

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 124**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/04** (2006.01)

**C12M 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04731905 .8**

96 Fecha de presentación: **10.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1623022**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Método, aparato y sistema para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico de una suspensión**

30 Prioridad:  
**09.05.2003 EP 03009784**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2012**

73 Titular/es:  
**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR  
INFEKTIONSFORSCHUNG GMBH (100.0%)  
INHOFFENSTRASSE 7  
38124 BRAUNSCHWEIG, DE**

72 Inventor/es:  
**WAGNER, ROLAND y  
ELSAYED, AHMED, ELSAYED**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 390 124 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método, aparato y sistema para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico de una suspensión.

5 El invento presente se refiere a un método, aparato y sistema para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico, sensibles a grandes fuerzas/esfuerzos de cizalladura, de una suspensión.

En el documento EP 1 280 885 A1 se consigue la separación de células de mamíferos, células de insectos y células botánicas de una suspensión celular mediante el uso de un hidrociclón.

10 El hidrociclón típico descrito en este documento consiste de una parte/cono que se estrecha y una parte cilíndrica superior, que comprende una entrada para alimentar tangencialmente la suspensión. La parte cilíndrica está cerrada por una tapa que tiene dispuesta en el medio una abertura en la tapa, el aliviadero superior. El cono del hidrociclón acaba en una salida, el aliviadero inferior. El hidrociclón no tiene partes móviles, opera automáticamente y tiene una gran durabilidad. El ámbito convencional para el uso de hidrociclones es para concentrar suspensiones, en las que las partículas de grano grueso salen del dispositivo en la forma de suspensión concentrada por el aliviadero inferior del hidrociclón. Las partículas finas, que no han sido separadas, salen del hidrociclón en la forma de una suspensión diluida por la abertura en la parte superior del aparato, el aliviadero superior.

20 La suspensión inicial es alimentada tangencialmente por la entrada al hidrociclón, que está generalmente en la parte cilíndrica del hidrociclón. La suspensión comienza a girar dentro del hidrociclón. La suspensión se acelera cuando comienza a ser impulsada en traslación hacia abajo de la sección estrechada del hidrociclón. El material celular que tiene típicamente una densidad mayor que la del resto de la suspensión, se mueve hacia la pared exterior y sale del hidrociclón por la salida del aliviadero inferior. El resto de la suspensión es recuperado por la abertura de la parte superior del hidrociclón.

25 En el documento EP 1 280 885 A1 se usa un hidrociclón en un sistema de perfusión en el que el material celular repatriado deja descontrolado el aliviadero inferior del hidrociclón dentro del biorreactor/depósito colector. El material celular rebota con la máxima velocidad sobre la superficie de la suspensión dentro del biorreactor. Esto puede dar lugar a grandes esfuerzos/fuerzas no fisiológicos, que pueden afectar negativamente a la viabilidad y a la productividad de las células.

30 También puede ocurrir que una súbita disminución de la presión dé lugar a una expansión/relajación súbitas en el extremo de la salida/aliviadero inferior del hidrociclón o que una gran diferencia de presión entre la entrada y la salida afecte negativamente la viabilidad del material celular. Debido a la súbita disminución de presión al emitir la suspensión del aliviadero inferior a la suspensión del biorreactor se causan grandes fuerzas de cizalladura al sensible material celular, que son responsables de degradar la viabilidad de las células.

Es por tanto un objetivo del invento presente proporcionar un método, un aparato y/o un sistema que controle el flujo de salida de la suspensión celular enriquecida de tal manera que aparezcan solamente pequeños esfuerzos de cizalladura y la viabilidad del material celular sea mantenida a un nivel alto.

35 Este objetivo se consigue mediante las características de las reivindicaciones.

40 El invento procede de la idea básica de usar un hidrociclón para la separación de las células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico y guiar y/o decelerar la suspensión enriquecida de material celular desde o a través de la salida del hidrociclón de tal manera que ocurra un mínimo de esfuerzos de cizalladura y la energía cinética de la suspensión enriquecida a la salida del hidrociclón sea reducida para que la viabilidad del material celular sea mínimamente influenciada.

