

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 683**

51 Int. Cl.:

C12M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2007 PCT/US2007/012498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2008 WO08016411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2007 E 07795356 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2046941**

54 Título: **Puerto de depósito de biorreactor desechable mejorado**

30 Prioridad:

02.08.2006 US 835329 P
26.03.2007 US 728560

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2017

73 Titular/es:

FINESSE SOLUTIONS, INC. (100.0%)
3501 Leonard Ct.
Santa Clara, CA 95054, US

72 Inventor/es:

SELKER, MARK;
JOHNSTON, TIMOTHY y
PALDUS, BARBARA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 645 683 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

Puerto de depósito de biorreactor desechable mejorado

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está dirigida a un puerto improvisado para depósitos de biorreactor. El puerto puede usarse para permitir la inserción de instrumentos para monitorear las condiciones en el interior del depósito del biorreactor y/o para la introducción de microorganismos, nutrientes o reactivos en el depósito.

10

RESUMEN DE LA INVENCION

Un biorreactor puede definirse como un depósito en el que se efectúa una conversión biológica. Esta definición puede aplicarse a cualquier conversión que involucre enzimas, microorganismos, o células de animales o plantas.

15 Sin embargo, usamos la palabra biorreactor para referirnos a depósitos (normalmente hechos de vidrio, metal o un polímero) en el que se cultivan organismos de manera controlada. El cultivo de células moderno se logra normalmente usando un biorreactor o un depósito fermentador. A pesar de que un biorreactor y un fermentador son básicamente similares en diseño y función general, la dicotomía en la nomenclatura se usa algunas veces para distinguir entre cultivos de células de animal o de plantas. Aquí usaremos el término biorreactor en sentido inclusivo
20 y genérico que incluya cultivos aeróbicos y anaeróbicos de células de microbios, animales y plantas, y comprendiendo por lo tanto un fermentador.

Se hace referencia al documento DE 3905158A que describe un sistema modular para biorreactores que comprende longitudes de tubería que tienen rebordes en los extremos y pueden conectarse unos a otros y además se le pueden
25 acoplar componentes de tapa.

El documento WO 2005/068059 A1 describe una bolsa de mezcla con base rígida que recibe y aloja un componente que agita fluido.

30 La meta de un biorreactor efectivo es controlar, contener e influenciar positivamente una reacción biológica deseada. Una reacción biológica deseada considerada aquí es el crecimiento de microorganismos. El procedimiento más popular para conseguir esto es un sistema de cultivo por lotes. Ver, por ejemplo, James Lee, Biochemical Engineering, Washington State University, e-book, 2002. Por motivos de simplicidad y claridad detallaremos aquí el proceso biológico de un lote, pero debe entenderse que el diseño del puerto de la presente invención puede
35 aplicarse a cualquier proceso de biorreactor (por ejemplo, perfusión u otro proceso continuo) y también a un proceso químico en donde la monitorización del depósito de reacción es importante.

En el proceso biológico de un lote los microorganismos se inoculan en un medio de cultivo y el ciclo de crecimiento
40 comienza. Este ciclo de crecimiento consiste en:

1. Fase de latencia: Un periodo de tiempo durante el que las células no han comenzado aún un crecimiento significativo.
2. Fase de crecimiento acelerado: El periodo durante el que el número de células incrementa y la división celular
45 alcanza un máximo.
3. Fase de crecimiento exponencial: El periodo durante el que el número de células incrementa de manera exponencial a medida que se dividen las células. La tasa de crecimiento se incrementa durante esta fase, pero la tasa de división es constante y a su máximo.
4. Fase de crecimiento desacelerado: Una vez que la tasa de crecimiento alcanza un máximo va seguida de una
50 deceleración en la tasa de crecimiento y la tasa de división.
5. Fase estacionaria: La población de células alcanza un valor máximo y no aumenta más.
6. Fase mortal: Una vez que los nutrientes disponibles para las células se han agotado y/o el entorno del biorreactor se ha vuelto demasiado hostil, las células comenzarán a morir y el número viable de células descenderá.

55 De manera general, es deseable minimizar la fase de latencia, para asegurar una concentración de nutrientes adecuada (por ejemplo, glucosa) en las fases de crecimiento, y para retrasar la activación de la fase mortal el mayor tiempo posible. Para conseguir esta optimización de la reacción biológica, es decir, de manera específica para maximizar el rendimiento de la producción de un biorreactor, deben considerarse dos factores. El primero es proporcionar parámetros de diseño de reactor adecuados para los aspectos biológicos, químicos y físicos concretos
60 del sistema. La segunda área de mayor importancia en el diseño de un biorreactor es monitorizar las condiciones en

el interior del reactor, así como controlar los parámetros relevantes al crecimiento de microorganismos. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan necesariamente a:

1. Temperatura
- 5 2. pH
3. Gases disueltos (por ejemplo: O₂, CO₂.)
4. Nutrientes (por ejemplo, azúcares como glucosa, proteínas, aminoácidos, grasas)
5. Sales inorgánicas
6. Niveles de agua y espuma en el biorreactor
- 10 7. Formación del producto (por ejemplo, colesterol, vitaminas)
8. Eliminación mediante producto (por ejemplo, ácido láctico, NH₃).
9. Productos finales: por ejemplo, enzimas y proteínas.
10. Densidad celular (concentración)
11. Viabilidad celular
- 15 12. Conductividad and osmolalidad

Debe señalarse que muchos de estos parámetros son imprescindibles sin importar que método de cultivo (es decir, por lotes, continuo, o perfusión) se use, y que algunos parámetros son más importantes que otros dependiendo del tipo de microbio o célula que se está cultivando. El proceso puede, por ejemplo, ser un proceso de lotes en un tanque agitado, un proceso de perfusión o puede utilizar un biorreactor aéreo etc. Sin embargo, el conocimiento de los parámetros que están relacionados con el crecimiento celular, respiración celular, muerte celular, y maximización del rendimiento, son fundamentales para comprender y optimizar cualquier proceso de crecimiento.

