

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 949**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

B01D 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015** **PCT/US2015/066884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100923**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015** **E 15825713 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3234099**

54 Título: **Dispositivos de perfusión acústicos**

30 Prioridad:

18.12.2014 US 201462093491 P

28.08.2015 US 201562211057 P

19.10.2015 US 201562243211 P

18.11.2015 US 201562256952 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2021

73 Titular/es:

FLODESIGN SONICS INC. (100.0%)

380 Main Street

Wilbraham, MA 01095, US

72 Inventor/es:

LIPKENS, BART;

MILLER, ERIK;

ROSS-JOHNSRUD, BENJAMIN;

PRESZ, WALTER M. JR.;

CHITALE, KEDAR y

KENNEDY, THOMAS J. III

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 811 949 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

Dispositivos de perfusión acústicos

5 El campo de la biotecnología ha crecido enormemente en los últimos 20 años. Este crecimiento se ha debido a muchos factores, algunos de los cuales incluyen mejoras en el equipo disponible para biorreactores, el mayor entendimiento de los sistemas biológicos y un mayor conocimiento de las interacciones de materiales (tales como anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes) con los diferentes sistemas del cuerpo humano.

10 Las mejoras en los equipos han permitido mayores volúmenes y menores costes para la producción de materiales biológicamente derivados tales como proteínas recombinantes. Esto es especialmente prevalente en el área de los productos farmacéuticos, en la que los éxitos de muchos tipos de terapias farmacológicas se han debido directamente a la habilidad de producir en masa estos materiales mediante procedimientos de fabricación basados en proteínas.

15 Uno de los componentes clave que se utiliza en los procesos de fabricación de nuevos productos farmacéuticos de base biológica es el biorreactor y los procesos ancestrales basados en él. Un área de crecimiento en el campo de los biorreactores ha sido con los procesos de perfusión. El proceso de perfusión se diferencia del proceso de lote alimentado por su menor coste de capital y su operación en continuo (en vez de por lote).

20 En el proceso de lote alimentado, un cultivo de inocula en el biorreactor. La adición gradual de un volumen fresco de nutrientes seleccionados durante el ciclo de crecimiento se usa para mejorar la productividad y el crecimiento. El producto se recupera después de que se recolecte el cultivo. El proceso de biorreactor de lote alimentado discontinuo ha sido atractivo debido a su simplicidad, así como por su transferencia desde procesos de fermentación bien conocidos. Sin embargo, un biorreactor de lote alimentado presenta unos costes iniciales elevados, y generalmente presenta un volumen elevado para obtener una cantidad rentable de producto al final del ciclo de crecimiento. Después de completar el lote, el biorreactor debe limpiarse y esterilizarse, lo que conlleva un tiempo de inactividad no productivo.

30 Un biorreactor de perfusión procesa un suministro continuo de medio fresco que se alimenta al biorreactor mientras que los productos secundarios inhibidores del crecimiento son eliminados de forma constante. El tiempo de inactividad no productivo puede reducirse o eliminarse con un proceso de biorreactor de perfusión. Las densidades celulares que se alcanzan en un cultivo de perfusión (30-100 millones de células/mL) son típicamente más elevadas que las de modos de lote alimentado (5-25 millones/mL). Estas mejoras han conducido a una menor contaminación durante la recolección y mejores rendimientos sin un aumento significativo del coste. Sin embargo, un biorreactor de perfusión requiere un dispositivo de retención de células para prevenir el escape del cultivo cuando los productos secundarios se están eliminando. Estos sistemas de retención de células añaden un nivel de complejidad al proceso de perfusión, que requiere una gestión, un control y un mantenimiento para una operación exitosa. Problemas operacionales tales como un mal funcionamiento o un fallo del equipo de retención de células han sido anteriormente un problema de los biorreactores de perfusión, lo cual ha limitado su atractivo en el pasado. El documento WO2014/124306 A1 describe una operación de dispositivo acústico en combinación con un biorreactor de perfusión, que comprende una cámara acústica provista de por lo menos un transductor que comprende un material piezoeléctrico y que está adaptado para crear una onda estacionaria acústica multidimensional.

