

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 MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

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 modificada tras oposición: **03.04.2024 EP 2046941**

54 Título: **Puerto mejorado para recipiente de biorreactor desechable**

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 modificada:
20.09.2024

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

DESCRIPCIÓN

Puerto mejorado para recipiente de biorreactor desechable

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un puerto mejorado para recipientes de biorreactores. El puerto se puede utilizar para permitir la inserción de instrumentos para monitorizar las condiciones dentro del recipiente del biorreactor y/o para la introducción de microorganismos, nutrientes o reactivos, en el recipiente.

10 Antecedentes de la invención

Un biorreactor se puede definir como un recipiente en el que se efectúa una conversión biológica. Esta definición se puede aplicar a cualquier conversión que involucre enzimas, microorganismos o células animales o vegetales. Sin embargo, usaremos la palabra biorreactor para referirnos a los recipientes (generalmente, hechos de vidrio, metal o un polímero) en los que los organismos se cultivan de manera controlada. El cultivo celular moderno se lleva a cabo normalmente utilizando un biorreactor o un recipiente fermentador. A pesar del hecho de que un biorreactor y un fermentador son esencialmente similares en diseño y función general, la dicotomía en la nomenclatura se utiliza a veces para distinguir entre cultivos de células animales y vegetales. En la presente memoria, utilizaremos el término biorreactor en un sentido genérico e inclusivo, ya que incluye tanto el cultivo aeróbico como el anaeróbico de células microbianas, animales y vegetales y, por lo tanto, abarca un fermentador.

Se puede hacer referencia al documento DE 3905158A, que describe un sistema modular para biorreactores que comprende tramos de tubería que tienen bridas en los extremos y pueden conectarse entre sí, y elementos de tapa y elementos de base que pueden bridarse a los mismos.

El documento WO 2005/068059 A1 describe una bolsa de mezcla con un elemento de base rígida que recibe y sostiene un elemento agitador de fluidos.

El objetivo de un biorreactor eficaz es controlar, contener e influir positivamente en una reacción biológica deseada. Una reacción biológica deseada que se considera aquí es el crecimiento de microorganismos. El método más popular para lograr esto es un sistema de cultivo por lotes. Véase, por ejemplo, James Lee, Biochemical Engineering, Washington State University, libro electrónico, 2002. Por motivos de simplicidad y claridad, aquí detallaremos un proceso biológico por lotes, pero debe entenderse que el diseño del puerto de la presente invención es aplicable a cualquier proceso de biorreactor (p. ej.: perfusión u otro proceso continuo) y también a un proceso químico en donde la monitorización del recipiente de reacción sea importante.

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

1. Fase de retraso: Período de tiempo durante el cual las células aún no han comenzado a crecer de manera significativa

2. Fase de crecimiento acelerado: El período durante el cual la cantidad de células aumenta y la tasa de división celular alcanza un máximo.

3. Fase de crecimiento exponencial: Período durante el cual la cantidad de células aumenta exponencialmente a medida que las células se dividen. La tasa de crecimiento aumenta durante esta fase, pero la tasa de división es constante y está en su máximo.

4. Fase de crecimiento desacelerado: Una vez que la tasa de crecimiento alcanza un máximo, le sigue una desaceleración tanto en la tasa de crecimiento como en la tasa de división.

5. Fase estacionaria: La población celular alcanza un valor máximo y no aumenta más.

6. Fase de muerte: Una vez que los nutrientes disponibles para las células se agotan y/o el entorno del biorreactor se vuelve demasiado hostil, las células comenzarán a morir y la cantidad de células viables disminuirá.

En general, es deseable minimizar la fase de retraso, garantizar una concentración adecuada de nutrientes (p. ej., glucosa) en las fases de crecimiento, y retrasar el mayor tiempo posible el inicio de la fase de muerte celular. Con el fin de lograr esta optimización de la reacción biológica, es decir, específicamente con el fin de maximizar el rendimiento del producto de un biorreactor, se deben considerar dos factores. El primero, es proporcionar parámetros de diseño del reactor adecuados para los aspectos biológicos, químicos y físicos particulares del sistema. La segunda área de mayor importancia en el diseño de biorreactores, es monitorizar las condiciones dentro del reactor, para así controlar los parámetros relevantes para el crecimiento de los microorganismos. Estos parámetros pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a:

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

Debe tenerse en cuenta que muchos de estos parámetros son críticos, independientemente del método de cultivo (es decir, por lotes, continuo o perfusión) que se utilice, y que algunos parámetros son más importantes que otros según el tipo de microbio o célula que se esté cultivando. El proceso puede ser, por ejemplo, un proceso por lotes en un tanque agitado, un proceso de perfusión, o puede utilizar un biorreactor de transporte aéreo, etc. Sin embargo, el conocimiento de los parámetros relacionados con el crecimiento celular, la respiración celular, la muerte celular y la maximización del rendimiento, es fundamental para comprender y optimizar cualquier proceso de crecimiento.

Debido a los requisitos para manejar la presión hidrostática y la presión asociada a los procedimientos de limpieza/esterilización, los biorreactores hasta la fecha se han construido generalmente de acero inoxidable, tal como el 316L, que a veces incluye componentes de vidrio. El costo inicial de un biorreactor de acero inoxidable 316L y las tuberías concomitantes, es sustancial. El costo de hacer funcionar el impulsor, el aireador y enfriar/calentar el biorreactor, también es considerable. Finalmente, los costes de limpiar y esterilizar un reactor de este tipo después de su uso, y de eliminar las aguas residuales del proceso de limpieza, no son despreciables. Dados los costos antes mencionados asociados al funcionamiento de un biorreactor convencional de acero, muchas organizaciones han comenzado a utilizar biorreactores desechables. Estos biorreactores de un solo uso se construyen generalmente utilizando películas que han demostrado ser biocompatibles y estar libres de componentes derivados de animales. A menudo, estas películas deben cumplir con las normas establecidas tanto por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés). La capa en contacto con el medio suele ser de polietileno o de etileno-acetato de vinilo (EVA, por sus siglas en inglés), y la capa exterior (de refuerzo) suele ser de nailon, aunque se han utilizado, o al menos se han propuesto, muchas combinaciones diferentes de materiales y técnicas de construcción. Las variaciones en los materiales utilizados se determinan con frecuencia por la implementación precisa de la mezcla y/o por si la bolsa necesita o no ser permeable a los gases. A menudo, estos reactores de bolsas desechables incluyen puertos de entrada y salida de gases, filtros de entrada y salida, una válvula de control de presión, y un puerto para llenar la bolsa con medios acuosos.