Debido a los requisitos para manejar presión hidrostática y la presión asociada con procedimientos de limpieza/esterilización, los biorreactores han sido construidos hasta hoy día generalmente de acero inoxidable como por ejemplo 316L, incluyendo a veces componentes de vidrio. El coste inicial de un biorreactor de acero inoxidable de 316L y los trabajos de fontanería concomitantes es considerable. El coste para hacer funcionar el impulsor, el aireador, y para enfriar/calentar el biorreactor es dimensionable también. Finalmente, los costes de limpieza y esterilización de un reactor de estas características tras su uso, así como el vertido del agua residual de los procesos de limpieza son inevitables. Debido a los costes mencionados anteriormente asociados con poner en marcha un biorreactor de acero convencional, muchas organizaciones han comenzado a usar biorreactores desechables. Estos biorreactores de un solo uso están construidos generalmente usando películas que se ha demostrado que son biocompatibles y están libres de componentes derivados de animales. A veces estas películas deben cumplir con estándares fijados por la US Food and Drug Administration (FDA) y la United States Pharmacopeia (USP). La capa en contacto con el medio es a menudo de polietileno o etilvinilacetato (EVA), y la capa externa (de refuerzo) es a menudo de nylon, aunque a veces se han usado diferentes combinaciones de materiales y técnicas de construcción, o al menos, se han propuesto. Las variaciones en los materiales utilizados se determinan frecuentemente por la implementación precisa de la mezcla, y/o según si la bolsa necesita o no ser permeable a los gases. A veces estas bolsas desechables de reactor incluyen una entrada de gas y puertos de salida, filtros de entrada y salida, una válvula de control de la presión, y un puerto para rellenar la bolsa con medios acuosos.

Debido a las múltiples variaciones en el diseño de biorreactores desechables, hay también muchas variaciones en los procedimientos para conseguir la mezcla y aireación. Un diseño famoso para biorreactores de bolsa usa una plataforma que implementa un movimiento de balanceo a la bolsa para mezcla y airear los contenidos de la bolsa (ver por ejemplo el documento Published US Patent 6,190,913). Otros diseños de biorreactor desechable se parecen más a reactores convencionales de acero inoxidable y vidrio, y usan impulsores que imitan los procedimientos de mezclado usados en biorreactores convencionales de acero inoxidable y vidrio (ver por ejemplo el documento US Patent Application 2005/0239199A1). Muchas reivindicaciones se hacen a ambos lados de este asunto en relación con la eficacia de los diferentes procedimientos de mezclado. El movimiento de balanceo es supuestamente más suave que el uso de impulsores y por lo tanto permite reducir el daño a las células de mamíferos, pero aparentemente puede estresar las costuras de la bolsa y no siempre puede proporcionar de manera efectiva suficiente mezcla y/o oxigenación. Los diseños basados en impulsor son generalmente agitadores más efectivos, pero a veces pueden dañar las células, y también requieren más infraestructura.

Independientemente del procedimiento usado para mezclar en biorreactores desechables, está claro que faltan procedimientos adecuados para determinar la eficacia del proceso del biorreactor y métodos fiables para obtener información oportuna del estado del proceso. Solo recientemente muchos de los principales fabricantes de biorreactores desechables han intentado unir la tecnología de sensores con su bolsa. La ambigüedad general respecto a la eficacia del mezclado y la oxigenación en bolsas de biorreactor desechable resalta la necesidad

fundamental para ser capaz de monitorear parámetros fundamentales del proceso. La práctica actual con biorreactores estándar de vidrio y acero es introducir las sondas aplicables a través de un puerto en la pared del reactor o placa frontal. El uso del mencionado puerto permite la calibrar y probar las sondas antes de colocar las sondas en el biorreactor. Sin embargo, con biorreactores desechables es difícil medir muchas de los parámetros fundamentales mencionados anteriormente usando la mayoría de las sondas disponibles debido a la naturaleza dieléctrica de las bolsas de biorreactor desechables. Concretamente, la mayoría de las sondas electroquímicas existentes usadas para medir parámetros de reacción como el oxígeno disuelto, pH, y CO₂ requieren que la sonda esté blindada y conectada a tierra. Alcanzar esto es complicado a veces por la falta de una carcasa de metal o al menos conductiva (y por tanto dieléctrica) para la bolsa del biorreactor. Además, muchas de las sondas tradicionales son demasiado largas o, por otra parte, no usables de manera funcional en biorreactores de bolsa desechable.

Un procedimiento para evitar muchos de los problemas inherentes con los sensores basados en la electroquímica en bolsas de biorreactor poliméricas es a través del uso de diferentes metodologías de transducción. Por ejemplo, las sondas para medir el oxígeno disuelto, el pH, y el CO₂ que utilizan tecnologías sensoras basadas en la óptica están disponibles desde tiempo reciente. Se ha informado de diferentes procedimientos para integrar sensores ópticos en una bolsa de biorreactor desechable. Un procedimiento posible es sellar la bolsa directamente con un parche con una sonda montada sobre él (Ver el documento Published US Patent Application: 2005/0272146). En la Figura 1 se muestra una bolsa desechable como se describe en la solicitud de patente mencionada anteriormente, en donde 101 es la situación de las sondas que van a acoplarse al interior de la bolsa. El parche necesita ser acoplado a la bolsa usando materiales biocompatibles que puedan resistir radiación gamma o procedimientos alternativos de esterilización. Aunque no está totalmente claro en las Figuras de la solicitud de patente mencionada anteriormente, es posible montar "puntos" que contengan un tinte sensible a un analito objetivo (por ejemplo, pH, u O₂ o CO₂,) en la superficie interior de un parche de plástico biocompatible y su uso en una radiofrecuencia o una fuente de calor para fundir este parche en la pared de la bolsa. Los puntos en este parche pueden contener varios materiales fluorescentes usados para medir el pH, el O₂ o CO₂ disueltos. Estos puntos utilizan generalmente un "puntos" por ejemplo, un complejo de metal de transición cuyo tiempo de fluorescencia es apagado por la presencia del analito objetivo a ser medido. El material puede imprimirse en el parche usando una calcomanía. Los únicos requisitos son que se transmita luz suficiente para excitar el tinte presente en la superficie interior del parche a través de la ventana del parche, y que suficiente señal fluorescente se transmita de vuelta a través de la ventana de manera que el decaimiento en la fuerza de la señal puede monitorearse desde el exterior de la bolsa. El monitoreo o la interpretación de las señales se hace normalmente en el transmisor que aloja la interfaz de usuario, el procesamiento de señales, en algunos casos los componentes opticoeléctricos del sistema de monitoreo del analito.