45 En principio, es deseable una gran diferencia de presión para grandes enriquecimientos lo que da lugar a una mayor velocidad de giro en la parte del hidrociclón que se estrecha y una mayor energía cinética en la salida del dispositivo. Esto representa un problema para dicho material celular ya que la velocidad de giro en la salida del hidrociclón puede aportar grandes fuerzas de cizalladura al material celular, que puede resultar dañado y disminuir la viabilidad del material celular de la suspensión. En principio hay dos efectos que deberían ser considerados en un tratamiento cuidadoso del material celular guiado desde la salida del hidrociclón hasta dentro del biorreactor:

50 1. La suspensión celular enriquecida puede ser decelerada por medios de flujo que estén aplicados al aliviadero inferior del hidrociclón. Los medios de flujo pueden ser de preferencia un tubo rígido o flexible conectado a la salida por el aliviadero inferior del hidrociclón. El movimiento giratorio de la suspensión celular enriquecida en la salida del hidrociclón es transformado fácilmente en un flujo laminar dentro de los medios de flujo. Los medios de flujo en la salida del hidrociclón están aplicados de preferencia en un primer ángulo agudo hacia el eje longitudinal de la salida o hacia al eje longitudinal del hidrociclón. El material celular se decelera en los medios de flujo evitando grandes esfuerzos de cizalladura debidos a la evacuación tangencial de los medios de flujo. La longitud de los medios de flujo es de preferencia mayor de 10 cm y más preferentemente entre 50 y 100 cm para decelerar la suspensión. Este efecto debe ser considerado cuando no es posible o deseable una inmersión directa de los medios de flujo dentro de

la suspensión del biorreactor, como en sistemas en los que el hidrociclón es aplicado en un bucle externo del biorreactor. Esta instalación favorece el desarrollo del proceso en pequeños biorreactores como los biorreactores de banco.

2. Además de decelerar la suspensión en los medios de flujo, el drenaje del biorreactor puede causar también grandes esfuerzos de cizalladura. Por tanto, alternativa o adicionalmente, se realiza un guiado directo o mediante medios de flujo dentro de la suspensión, bajo el nivel superior del fluido del biorreactor. La salida del hidrociclón puede estar sumergida directamente en el fluido del biorreactor o el hidrociclón puede estar aplicado por encima del nivel superior del fluido del biorreactor y la suspensión enriquecida ser guiada desde la salida del hidrociclón hasta dentro del biorreactor mediante medios de flujo. Los medios de flujo, preferentemente un tubo rígido o flexible, guían la suspensión desde la salida del hidrociclón hasta dentro del fluido donde el extremo de los medios de flujo en oposición a la salida del hidrociclón guía la suspensión bajo el nivel superior del fluido del biorreactor. El último método es el preferido, ya que la energía de separación del hidrociclón depende de la presión hidrostática. En hidrociclones aplicados por encima del nivel del fluido del biorreactor, se alcanza una presión hidrostática mayor y por tanto puede perfundirse un mayor volumen por unidad de tiempo. En este caso, la fricción del material celular con las moléculas de la suspensión/fluido del biorreactor decelera el material celular e impide el daño a dicho material celular.

Otra posibilidad alternativa que puede ser combinada opcionalmente con una o ambas de las dos soluciones mencionadas anteriormente es el drenaje de la suspensión por encima (o por debajo) del nivel del fluido superior del biorreactor mediante medios de flujo contra la pared del biorreactor o de un depósito separado. Los medios de flujo, de preferencia un tubo con una sección transversal redonda, están dispuestos en su extremo distal en un segundo ángulo agudo hacia la pared del biorreactor. El extremo distal de los medios de flujo, en oposición a la salida del hidrociclón, está de preferencia cortado en un tercer ángulo agudo con respecto al eje longitudinal de los medios de flujo que se corresponde de preferencia con el segundo ángulo agudo mencionado anteriormente. Por tanto, la abertura del tubo en el extremo distal tiene forma oval. La abertura con forma oval de los medios de flujo está de preferencia aplicada a una pequeña distancia de la pared del biorreactor, para que la suspensión del material celular fluya sustancialmente de forma tangencial contra la pared. La suspensión del material celular fluye verticalmente hacia abajo de la pared, pero la dirección del flujo puede diferir también de la dirección vertical.

Este método de separación no es solamente aplicable a los sistemas de perfusión, sino que puede ser usado en general para cualquier separación de células eucariotas o procariotas sensibles a grandes fuerzas de cizalladura en la que se desea una gran viabilidad.

A continuación se describe el invento con más detalle junto con los dibujos que se adjuntan, en los que:

la Figura 1 muestra una primera realización preferida del invento presente con unos medios de flujo en un ángulo agudo;

la Figura 2 muestra una segunda realización preferida del invento presente con unos medios de flujo que guían la suspensión por debajo del nivel superior del fluido del biorreactor;

la Figura 3 muestra una tercera realización preferida del invento presente, que guía la suspensión directamente por debajo del nivel superior del fluido del biorreactor;

la Figura 4 es un ejemplo de un cultivo continuo de células SP2/0 en un reactor de 5 L mediante perfusión por hidrociclón de acuerdo con el invento presente, y

la Figura 5 es un ejemplo de un cultivo continuo de células NS0 en un reactor de 5 L mediante perfusión por hidrociclón de acuerdo con el invento presente.