45 **Breve descripción**

La presente divulgación se refiere, en varias formas de realización, a dispositivos acústicos que se usan para la biofabricación de perfusión. Más particularmente, los dispositivos están acoplados a un biorreactor asociado. Dentro del biorreactor, se producen biomoléculas, tales como proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales. El dispositivo acústico se usa asimismo para separar estos productos deseables de las células de manera continua, y las células se devuelven continuamente al biorreactor. Generalmente, un medio fluido que contiene las células y los productos deseables se hacen pasar o fluyen a través del dispositivo acústico y se separan en su interior mediante onda(s) estacionaria(s) multidimensional(es). El medio fluido puede hacerse fluir continuamente dentro del dispositivo, siendo los productos deseados continuamente eliminados. El dispositivo de perfusión acústico devuelve las células viables sanas al biorreactor, mientras que los productos deseados son recolectados y se hacen fluir aguas abajo para su procesamiento posterior, por ejemplo, filtrado adicional, cromatografía, etc. Adicionalmente, el medio de cultivo celular en el biorreactor se clarifica ya que también se permite el paso de los fragmentos celulares a la corriente de recolección y a través de esta fuera del medio fluido que se recicla hacia el biorreactor. Esto conlleva una utilización de medio de cultivo celular menor en conjunto, que corresponde con un ahorro de costes predicho de 20,000\$ por día para biorreactores de gran tamaño.

En varias formas de realización, se divulgan dispositivos de perfusión acústicos que comprenden: una cámara acústica; una abertura de entrada, una trayectoria de flujo de entrada que va desde la abertura de entrada hasta la cámara acústica; una abertura de salida situada debajo de la cámara acústica para recircular el fluido que fluye a través del dispositivo de vuelta a su fuente (por ejemplo, un biorreactor); por lo menos una abertura de recogida o recolección situada debajo de la cámara acústica para recoger una corriente de producto de fluido que sale de

la cámara acústica; y por lo menos un transductor ultrasónico en la cámara acústica debajo de dicha por lo menos una abertura de recolección, incluyendo dicho por lo menos un transductor ultrasónico un material piezoeléctrico accionado por una señal de voltaje para crear una onda estacionaria acústica a través de una trayectoria de flujo de recogida o recolección que va desde la cámara acústica hasta dicha por lo menos una abertura de recogida o recolección. La onda estacionaria acústica puede ser planar o multidimensional, o una combinación de dichas ondas puede estar presente en la cámara acústica (generalmente a partir de múltiples transductores). La onda estacionaria acústica puede pensarse con una "campo de fuerza" que retiene células enteras, pero permite el paso de materiales más pequeños tales como las biomoléculas deseadas (por ejemplo, proteínas recombinantes y/o anticuerpos monoclonales) y fragmentos de células, y que estos sean eliminados del fluido que se devuelve al biorreactor.

La abertura de salida está generalmente debajo de la abertura de entrada, y está generalmente situada en un extremo inferior del dispositivo.

Tal y como se menciona anteriormente, el dispositivo puede presentar una o más aberturas de recogida o recolección en la parte superior del dispositivo. En algunas formas de realización más específicas, el dispositivo puede presentar un total de dos aberturas de recolección espaciadas una de la otra en el extremo superior del dispositivo.

En formas de realización particulares, la abertura de entrada está situada en un primer extremo del dispositivo a una primera altura, dicho por lo menos un transductor ultrasónico está situado a una segunda altura por encima de la primera altura, y una pared inferior se extiende desde una abertura de entrada hasta la abertura de salida. La abertura de salida puede estar situada en un segundo extremo del dispositivo opuesto al primer extremo. La pared inferior puede ser cóncava, en relación con una línea entre la abertura de entrada y la abertura de salida. El dispositivo puede incluir una pared superior por encima de la trayectoria de flujo de entrada. La abertura de entrada, la abertura de salida, y dicha por lo menos una abertura de recolección están en ocasiones todas situadas en una pared frontal del dispositivo. La pared frontal puede ser ella misma planar (es decir, plana).

El dispositivo puede comprender además un reflector situado en la cámara acústica opuesto a dicho por lo menos un transductor ultrasónico. Alternativamente, el dispositivo puede presentar un total de dos transductores ultrasónicos situados en lados opuestos de la trayectoria de flujo de recolección a la misma altura y encarados entre sí, o transductores ultrasónicos adicionales pueden estar situados en múltiples lados de la trayectoria de flujo de recogida/recolección. Un reflector puede estar situado entre los dos transductores ultrasónicos. Asimismo, puede haber una pluralidad de pares de transductores/reflectores situados de forma apropiada para formar onda(s) estacionaria(s) acústica(s) planar(es), multidimensionales o combinaciones de las mismas.

En formas de realización particulares, la onda estacionaria acústica tiene como resultado una fuerza de radiación acústica que presenta una componente de fuerza axial y una componente de fuerza lateral que son del mismo orden de magnitud.