En el caso de bolsas de reactor desechables, usar un parche de material fusionado con el revestimiento, o simplemente usar el propio revestimiento del reactor desechable para montar sondas basadas en la óptica hace que sirgan limitaciones significativas ya que es difícil introducir y sacar sondas ópticas de alta fidelidad o conexiones ópticas intrusivas de la bolsa. Usando un simple punto fijo al interior de la pared del biorreactor desechable, solo pueden transmitirse y recibirse señales ópticas de fidelidad limitada. Esto añade mayores requisitos y restricciones a los componentes ópticos y electrónicos en el transmisor. Además, los materiales usados para hacer las bolsas se eligen normalmente por su biocompatibilidad, permeabilidad a los gases, y fuerza, más que por su transparencia óptica. Esto hace que introducir señales ópticas de alta fidelidad sea problemático ya que la luz puede ser atenuada y/o dispersada de manera aleatoria al pasar a través de la pared de la bolsa. También dificulta o incluso imposibilita optimizar la eficiencia del sistema óptico de transmisión y recepción.

Otros problemas que surgen de depender de la técnica relativamente simple de fijar un material sensor al interior de una pared de la bolsa de biorreactor desechable son que puede impedir la instalación de sensores más avanzados. Concretamente, a medida que avanzan los sensores es evidente que las señales además de una señal óptica necesitaran ser introducidos y extraídas del biorreactor. Es probable que cuando los sensores que utilizan tecnología óptica, eléctrica, química, acústica, magnética, y microfluídica o un subconjunto de estas tecnologías, será necesario más comunicación con el instrumental externo del que es posible usando las técnicas disponibles actualmente.

A través del uso de una interfaz más sofisticada o ventana hacia el biorreactor, pueden obtenerse múltiples medidas a la vez. Estas medidas pueden incluir cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente, y pueden incluir detección pH/DO o ATR de glucosa/lactato. Los procedimientos de medición incluyen, pero no se limitan a aquellos que están basados en técnicas ópticas, eléctricas, químicas, bioquímicas, acústicas, magnéticas, y microfluídicas, o cualquier combinación de estas. Estas técnicas pueden medir tanto el espacio vacío del medio líquido o gaseoso en el interior del biorreactor desechable. Además, estas mediciones pueden utilizar cualquier parte del espectro electromagnético incluyendo ultravioleta, visible, infrarrojo cercano, y desde radiación infrarroja media a infrarroja lejana o radiofrecuencia y campos eléctricos DC para sondear el sistema bioquímico o químico en el interior de la bolsa del reactor. De manera óptica, las mediciones pueden hacerse también usando radiación Raman Stokes o

radiación anti-Stokes, usando procedimientos FTIR, autofluorescencia, fotoacústica o sistemas de campo óptico cercano para obtener los datos de interés. Otras mediciones pueden implicar las siguientes tecnologías miniaturizadas o en chip: espectrometría de masa, cromatografía líquida, citometría de flujo, o resonancia magnética nuclear (NMR). Estos datos pueden indicar directa o indirectamente el estado del medio del biorreactor. Virtualmente cualquier método de transducción que pueda usarse con el puerto de la presente invención, y que puede correlacionarse directamente con un analito de interés puede ser un sensor útil.

Además de las bolsas de biorreactor desechables más tradicionales con mecadores (Wave Biotech) o mezcladores (Hyclone, XCellerex) o rociadores (por ejemplo, accionados por aire) para agitar, otros tipos de biorreactores incluyendo biorreactores desechables que utilizan fibras huecas, o placas paralelas para crecer (por ejemplo, Coming Cell Cube®) pueden beneficiarse del uso del puerto y tecnología de sonda desechable de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15

La Figura 1 muestra una bolsa de biorreactor desechable de acuerdo con la técnica anterior.

Las Figuras 2 a 8 muestran varias realizaciones de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 muestra un conjunto de puerto que permite que una variedad de mediciones ópticas, eléctricas, acústicas, magnéticas, y microfluídicas tengan lugar en un biorreactor desechable.

La Figura 3 muestra un puerto combinado con un parche de material para facilitar el acoplamiento del puerto a la pared del depósito del biorreactor.

La Figura 4 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde un hueco óptico desechable se usa con el propósito de monitorear la densidad celular total.

Este sistema puede usarse también para mediciones espectroscópicas.

La Figura 5 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde la radiación infrarroja cercana y la radiación infrarroja media se usan junto con un sistema de espectroscopia de reflectancia total atenuada.

Este conjunto puede usarse para detectar múltiples analitos a la vez.

La Figura 6 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para usar con un sistema de fibra óptica de fase fluorométrica basada o de medición Raman.

La Figura 7 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para usar con sistema de comunicaciones ópticas en exteriores de fase fluorométrica basada.

La Figura 8 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para usar con sensores eléctricos como transistores de efecto campo específico, o sensores de conductividad, temperatura, u osmolalidad.