La Figura 1 muestra la primera realización preferida del invento presente para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que comprende al menos un hidrociclón con al menos una entrada 4 y una salida 5. La salida 5 que forma el aliviadero inferior del hidrociclón está esencialmente en oposición a la entrada 4. El espacio interior 2 del hidrociclón converge hacia la salida 5. La suspensión entra en el hidrociclón por la entrada 4 dispuesta tangencialmente a la pared interior de una cámara de separación 1 que se extiende longitudinalmente, que está aplicada por encima de la cámara 2 formada con un estrechamiento. La presión de entrada crea una gran velocidad de entrada que a su vez da lugar a un vórtice líquido libre dentro de la cámara. Fuerzas centrífugas actúan sobre el líquido y el material celular de la suspensión dando lugar a una separación según sus densidades relativas. El hidrociclón tiene al menos dos salidas de la cámara de separación, dicha salida 5 está situada esencialmente en oposición a la entrada para adaptar el aliviadero inferior 5 para la fracción de mayor densidad, y una segunda salida que está situada en el extremo superior del hidrociclón para adaptar un aliviadero superior 3 para la fracción de menor densidad. La suspensión celular enriquecida tiene una elevada velocidad de giro y por tanto las células tienen una gran energía cinética en la salida 5. De acuerdo con el invento, el material celular debe ser decelerado en o después de la salida para que se produzcan solamente pequeñas fuerzas de cizalladura en el material celular. Esto puede conseguirse mediante medios de flujo 6 aplicados a la salida del hidrociclón. En esta realización preferida, los medios de flujo 6 están dispuestos en un primer ángulo esencialmente

agudo  $\alpha_1$  hacia el eje longitudinal de la salida o hacia el eje longitudinal del hidrociclón aplicado, para que la suspensión enriquecida tenga un flujo esencialmente tangencial al menos cerca de la salida dentro de los medios de flujo. Los medios de flujo 6 pueden ser un tubo flexible o rígido. Aplicar unos medios de flujo en un ángulo esencialmente agudo  $\alpha_1$  hacia el eje longitudinal de la salida o hacia el eje longitudinal del hidrociclón da lugar a un orificio con forma oval en la salida del hidrociclón. Para reducir la energía cinética del material celular antes de que caiga en el biorreactor 10 los medios de flujo 6 tienen una longitud mínima preferida de al menos 10 cm, más preferentemente una longitud entre 50 y 100 cm.

Para usar el hidrociclón, por ejemplo, en un sistema de perfusión, los medios de flujo 6 guían la suspensión hasta dentro del biorreactor. Para drenar la suspensión por encima del nivel superior del fluido 9 del biorreactor 10 los medios de flujo 6 son aplicados en un segundo ángulo agudo  $\alpha_2$  contra la pared del biorreactor. El extremo de los medios de flujo, en oposición a la salida del hidrociclón, está cortado de preferencia en un tercer ángulo agudo  $\alpha_3$ . Por tanto, la intersección o abertura en el extremo distal del tubo tiene forma oval. La abertura con forma oval en el extremo distal de los medios de flujo está dispuesta a una distancia pequeña de cara a la pared del biorreactor, para que el material celular fluya sustancialmente de forma tangencial contra la pared. La distancia está de preferencia dentro del margen de 1 a 50 mm.

La segunda realización preferida del invento presente, mostrada en la Figura 2, proporciona un hidrociclón conectado por unos medios de flujo 11 ó un saliente de comunicación al biorreactor 10 en el que la salida 5 del hidrociclón está dispuesta con relación al biorreactor para que la suspensión sea entregada por debajo del nivel superior de la suspensión/fluido dentro del biorreactor. Los medios de flujo 11 del biorreactor están sumergidos en el fluido 9 del biorreactor 10 para que la suspensión procedente de los medios de flujo sea transportada por debajo del nivel superior del fluido 9 dentro del biorreactor. Debido a la inmersión de los medios de flujo la presión hidrostática dentro del hidrociclón es lo suficientemente pequeña para evitar las energías cinéticas que puedan dañar el material celular. Además, el material celular es decelerado debido a la fricción con las moléculas de la suspensión.

Por un lado, los esfuerzos de cizalladura disminuyen cuando se reduce la presión hidrostática, por otra parte, la energía de separación disminuye. Para conseguir una deseada mayor velocidad de producción, es favorable el uso de al menos dos hidrociclones en paralelo o en serie o una combinación en paralelo y en serie.

En la Figura 3, el hidrociclón guía la suspensión celular enriquecida a través del conector 12 por debajo del nivel superior del fluido 9 del biorreactor 10, en la que el hidrociclón está dispuesto horizontalmente. Se aprecia también disponer el hidrociclón verticalmente o en cualquier otro ángulo con el biorreactor.

