

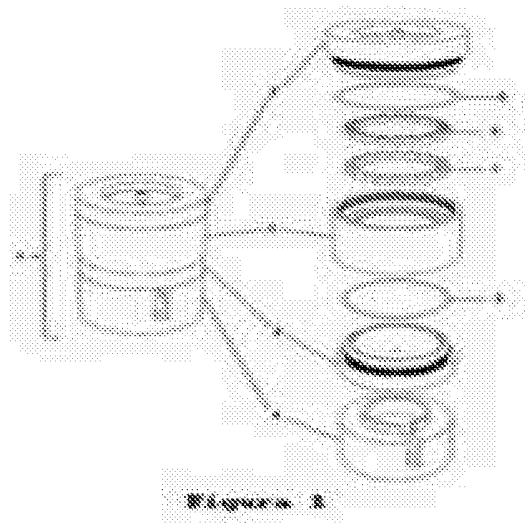
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.08.06	(73) Titular(es): ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF TISSUE ENGINEERING AND CELL BASED TECHNOLOGIES & THERAPIES (A4TEC) UNIVERSIDADE DO MINHO, DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE POLÍMEROS, 3B'S RESEARCH GROUP 4710-057 CAMPUS DE GUALTAR	PT
(30) Prioridade(s):	(72) Inventor(es): RUI LUÍS GONÇALVES DOS REIS PEDRO FERREIRA DA COSTA ALBINO MANUEL PEREIRA MARTINS MARIA MANUELA ESTIMA GOMES NUNO JOÃO MELEIRO ALVES DAS NEVES	PT PT PT PT PT
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.08	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2017.03.31 68/2017		

(54) Epígrafe: **BIOREACTOR MULTI-CÂMARA COM PERFUSÃO BIDIRECCIONAL INTEGRADO NUM SISTEMA DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM BIOREACTOR INTEGRADO NUM SISTEMA DE CULTURA QUE PODE SER USADO PARA ESTIMULAR A COLONIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR, EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS SOB CONDIÇÕES DE CULTURA ALTAMENTE CONTROLADAS E MONITORIZADAS. O BIOREACTOR (1) É UM DISPOSITIVO MULTI-CÂMARA DE PERFUSÃO CONTENDO UM MECANISMO INOVADOR DE RETENÇÃO DE ESTRUTURAS DE SUPORTE PARA CRESCIMENTO CELULAR E DE CAVIDADES DE DISTRIBUIÇÃO DE FLUXO DE MEIO DE CULTURA. QUANDO INTEGRADO NO SISTEMA DE CULTURA DESCRITO, O BIOREACTOR PODE SER UTILIZADO PARA AUMENTAR E DIRECCIONAR O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULARES, ATRAVÉS DO ESTABELECIMENTO DE UM AMBIENTE DE CULTURA DINÂMICO. ESTE É CAPAZ DE HOMOGÉNEA E SIMULTANEAMENTE EXPOR VÁRIAS MATRIZES CELULARIZADAS BIDIMENSIONAIS E/OU TRIDIMENSIONAIS A TENSÃO DE CORTE ATRAVÉS DA PERFUSÃO UNI OU BIDIRECCIONAL DE MEIO DE CULTURA. O SISTEMA DE CULTURA É ESTANQUE, SENDO INDEPENDENTE E AUTO-SUFICIENTE NO QUE DIZ RESPEITO AO ESTABELECIMENTO DA SUA



TEMPERATURA INTERNA E DA COMPOSIÇÃO GASOSA DO MEIO DE CULTURA. O SISTEMA TAMBÉM INTEGRA DISPOSITIVOS PARA A MONITORIZAÇÃO E CONTROLO CONTÍNUOS DOS PARÂMETROS DE CULTURA ASSIM COMO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE VÁRIOS COMPONENTES BIOQUÍMICOS DISSOLVIDOS NO MEIO DE CULTURA.

RESUMO

BIOREACTOR MULTI-CÂMARA COM PERFUSÃO BIDIRECCIONAL INTEGRADO NUM SISTEMA DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS

A presente invenção refere-se a um bioreactor integrado num sistema de cultura que pode ser usado para estimular a colonização e adesão celular, expansão e diferenciação de células sob condições de cultura altamente controladas e monitorizadas. O bioreactor (1) é um dispositivo multi-câmara de perfusão contendo um mecanismo inovador de retenção de estruturas de suporte para crescimento celular e de cavidades de distribuição de fluxo de meio de cultura. Quando integrado no sistema de cultura descrito, o bioreactor pode ser utilizado para aumentar e direccionar o crescimento e diferenciação celulares, através do estabelecimento de um ambiente de cultura dinâmico. Este é capaz de homogénea e simultaneamente expor várias matrizes celularizadas bidimensionais e/ou tridimensionais a tensão de corte através da perfusão uni ou bidireccional de meio de cultura. O sistema de cultura é estanque, sendo independente e auto-suficiente no que diz respeito ao estabelecimento da sua temperatura interna e da composição gasosa do meio de cultura. O sistema também integra dispositivos para a monitorização e controlo contínuos dos parâmetros de cultura assim como para a quantificação de vários componentes bioquímicos dissolvidos no meio de cultura.

DESCRIÇÃO

BIOREACTOR MULTI-CÂMARA COM PERFUSÃO BIDIRECCIONAL INTEGRADO NUM SISTEMA DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS

OBJECTO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com a colonização e adesão celular e cultura bidimensional e/ou tridimensional de células. Em particular, a presente invenção descreve um bioreactor desenhado para suportar a colonização e cultivo de células em estruturas bidimensionais e/ou tridimensionais de suporte para crescimento celular, para posterior utilização como implantes médicos.