Dadas las muchas variaciones en el diseño de biorreactores desechables, también hay muchas variaciones en los métodos para lograr la mezcla y la aireación. Un diseño popular para biorreactores tipo bolsa utiliza una plataforma que implementa un movimiento de balanceo en la bolsa con el fin de mezclar y airear el contenido de la bolsa (véase, p. ej., la patente de EE. UU. publicada US-6.190.913). Otros diseños de biorreactores desechables se parecen más a los reactores convencionales de acero inoxidable y vidrio, y utilizan impulsores que esencialmente imitan los métodos de mezcla utilizados en los biorreactores convencionales de acero y vidrio (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. US-2005/0239199A1). Se hacen muchas afirmaciones en ambos lados de esta cuestión con respecto a la eficacia de los diversos métodos de mezcla. Al parecer, el movimiento de balanceo es más suave que el uso de impulsores y, por lo tanto, provoca menos daño a las células de los mamíferos, pero aparentemente puede estresar las costuras de la bolsa, y no siempre proporciona una mezcla y/u oxigenación suficientemente eficaces. Los diseños basados en impulsores son generalmente agitadores más efectivos, pero a veces pueden dañar las células, y también requieren más infraestructura.

Independientemente del método de mezcla utilizado en los biorreactores desechables, está claro que faltan métodos adecuados para determinar la eficacia del proceso del biorreactor y métodos fiables para obtener información oportuna

sobre el estado del proceso. Solo recientemente, muchos de los principales fabricantes de biorreactores desechables han intentado combinar la tecnología de sensores con su bolsa. La ambigüedad general con respecto a la eficacia de la mezcla y la oxigenación en las bolsas de biorreactores desechables, destaca la necesidad fundamental de ser capaces de monitorizar los parámetros críticos del proceso. La práctica actual con los biorreactores estándar de vidrio y acero consiste en introducir las sondas aplicables a través de un puerto en la pared del reactor o en la placa superior. El uso de un puerto de este tipo permite la calibración y la prueba de las sondas antes de colocar las sondas en el biorreactor. Sin embargo, con los biorreactores desechables es difícil medir muchos de los parámetros críticos anteriormente mencionados utilizando la mayoría de las sondas disponibles actualmente, debido a la naturaleza dieléctrica de las bolsas de biorreactores desechables. Específicamente, la mayoría de las sondas electroquímicas existentes que se utilizan para medir los parámetros de reacción, como el oxígeno disuelto, el pH y el CO₂ disuelto, requieren que la sonda esté tanto protegida como conectada a tierra. Lograr esto a menudo se complica por la falta de una carcasa metálica, o al menos conductora, para un biorreactor de bolsa desechable (y, por lo tanto, dieléctrico). Además, muchas de las sondas tradicionales son demasiado grandes o de otro modo no se pueden utilizar funcionalmente en biorreactores de bolsas desechables.

Un método para evitar muchos de los problemas inherentes a los sensores tradicionales de base electroquímica en bolsas poliméricas de biorreactores, es mediante el uso de diferentes metodologías de transducción. Por ejemplo, están disponibles sondas para medir el oxígeno disuelto, el pH y el CO₂ disuelto, que utilizan tecnologías de detección de base óptica. Se han descrito diferentes métodos para integrar los sensores ópticos en una bolsa de biorreactor desechable. Un posible método es sellar directamente a la bolsa un parche que tenga una sonda montada en el mismo (véase la solicitud de patente de EE. UU. publicada: US-2005/0272146). En la Figura 1 se muestra una bolsa desechable como la descrita en la solicitud de patente anteriormente citada, donde 101 es la ubicación de las sondas que se van a unir al interior de la bolsa. El parche debe montarse en la bolsa utilizando materiales biocompatibles que puedan soportar la radiación gamma o métodos alternativos de esterilización. Aunque no se deduce del todo a partir de las figuras de la solicitud de patente anteriormente citada, es posible colocar “puntos” que contengan un tinte sensible a un analito objetivo (p. ej., pH, u O₂ o CO₂ disueltos) en la superficie interior de un parche de plástico biocompatible, y utilizar una fuente térmica o de RF para fusionar este parche a la pared de la bolsa. Los puntos en este parche pueden contener diversos materiales fluorescentes para su uso en la detección del pH, el O₂ disuelto y el CO₂ disuelto. Estos puntos generalmente utilizan un “tinte”, p. ej., un complejo de metal de transición cuya vida útil de fluorescencia se extingue por la presencia del analito objetivo que se va a medir. El material puede imprimirse sobre el parche o pegarse utilizando una calcomanía. Los únicos requisitos son que se transmita a través de la ventana del parche luz suficiente para excitar el tinte presente en la superficie interior del parche, y que se transmita suficiente señal de fluorescencia a través de la ventana, de modo que la disminución de la intensidad de la señal pueda monitorizarse desde el exterior de la bolsa. La monitorización o interpretación de la señal se realiza normalmente en el transmisor que aloja la interfaz de usuario, el procesamiento de la señal y, en algunos casos, los componentes optoelectrónicos del sistema de monitorización de analitos.