35

La Figura 9 muestra un puerto de acuerdo con la presente invención y un sensor que permite que un sensor de laboratorio-en-chip como un citómetro de flujo miniaturizado, un espectrómetro de masa o un cromatógrafo líquido.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Puertos para usar con una jeringa para extraer material fuera de una bolsa de biorreactor desechable o para inyectar material en una bolsa son conocidos pero dichos puertos solo son adecuados para eliminar o introducir fluido en el biorreactor y no están diseñados para usar con sensores de monitoreo avanzados, y son evidentemente no aptos para soportar el uso de sondas ecuménicas. Hemos desarrollado una solución para el monitoreo de analitos fundamentales en el medio líquido contenido en un biorreactor desechable colocando un puerto que puede sellarse en la pared del biorreactor desechable. Una realización de nuestro diseño único de un puerto para uso analítico se muestra en la Figura 2. El puerto analítico de la presente invención puede acomodar una variedad de plataformas ópticas, eléctricas, acústicas, magnéticas, y/o microfluídicas para monitorear y controlar aplicaciones. La Figura 2 es un dibujo transversal que muestra cómo funciona este puerto. En la Figura 2, 1 designa una parte del puerto que puede fijarse de manera permanente al revestimiento del biorreactor desechable mediante radiofrecuencia o soldándolo mediante calor a la bolsa. Este componente de puerto sirve como placa de base y está hecho de un material flexible (por ejemplo, una cicloolefina) para conformar un subsistema más delicado que no requiere soporte. También se muestra un componente de casquillo insertable 2 que puede facilitar una variedad de mediciones. En su forma más simple puede contener un componente óptico pasivo que simplemente dirige luz hasta y desde 3 (el «lector»), a través del fluido en el interior del biorreactor. El lector 3 puede ser un sistema óptico, eléctrico, acústico, magnético, o microfluídico (o una combinación) que sostiene a la infraestructura adecuada para las mediciones. Dicha infraestructura puede comprender una fuente óptica y un fotodetector que mide la señal que emana de un punto de tinte presente en el componente 3 y/o la cantidad de absorción de luz transmita a través de un hueco óptico para determinar por tanto la absorción causada por el fluido del biorreactor. Otras realizaciones de este inserto se

discutirán junto con otras figuras que ilustran la invención. Cabe resaltar que el lector puede estar fabricado desde metal o plásticos rígidos (por ejemplo, un poliéter-cetona) y no entra en contacto con los contenidos del biorreactor desechable. El lector puede estar, pero no necesariamente sujeto por una cápsula de cierre o un mecanismo de bloqueo 4. Se muestran enroscados en la Figura 2, pero métodos de retención alternativos o configuraciones que

5 retienen el sistema en una posición fija pueden utilizarse.

Por ejemplo, el lector puede acoplarse al inserto desechable mediante un muelle mecánico cargado o una clavija enroscada, mientras que el inserto se sujeta al puerto por ejemplo usando una presilla o un anillo de compresión. Además, dependiendo del sistema material elegido, el inserto desechable puede unirse o fijarse de manera

10

La Figura 3 muestra una vista general de cómo un puerto desechable de acuerdo con la presente invención puede montarse en el revestimiento 6 de un biorreactor desechable. La parte de base del puerto 5 puede sellarse al revestimiento 6 usando procedimientos conocidos, incluyendo, pero no limitados a energía de radiofrecuencia, una fuente termal, y energía acústica/ultrasónica.

15

La Figura 4 muestra una realización del conjunto de puerto mostrado de manera general en la Figura 2 cuando se diseña para monitorear la densidad celular. La estructura de puerto 10 (correspondiente al componente 1 en la Figura 2) está fijado al revestimiento 11 del biorreactor desechable. Un componente normalmente desechable 12 (correspondiente al componente 2 de la Figura 2) que está hecho de un material polimérico que puede esterilizarse usando radiación gamma o beta, y que cumple con los requisitos de biocompatibilidad de la FDA y la USP se inserta

20

en el puerto. Este componente 12 tiene secciones ópticas considerablemente transparentes o puede alojar componentes ópticos 14 y 16. Estos componentes se usan para crear un hueco óptico 15 que se sumerge en el fluido del biorreactor. La fuente de luz apropiada 13 (por ejemplo: un diodo láser, un LED de espectro

25

adecuadamente filtrado, un láser de estado sólido bombeado por diodo, etc.) se acopla a los componentes ópticos y atraviesa el hueco 15 y vuelve 17 al fotodetector (no mostrado) para el procesamiento de señales. Este tipo de sensor de densidad celular es conocido para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, US Patent No. 7,180,594). Debe resaltarse también que con la fuente óptica apropiada y componentes ópticos de detección y componentes electrónicos el sistema mostrado en la Figura 4 puede usarse también para identificar analitos mediante el uso de

30

transmisión directa o espectroscopia de absorción, o espectroscopia de Raman (por ejemplo: Andrew Berger, Tae-Woong Koo, Irving Itzkan, Gary Horowitz, and Michael S. Feld, Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy, *Applied Optics*, 38, 13, 1999, p. 2916). La realización mostrada en la Figura 4 puede usarse también para detectar autofluorescencias, o para usar en mediciones de absorción directa de rayos ultravioleta para cuantificar la pureza y concentración de proteínas y aminoácidos, así como para ayudar al monitoreo metabólico (por ejemplo, Simon C.W. Kwong and Govind Rao, *Metabolic Monitoring by Using the Rate of Change of NAD(P)H*

35

Fluorescence, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44, No. 4, August 5 1994, p. 454). La realización mostrada en la Figura 4 puede adaptarse también para mediciones con un perfil mejorado para cavidades (por ejemplo: B.A. Paldus, et al., *Cavity ring-down spectroscopy using mid-infrared quantum cascade lasers*, *Optics Letters* 25, 2000, p. 666) mediante la utilización de componentes ópticos adecuados.

40

Un lector, que está conectado a un transmisor, no se muestra aquí. El lector mantiene los componentes ópticos y electrónicos necesarios para permitir cada una de las mediciones mencionadas anteriormente y se inserta en el inserto desechable 12 como se describe en conexión con la Figura 2. Las señales ópticas o electrónicas son mostradas después en el transmisor.