ESTADO DA TÉCNICA

As células constituintes dos tecidos experimentam estímulos mecânicos constantemente. O stress mecânico é um importante modulador da fisiologia celular e pensa-se que a dinâmica mecânica intracelular é também importante para a homeostasia dos tecidos. Extensiva investigação sobre o efeito do estímulo mecânico no metabolismo celular sugeriu que os tecidos respondem à estimulação mecânica induzida pelo fluxo dos fluidos intersticiais. Estímulos físicos como a tensão de corte, o fluxo de fluidos, a compressão e a tensão são traduzidos em sinais bioquímicos que modulam a função celular. Mesmo as células em condição estática experimentam estímulos

físicos através do efeito da gravidade. Existe considerável evidência de que os estímulos mecânicos afectam a expressão de genes e aumentam significativamente a actividade de biossíntese de vários tipos celulares. Estudos recentes demonstraram que a cultura de células num ambiente bioquímico apropriado e na presença de estímulos mecânicos podem fornecer os sinais correctos para a diferenciação e a produção de matriz extracelular com propriedades mecânicas adequadas.

Existe um grande interesse no desenvolvimento de um ambiente físico *in vitro* apropriado, utilizando sistemas dinâmicos de simulação biomecânica, conhecidos como bioreactores, para gerar ou regenerar tecidos funcionais.

Os bioreactores devem ser desenhados com o objectivo de estabelecer uma distribuição espacial uniforme de células em estruturas tridimensionais de suporte para crescimento celular, manter as concentrações desejadas de gases e nutrientes no meio de cultura, permitir a difusão de factores bioquímicos para o interior da matriz celularizada, assim como a contínua renovação de subprodutos do metabolismo celular e exposição do tecido em desenvolvimento aos estímulos mecânicos adequados. Esta estratégia de engenharia de tecidos tem o potencial de fornecer um número ilimitado de transplantes, assim como constitui um melhor meio de controlo quantitativo dos parâmetros de cultura celular, permitindo o desenvolvimento de tecidos funcionais *in vitro*.

Nos últimos anos diversos sistemas dinâmicos de colonização e cultura celular têm sido implementados para induzir diferentes tipos de estimulação física às células *in vitro*. Sistemas simples incluem placas de cultura, vasos agitados e vasos rotativos nos quais as matrizes celularizadas estão fixadas ou a flutuar, e o meio de cultura é renovado periodicamente. Outros sistemas são baseados em colunas ou câmaras de perfusão, nas quais as matrizes celularizadas são fixadas e o meio de cultura continuamente recirculado e perfundido através delas. Nestes sistemas o condicionamento físico das matrizes celularizadas ocorre por forças de corte hidrodinâmicas.

A provisão de nutrientes a tecidos tridimensionais poderá ocorrer por difusão passiva, ou por distribuição activa por perfusão directa. No entanto, a perfusão directa introduz um novo nível de complexidade quando a produção em grande escala é desejada, sendo os desafios de engenharia significativos.

A presente invenção aspira ao desenvolvimento de um sistema dinâmico melhorado de colonização e cultura de matrizes celularizadas para regeneração tecidual, baseado no conceito de perfusão directa. Este dispositivo é maquinado em materiais autoclaváveis e biologicamente inertes. O número de câmaras de cultura/perfusão aumenta significativamente a homogeneidade entre matrizes celularizadas. Além disso, o controlo da temperatura e troca de gases é alcançado através de monitorização e automação computacional em tempo real. A quantificação em

tempo real da actividade celular é também possível, utilizando sensores e software analítico apropriados.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um bioreactor integrado num sistema de cultura que pode ser usado na colonização e adesão celular e cultura de matrizes celularizadas para aplicação em estratégias de regeneração de tecidos. Este sistema de cultura pode ser capaz de originar matrizes celularizadas para vários tipos de implantes tecidulares, tais como osso, pele, cartilagem e músculo.

O sistema de cultura descrito é capaz de exercer perfusão contínua de meio de expansão ou diferenciação, melhorando o transporte de massa das células em matrizes celularizadas. A perfusão contínua de meio de cultura exercida pelo sistema de cultura é capaz de actuar como um estímulo sobre as células, sendo assim capaz de regular ou aumentar a proliferação e diferenciação celulares. A perfusão de meio através das matrizes celularizadas em cultura pode ser feita tanto unidireccionalmente como bidireccionalmente.

O bioreactor, que possui uma forma cilíndrica, é essencialmente composto por duas tampas e uma peça central, sendo cada uma das tampas presa a cada uma das extremidades da peça central. A peça central contém várias câmaras de cultura/perfusão, (preferencialmente vinte) no seu interior, sendo cada uma capaz de conter

uma ou mais estruturas de suporte para crescimento celular. Quando presas à peça central, cada uma das tampas define uma cavidade distribuidora/colectora responsável por homogeneamente fornecer meio de cultura a várias matrizes celularizadas. Uma outra característica principal deste bioreactor é o seu mecanismo de retenção das matrizes celularizadas dentro das câmaras de cultura/perfusão. As matrizes celularizadas são retidas nas câmaras de cultura/perfusão, na parte central, entre as duas cavidades distribuidoras/colectoras. As matrizes celularizadas são mantidas immobilizadas no interior das câmaras de cultura/perfusão através da utilização de secções tubulares cujos comprimentos podem ser definidos de acordo com a espessura das matrizes celularizadas. Adicionalmente, é possível cultivar tanto matrizes celularizadas bidimensionais como tridimensionais.

O meio de cultura é fornecido às câmaras distribuidoras/colectoras através de um orifício para entrada/saída de meio, situado no centro de cada uma das tampas e circulado de e para um reservatório arejado de meio de cultura por acção de uma bomba peristáltica.