En el caso de los reactores de bolsas desechables que utilizan un parche de material fundido en el revestimiento, o simplemente utilizan el propio revestimiento del reactor desechable para montar sondas de base óptica, surgen limitaciones significativas, ya que es difícil introducir y sacar sondas ópticas de alta fidelidad o conexiones ópticas intrusivas dentro y fuera de la bolsa. Utilizando un simple punto fijado al interior de la pared del biorreactor desechable, solo se pueden transmitir de un lado a otro señales ópticas de fidelidad limitada. Esto impone mayores requisitos y restricciones a la óptica y la electrónica del transmisor. Además, los materiales utilizados para fabricar las bolsas se eligen normalmente por su biocompatibilidad, permeabilidad a los gases y resistencia, en lugar de por su transparencia óptica. Esto hace que la introducción de señales ópticas de alta fidelidad sea problemática, ya que la luz puede atenuarse y/o dispersarse aleatoriamente a medida que atraviesa la pared de la bolsa. También hace que sea difícil, o incluso imposible, optimizar la eficiencia del sistema óptico de entrega y recogida.

Otros problemas que surgen al confiar en la técnica relativamente simple de fijar un material sensor al interior de la pared de una bolsa de biorreactor desechable, son que puede impedir la instalación de sensores más avanzados. Específicamente, a medida que los sensores sigan avanzando, está claro que las señales, además de una señal óptica, deberán necesitar entrar y salir del biorreactor. Es probable que cuando los sensores utilicen tecnologías ópticas, eléctricas, químicas, acústicas, magnéticas y microfluídicas, o un subconjunto de estas tecnologías, sea necesaria una mayor comunicación con la instrumentación externa de la que es posible al utilizar las técnicas disponibles actualmente.

Mediante el uso de una interfaz o ventana más sofisticada en el biorreactor, se pueden conseguir múltiples mediciones simultáneamente. Estas mediciones pueden incluir cualquiera de los parámetros descritos anteriormente, y pueden incluir la detección fluorométrica de pH/DO o ATR de glucosa/lactato. Los métodos de medición incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se basan en técnicas ópticas, eléctricas, químicas, bioquímicas, acústicas, magnéticas y microfluídicas, o cualquier combinación de las mismas. Estas técnicas pueden medir tanto el gas del espacio libre como el medio líquido dentro del biorreactor desechable. Además, estas mediciones pueden utilizar cualquier parte del espectro electromagnético, incluida la radiación ultravioleta, visible, infrarrojo cercano e infrarrojo medio a infrarrojo lejano, o campos eléctricos de RF y corriente continua para sondear el sistema bioquímico o químico dentro de la bolsa del reactor. Ópticamente, las mediciones también se pueden realizar utilizando radiación Raman Stokes o antiStokes, utilizando métodos FTIR, autofluorescencia, sistemas fotoacústicos u ópticos de campo cercano, para

obtener los datos de interés. Otras mediciones pueden incluir medidas miniaturizadas o en chip: espectrometría de masas, cromatografía líquida, citometría de flujo o resonancia magnética nuclear (RMN). Estos datos pueden ser indicativos directa o indirectamente del estado del medio del biorreactor. Prácticamente cualquier método de transducción que pueda utilizarse con el puerto de la presente invención, y que pueda correlacionarse directamente con un analito de interés, permite un sensor útil.

Además de los biorreactores de bolsas desechables más tradicionales que tienen balancines (Wave Biotech) o mezcladores (Hyclone, XCellerex) o rociadores (p. ej., elevadores de aire) para la agitación, otros tipos de biorreactores, incluyendo los biorreactores desechables que utilizan fibras huecas o placas paralelas para el crecimiento (p. ej.: Coming Cell Cube®), pueden beneficiarse del uso de la tecnología de puerto y sonda desechable de la presente invención.

Resumen de la invención

Según la presente invención, se proporciona un puerto para su uso con un recipiente de biorreactor desechable, comprendiendo dicho puerto: i) un elemento de base flexible que comprende una parte tubular hueca y una placa base configurada para fijarse de forma hermética a un orificio en la pared de dicho recipiente de biorreactor; ii) un elemento de casquillo hueco, generalmente tubular, para contener componentes de monitorización eléctricos, ópticos y/o acústicos y/o magnéticos y/o microfluídicos y/o químicos, cuyo elemento de casquillo encaja dentro del orificio de la parte tubular de dicho elemento de base, proporcionando tanto dicho elemento de base como dicho elemento de casquillo acceso al contenido de dicho recipiente de biorreactor; iii) un conjunto de monitorización insertado en dicho elemento de casquillo, cuyo conjunto comprende medios para proporcionar señales ópticas y/o eléctricas entrantes, y medios para recoger y transmitir señales de medición resultantes de la interacción de dichas señales ópticas y/o eléctricas entrantes con el contenido de dicho biorreactor, en donde dicho conjunto de monitorización, o sus componentes, están configurados para así permitir la inserción en dicho casquillo en una sola orientación; y iv) una cubierta que mantiene la posición y la alineación de los componentes ii) y iii) con respecto a dicho elemento de base.

Breve descripción de los dibujos

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

Las Figuras 2 a 8 ilustran diversas realizaciones según la presente invención.

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

La Figura 3 muestra un puerto combinado con un parche de material para facilitar la unión del puerto a la pared del recipiente del biorreactor.

La Figura 4 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde se utiliza un espacio óptico desechable con el fin de monitorizar la densidad celular total. Este sistema también se puede utilizar para mediciones espectroscópicas.

La Figura 5 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde se utiliza radiación de infrarrojo cercano e infrarrojo medio, junto con un sistema de espectroscopía de reflexión total atenuado.

Este conjunto se puede utilizar para detectar múltiples analitos simultáneamente.

La Figura 6 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para su uso con sistemas de medición Raman o fluorométricos de fase basados en fibra óptica.

La Figura 7 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para su uso con sistemas de medición fluorométricos de fase basados en óptica de espacio libre.

La Figura 8 muestra un conjunto de puerto y sensor adaptado para su uso con sensores eléctricos, tales como transistores de efecto de campo específicos de iones o sensores de conductividad, temperatura u osmolalidad.

La Figura 9 muestra un puerto según la presente invención, y un sensor microfluídico que permite un sensor de laboratorio en chip, tal como un citómetro de flujo miniaturizado, un espectrómetro de masas o un cromatógrafo de líquidos.