En otras formas de realización del dispositivo divulgado en la presente memoria, la trayectoria de flujo de entrada conduce desde la abertura de entrada aguas abajo hacia un extremo inferior del dispositivo y pasada la abertura de salida, y después hacia arriba hasta la cámara acústica. En ocasiones, la abertura de entrada y dicha por lo menos una abertura de recolección están ambas situadas en una pared superior del dispositivo, y la abertura de salida está situada en una pared frontal del dispositivo. Dicho por lo menos un transductor ultrasónico puede estar montado en una pared trasera o en una pared frontal del dispositivo. La pared inferior de esta cámara acústica puede ser una superficie planar inclinada. El reflector puede estar realizado a partir de un material transparente.

La trayectoria del flujo de entrada puede estar conformada para generar una trayectoria del flujo tangencial por debajo de un campo acústico generado por la onda estacionaria acústica. En versiones todavía adicionales vistas en la presente memoria, la trayectoria del flujo de entrada entra en la cámara acústica por un primer lado del dispositivo, y la abertura de salida está situada (i) en un primer lado del dispositivo o (ii) en un segundo lado opuesto. La abertura de entrada puede estar situada en un lado frontal del dispositivo, y dicha por lo menos una abertura de recolección puede estar situada en una pared superior del dispositivo. Dicho por lo menos un transductor puede estar situado en un lado frontal o en un lado trasero del dispositivo. En formas de realización más particulares, puede haber dos transductores, uno en un lado frontal y el otro en un lado trasero. En todavía otras formas de realización particulares, hay un transductor ultrasónico en el lado frontal o trasero, y un reflector situado en el respectivo lado trasero o frontal opuesto al transductor.

El dispositivo puede estar unido a una pieza de montaje que presenta orificios para una unión.

También se divulgan procedimientos para separar células a partir de un medio fluido que contiene las células. El medio fluido se hace fluir a través de un dispositivo de perfusión acústico de la estructura descrita anteriormente, que presenta por lo menos un transductor ultrasónico. Dicho por lo menos un transductor ultrasónico se acciona para crear la onda estacionaria acústica. Un fluido enriquecido de células puede recogerse a partir de la abertura de salida y un fluido clarificado, empobrecido en células, puede recogerse a partir de dicha por lo menos una

abertura de recolección.

En formas de realización particulares, la tasa de flujo a través de la trayectoria del flujo de recogida/recolección es por lo menos un orden de magnitud menor que la tasa de flujo a través de la trayectoria de apertura de entrada.
En formas de realización específicas, una tasa de flujo del medio fluido que entra en el dispositivo a través de la
abertura de entrada es de aproximadamente 1 litro por minuto y una tasa de flujo del fluido empobrecido en células
que sale del dispositivo a través de dicha por lo menos una apertura de recogida/recolección es de
aproximadamente 10 mililitros por minuto. Alternativamente, la relación entre la tasa de flujo que entra a través de
la apertura de entrada y la tasa de flujo que sale a través de dicha por lo menos una apertura de
recogida/recolección es tal que la onda estacionaria acústica no se ve superada por el cuerpo de células principal,
o, en otras palabras, es tal que un gran volumen de células no empiece a salir del dispositivo a través de la(s)
abertura(s) de recogida/recolección.

Los procedimientos pueden comprender asimismo el arrastre del medio fluido a través del dispositivo utilizando
una primera bomba unida a dicha por lo menos una apertura de recolección del dispositivo y una segunda bomba
unida a la apertura de salida del dispositivo.

También se divulgan en la presente memoria unos dispositivos adaptados para (i) recibir una mezcla que fluye que
contiene un fluido primario y unas células; y (ii) utilizar una primera onda estacionaria acústica para divertir de
forma continua una corriente de fluido de recolección empobrecido en células de la mezcla que fluye, cambiando
mediante ello la concentración de células de la mezcla que fluye. Puede generarse un incremento de presión en
un borde de la onda estacionaria acústica, junto con una fuerza de radiación acústica. Este "efecto de borde" actúa
como barrera en el borde de la onda estacionaria acústica. La frecuencia de la onda estacionaria acústica puede
ser modificada de manera que unos materiales de factores de contraste diferentes pueden ser retenidos o puede
permitírseles el paso a través de la onda estacionaria acústica.

El dispositivo puede asimismo comprender una cámara de flujo secundaria en la que la corriente de fluido de
recolección empobrecida en células pasa a través de una segunda onda estacionaria acústica que presenta una
frecuencia mayor que la de la primera onda estacionaria acústica.