En instalaciones piloto o construcciones de producción el hidrociclón puede ser aplicado con una rosca de tornillo DN25 con junta de anillo tórico que puede estar conectada mediante una pieza de conexión del biorreactor correspondiente con la parte superior del biorreactor. Esta conexión puede ser estéril para que sea posible una esterilización in situ del hidrociclón. Para biorreactores con un volumen superior a 250 litros se prefiere el uso de múltiples hidrociclones que pueden acabar en un conducto de flujo común.

En el caso del uso en paralelo de dos o más hidrociclones, las salidas de una pluralidad de hidrociclones pueden acabar en un conducto de flujo común, por ejemplo.

Resulta evidente que las soluciones descritas anteriormente y mostradas en las Figuras 1 a 3 y sus características pueden ser combinadas, al menos en parte. Por ejemplo, la realización mostrada en la Figura 2 puede comprender medios de flujo 11 que estén dispuestos en un ángulo agudo con referencia al hidrociclón y/o a la pared del biorreactor. Además, el hidrociclón con los medios de flujo rectos 11 como se muestra en la Figura 2 puede ser dispuesto como se muestra en la Figura 1, en la que el extremo distal de los medios de flujo acaban cerca de la pared del biorreactor ya sea por encima o por debajo de la superficie del fluido.

En las Figuras 4 y 5 se muestran ejemplos de las ventajas y aplicaciones del invento presente.

La Figura 4 muestra un ejemplo de un cultivo continuo de células SP2/0 en un reactor de 5 L mediante perfusión por hidrociclón de acuerdo con una realización preferida según el invento presente. Resulta evidente que la viabilidad celular es  $> 95\%$  en todo momento. Se obtuvieron concentraciones celulares superiores a  $8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  a una velocidad de perfusión de  $0,5 V_{RD}^{-1}$ . Se usó un medio de ZKTI y 8 mM de glutamina a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

La Figura 5 muestra un ejemplo de un cultivo continuo de células NS0 en un reactor de 5 L mediante perfusión por hidrociclón de acuerdo con las realizaciones preferidas del invento. Resulta evidente que la viabilidad celular es  $> 95\%$  en todo momento. Se obtuvieron altas concentraciones celulares superiores a  $7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  a una velocidad de perfusión de  $0,5 V_{RD}^{-1}$ . Se usó un medio de CD-hibridoma con una mezcla de colesterol/lípido y 8mM de glutamina a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

**REIVINDICACIONES**

1. Método para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión mediante los pasos siguientes:
  - 5 (a) proporcionar al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
  - (b) entregar la suspensión a la entrada (4) del hidrociclón,
  - (c) drenar la suspensión enriquecida con las células u otro material desde la salida (5),
  - 10 (d) en el que la suspensión enriquecida es guiada desde o a través de la salida (5) por unos medios de flujo (6) en un ángulo esencialmente agudo ( $\alpha_1$ ) hacia el eje longitudinal de la salida o hacia el eje longitudinal del hidrociclón para que la suspensión enriquecida tenga un flujo esencialmente tangencial al menos cerca de la salida dentro de los medios de flujo.
  
2. Método para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión mediante los pasos siguientes:
  - 15 (a) proporcionar al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
  - (b) entregar la suspensión a la entrada (4) del hidrociclón,
  - (c) drenar la suspensión enriquecida con las células u otro material desde la salida (5),
  - 20 (d) en el que la suspensión enriquecida es guiada desde o a través de la salida (5) por unos medios de flujo que están formados de manera que en su extremo en oposición a la salida la energía cinética de la suspensión enriquecida es lo suficientemente pequeña para evitar cualquier daño a las células o al material de la suspensión cuando son emitidos desde los medios de flujo.
  
3. Método para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión mediante los pasos siguientes:
  - 25 (a) proporcionar al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
  - (b) entregar la suspensión a la entrada (4) del hidrociclón,
  - 30 (c) drenar la suspensión enriquecida con las células u otro material desde la salida (5),
  - (d) en el que la suspensión enriquecida es guiada desde o a través de la salida (5) por unos medios de flujo para que en su extremo en oposición a la salida los medios de flujo transporten la suspensión enriquecida por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro de un biorreactor (10).
  
4. Método para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión mediante los pasos siguientes:
  - 35 (a) proporcionar al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
  - (b) entregar la suspensión a la entrada (4) del hidrociclón,
  - 40 (c) drenar la suspensión enriquecida con las células u otro material desde la salida (5),
  - (d) en el que la suspensión enriquecida es guiada desde o a través de la salida (5) directamente por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro de un biorreactor (10).
  
5. Método de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 2.
  
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los medios de flujo (6) están conectados a la salida mediante un orificio con forma oval en la salida.