45

En la Figura 6 un diseño alternativo de otro conjunto se muestra donde el puerto 20 (correspondiente al elemento 1 en la Figura 2) se fija al revestimiento del biorreactor desechable 21. Se proporciona un inserto biocompatible 22 (que corresponde al elemento 2 de la Figura 2). Este inserto aloja componentes ópticos pasivos que pueden usarse, por ejemplo, para espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) u otras variantes como ondas evanescentes CRDS (por ejemplo, A.C.R. Pipino et al, *Evanescence wave cavity ring down spectroscopy with a total internal reflection mini-cavity*, *Review of Scientific Instruments* 68,1997, p. 2978). La espectroscopia ATR es un procedimiento de espectroscopia de superficie de absorción sensible que puede usarse para detectar pequeñas cantidades de una sustancia cercana a una interfaz. En la geometría de ATR mostrada en la Figura 5, la radiación de entrada 23 es reflejada totalmente de manera interna en la interfaz 24 al fluido del biorreactor 27. En cada sitio de bote hay un campo evanescente que puede extenderse unas pocas micras en el fluido y es absorbido si algo en el biorreactor tiene una transición en la longitud de onda de la iluminación. Los efectos de esta absorción están contenidos en la radiación de salida 26. El vidrio de Ge, ZnSe, Chal-cogonide u otros materiales usados puede fabricarse como una losa en zig-zag 25 como se muestra en la Figura 5, o puede ser tan simple como una fibra óptica.

50

Como se ha mencionado anteriormente, es posible usar sensores basados en la óptica para monitorear el oxígeno

60

disuelto, pH, y CO₂ disuelto, así como otros analitos clave del biorreactor. Un procedimiento es la fluorometría, en concreto la fluorometría de fase. Los detalles de la espectroscopia de fluorescencia y la fluorometría de fase pueden encontrarse en J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Edition, Kluwer Academic/Plenum Press, 1999. Los sistemas de detección fluorométrica pueden adaptarse para usar un conjunto de puerto y sensor de la presente invención ilustrado en la Figura 6.

En la Figura 6, se muestra el uso de una fibra o conjunto de fibras 33 como la fuente de estímulo de luz. El sistema de fibra está anclado en la coraza de inserto desechable 32 (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) a través de un casquillo 34 u otro sistema de retención adecuado. La luz divergente 35 de la fibra o el conjunto de fibras está colimado preferiblemente usando una lente o sistema de lentes 36. El uso de dicho sistema de lentes permite a la luz colimada 37 incidir de manera precisa en el punto de tinte fluorescente 38. Si la luz de estímulo no está colimada, continuará afectando en el punto de tinte fluorescente, pero proporcionará iluminación general al área en lugar de un rayo concentrado que incida de manera precisa en el punto de tinte fluorescente. El fluoróforo absorbe la luz de estímulo y después emite luz fluorescente 39. Esta señal fluorescente afecta entonces al sistema de recolección, mostrado aquí como la lente 36, y se concentra 35 y vuelve a un fotodiodo (no mostrado). Cabe resaltar que el sistema de lentes 36 y la fibra óptica 33 son adecuados para concentrar y transmitir la luz de iluminación y la señal fluorescente. El punto de tinte fluorescente y la fibra en la Figura 6 están montados también en la coraza desechable 32 que comprende preferiblemente un material que cumpla con las regulaciones de la USP y la FDA, que transparente ópticamente y moldeable o mecanizable. Esta carcasa desechable se muestra insertada en el puerto 30 (correspondiente al elemento 1 en la Figura 2) se fija al revestimiento del biorreactor desechable 31.

La Figura 7 muestra otro conjunto de puerto y sensor de acuerdo con la presente invención para usar con sistemas de detección fluorométrica de analitos. En la Figura 7, el conjunto óptico estará preferiblemente unido permanentemente al lector cuya carcasa 92 se inserta en la coraza desechable 91 (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) que se inserta en el puerto 90 (correspondiente al elemento 1 de la Figura 2). El lector contendrá normalmente una fuente de estimulación de luz 81 que es preferiblemente un LED. El espectro de LED es estrechado por filtro óptico 82 que deja pasar aquella parte del rayo óptico 83 cuya longitud de onda coincide con el espectro de absorción del fluoruro (punto de material fluorescente) 84.

La señal fluorescente 86 es recogida por un sistema óptico adecuado 85. La señal fluorescente recogida pasa a través de un segundo filtro óptico 87 que permite de manera considerable que solo pase la señal fluorescente, y bloquea cualquier otra luz para que no afecte al fotodetector 88.

La Figura 8 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde 200 indica el puerto (correspondiente al elemento 1 en la Figura 2) el cual se fija al revestimiento del biorreactor desechable 201. El inserto biocompatible y que cumpla con las normas de la USP y la FDA 202 (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) es mostrado sujetando un transistor de efecto campo específico sensible a iones 202 (ISFET, ver, por ejemplo: [http://www.iupac.org/publications/analytical compendium/Cha08sec324.pdf](http://www.iupac.org/publications/analytical%20compendium/Cha08sec324.pdf)). Sin embargo, cualquier chemFET u otro equipo de medición para, temperatura, conductividad, u osmolalidad puede emplearse usando esta configuración de conjunto.

El uso de un puerto también permite la habilidad de conectar fácilmente un muestreador automático o utilizar cartas y lectores microfluídicos (por ejemplo, www.yxilifesciences.net, www.micronics.net) se muestra en la Figura 9. Por ejemplo, a través del uso del puerto mencionado anteriormente, una combinación de dispositivo óptico/microfluídico para citometría de flujo en línea o at-line, cromatografía líquida, espectrometría de masa, NMR, o análisis químico mediante reactivos básico. A través del uso de técnicas de muestreo, muchas reacciones enzimáticas estándar pueden utilizarse para determinar las concentraciones de analitos. Por ejemplo, las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato pueden determinarse a través de dichas reacciones enzimáticas. Además, puede aplicarse citometría de flujo at-line para determinar la viabilidad celular o fenotipo usando el conjunto de puerto mostrado en la Figura 9. Mientras haya acceso al fluido del biorreactor, y un sistema de válvula para evitar contaminación por reflujo, se puede aplicar sistemas de citometría de flujo estándar. En la Figura 9, 300 es el puerto real, 301 está en el revestimiento del reactor desechable, 302 es un inserto que está hecho de un material biocompatible. Este inserto está en contacto con el fluido del biorreactor 303, y tiene una abertura 304 con una válvula 305 de manera que el fluido solo pueda salir del biorreactor. El fluido del biorreactor puede mezclarse con una enzima para pruebas para varios analitos, y el material de desecho se almacena en depósitos 306 en los chips.