Descripción detallada de la invención

Se conocen puertos para su uso con una jeringa para extraer material de una bolsa de biorreactor desechable, o para inyectar material en una bolsa, pero dichos puertos son solo adecuados para extraer o introducir fluidos en el biorreactor, y no están diseñados para su uso con sensores de monitorización avanzados, y claramente no son adecuados para soportar el uso de sondas ecuménicas. Hemos desarrollado una solución para la monitorización de

analitos críticos en el medio líquido contenido en un biorreactor desechable, mediante la colocación de un puerto hermético en la pared del biorreactor desechable. En la Figura 2 se muestra, para uso analítico, una realización de nuestro diseño único de un puerto. El puerto analítico de la presente invención puede alojar una variedad de plataformas ópticas, eléctricas, acústicas, magnéticas y/o microfluídicas, para aplicaciones de monitorización y control. La Figura 2 es un dibujo en sección transversal que representa cómo funciona este puerto. En la Figura 2, 1 indica una parte del puerto que puede fijarse permanentemente al revestimiento del biorreactor desechable, mediante RF o soldándolo térmicamente a la bolsa. Este componente de puerto sirve como placa base y está fabricado de un material flexible (p. ej., una cicloolefina) para conformarse a un subsistema más delicado que no requiera soporte. También se muestra un elemento 2 de casquillo insertable que puede facilitar una variedad de mediciones. En su forma más simple, puede contener un componente óptico pasivo que simplemente dirige la luz desde y hacia 3 (el “lector”), a través del fluido del interior del biorreactor. El lector 3 puede ser un sistema óptico, eléctrico, acústico, magnético o microfluídico (o una combinación) que contenga la infraestructura adecuada para la medición. Dicha infraestructura puede comprender una fuente óptica y un fotodetector que mida la señal que emana de un punto de tinte presente en el componente 3 y/o el grado de absorción de la luz transmitida a través de un espacio óptico, para determinar así la absorción provocada por el fluido del biorreactor. Otras realizaciones de este inserto se describirán en relación a otras figuras que ilustran la invención. Obsérvese que el lector puede construirse de metal o plásticos rígidos (p. ej., una poliéter-cetona aromática) y no entra en contacto con el contenido del biorreactor desechable. El lector puede estar sujeto, pero no necesariamente, por una tapa o un mecanismo 4 de bloqueo. Las roscas se muestran en la Figura 2, pero se pueden utilizar métodos o disposiciones de retención alternativos que retengan el sistema en una posición fija. Por ejemplo, el lector se puede unir al inserto desechable mediante un pasador mecánico roscado o accionado por resorte, mientras que el inserto desechable se sujeta al puerto, por ejemplo, mediante el uso de una correa o un anillo de compresión. Además, dependiendo del sistema de material elegido, el inserto desechable se puede unir o fijar permanentemente al puerto.

La Figura 3 muestra una visión general de cómo se puede montar un puerto desechable según la presente invención, en el revestimiento 6 de un biorreactor desechable. La parte (5) base del puerto se puede sellar al revestimiento 6 utilizando métodos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, energía de RF, una fuente térmica, y energía acústica/ultrasónica.

La Figura 4 muestra una realización del conjunto de puerto mostrado generalmente en la Figura 2, cuando está diseñado para monitorizar la densidad celular. La estructura 10 de puerto (correspondiente al elemento 1 en la Figura 2) está fijada al revestimiento 11 del biorreactor desechable. En el puerto se inserta un elemento 12 normalmente desechable (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) que está fabricado de un material polimérico que puede esterilizarse mediante radiación gamma o beta, y que cumple con los requisitos de biocompatibilidad de la FDA y la USP. Este elemento 12 tiene secciones sustancialmente ópticamente transparentes, o puede alojar los elementos ópticos 14 y 16. Estos elementos se utilizan para crear un espacio óptico 15 que se sumerge en el fluido del biorreactor. La fuente 13 de luz apropiada (p. ej.: un láser de diodo, un LED adecuadamente filtrado espectralmente, un láser de estado sólido bombeado por diodos, etc.) se acopla a la óptica y atraviesa el espacio óptico 15, y vuelve 17 al fotodetector (no mostrado) para el procesamiento de la señal. Los expertos en la técnica conocen este tipo de sensor de densidad celular (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. US-7.180.594). También se debe tener en cuenta que con la fuente óptica adecuada y la óptica y electrónica de detección adecuadas, el sistema que se muestra en la Figura 4 también se puede utilizar para identificar analitos mediante el uso de espectroscopía de transmisión o absorción directa, o espectroscopía Raman (p. ej.: Andrew Berger, Tae-Woong Koo, Irving Itzkan, Gary Horowitz y Michael S. Feld, Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy, *Applied Optics*, 38, 13, 1999, pág. 2916). La realización que se muestra en la Figura 4 también se puede utilizar para la detección de la autofluorescencia, o para su uso en mediciones directas de la absorción UV para cuantificar la pureza y concentración de proteínas y aminoácidos, así como para ayudar en la monitorización metabólica (p. ej.: Simon C. W. Kwong y Govind Rao, *Metabolic Monitoring by Using the Rate of Change of NAD(P)H Fluorescence*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, núm. 4, 5 de agosto de 1994, pág. 454). La realización mostrada en la Figura 4 también se puede adaptar a mediciones de tipo de cavidad mejorada (p. ej.: B.A. Paldus, y col., *Cavity ring-down spectroscopy using mid-infrared quantum cascade lasers*, *Optics Letters* 25, 2000, p. 666) utilizando la óptica adecuada. Aquí no se muestra un lector que esté conectado a un transmisor. El lector contiene la óptica y la electrónica necesarias para permitir cada una de las mediciones mencionadas anteriormente, y se inserta en el inserto desechable 12 como se describe en relación a la Figura 2. Las señales ópticas o electrónicas se muestran entonces en el transmisor.