O arejamento do meio de cultura é efectuado no reservatório de meio de cultura por injeção de uma mistura de gases preestabelecida. A troca de gases entre a fase gasosa e a fase líquida pode ser efectuada por simples borbulhamento da mistura gasosa no meio de cultura depositado no reservatório ou efectuada através de uma membrana permeável a gases. A mistura dos gases a serem injectados é efectuada por um misturador de gases,

o qual pode ser controlado através de um computador central. Os gases e as suas concentrações no reservatório de meio de cultura podem ser definidos de acordo com o tipo e objectivo de cada cultura.

A temperatura no interior do sistema de cultura é regulada por um sistema termostático integrado electrónico ligado a um computador central que o controla. Uma câmara estanque é usada para conter os elementos principais do sistema, de forma a manter uma temperatura interna constante e manter igualmente um ambiente estéril.

Os componentes principais do sistema de cultura podem ser fabricados a partir de materiais inertes, biocompatíveis e autoclaváveis, permitindo assim um processo de esterilização fácil e rápido.

O sistema de cultura aqui descrito pode ser instrumentado com sensores para medição de parâmetros tais como pressão hidrostática, pH, concentração de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos e concentração de glucose. Sistemas analíticos adicionais podem ser integrados no sistema para quantificação de múltiplos componentes bioquímicos (por exemplo metabolitos) dissolvidos no meio de cultura.

Parâmetros tais como a velocidade e direcção de fluxo podem também ser automatizados e controlados através da ligação da bomba peristáltica ao computador central. Desta forma, estes parâmetros podem ser mantidos

de acordo com programas de cultura pré-estabelecidos ou automaticamente alterados a qualquer momento.

A intensidade e, particularmente, a bidireccionalidade do fluxo são factores importantes na colonização ou cultura de células em ambiente dinâmico. Deste modo, a estrutura do sistema de cultura aqui descrito permite a homogeneidade e controlo preciso sobre estes dois fenómenos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra, em vista isométrica montada e explodida, a estrutura e configuração preferenciais do bioreactor.

Na Figura 2 encontra-se representada a parte central do bioreactor, parcialmente seccionada, mostrando em detalhe o interior de três das vinte câmaras de cultura/perfusão em três possíveis configurações.

A Figura 3 ilustra uma secção longitudinal do bioreactor descrito na figura 1 montado, mostrando em detalhe as câmaras de cultura/perfusão em cinco possíveis configurações: **a)** contendo uma estrutura de suporte para crescimento celular tridimensional imobilizado por uma secção tubular, **b)** contendo uma membrana imobilizada por uma secção tubular longa, **c)** aberta, **d)** contendo duas estruturas de suporte para crescimento celular sobrepostas imobilizadas

por uma secção tubular curta **e)** tapado por um disco de silicone e um cilindro de PTFE.

A Figura 4 representa o sistema de cultura completo integrando dispositivos de monitorização e controlo das composições do meio de cultura e atmosfera e de renovação de meio de cultura.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A descrição que se segue refere-se a uma forma preferencial de realização da presente invenção que recorre às figuras anteriormente referidas de modo a permitir uma melhor compreensão da invenção.

O bioreactor (1) é essencialmente composto por uma peça central (3), que contém várias câmaras de cultura/perfusão (9) para acomodação de matrizes celularizadas (7) e por duas tampas (2) que se ligam à peça central. Estas tampas definem duas cavidades distribuidoras/colectoras (14) de meio de cultura, o qual entra e sai dessas mesmas cavidades distribuidoras/colectoras através de um orifício (13) no centro de cada tampa.

A peça central (3) deste dispositivo é composta por vinte câmaras de cultura/perfusão, dispostas radialmente, maquinadas num único bloco cilíndrico de policarbonato. O uso de policarbonato na construção desta peça relaciona-se com as suas propriedades químicas, mecânicas e ópticas já que é biologicamente inerte, extremamente resistente a

solventes e possui grande estabilidade dimensional e resistência a altas temperaturas. Adicionalmente, este material possui a vantagem de ser transparente, permitindo assim que o conteúdo de cada câmara de cultura/perfusão seja visualizado através do bloco.

Alternativamente ao policarbonato, diversos outros materiais podem ser usados na fabricação desta peça, particularmente no caso de o dispositivo ter fins descartáveis. Relativamente às câmaras de cultura/perfusão, o seu número e dimensões também podem ser variadas de acordo com as necessidades específicas de cada aplicação. Na invenção aqui descrita são consideradas vinte câmaras com um diâmetro de oito milímetros e uma profundidade de quinze milímetros, cada uma capaz de conter uma ou mais matrizes celularizadas com oito milímetros de diâmetro e uma espessura total máxima de oito a dez milímetros.

As matrizes celularizadas são inseridas e apertadas no interior das câmaras de cultura/perfusão de modo a que o meio de cultura flua através das matrizes celularizadas e não à sua volta. Secções tubulares (6) de etileno-propileno fluoretizado (FEP) são inseridas sobre cada uma das matrizes celularizadas de forma a mantê-las imobilizadas no interior de cada uma das câmaras de cultura/perfusão. O uso destas secções tubulares de FEP é uma característica importante da invenção já que permitem cultivar matrizes celularizadas com diferentes espessuras simplesmente ajustando o comprimento dessas mesmas secções tubulares, que são cortadas a partir de tubos

transparentes de FEP com oito milímetros de diâmetro externo. Quanto ao diâmetro interno das secções tubulares, este deve ser o maior possível sendo no entanto suficientemente pequeno para que seja capaz de reter eficientemente a matriz celularizada. Tal como no caso de todas as outras peças, outros materiais podem ser considerados na produção destes anéis desde que possuam características adequadas.

À medida que as matrizes celularizadas vão sendo removidas das respectivas câmaras para serem analisadas em diferentes tempos de cultura, as cavidades vazias resultantes desta remoção são tapadas através da inserção de um disco de silicone (11) e de um cilindro (10) de politetrafluoretileno (PTFE) de modo a impedir completamente a passagem de meio de cultura através dessas câmaras vazias. Após a remoção das matrizes celularizadas, o fluxo total de perfusão é reajustado de modo a que se mantenha o fluxo de perfusão por matriz celularizada individual pretendido.