También se divulgan en la presente memoria unos dispositivos de flujo que comprenden: por lo menos una entrada
para recibir una mezcla que fluye de un fluido primario y unas células, un transductor ultrasónico que produce una
primera onda estacionaria acústica y utiliza un incremento de presión y una fuerza de radiación acústica generada
en un borde de la primera onda estacionaria acústica ultrasónica para separar la mezcla que fluye en una corriente
de fluido de alta concentración de células primaria y una corriente de fluido de recolección secundaria; una apertura
de salida para la corriente de fluido de alta concentración de células primaria; y por lo menos una apertura de
recogida para la corriente de fluido de recolección secundaria. Una apertura de purga también puede estar presente
para extraer una mezcla concentrada de fluido/célula.

El dispositivo puede comprender además una cámara de flujo secundaria en la que la corriente de flujo secundaria
pasa a través de una segunda onda estacionaria acústica que tiene una frecuencia mayor que la primera onda
estacionaria acústica ultrasónica.

Estás y otras características no limitativas se describen de forma más particular a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Lo que viene a continuación es una breve descripción de los dibujos que se presentan con el objetivo de ilustrar
las formas de realización ejemplificativas divulgadas en la presente memoria y no con el objetivo de limitar los
mismos.

La figura 1 ilustra una onda acústica estacionaria individual generada por un transductor ultrasónico y un
reflector.

La figura 2 es una ilustración que compara un sistema de biorreactor de lote alimentado con un sistema de
biorreactor de perfusión.

La figura 3 es una vista en sección transversal que muestra los varios componentes de un biorreactor de tanque
agitado.

La figura 4 es una vista en perspectiva de una forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión
acústico de la presente divulgación, que presenta dos aberturas de recogida o recolección y un único
transductor ultrasónico.

La figura 5 muestra una segunda forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión acústico
de la presente divulgación, con un único reflector ubicado entre dos transductores ultrasónicos.

La figura 6 es una vista esquemática que ilustra un biorreactor de perfusión acoplado con un dispositivo de perfusión acústico de la presente divulgación ubicado entre dos transductores ultrasónicos y una trayectoria de reciclaje.

La figura 7 es una vista en sección transversal frontal de una tercera forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión acústico de la presente divulgación.

La figura 8 es una vista en perspectiva exterior del dispositivo de perfusión acústico de la figura 7.

La figura 9 es una vista en sección transversal frontal de una cuarta forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión acústico de la presente divulgación.

La figura 10 es una vista en perspectiva del dispositivo de perfusión acústico de la figura 9.

La figura 11 es un diagrama en sección transversal de un transductor ultrasónico convencional.

La figura 12 es un diagrama en sección transversal de un transductor ultrasónico de la presente divulgación. Un hueco de aire está presente dentro del transductor, y no están presentes ni una capa adicional ni una placa de desgaste.

La figura 13 es un diagrama en sección transversal de un transductor ultrasónico de la presente divulgación. Un hueco de aire está presente dentro del transductor, y una capa adicional y una placa de desgaste están presentes.

La figura 14 es un gráfico de la amplitud de impedancia eléctrica con respecto a la frecuencia para un transductor cuadrado accionado a diferentes frecuencias.

La figura 15 ilustra las configuraciones de línea de atrapamiento para siete de las frecuencias de resonancia (mínimos de amplitud de impedancia eléctrica) de la figura 14 a partir de la dirección ortogonal al flujo de fluido.

La figura 16 es una simulación por computador de la amplitud de presión acústica (escala derecha en Pa) y el transductor fuera del plano de desplazamiento (escala izquierda en metros). El texto en la parte superior de la escala izquierda indica " $\times 10^{-7}$ ". El texto en la parte superior de la escala izquierda cerca del triángulo que apunta hacia arriba indica " 1.473×10^{-6} ". El texto en la parte inferior de la escala izquierda cerca del triángulo que apunta hacia abajo indica " 1.4612×10^{-10} ". El texto en la parte superior de la escala derecha indica " $\times 10^6$ ". El texto en la parte superior de la escala derecha cerca del triángulo que apunta hacia arriba indica " 1.1120×10^6 ". El texto en la parte inferior de la escala derecha cerca del triángulo que apunta hacia abajo indica "7.357". Los triángulos muestran los valores máximos y mínimos ilustrados en esta figura para la escala dada. El eje horizontal representa la ubicación dentro de la cámara a lo largo del eje X, en pulgadas, y el eje vertical representa la ubicación dentro de la cámara a lo largo del eje Y, en pulgadas.

La figura 17 muestra el desplazamiento en el plano y fuera del plano de un cristal en el que están presentes ondas compuestas.

La figura 18 es una vista de un primer dispositivo de perfusión acústico de la presente divulgación conectado a un biorreactor asociado, que muestra una pluralidad de mangueras que conectan fluidicamente las varias aberturas del dispositivo al biorreactor asociado y una bomba de flujo hacia fuera que conecta fluidicamente la abertura de salida del dispositivo al biorreactor asociado.