En la Figura 5, se muestra otro conjunto de diseño alternativo, en donde el puerto 20 (correspondiente al elemento 1 de la Figura 2) está fijado al revestimiento 21 del biorreactor desechable. Se proporciona un inserto biocompatible 22 (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2). Este inserto aloja elementos ópticos pasivos que pueden utilizarse, por ejemplo, para espectroscopía de reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) u otras variantes, tal como el CRDS de ondas evanescentes (p. ej.: A.C.R. Pipino y col., *Evanescent wave cavity ring down spectroscopy with a total internal reflection mini-cavity*, *Review of Scientific Instruments* 68, 1997, pág. 2978. La espectroscopia de ATR es un método de espectroscopia de absorción sensible a la superficie que se puede utilizar para detectar pequeñas cantidades de una sustancia cerca de una interfaz. En la geometría de ATR mostrada en la Figura 5, la radiación 23 de entrada se refleja totalmente internamente en la interfaz 24 con el fluido 27 del biorreactor. En cada punto de rebote hay un campo evanescente que puede extenderse unas pocas micras en el fluido, y que se absorbe si algo en el biorreactor tiene una transición en las longitudes de onda de la iluminación.

Los efectos de esta absorción están contenidos en la radiación 26 de salida. El Ge, el ZnSe, el vidrio calcogénido, u otros materiales utilizados, pueden construirse como una placa 25 en zigzag, como se muestra en la Figura 5, o pueden ser tan simples como una fibra óptica.

Como se mencionó anteriormente, es posible utilizar sensores de base óptica para monitorizar el oxígeno disuelto, el pH y el CO₂ disuelto, así como otros analitos clave del biorreactor. Un método óptico es la fluorometría, en particular la fluorometría de fase. Los detalles sobre la espectroscopia de fluorescencia y la fluorometría de fase se pueden encontrar en J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2a edición, Kluwer Academic/Plenum Press, 1999. Los sistemas de detección fluorométrica pueden adaptarse para usar un conjunto de puerto y sensor de la presente invención, como se ilustra en la Figura 6.

En la Figura 6, se muestra el uso de una fibra o haz 33 de fibras como fuente de luz de excitación. El sistema de fibras está anclado a la cubierta 32 de inserción desechable (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) a través de una férula 34 u otro sistema de retención adecuado. La luz divergente 35 de la fibra o haz de fibras se colimará preferiblemente utilizando una lente o un sistema 36 de lentes. El uso de un sistema de lentes de este tipo permite que la luz colimada 37 incida con precisión en el punto 38 de tinte fluorescente. Si la luz de excitación no está colimada, seguirá incidiendo en el punto de tinte fluorescente, pero proporcionará una iluminación general del área, en lugar de que un haz enfocado incida de manera precisa sobre el punto de tinte fluorescente. El fluoróforo absorbe la luz de excitación y, a continuación, emite la luz fluorescente 39. A continuación, esta señal fluorescente incide en el sistema de recogida, mostrado aquí como lente 36, y se enfoca 35 y vuelve a un fotodiodo (no mostrado) a través de la fibra o haz 33 de fibras. Obsérvese que el sistema 36 de lentes y la fibra óptica 33 son adecuados para enfocar y transmitir tanto la luz iluminante como la señal fluorescente. El punto de tinte fluorescente y la fibra de la Figura 6, también se montan en una cubierta desechable 32 que está compuesta preferiblemente por un material que cumple con las normas de la USP y la FDA, que es ópticamente transparente y moldeable o mecanizable. Esta cubierta desechable se muestra insertada en el puerto 30 (correspondiente al elemento 1 en la Figura 2) que está fijado al revestimiento 31 del biorreactor desechable.

La Figura 7 muestra otro conjunto de puerto y sensor según la presente invención para su uso en sistemas fluorométricos de detección de analitos. En la Figura 7, el conjunto óptico se unirá preferiblemente de forma permanente al lector cuya carcasa 92 se inserta en la cubierta 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 81 de luz de excitación que es preferiblemente un LED. El espectro del LED se estrecha mediante un filtro óptico 82 que pasa por la parte del haz óptico 83 cuya longitud de onda coincide con el espectro de absorción del fluoróforo (punto de material fluorescente) 84.

La señal fluorescente 86 es recogida por un sistema óptico 85 apropiado. La señal fluorescente de la señal recogida pasa a través de un segundo filtro óptico 87 que permite que pase sustancialmente solo la señal fluorescente, y bloquea cualquier otra luz para que no incida en el fotodetector 88.

La Figura 8 muestra un conjunto de puerto y sensor en donde 200 indica el puerto (correspondiente al elemento 1 de la Figura 2) que está fijado al revestimiento 201 del biorreactor desechable. El inserto 202 biocompatible y compatible con la USP y la FDA (correspondiente al elemento 2 de la Figura 2) se muestra sosteniendo un transistor 203 de efecto de campo específico de iones (ISFET, véase, por ejemplo: http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/Cha08sec324.pdf Sin embargo, se puede emplear cualquier ChemFET u otro aparato de medición de temperatura, conductividad u osmolalidad, utilizando esta configuración de conjunto.

El uso de un puerto también permite poder conectarse fácilmente a un muestreador automático, o utilizar tarjetas y lectores de microfluidos (p. ej.: www.vsilifesciences.net, www.micronics.net), como se muestra en la Figura 9. Por ejemplo, mediante el uso del puerto mencionado anteriormente, es factible un dispositivo combinado óptico/de microfluidos para la citometría de flujo en línea y/o en la línea, cromatografía líquida, espectrometría de masas, RMN o análisis químico básico de reactivos. Mediante el uso de técnicas de muestreo, se pueden utilizar muchas reacciones enzimáticas estándar para determinar las concentraciones de analito. Por ejemplo, las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato pueden determinarse mediante tales reacciones enzimáticas. Además, la citometría de flujo en la línea se puede aplicar para determinar la viabilidad o el fenotipo celular utilizando el conjunto de puerto que se muestra en la Figura 9. Siempre que haya acceso al fluido del biorreactor y un sistema de válvulas para evitar la contaminación por reflujo, se pueden aplicar sistemas de citometría de flujo estándar. En la Figura 9, 300 es el puerto en sí, 301 es el revestimiento del reactor desechable, 302 es un inserto que está fabricado de un material biocompatible. Este inserto está en contacto con el fluido 303 del biorreactor, y tiene una abertura 304 con una válvula 305, de modo que el fluido solo pueda salir del biorreactor. El fluido del biorreactor se puede mezclar con una enzima para probar varios analitos, y el material de desecho se almacena en los depósitos 306 en los chips