Dada a versatilidade das câmaras de cultura/perfusão e do mecanismo de retenção de matrizes celularizadas, várias configurações de matrizes celularizadas podem ser utilizadas. Além de matrizes celularizadas tridimensionais singulares (7), cada câmara de cultura/perfusão pode também conter mais do que uma matriz celularizada, por exemplo, várias matrizes celularizadas sobrepostas (15). Adicionalmente, ajustando o comprimento das secções tubulares (6) de FEP, matrizes

celularizadas bidimensionais, na forma de membranas (16), podem também ser cultivadas.

De modo a fechar o bioreactor, as duas tampas (2) feitas de PTFE são ligadas à peça central. Esta ligação é feita através do uso de um mecanismo de enroscamento possibilitado pela presença de roscas (8) em ambas as tampas e na peça central. A utilização de PTFE no fabrico das duas tampas justifica-se pela sua excelente estabilidade dimensional, grande resistência a altas temperaturas, propriedades mecânicas constantes e pelo facto de ser um material inerte e bio compatível. De modo a garantir a estanquicidade do bioreactor, dois vedantes (5) feitos de Viton® são colocados nos espaços entre as tampas e a peça central de policarbonato.

Cada uma das duas tampas define uma cavidade distribuidora/colectora (14) que é capaz de actuar como distribuidora de meio pelas várias câmaras de cultura/perfusão, assim como colectora do meio oriundo dessas mesmas câmaras de cultura/perfusão, dependendo do sentido de deslocação do meio de cultura seleccionado. As superfícies destas cavidades foram desenhadas de modo a que o meio de cultura a circular no seu interior seja homogeneamente distribuído pelas várias câmaras de cultura/perfusão. Desta forma, todas as matrizes celularizadas inseridas nas câmaras de cultura/perfusão são expostas a uma igual intensidade de fluxo. A principal vantagem deste mecanismo de distribuição de meio de cultura é o facto de este estar integrado no próprio bioreactor. Esta característica elimina a

necessidade de utilizar múltiplos tubos e conexões, os quais são, em grande medida, responsáveis pelo surgimento de contaminações. Adicionalmente, o perfil destas cavidades minimiza a acumulação de bolhas de ar. Desta forma, o sistema revela-se consideravelmente mais simples e de fácil utilização permitindo, nomeadamente, uma mais fácil e rápida montagem do sistema.

Ambas as tampas (2) apresentam um orifício central (13) com um prolongamento tubular roscado (12) que permite a conexão de tubos externos para a circulação do meio de cultura. O desenho das tampas permite também o seu encaixe num suporte específico (4) feito de PTFE que suporta o bioreactor durante a sua montagem e cultura.

Sendo ambas as tampas exactamente iguais, estas são capazes de se ligar a qualquer uma das duas extremidades da peça central, assim como de encaixar no suporte do bioreactor, possibilitando uma fácil e rápida inversão do bioreactor.

Quanto ao sistema de cultura ilustrado na figura 4, este é composto pelo bioreactor (1) (acima descrito) ligado a um reservatório de meio (17) pelos orifícios de entrada/saída de meio (13) de ambas as tampas. Além de duas ligações de entrada/saída de meio (18), o reservatório possui também ligações adicionais para entrada (19) e saída de gases (20), os quais são purificados por filtros de ar (21). O filtro pelo qual se dá entrada de ar pode ser directamente exposto aos gases da atmosfera circundante (opção não representada) ou pode

alternativamente e preferencialmente ser ligado a um misturador de gases (22) que continuamente mistura e injecta uma mistura desejada de vários gases, obtidos de fontes externas (23), através do filtro de ar, sob a superfície do meio de cultura depositado no reservatório de meio. Desta forma, é possível controlar a concentração de cada gás dissolvido no meio de cultura circulante. Os gases são dissolvidos no meio de cultura por simples borbulhamento da mistura gasosa no meio de cultura ou alternativamente através de uma membrana permeável a gases (não representada) imersa no meio de cultura.

Resumidamente, o meio de cultura é recolhido do reservatório de meio (17), bombeado para uma primeira cavidade distribuidora/colectora (14), atravessa as matrizes celularizadas contidas nas múltiplas câmaras de cultura/perfusão, recolhido na segunda cavidade distribuidora/colectora (14) e, finalmente, direccionado de novo para o reservatório de meio (17). Adicionalmente, o meio de cultura circulante pode ser automaticamente descartado e substituído por meio fresco através da inclusão no circuito de circulação de meio de duas válvulas (24) controladas pelo computador central que permitem recolher/expelir meio através de ligações a reservatórios externos (25) para fornecimento de meio fresco e recolha de meio descartado.

A tubagem utilizada na circulação de meio de cultura pode ser de vários tipos. Quando é usado um misturador de gases para dissolver gases no meio de cultura, é privilegiado o uso de tubagens com pouca ou nenhuma

permeabilidade a gases de modo a manter uma composição gasosa precisa e constante dissolvida no meio de cultura circulante. Tubagens produzidas a partir de formulações poliméricas tais como Tygon® R-3607 ou Pharmed® ismaprene são bons exemplos. Quando os gases são passivamente dissolvidos no meio circulante através de um filtro de ar, é preferida a utilização de tubagens com grande permeabilidade a gases, de forma a aumentar a troca de gases entre o meio circulante e a atmosfera circundante. Neste caso, formulações tais como silicone podem ser usadas, já que são altamente permeáveis a gases tais como dióxido de carbono e oxigénio.

