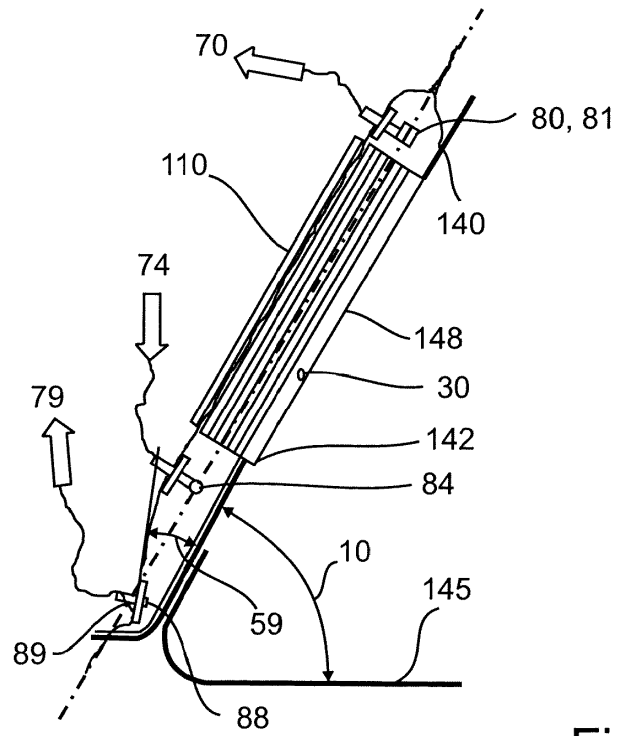


Fig. 10

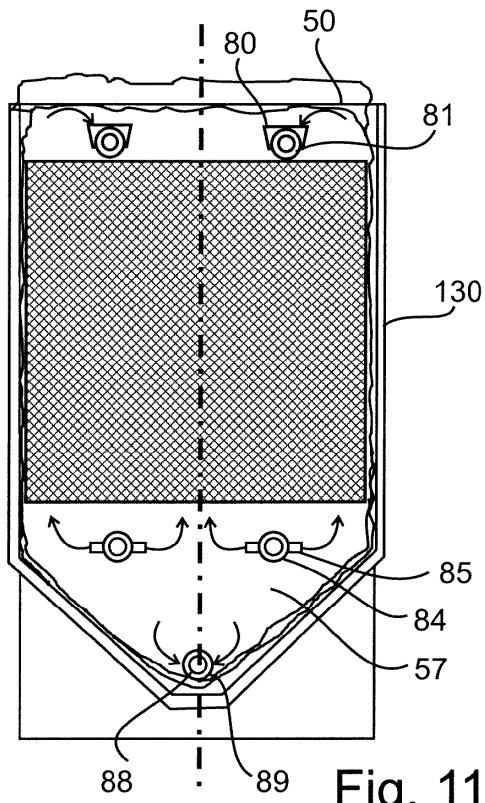


Fig. 11

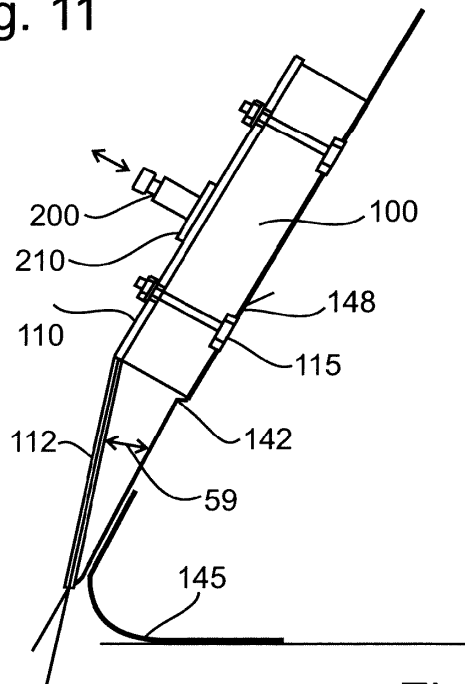


Fig. 12

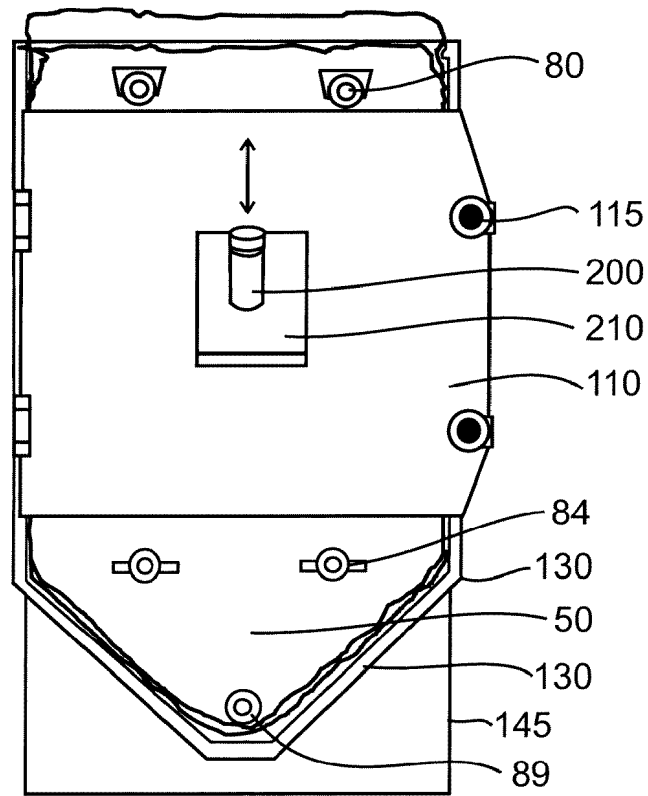