7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los medios de flujo tienen una longitud de al menos 10 cm, de preferencia entre 50 y 100 cm.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los medios de flujo (6, 11) en su extremo distal en oposición a la salida del hidrociclón están dirigidos hacia un biorreactor (10).
- 5 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los medios de flujo (11) o un saliente de comunicación del biorreactor transportan la suspensión enriquecida por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro del biorreactor (10).
- 10 10. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los medios de flujo (6) acaban en su extremo distal en oposición a la salida del hidrociclón en un ángulo de preferencia agudo ( $\alpha_3$ ), formando una abertura con forma oval.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el extremo distal de los medios de flujo (6) está dispuesto en una posición, que forma un ángulo de preferencia agudo ( $\alpha_2$ ) entre el extremo distal de los medios de flujo y la pared del biorreactor (10).
- 15 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el método es usado en un sistema de perfusión.
13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que están dispuestos al menos dos hidrociclones paralelos entre sí.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que al menos dos hidrociclones son drenados por medio de un conducto de flujo común.
- 20 15. Aparato para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión con:
- (a) al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
- (b) una entrada (4) del hidrociclón para entregar la suspensión dentro del hidrociclón,
- 25 (c) una salida (5) para drenar la suspensión que está siendo enriquecida con células u otro material, y
- (d) unos medios de flujo (6) para guiar la suspensión enriquecida desde o a través de la salida que está orientada en un ángulo esencialmente agudo ( $\alpha_1$ ) hacia el eje longitudinal de la salida o hacia el eje longitudinal del hidrociclón para que la suspensión enriquecida tenga al menos cerca de la salida un flujo esencialmente tangencial dentro de los medios de flujo.
- 30 16. Aparato para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión con:
- (a) al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
- (b) una entrada (4) del hidrociclón para entregar la suspensión dentro del hidrociclón,
- 35 (c) una salida (5) para drenar la suspensión que está siendo enriquecida con células u otro material, y
- (d) unos medios de flujo para guiar la suspensión enriquecida desde o a través de la salida (5), estando formados los medios de flujo para que en su extremo en oposición a la salida la energía cinética de la suspensión enriquecida sea lo suficientemente pequeña para evitar cualquier daño a las células o al material de la suspensión cuando son emitidos desde los medios de flujo.
- 40 17. Aparato para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión con:
- (a) al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
- (b) una entrada (4) del hidrociclón para entregar la suspensión dentro del hidrociclón,
- 45 (c) una salida (5) para drenar la suspensión que está siendo enriquecida con células u otro material, y

- (d) unos medios de flujo para guiar la suspensión enriquecida desde o a través de la salida (5) para que en su extremo en oposición a la salida los medios de flujo (11) transporten la suspensión enriquecida por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro de un biorreactor (10).
- 5 18. Aparato para separar células eucariotas o procariotas u otro material particularmente biológico que sea sensible a grandes fuerzas de cizalladura de una suspensión con:
- (a) al menos un hidrociclón con una entrada (4) y una salida (5), estando la salida esencialmente en oposición a la entrada en el que el espacio interior (2) del hidrociclón converge hacia la salida (5),
- (b) una entrada (4) del hidrociclón para entregar la suspensión dentro del hidrociclón,
- (c) una salida (5) para drenar la suspensión que está siendo enriquecida con células u otro material,
- 10 siendo guiada la suspensión enriquecida desde o a través de la salida (5) directamente por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro de un biorreactor (10).
19. Aparato de acuerdo con la reivindicación 15 y la reivindicación 16.
20. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a la 17 y la 19, en el que los medios de flujo (6) están conectados a la salida (5) mediante un orificio con forma oval en la salida.
- 15 21. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a la 17 y de la 19 a la 20, en el que los medios de flujo tienen una longitud de al menos 10 cm, de preferencia entre 50 y 100 cm.
22. Sistema con un biorreactor (10) y un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 15 a la 17 y de la 19 a la 21 en el que los medios de flujo (6, 11) en su extremo distal en oposición a la salida del hidrociclón están dirigidos hacia el biorreactor.
- 20 23. Sistema de acuerdo con la reivindicación 22, en el que los medios de flujo o un saliente de comunicación del biorreactor (10) transportan la suspensión enriquecida por debajo del nivel superior de un fluido (9) dentro del biorreactor (10).
24. Sistema de acuerdo con la reivindicación 22, en el que los medios de flujo acaban en su extremo distal en oposición a la salida (5) del hidrociclón en un ángulo de preferencia agudo ( $\alpha_3$ ), formando una abertura con forma oval.
- 25 25. Sistema de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el extremo distal de los medios de flujo está dispuesto en una posición, formando un ángulo de preferencia agudo ( $\alpha_2$ ) entre el extremo distal de los medios de flujo y la pared del biorreactor (10).
26. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 15 a la 25, en el que el sistema es usado en un sistema de perfusión.
- 30 27. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a la 26 en el que están dispuestos al menos dos hidrociclones paralelos entre sí.
28. Sistema de acuerdo con la reivindicación 27, en el que al menos dos hidrociclones son drenados por un conducto de flujo común.