La figura 19 es una vista de otro dispositivo de perfusión acústico de la figura 5, que muestra un reflector en la cámara acústica entre el primer y segundo transductores. Un medio fluido también está presente en el dispositivo y se muestran unas flechas indicando la dirección de flujo además de ondas que indican el campo acústico entre el reflector y el primer y segundo transductores.

La figura 20 es un gráfico que muestra la eficiencia de eliminación de células del medio fluido para un experimento a dos tasas de perfusato/alimentación diferentes.

La figura 21 es un gráfico que muestra la reducción de turbidez del flujo de recolección (también denominado perfusato) para un experimento.

La figura 22 es un gráfico que muestra la viabilidad celular para varias tasas de flujo para el experimento llevado a cabo para los gráficos de las figuras 20-21.

La figura 23 es un gráfico que muestra la densidad celular total y la retención de células para una variedad de tasas de flujo y métodos de flujo para otro experimento.

La figura 24 es un gráfico que muestra la viabilidad celular para una variedad de tasas de flujo para el experimento realizado para los gráficos de la figura 23.

La figura 25 es un gráfico que muestra la densidad de células total y la retención de células para un número variado de transductores ultrasónicos para otro experimento.

La figura 26 es un gráfico que muestra la viabilidad celular para un número variado de transductores ultrasónicos para el experimento para el gráfico de la figura 25.

La figura 27 es una imagen de otro dispositivo de perfusión acústico que se probó.

La figura 28 es un gráfico que muestra el efecto de la tasa de flujo de perfusión o el voltaje sobre la retención de células.

La figura 29A es una imagen de microscopio de un Analizador de Células ViCell de las partículas en la corriente de alimentación que entra en el dispositivo. La corriente de alimentación es un fluido de biorreactor que contiene células CHO, proteína, y fragmentos de células. La figura 29B es un gráfico de la distribución de diámetro de partículas de la alimentación, que muestra una distribución bimodal. En la figura 29B, el eje y es el conteo de partículas desde 0 a 200 en intervalos de 10. El eje x es el diámetro de partícula en micrones desde 6 a 50 en intervalos de 2. El número total de partículas es de 5539, el tamaño de partícula promedio es de 16.78 micrones, la desviación estándar de 6.76 micrones y el tamaño de partículas modal de 10.56 micrones.

La figura 30A es una imagen de microscopio del perfusato (o flujo de recolección clarificado) que sale del dispositivo. La figura 30B es un gráfico de la distribución de diámetro de partícula del perfusato, que muestra una distribución unimodal a tamaños mucho menores. En la figura 30B, el eje y es el conteo de partícula desde 0 a 300 en intervalos de 20. El eje x es el diámetro de partícula en micrones desde 6 a 50 en intervalos de 2. El número total de partículas es de 2919, el tamaño de partícula promedio de 10.08 micrones, la desviación estándar de 3.75 micrones y el tamaño de partícula modal de 8.99 micrones.

La figura 31 es un modelo CFD que muestra la distribución de velocidades en el dispositivo de la figura 27. El texto en la parte superior de la escala indica "x10⁻²". El texto en la parte superior de la escala cerca del triángulo que apunta hacia arriba indica "0.678": El texto en la parte inferior de la escala cerca del triángulo que apunta hacia abajo indica "0". Los triángulos muestran los valores máximos y mínimos ilustrados en esta figura para la escala dada. La escala va desde 0 a 5 m/s en intervalos de 0.5, con el negro indicando 5 en la parte superior de la escala, y el blanco indicando cero en la parte inferior de la escala.

La figura 32 es una vista frontal del dispositivo de la figura 27, que muestra las trayectorias de flujo, el campo acústico y el efecto de borde acústico.

La figura 33 es una fotografía compuesta que muestra el dispositivo de perfusión acústico de la figura 27 en dos modos de funcionamiento. A la izquierda, el dispositivo está en modo de arranque o de asentamiento de células. A la derecha, el dispositivo está en modo de retención de células estacionario.

La figura 34 muestra la geometría de un modelo de simulación del dispositivo acústico utilizado para la retención de células. El modelo contiene dos fluidos, siendo uno un fluido clarificado dentro del campo acústico, siendo el otro un fluido de alta densidad de células a la izquierda del campo acústico, un transductor piezoeléctrico, un reflector de acero y una carcasa de aluminio. El primer fluido era agua dentro del campo acústico y el segundo fluido era una solución de agua con un 15% de concentración de células CHO fuera (hacia la izquierda) del campo acústico. La línea sólida azul en el modelo indica la línea separación entre los dos fluidos.