Uma das mais importantes características deste sistema de cultura é a sua capacidade de variar o sentido de circulação e a intensidade do fluxo do meio de cultura instantaneamente e em qualquer momento. Isto é efectuado simplesmente alterando o sentido e a velocidade de rotação da bomba peristáltica (26). Desta forma, é possível efectuar perfusão de meio de cultura através das matrizes celularizadas de uma forma bidireccional e com uma qualquer intensidade desejada. Assim, é possível aplicar programas de perfusão, no decurso das culturas, que variam o sentido e a intensidade de fluxo a qualquer momento.

O estabelecimento de programas de variação de intensidade e sentido de fluxo pode ser efectuado tanto manualmente, alterando em qualquer momento a intensidade e sentido de fluxo directamente no painel de controlo da bomba peristáltica, assim como automaticamente, usando um

computador para controlar a velocidade e sentido de rotação da bomba peristáltica ao longo do tempo. Na colonização de células em estruturas de suporte para crescimento celular, o estabelecimento de uma intensidade de fluxo adequada é crucial para uma adesão celular eficaz às superfícies das estruturas de suporte para crescimento celular, enquanto a bidireccionalidade é responsável por uma distribuição mais homogénea das células pela totalidade das superfícies internas e externas das estruturas de suporte para crescimento celular. Durante a cultura, a aplicação de um fluxo de meio adequado combinado com um programa adequado de inversão do sentido de fluxo pode ser responsável pelo aumento da proliferação e diferenciação celular de acordo com o programa de cultura escolhido.

Este sistema permite também, se desejado, a integração de múltiplos sensores (28) de modo a monitorizar parâmetros tais como pressão hidrostática, pH, concentrações de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos e concentração de glucose, entre outros.

Adicionalmente, outros equipamentos analíticos (29), podem ser acoplados ao sistema. Sistemas analíticos baseados em análise de fluxo injectado (FIA) ou de injeção sequencial (SIA) podem ser integrados no sistema de modo que recolham e analisem periodicamente amostras do meio de cultura circulante de perfusão e assim quantificar vários componentes bioquímicos (p.e. metabolitos celulares) dissolvidos no meio. Todos os dados obtidos através dos sensores e analisadores, podem

ser adquiridos independentemente, através do software de cada um dos sensores, ou direccionados para uma aplicação de software no computador central (27), que pode ser simultaneamente responsável pela automação e controlo de todos os dispositivos electrónicos do sistema, tal como a bomba peristáltica e as válvulas. Esta solução permite uma aquisição centralizada e facilitada de dados, sincronizada com as acções dos dispositivos efectores integrados no sistema de cultura.

A temperatura no interior do sistema de cultura é regulada por uma resistência eléctrica (30) e um sensor de temperatura (31), que estão ligados ao computador central (27) e que por ele são controlados.

De modo a manter um ambiente estéril e com uma temperatura estável, os elementos principais do sistema são colocados no interior de uma câmara estanque (32). Esta câmara estanque contém vários orifícios para troca de meio de cultura e de gases, e também para passagem de cabos de comunicação de dados. Esta câmara estanque pode ser feita de policarbonato ou outro material similar que permita a visualização do seu interior e que permita também a esterilização por autoclavagem.

Tal como mencionado anteriormente, este sistema de cultura pode ser usado não apenas na cultura mas também na colonização de células em estruturas de suporte para crescimento celular. Dada a sua pequena dimensão, este sistema requer volumes muito pequenos de meio de cultura para eficientemente perfundir estruturas de suporte para

crescimento celular ou matrizes celularizadas. Por esta razão, é possível efectuar um procedimento de colonização dinâmica usando suspensões celulares altamente concentradas sem que seja necessário utilizar quantidades extremamente grandes de células. Normalmente, um volume de cerca de 100 mililitros é suficiente para efectuar uma colonização dinâmica num conjunto de estruturas de suporte para crescimento celular, já que o volume interno total do circuito de perfusão é de cerca de 90 mililitros. Desta forma, as células têm uma maior possibilidade de aderir às superfícies das estruturas de suporte para crescimento celular já que se encontram altamente concentradas e passam um maior número de vezes pelo seu interior, tornando o processo de colonização mais eficiente.

Também, devido à natureza bidireccional do sistema de cultura, a colonização celular torna-se mais homogénea. A constante mudança do sentido de perfusão da suspensão celular permite a variação das condições às quais as múltiplas superfícies das estruturas de suporte para crescimento celular são expostas. Desta forma, todas as superfícies das estruturas de suporte para crescimento celular tendem a sentir as mesmas variações de intensidade de fluxo, independentemente da sua posição ou orientação relativa.

Lisboa, 2 de Março de 2017

REIVINDICAÇÕES

1. Bioreactor caracterizado por ser composto por uma peça central (3), que contém várias câmaras de cultura/perfusão (9), dispostas radialmente, maquinadas num único bloco cilíndrico de policarbonato, entre duas cavidades distribuidoras/coletoras (14), para acomodação de matrizes celularizadas (7) e por duas tampas (2) iguais entre si, que se ligam à peça central através do uso de um mecanismo de enroscamento possibilitado pela presença de roscas (8) em ambas as tampas e na peça central, e que definem as duas cavidades distribuidoras/coletoras (14) de meio de cultura, homogeneamente distribuído pelas várias câmaras de cultura/perfusão (9), o qual entra e sai dessas mesmas cavidades distribuidoras/coletoras através de um único orifício (13) no centro de cada tampa, apresentando este orifício um prolongamento tubular roscado (12) que permite a conexão de tubos externos para a circulação do meio de cultura, e sendo possível o encaixe do bioreactor num suporte específico (4) devido ao desenho das tampas.

2. Bioreactor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir ambas as tampas (2) exactamente iguais, possibilitando uma fácil e rápida inversão do bioreactor.

3. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o número de câmaras de cultura/perfusão que alcança uma razão área/volume óptima ser de 20.

4. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por reter as matrizes celularizadas nas câmaras de cultura/perfusão, na parte central, entre as duas cavidades distribuidoras/colectoras sendo estas mantidas imobilizadas no interior das câmaras de cultura/perfusão através da utilização de secções tubulares cujos comprimentos podem ser definidos de acordo com a espessura das matrizes celularizadas.

5. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por cada uma das duas tampas definir uma cavidade distribuidora/colectora (14) que é capaz de actuar como distribuidora de meio pelas várias câmaras de cultura/perfusão, assim como colectora do meio oriundo dessas mesmas câmaras de cultura/perfusão, dependendo do sentido de deslocação do meio de cultura seleccionado.

6. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por o mecanismo de distribuição de meio de cultura estar integrado no próprio bioreactor.

7. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por permitir cultivar tanto matrizes celularizadas bidimensionais como tridimensionais.

8. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado por permitir a utilização de qualquer tipo de tubagem cujas dimensões sejam consistentes com as entradas e saídas de meio do bioreactor e seja biocompatível ou inerte.

9. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado por cada câmara de cultura/perfusão poder acomodar uma ou mais estruturas de suporte para crescimento celular.

10. Bioreactor de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado por os componentes principais do sistema de cultura poderem ser fabricados a partir de quaisquer materiais inerte e biocompatível.

11. Sistema de cultura celular caracterizado por ser composto por um bioreactor (1), de acordo com as reivindicações 1 a 10, ligado a um reservatório de meio (17) pelos orifícios de entrada/saída de meio (13) de ambas as tampas e que possui, além de duas ligações de entrada/saída de meio (18), ligações adicionais para entrada (19) e saída de gases (20), os quais são purificados por filtros de ar (21), sendo o meio de cultura recolhido do reservatório de meio (17), bombeado para uma primeira cavidade distribuidora/colectora (14), atravessando as matrizes celularizadas contidas nas múltiplas câmaras de cultura/perfusão, recolhido na segunda cavidade distribuidora/colectora (14) e direccionado de novo para o reservatório de meio (17), podendo o referido meio de cultura circulante ser automaticamente descartado e substituído por meio fresco através da inclusão no circuito de circulação de meio de duas válvulas (24) controladas pelo computador central que permitem recolher/expelir meio através de ligações a reservatórios externos (25) para fornecimento de meio fresco e recolha de meio descartado; tendo este sistema a

capacidade de exercer perfusão contínua de meio de expansão ou diferenciação, podendo a perfusão de meio através das matrizes celularizadas em cultura ser feita tanto unidireccionalmente como bidireccionalmente.

12. Sistema de cultura celular de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a temperatura do sistema ser controlada por um sistema termoestático electrónico integrado, conectado e controlado por um computador central.

13. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 e 12, caracterizado por o circuito de meio de cultura incluir um único reservatório para a colheita e distribuição do meio de e para as câmaras de cultura/perfusão.

14. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 13, caracterizado por o arejamento do meio de cultura poder ser realizado no reservatório por injeção (borbulhamento) de uma mistura de gases pré-definida, monitorizada e controlada automaticamente por um computador central, ou por troca passiva de gases filtrados da atmosfera externa.

15. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 14, caracterizado por permitir a sua utilização como um sistema dinâmico de cultura celular, com fluxo de meio estabelecido unidireccionalmente ou bidireccionalmente.

16. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 15, caracterizado por permitir que as cavidades vazias resultantes da remoção das matrizes celularizadas com diferentes tempos de cultura sejam tapadas através da inserção de um disco de silicone (11) e de um cilindro (10) de politetrafluoretileno (PTFE), ou de qualquer outro material compatível, de modo a impedir completamente a passagem de meio de cultura através dessas câmaras vazias, sendo o fluxo total de perfusão reajustado de modo a que se mantenha o fluxo de perfusão por matriz celularizada individual pretendido.

17. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 16, caracterizado por permitir a integração de múltiplos sensores (28) de modo a monitorizar parâmetros tais como pressão hidrostática, pH, concentrações de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos e concentração de glucose, entre outros, assim como outros equipamentos analíticos (29), tais como sistemas analíticos baseados em análise de fluxo injectado (FIA) ou de injeção sequencial (SIA) de modo a recolher e analisar periodicamente amostras do meio de cultura circulante de perfusão e assim quantificar vários componentes bioquímicos dissolvidos no meio.

18. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 17, caracterizado por os elementos principais do sistema serem colocados no interior de uma câmara estanque (32) que contém vários orifícios para troca de meio de cultura e de gases.

19. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 18, caracterizado por permitir a utilização de todos os tipos celulares (por exemplo, de origem animal ou humana, culturas primárias ou linhas celulares) usadas nos procedimentos de colonização e adesão celular e/ou manutenção em cultura.

20. Sistema de cultura celular de acordo com as reivindicações 11 a 19, caracterizado por os componentes principais do sistema de cultura poderem ser fabricados a partir de materiais inertes, biocompatíveis e autoclaváveis, permitindo assim um processo de esterilização fácil e rápido.