35

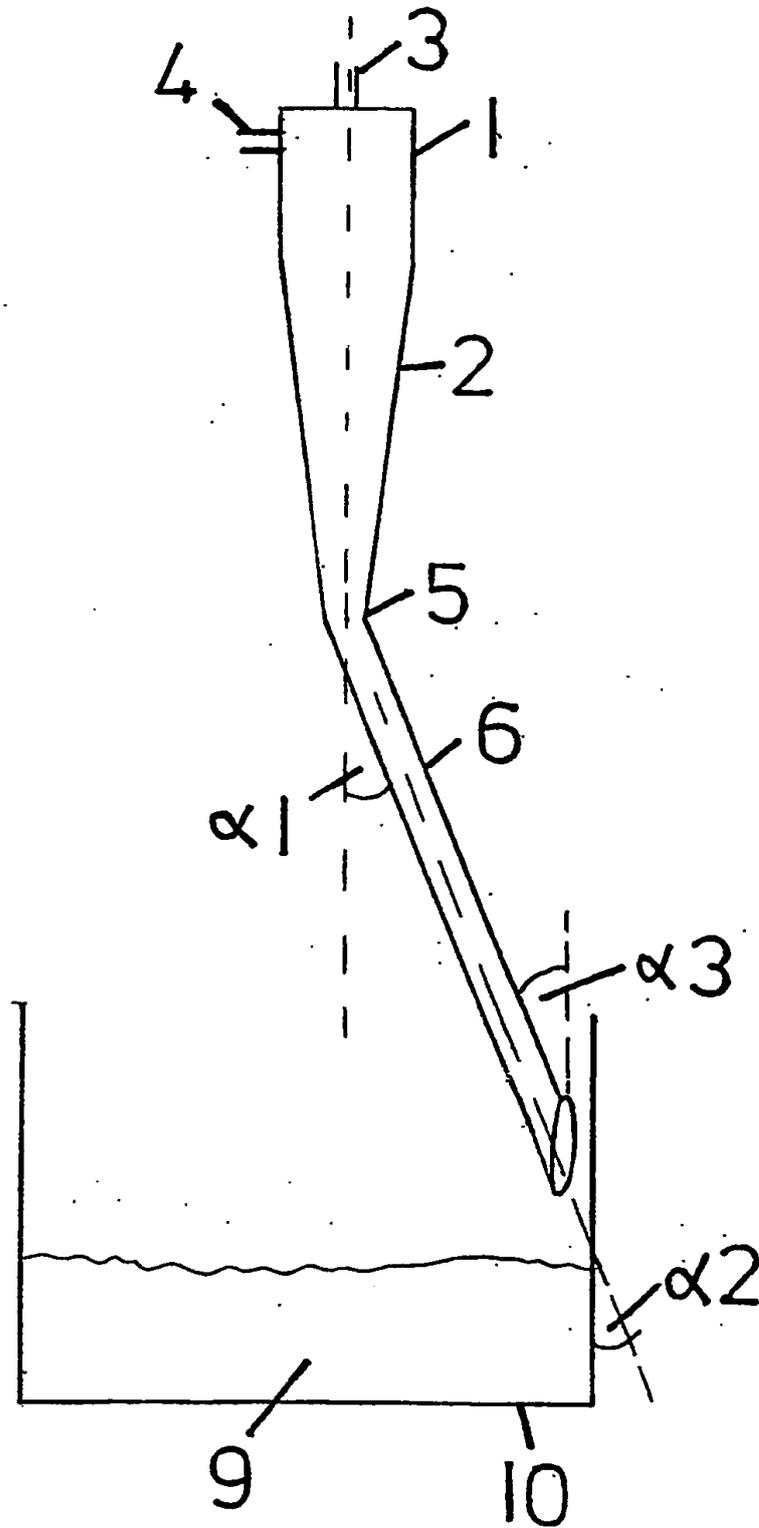


FIG 1

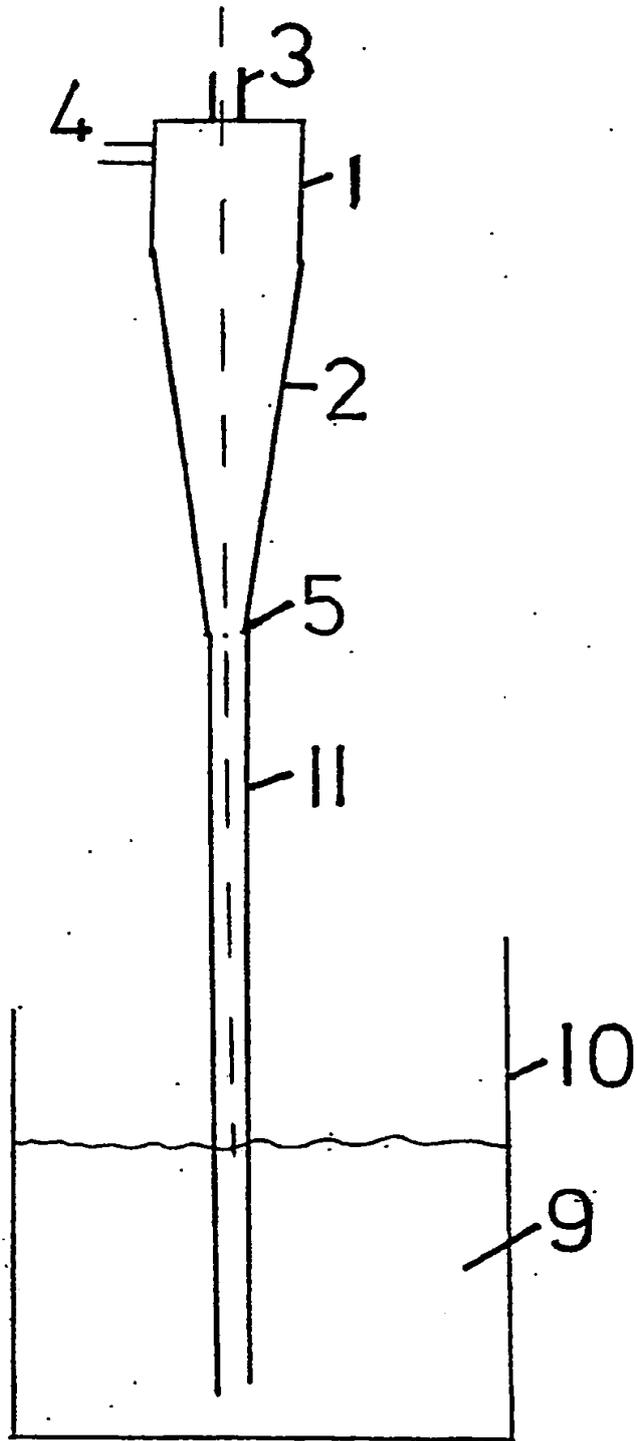