Las figuras 35A, 35B y 35C son gráficos que muestran el desplazamiento del material piezoeléctrico, la carcasa de aluminio y el reflector de acero (escala a la izquierda); y la presión acústica en los dos fluidos (escala a la derecha) del modelo de simulación de la figura 34 a múltiples frecuencias de funcionamiento. La figura 35A corresponde a una frecuencia de 2.218 MHz. La figura 35B corresponde a una frecuencia de 2.2465 MHz. La figura 35C corresponde a una frecuencia de 2.3055 MHz. Para los tres gráficos, la escala a la izquierda está indicada con el texto en la parte superior de la escala que indica "x10⁻⁶" o "x10⁻⁷", y está en unidades de pulgadas. La escala de la derecha está indicada con el texto en la parte superior de la escala que indica "x10⁶" y está en unidades de Pascales. El eje y va desde -0.8 a 1.6 en intervalos de 0.2. El eje x va desde -0.5 a 1.5 en intervalos de 0.5.

La figura 36 es un gráfico que muestra la fuerza lateral promedio (N) y la fuerza lateral promedio normalizada (N/W) que actúa sobre las células CHO suspendidas a múltiples frecuencias de funcionamiento.

La figura 37 es una imagen (vista superior) de un dispositivo de perfusión acústico de la presenta divulgación. Las flechas indican el flujo dentro de la abertura de entrada, el flujo hacia fuera de la abertura de salida; el flujo

del fluido clarificado hacia fuera por la parte superior del dispositivo y el flujo del concentrado hacia fuera por la parte inferior del dispositivo.

La figura 38 es una imagen (vista lateral) del dispositivo de perfusión acústico de la figura 37.

La figura 39 es un gráfico de la retención de células con respecto a la tasa de flujo de perfusato para el dispositivo de la figura 37.

La figura 40 es una ilustración del estado de la técnica anterior que muestra la filtración de flujo directo (DFF) y la filtración de flujo tangencial (TFF).

La figura 41 es una imagen que ilustra un primer modo de funcionamiento durante la perfusión, en la que las células son atrapadas, agrupadas y separadas a partir de la corriente de recolección. El dispositivo funciona verticalmente, con una flecha indicando la dirección de la gravedad.

La figura 42 es una imagen que ilustra un segundo modo de funcionamiento durante la perfusión, en el que se impide que las células entren en un campo de onda estacionaria acústica, mientras que se permite que partículas más pequeñas pasen a través del campo y dentro de la corriente de recolección. El dispositivo funciona verticalmente, con una flecha indicando la dirección de la gravedad.

Descripción detallada

La presente divulgación puede entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las formas de realización deseadas y los ejemplos incluidos en la misma. En la siguiente memoria y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos que deben definirse para que tengan los siguientes significados.

A pesar de que se utilizan términos específicos en la siguiente descripción en aras de claridad, con estos términos solamente se tiene la intención de hacer referencia a la estructura particular de las formas de realización seleccionadas para la ilustración en los dibujos, y no se tiene la intención de definir o limitar el alcance de la divulgación. En los dibujos y en la siguiente descripción abajo, debe entenderse que designaciones numéricas iguales se refieren a componentes de igual función.

Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales excepto que el contexto dicte claramente lo contrario.

El término “que comprende” se utiliza en la presente memoria como que requiere la presencia del componente mencionado y permite la presencia de otros componentes. El término “que comprende” debería ser interpretado para incluir el término “que consiste en”, que permite la presencia únicamente del componente mencionado, junto con cualquier impureza que pueda resultar de la fabricación del componente mencionado.

Se debería entender que los valores numéricos incluyen valores numéricos que son los mismos cuando se reducen al mismo número de dígitos significativos y valores numéricos que difieren de los valores indicados por menos del error experimental de una técnica de medición convencional del tipo descrito en la presente solicitud para determinar el valor.

Todos los rangos divulgados en la presente memoria incluyen el extremo enumerado y combinables de forma independiente (por ejemplo, el rango de “desde 2 gramos a 10 gramos” incluye los extremos, 2 gramos y 10 gramos, y todos los valores intermedios). Los extremos de los rangos y cualquier valor divulgado en la presente memoria no están limitados al rango o valor precisos; son suficientemente imprecisos para incluir valores que se aproximen a estos rangos y/o valores.

El modificador “aproximadamente” utilizado en conexión con una cantidad es inclusivo del valor mencionado y tiene el significado dictado por el contexto. Cuando se utiliza en el contexto de un rango, se debería considerar que el modificador “aproximadamente” divulga el rango definido por los valores absolutos de los dos extremos. Por ejemplo, el rango “de aproximadamente 2 a 10” también divulga el rango “de 2 a 10”. El término “aproximadamente” puede referirse a más o menos 10% del número indicado. Por ejemplo, “aproximadamente 10%” puede indicar un rango de 9% a 11%, y “aproximadamente 1” puede significar de 0.9-1.1.