Fig. 13

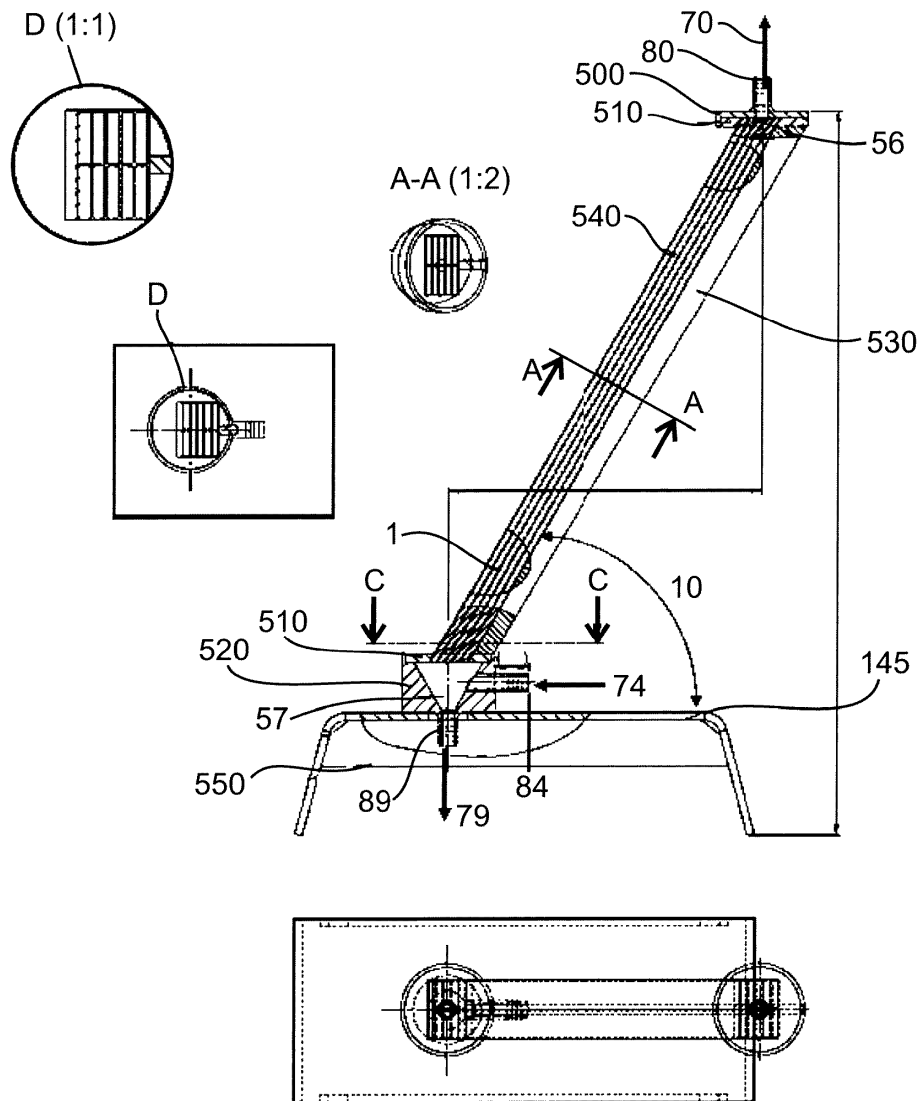


Fig. 14

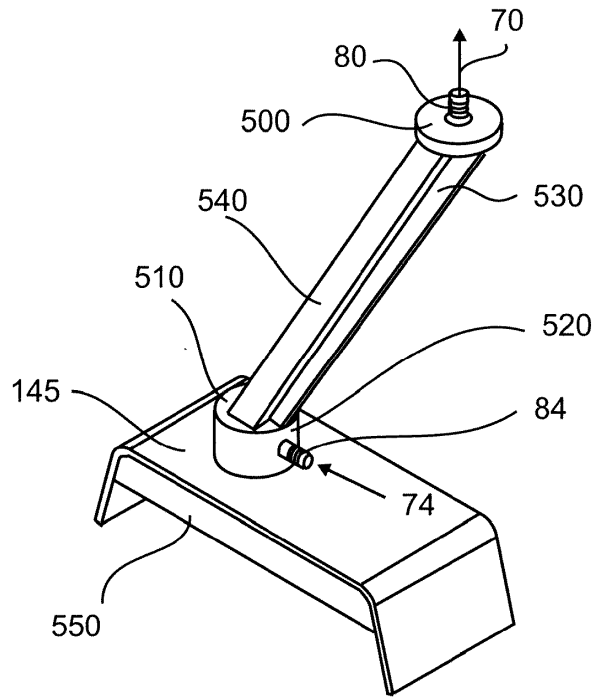


Fig. 15

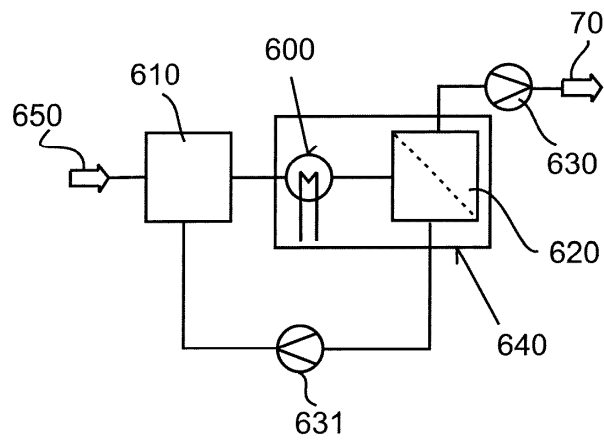


Fig. 16