FIG2

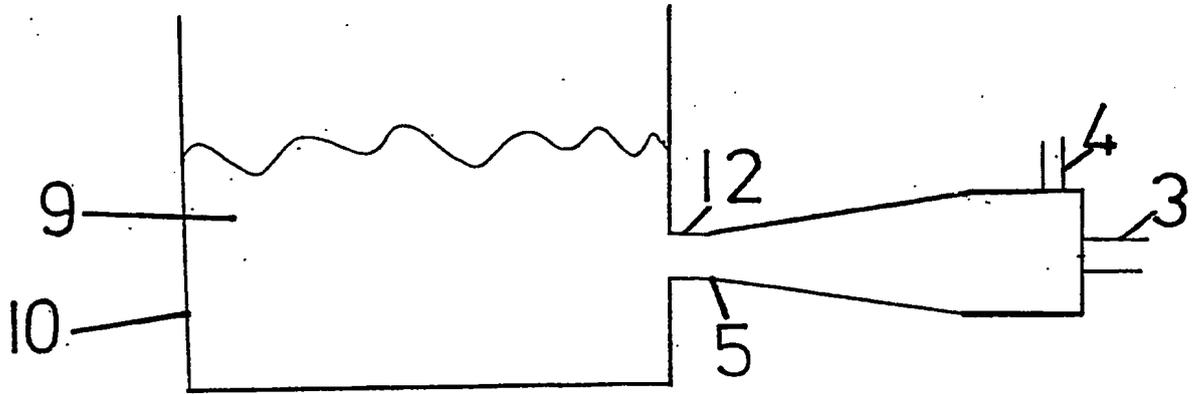


FIG 3