Debería notarse que muchos de los términos utilizados en la presente memoria son términos relativos. Por ejemplo, los términos “superior” e “inferior” son relativos entre sí en ubicación, es decir, un componente superior está situado a una elevación mayor que un componente inferior en una orientación dada, pero estos términos pueden cambiar si el dispositivo se voltea. Los términos “entrada” y “salida” son relativos a un fluido que fluye a través de ellas con respecto a una estructura dada, por ejemplo, un fluido fluye a través de la entrada hacia dentro la estructura y fluye a través de la salida hacia fuera de la estructura. Los términos “aguas arriba” y “aguas abajo” son relativos a la dirección en la que un fluido fluye a través de varios componentes, es decir, el fluido fluye a través de un

componente aguas arriba antes de fluir a través de un componente aguas abajo. Debería notarse que, en un bucle, un primer componente puede describirse como estando tanto aguas arriba como aguas debajo de un segundo componente.

Los términos “horizontal” y “vertical” se utilizan para indicar una dirección relativa a una referencia absoluta, es decir, el nivel del suelo. Sin embargo, estos términos no deben interpretarse como que requieren que las estructuras estén absolutamente paralelas o absolutamente perpendiculares entre sí. Por ejemplo, una primera estructura vertical y una segunda estructura vertical no son necesariamente paralelas entre sí. Los términos “parte superior” e “parte inferior” o “base” se utilizan para hacer referencia a superficies en las que la parte superior siempre está más elevada que la parte inferior/base en relación con una referencia absoluta; hacia arriba es siempre contra la gravedad de la Tierra.

La presente solicitud se refiere a “el mismo orden de magnitud”. Dos números son del mismo orden de magnitud si el cociente del número mayor dividido por el número menor es un valor menor que 10.

Los biorreactores son útiles para producir biomoléculas tales como proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales. De forma muy general, las células se cultivan en un tanque de biorreactor con medios para producir el producto deseado, y el producto deseado se recolecta a continuación por la separación de células y medios en un dispositivo de perfusión acústico, tal que el dispositivo de la presente divulgación. El dispositivo de filtración acústico permite la retirada de algo de producto deseado, una pequeña porción de los medios, y fragmentos / restos celulares menores que las células, siendo el remanente reciclado de vuelta al biorreactor (particularmente las células). El uso de cultivos de células de mamífero incluyendo células de hámster chino (CHO), células de hibridoma NS0, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de insecto y células humanas (por ejemplo, células T, células B, células madre, glóbulos rojos sanguíneos) y células vivas/biológicas en general ha demostrado ser un modo muy eficaz de producir/expresar las proteínas recombinantes y los anticuerpos monoclonales utilizados en varias aplicaciones como productos farmacéuticos o vacunas. Existen dos tipos de procesos de biorreactor generales: lote alimentado y perfusión.

Mientras que los reactores de lote alimentado son actualmente la norma, debido principalmente a la familiaridad del proceso para numerosos científicos y técnicos, la tecnología de perfusión está creciendo a un ritmo muy rápido. Muchos factores favorecen el uso de un proceso de biorreactor de perfusión, principalmente debido a que es propicio para una producción en continuo. Los costes de capital y de arranque para biorreactores de perfusión son menores, se requiere una capacidad de procesamiento previo y de procesamiento después del biorreactor menor, el rendimiento puede ser superior, el proceso es continuo, y el proceso utiliza menores volúmenes y menos etapas de sembrado que los procedimientos de lote alimentado. Un proceso de biorreactor de perfusión también se presta mejor al desarrollo, escalado, optimización, estudios de sensibilidad de parámetros y validación.

También puede utilizarse un biorreactor de perfusión para generar células que pueden utilizarse en proceso de terapia celular. En este tipo de biorreactor de perfusión, células biológicas tales que las células CAR T, células Jurkat y similares se cultivan en un biorreactor de perfusión. La onda estacionaria acústica utilizada en los dispositivos de perfusión de la presente divulgación pueden ser utilizados para separar células viables de células no viables después de un procedimiento de transfección. Esto permite una eficiencia mejorada de la inoculación del paciente con esta terapia de células T ya que solamente se utilizan células viables. Las células no viables y los fragmentos de células se separan hacia fuera mediante el proceso de perfusión, siendo dirigidos estos materiales a una corriente secundaria y saliendo del biorreactor.