Lisboa, 2 de Março de 2017

FIGURAS

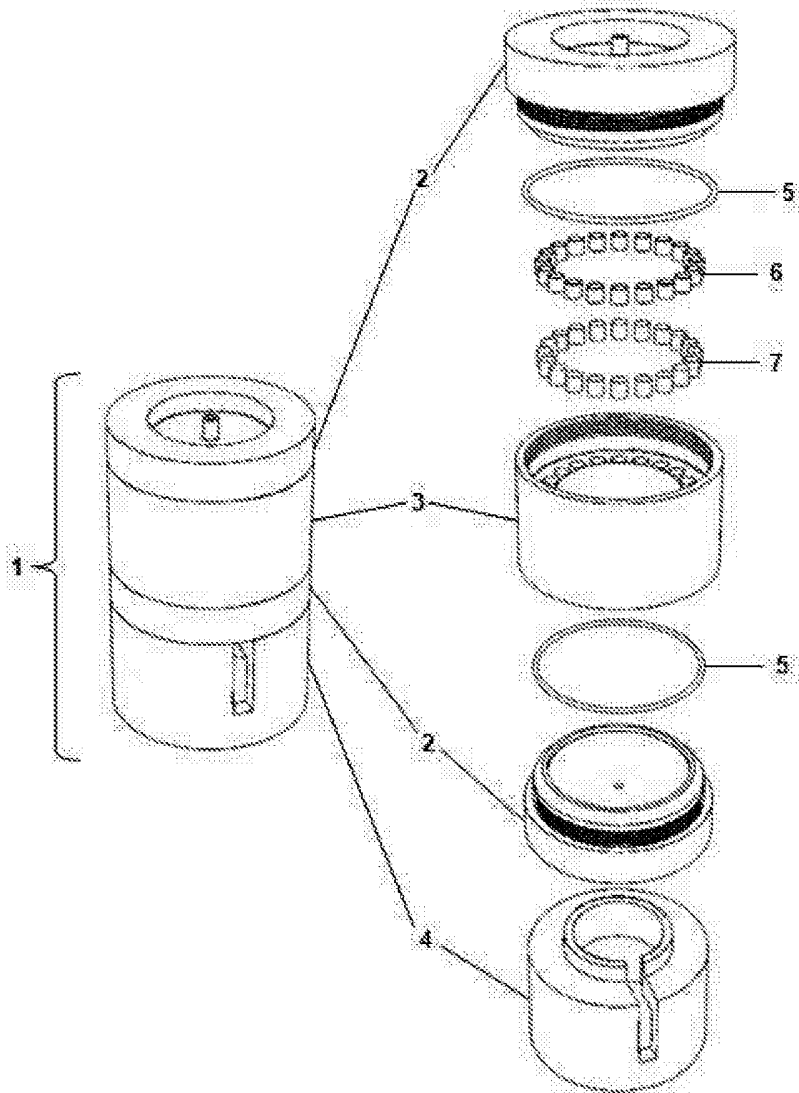


Figura 1

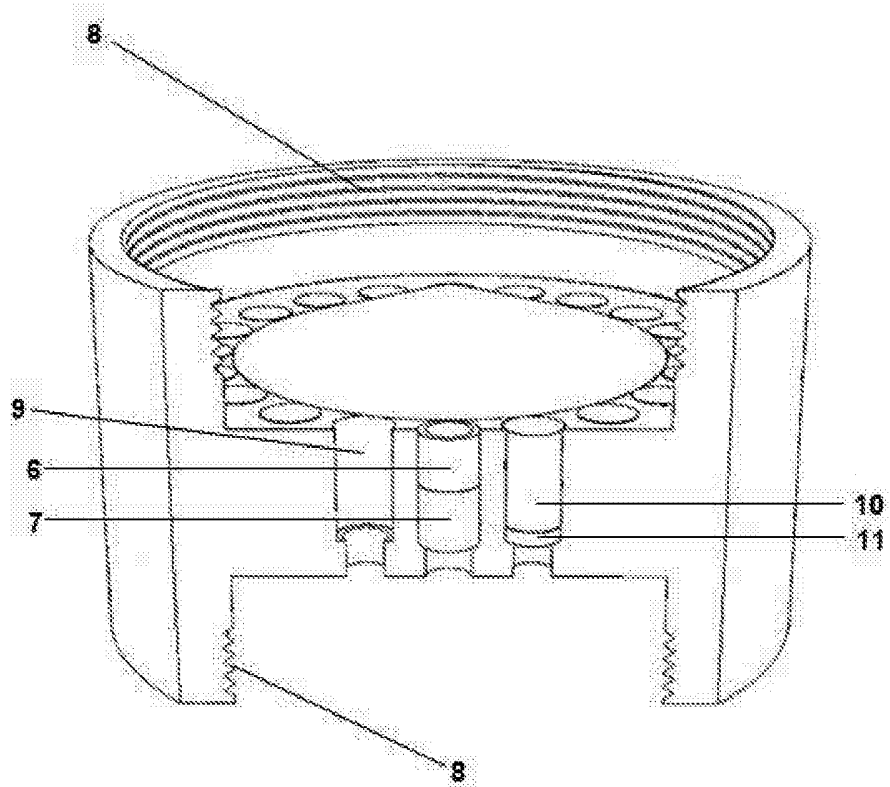