REIVINDICACIONES

1. Un puerto para su uso con un recipiente de biorreactor desechable, comprendiendo dicho puerto:
 - 5 i) un elemento de base flexible que comprende una parte tubular hueca y una placa base configurada para fijarse de forma hermética a un orificio en la pared de dicho recipiente de biorreactor;
 - 10 ii) un elemento de casquillo hueco, generalmente tubular, para contener componentes de monitorización eléctricos, ópticos y/o acústicos y/o magnéticos y/o microfluídicos y/o químicos, cuyo elemento de casquillo encaja dentro del orificio de la parte tubular de dicho elemento de base, proporcionando tanto dicho elemento de base como dicho elemento de casquillo acceso al contenido de dicho recipiente de biorreactor;
 - 15 iii) un conjunto de monitorización insertado en dicho elemento de casquillo, cuyo conjunto comprende medios para proporcionar señales ópticas y/o eléctricas entrantes, y medios para recoger y transmitir señales de medición resultantes de la interacción de dichas señales ópticas y/o eléctricas entrantes con el contenido de dicho biorreactor, en donde dicho conjunto de monitorización o sus componentes están configurados para permitir la inserción en dicho casquillo en una sola orientación; y
 - 20 iv) una cubierta que mantiene la posición y la alineación de los componentes ii) y iii) con respecto a dicho elemento de base.
2. El puerto de la reivindicación 1, en donde el puerto comprende un material compatible con un biorreactor adecuado para la esterilización mediante radiación γ o β .
- 25 3. El puerto de la reivindicación 1, en donde dicha placa base comprende un material que puede sellarse por fusión a un recipiente de biorreactor que comprende un polímero flexible
4. El puerto de la reivindicación 1, en donde dicho conjunto de monitorización mide al menos uno de la temperatura, pH, presión y/o la concentración de uno o más de O₂ disuelto, CO₂, amoníaco, glutamina y ácido láctico presentes en dicho recipiente del biorreactor.
- 30 5. El puerto de la reivindicación 1, en donde dicho conjunto de monitorización mide la concentración de al menos uno de entre glucosa, aminoácido, colesterol, vitamina y proteína.
- 35 6. El puerto de la reivindicación 1, en donde dicho conjunto de monitorización mide la densidad celular y/o la viabilidad celular.
7. El puerto de la reivindicación 1, en donde dicho puerto proporciona una muestra microfluídica para su análisis mediante espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear o cromatografía líquida.
- 40 8. El puerto de la reivindicación 1, en donde dos o más mediciones se realizan simultáneamente desde dicho puerto.
9. El puerto de la reivindicación 8, en donde dichas mediciones combinadas incluyen pH/DO fluorométrico, o detección ATR de glucosa/lactato.
- 45 10. Un recipiente de biorreactor desechable que tiene un puerto según cualquier reivindicación anterior.
11. Un recipiente según la reivindicación 10, que es un reactor de bolsas.
- 50 12. Un recipiente según las reivindicaciones 10 u 11, construido utilizando una película.