REIVINDICACIONES

1. Un puerto para usar con un depósito de biorreactor desechable, comprendiendo dicho puerto:
- 5 i) una base de miembro flexible que comprende una parte tubular hueca y una placa de base configurada para estar fija de manera que selle un agujero en la pared del mencionado depósito de biorreactor;
- 10 ii) un elemento de casquillo hueco, generalmente tubular, para contener componentes de monitoreo eléctricos, y/o ópticos, y/o acústicos y/o magnéticos y/o microfluídicos y/o químicos que el miembro de casquillo encaja en el interior de agujero de la parte tubular del mencionado miembro de base, proporcionando los mencionados miembro base y el mencionado miembro de casquillo acceso a los contenidos del mencionado depósito de biorreactor;
- 15 iii) un conjunto de monitoreo insertado en el mencionado miembro de casquillo cuyo conjunto comprende medios para proporcionar señales ópticas y/o eléctricas entrantes y medios para coleccionar y transmitir señales de medición que resultan de la interacción de las mencionadas señales ópticas y/o eléctricas con los contenidos del mencionado biorreactor, y iv) una cubierta que mantiene la posición y alineación de los componentes ii) y iii) e manera relativa al mencionado miembro de base.
2. El puerto de la reivindicación 1 en donde el puerto comprende un material compatible con biorreactor adecuado para esterilizar mediante radiación γ o β .
3. El puerto de la reivindicación 1 en donde el mencionado conjunto de monitoreo o los componentes del mismo está encajados para permitir la inserción en el mencionado casquillo en una única orientación.
- 20 4. El puerto de la reivindicación 1 en donde la mencionada placa de base comprende un material que puede sellarse de manera fusible a un depósito de biorreactor que comprende un polímero flexible.
- 25 5. El puerto de la reivindicación 1 en donde el mencionado conjunto de monitoreo mide al menos la temperatura, pH, presión, y/o la concentración de uno o más de los siguientes disueltos: O₂, CO₂, amoníaco, glutamina, y ácido láctico presentes en el mencionado depósito de biorreactor.
- 30 6. El puerto de la reivindicación 1 en donde el mencionado conjunto de monitoreo mide la concentración de al menos uno de los siguientes: glucosa, aminoácidos, colesterol, vitamina y proteína.
7. El puerto de la reivindicación 1 en donde el mencionado conjunto de monitoreo mide la densidad celular y/o la viabilidad celular.
- 35 8. El puerto de la reivindicación 1 en donde el mencionado puerto proporciona una muestra microfluídica para analizar mediante espectrometría de masa, resonancia magnética nuclear, o cromatografía líquida.
- 40 9. El puerto de la reivindicación 1 en donde dos o más mediciones se hacen de manera simultánea desde dicho puerto.
10. El puerto de la reivindicación 9 en donde dichas mediciones de combinación incluyen pH/DO fluorométrica, o detección ATR de glucosa/lactato.
- 45 11. Un depósito de biorreactor desechable con un puerto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
12. Un depósito de acuerdo con la reivindicación 11 que es un reactor de bolsa.
13. Un depósito de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 construido usando película.