Figura 2

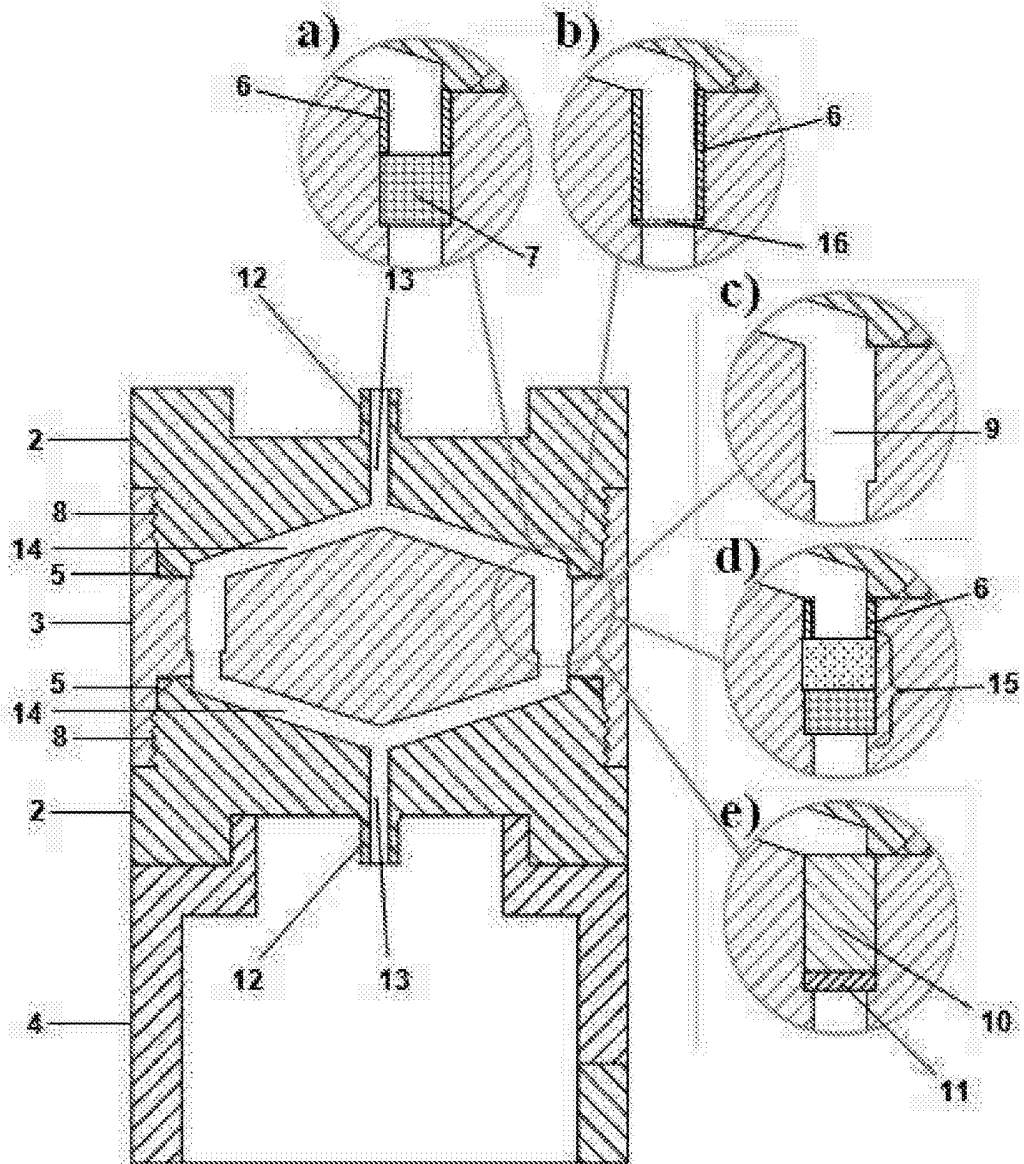


Figura 3

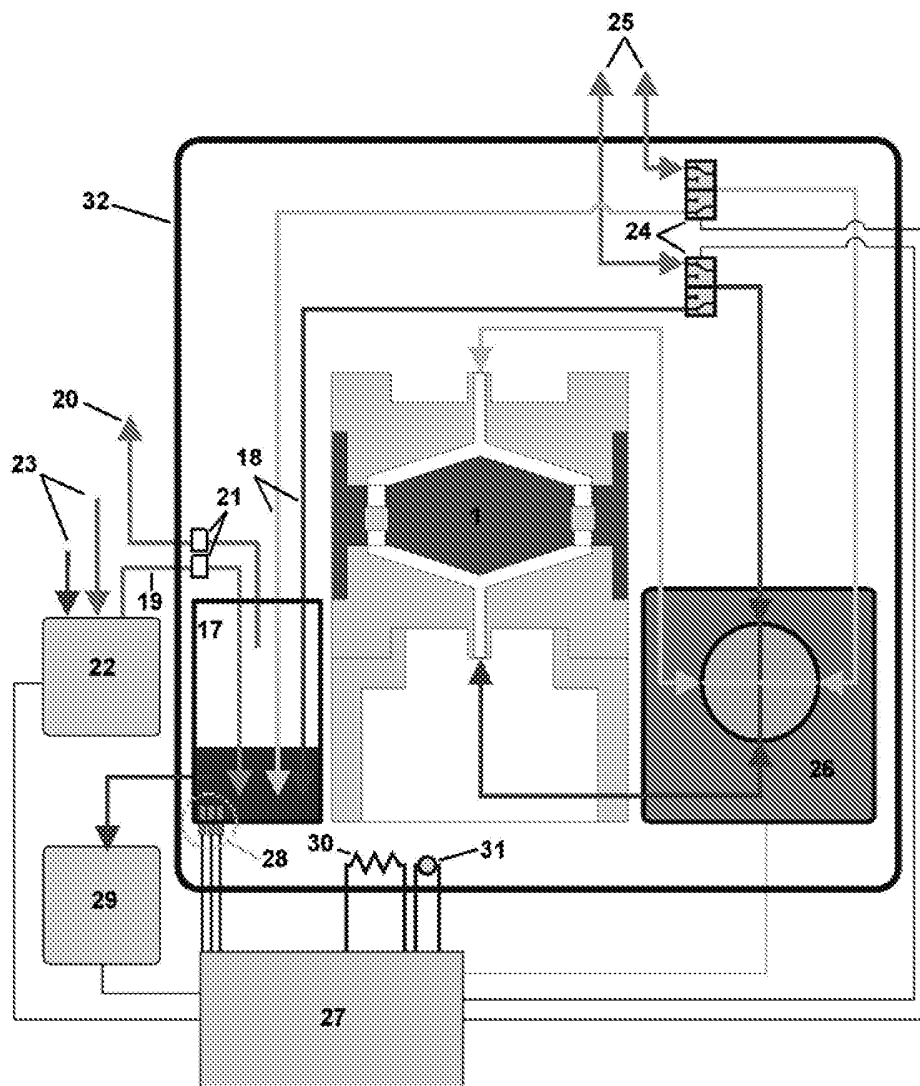


Figura 4