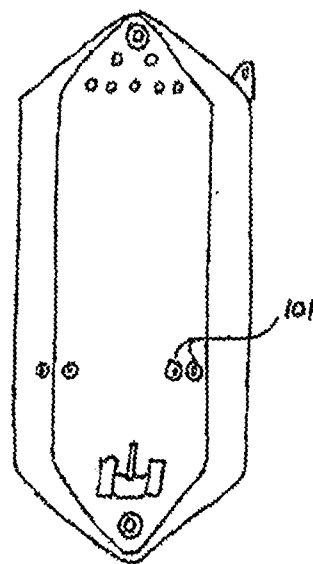


Figura 1

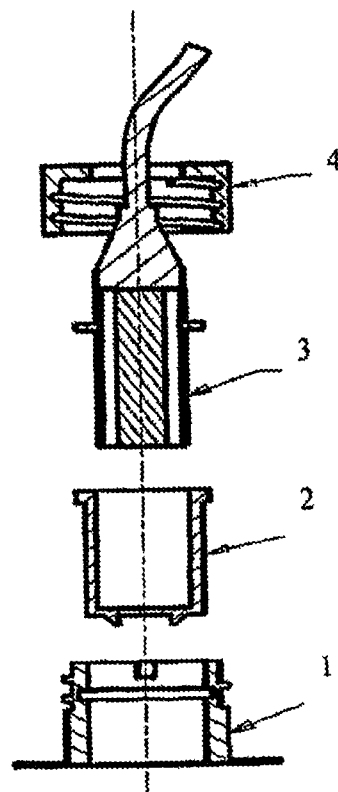


Figura 2

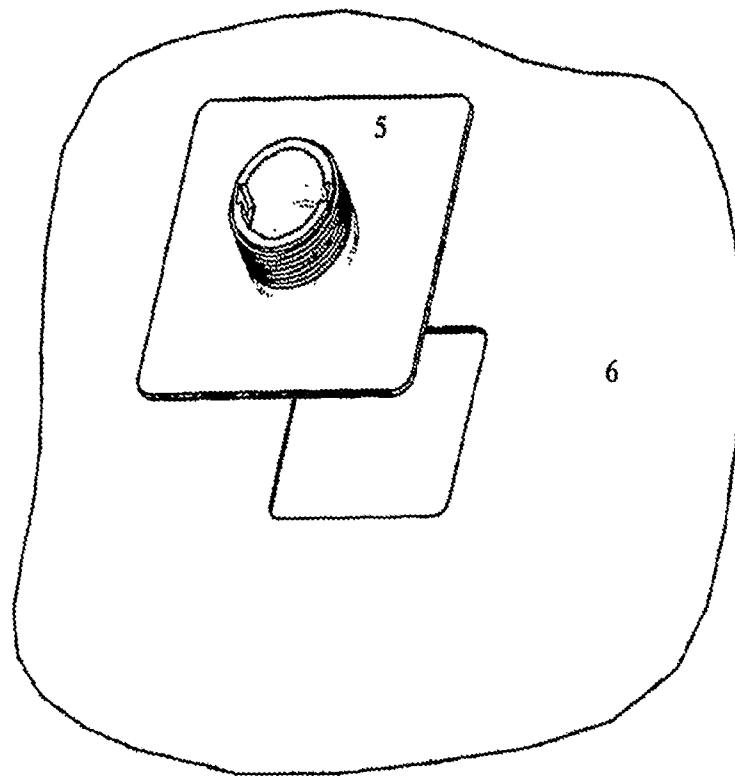


Figura 3

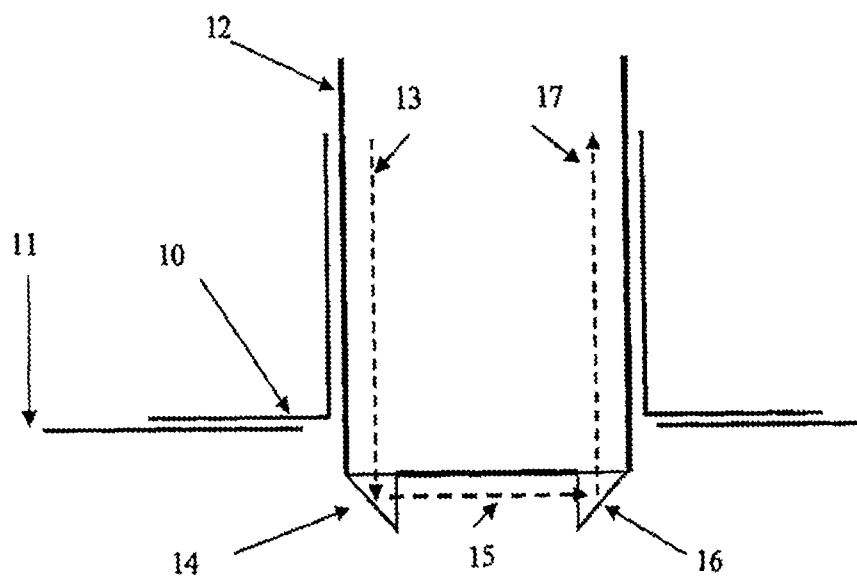


Figura 4

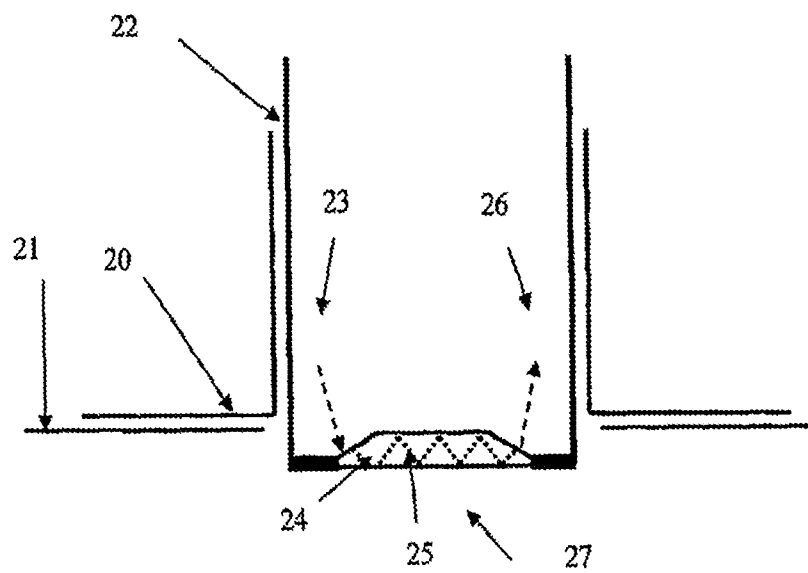