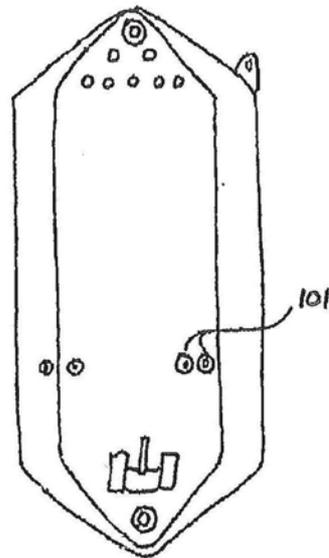


FIGURA 1

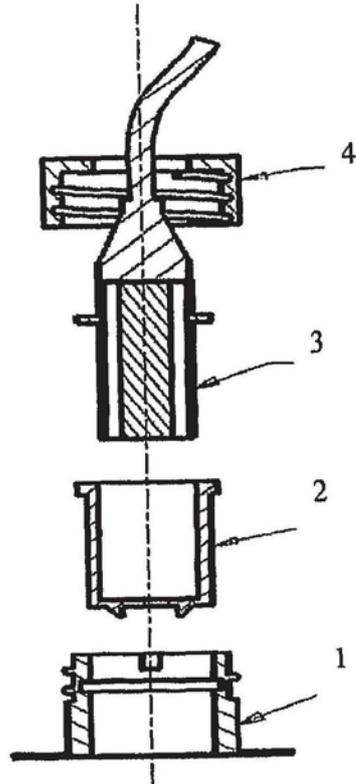


Figura 2

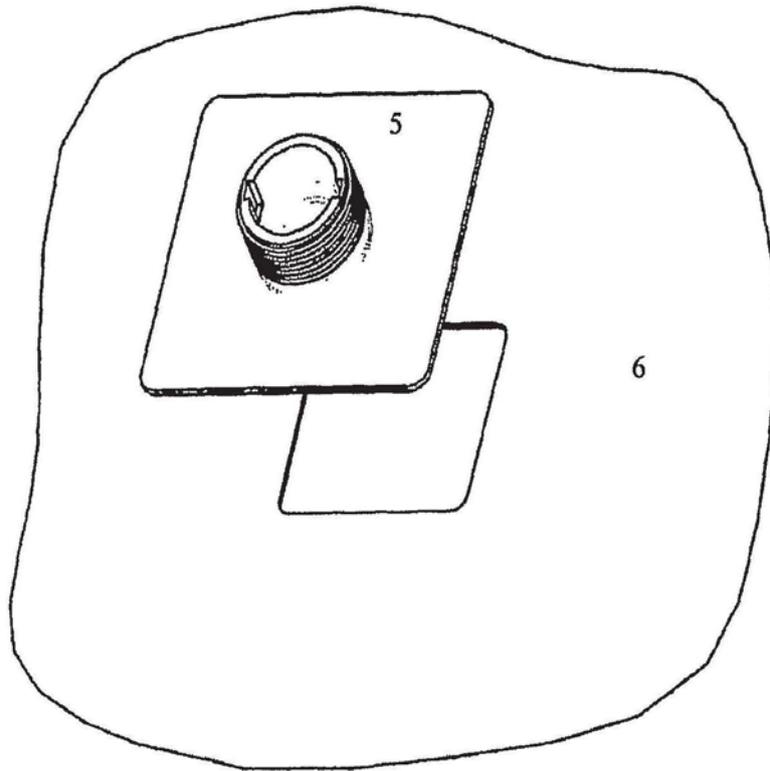


Figura 3

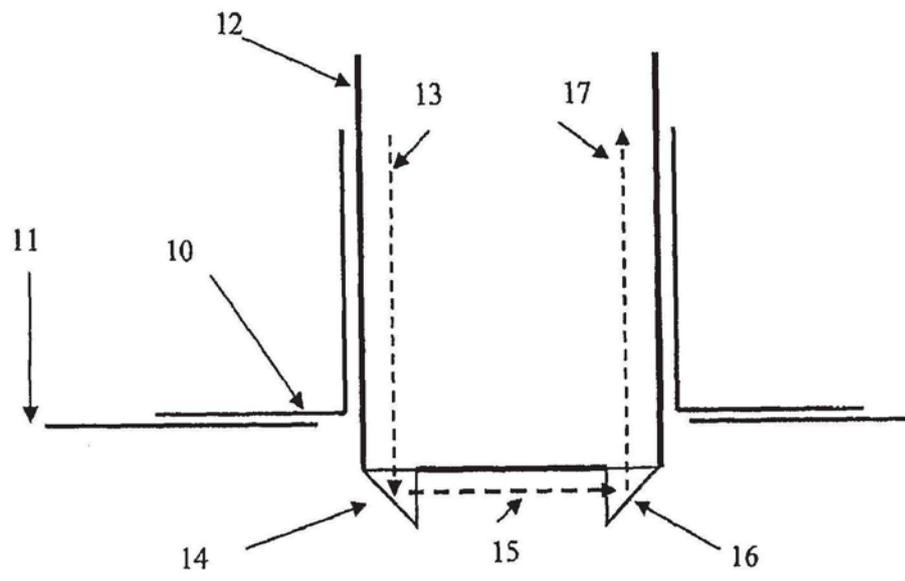


Figura 4

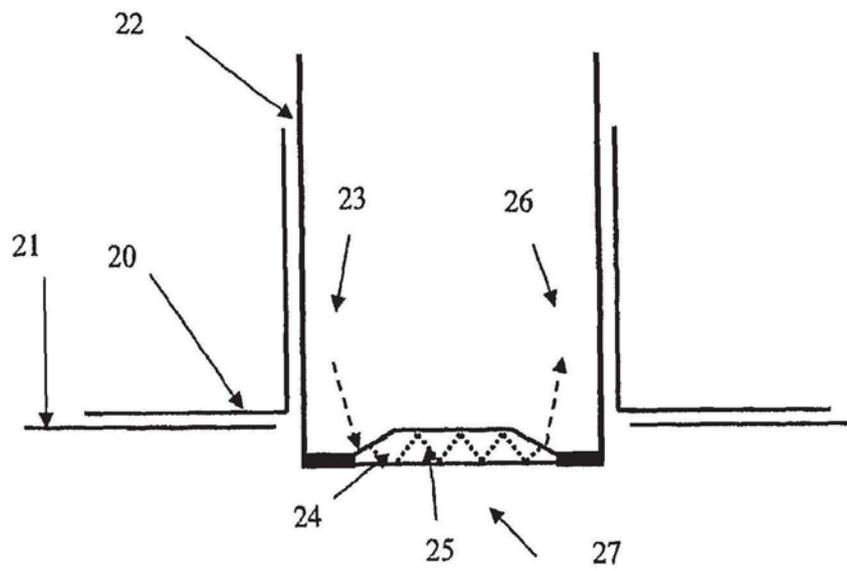