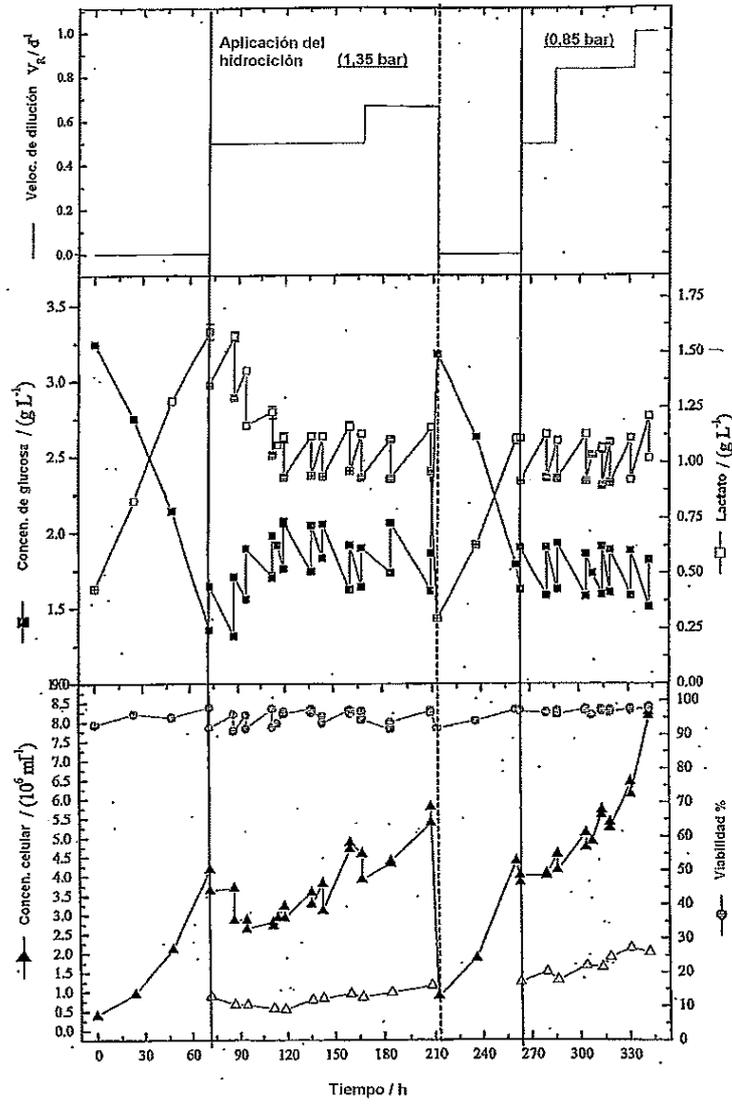


Fig. 4

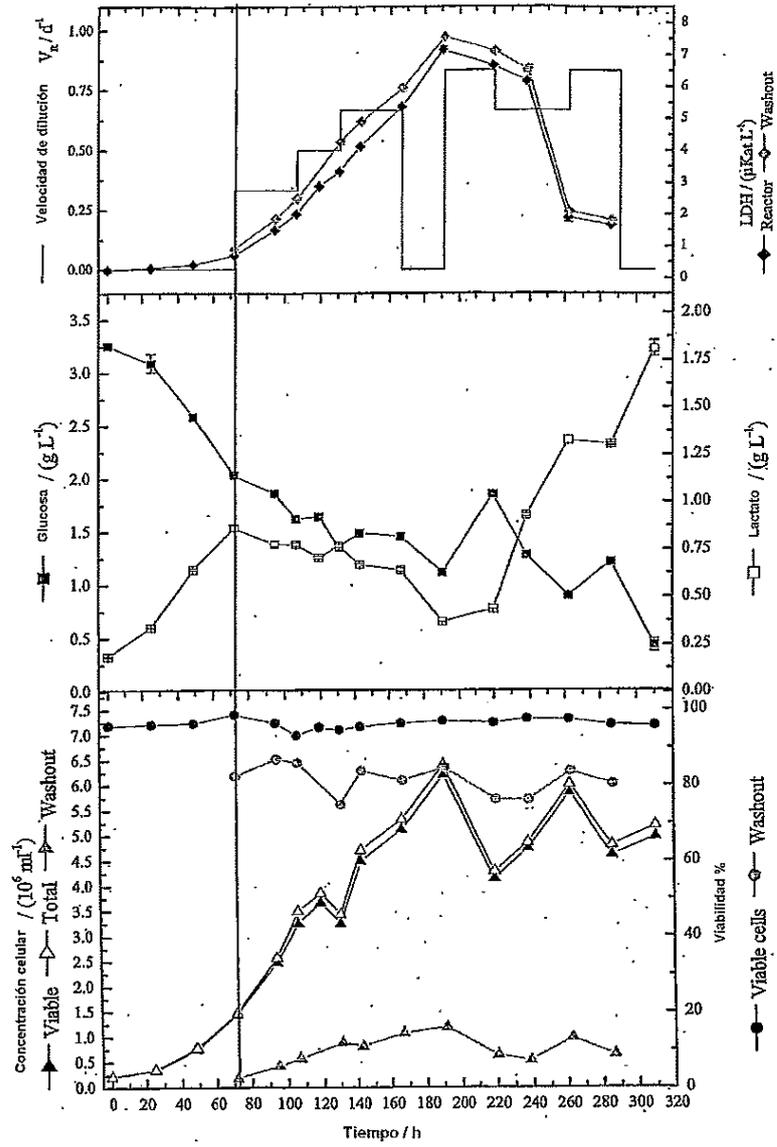


Fig. 5