Figura 5

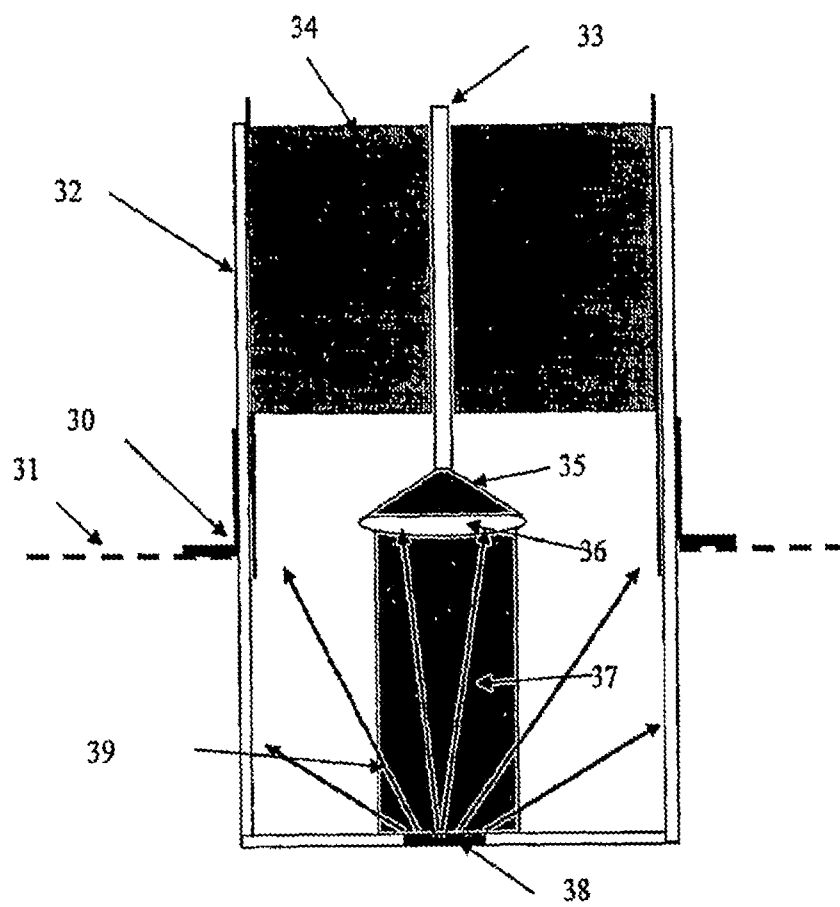


Figura 6

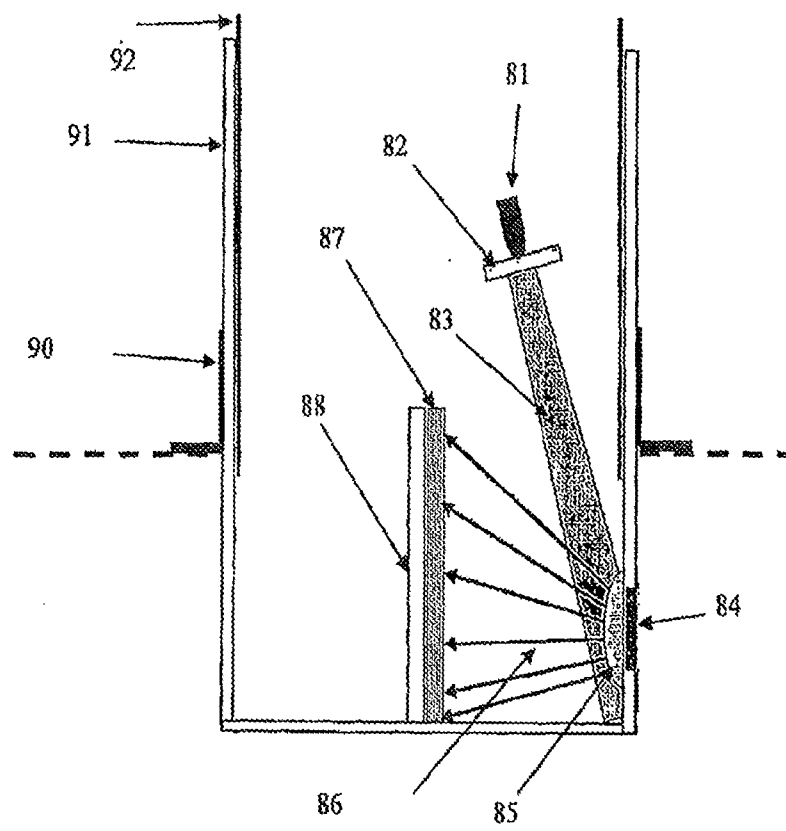


Figura 7

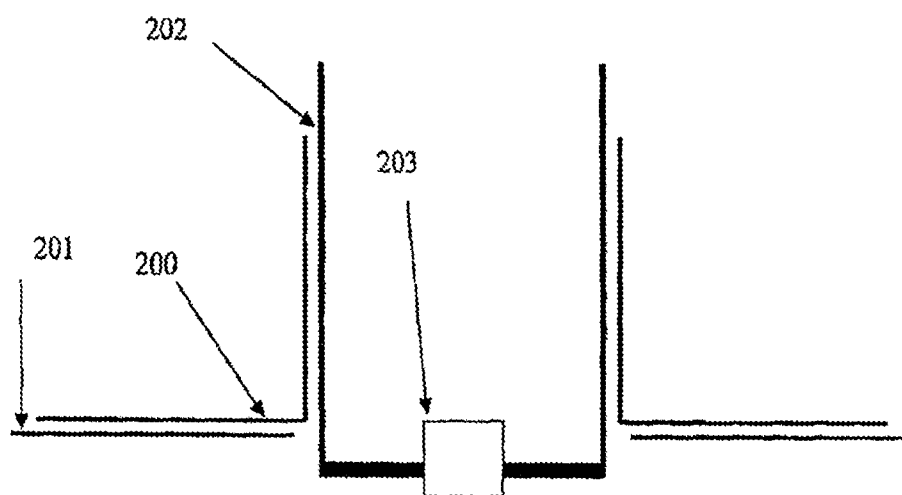


Figura 8

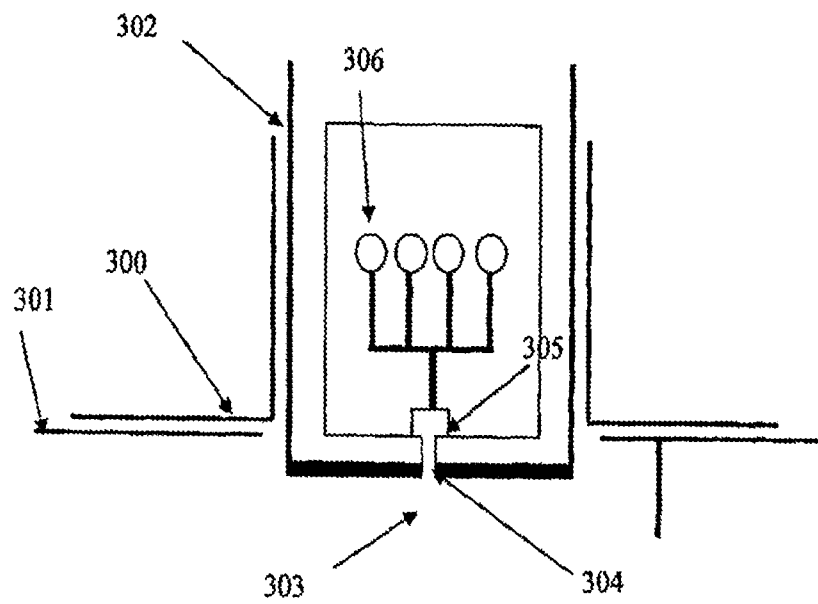


Figura 9