Figura 5

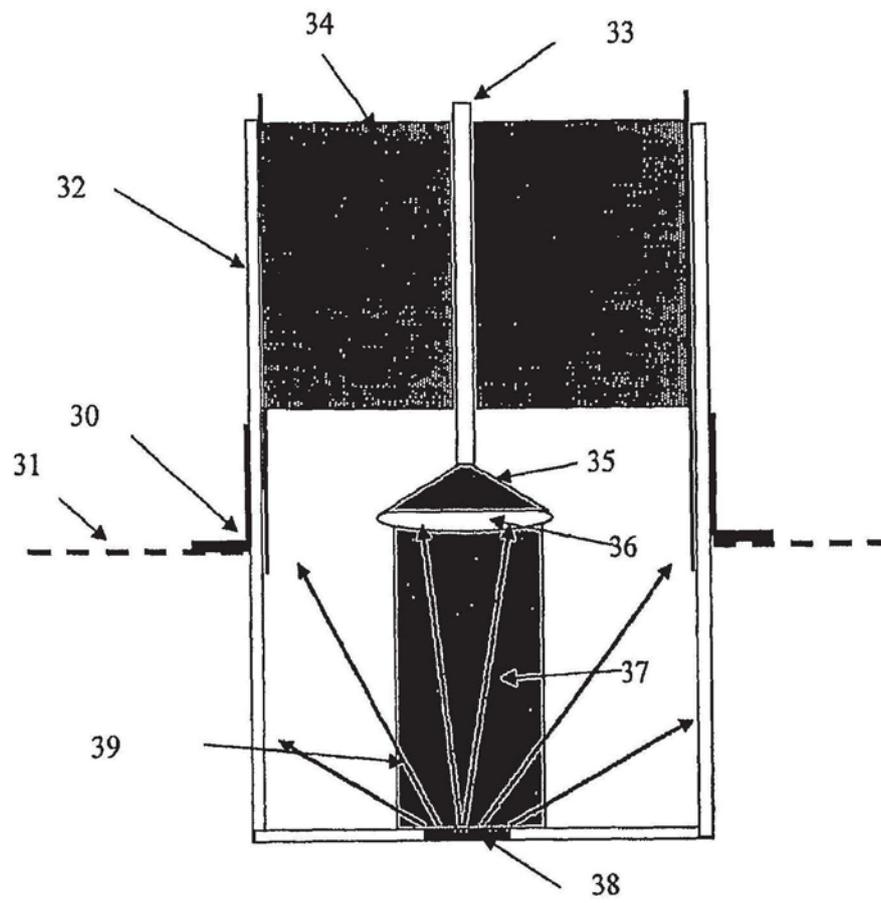


Figura 6

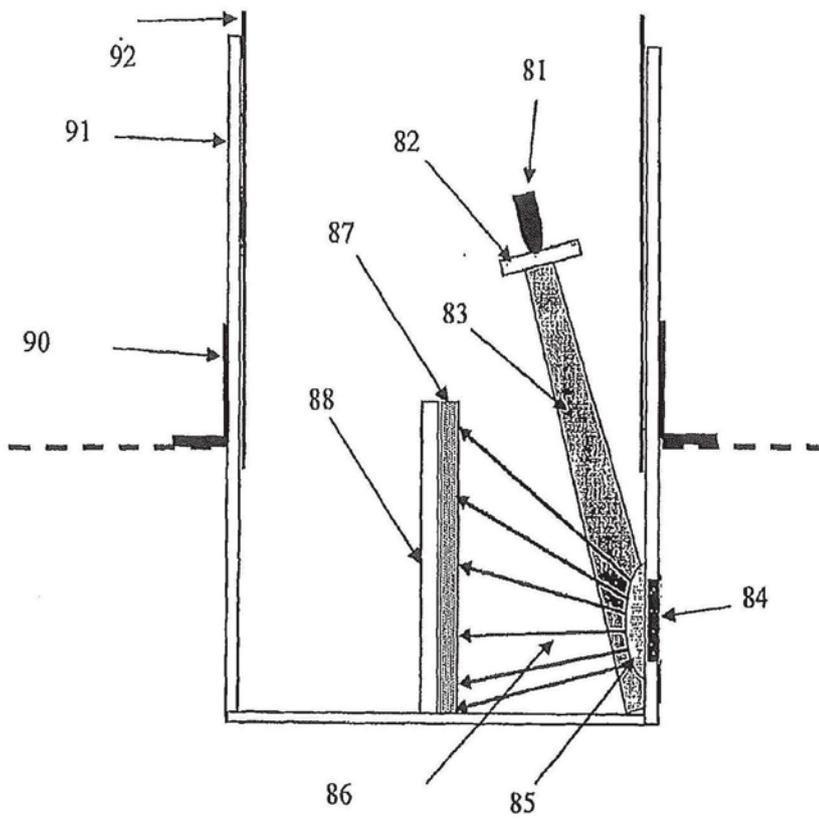


Figura 7

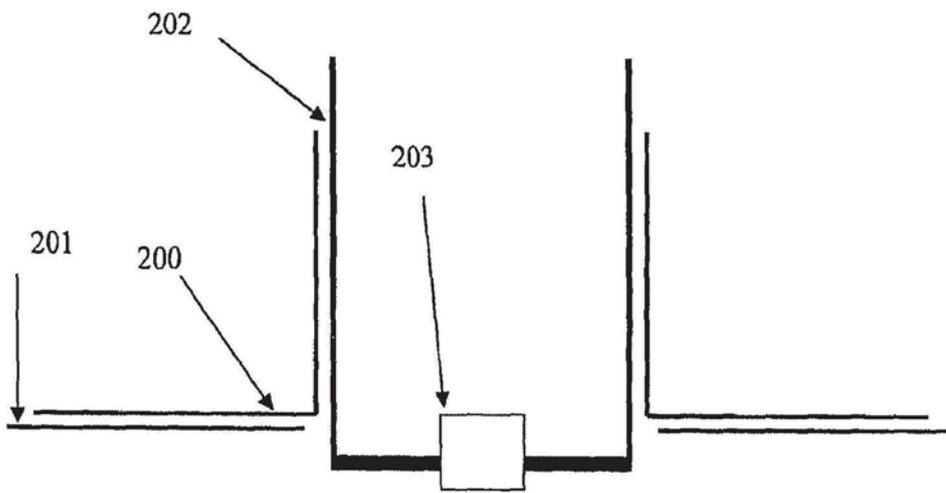


Figura 8

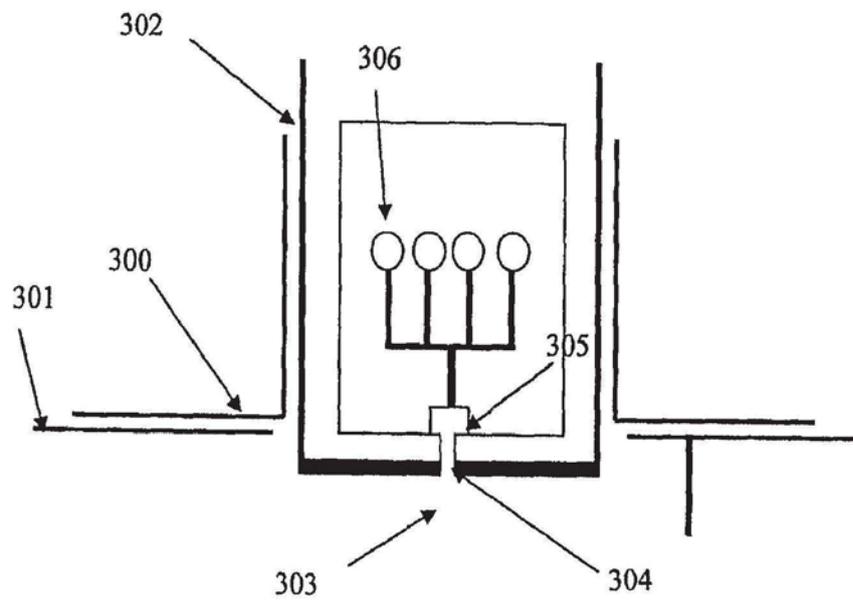


Figura 9