Desarrollos recientes de la tecnología de biorreactor de perfusión también favorecen su uso. La tecnología de control y el equipo de soporte general está mejorando para los biorreactores de perfusión, aumentando la robustez de los procesos de perfusión. Ahora el proceso de perfusión puede escalarse hasta biorreactores que tengan un volumen de hasta 1000 litros (L). Mejores sistemas de retención de células para biorreactores de perfusión tienen como resultado menores pérdidas de células y mayores densidades de células que las que se han visto anteriormente. En estos momentos, pueden alcanzarse densidades celulares superiores a 50 millones de células/mL, en comparación con las densidades celulares de lote alimentado de alrededor de 20 millones de células/mL. Unas menores tasas de contaminación e infección han mejorado el rendimiento de los biorreactores de perfusión. De este modo, han resultado concentraciones de producto más elevadas y mejores rendimientos sin un incremento significativo de coste para los procesos de perfusión.

Los biorreactores de perfusión son particularmente atractivos debido a la producción en continuo de biomoléculas a partir del cultivo celular que las expresa, y menores tiempos de residencia de dichas biomoléculas en el proceso antes de la recolección. Las células diana son retenidas mediante un proceso de filtración, tal que la filtración de flujo tangencial (TFF) o la filtración de flujo tangencial alterno (ATF), mientras que las biomoléculas expresada se extraen del biorreactor de perfusión. Las células son entonces devueltas al biorreactor para garantizar que reciben la nutrición y el oxígeno para mantener la producción del cultivo celular en conjunto. En el proceso de reactor de perfusión, las células continúan multiplicándose por lo que también es necesario realizar una purga de parte de la población del cultivo durante el proceso de producción por perfusión.

Los procesos de filtración TFF and ATF tienen múltiples problemas, tales como la colmatación/bloqueo y la pérdida de producto de biomolécula (particularmente a densidades celulares elevadas), todos relacionados directamente con la naturaleza de las membranas de fibra hueca utilizadas en la filtración. Por lo tanto, es deseable encontrar un nuevo proceso de filtrado que no se bloquee y minimice la pérdida del producto de biomoléculas deseado. Además, TFF y ATF retendrán todos los residuos celulares y desechos finos en el reactor, lo cual no es deseable. Por lo tanto, un proceso capaz de distinguir entre la retención de células y al mismo tiempo permitir el paso de fragmentos de células y desechos finos podría ser favorable.

En resumen, la presente divulgación se refiere a unos dispositivos de perfusión acústicos capaces de generar onda(s) estacionaria(s) acústica(s) multidimensional(es) a partir de uno o más transductores piezoeléctricos, en el que los transductores son eléctricamente de tal manera que se desplazan siguiendo un patrón de desplazamiento multimodo en vez de un modo "pistón" de vibración". Mediante este modo de generación de onda estacionaria acústica, se genera una fuerza de atrapamiento lateral mayor que si el transductor piezoeléctrico se excita en un modo "pistón" en el que solamente se genera una onda estacionaria grande. De este modo, con la misma entrada de potencia a un transductor piezoeléctrico, las ondas estacionarias acústicas multidimensionales pueden tener una fuerza de atrapamiento lateral mayor en comparación con una onda estacionaria acústica planar. La entrada de potencia es ajustable para un flujo controlado. Esto puede utilizarse para facilitar la purificación de un fluido proteínico de una corriente de fluido que proviene de un biorreactor. Alternativamente, la onda estacionaria acústica puede ser asimismo una onda estacionaria planar donde el transductor piezoeléctrico se excita en el modo pistón, generando una onda planar. La(s) onda(s) estacionaria(s) acústica(s) pueden ser asimismo una combinación de ondas estacionarias acústicas planares y multidimensionales. Todas estas ondas estacionarias generan un "efecto de borde" de tal manera que las células del biorreactor son retenidas y el producto de biomolécula expresado por las células, los fragmentos celulares y los restos pequeños se dejan pasar a través.

La acustofóresis es un método de baja potencia, no reducción de presión, no bloqueo, de estado sólido de separación de partícula a partir de dispersiones fluidas (es decir, se utiliza para lograr separaciones que se realizan más típicamente con filtros porosos, pero no tiene ninguna de las desventajas de los filtros). En particular, los dispositivos de perfusión acústicos de la presente divulgación son aptos para su utilización con biorreactores de escala macro para separaciones en sistema que fluyen a tasas de flujo elevado. El dispositivo de perfusión acústico está diseñado para crear una onda estacionaria ultrasónica multidimensional de alta intensidad que tiene como resultado una fuerza de radiación acústica que puede superar los efectos combinados del arrastre y la flotación del fluido o la gravedad a tasas de flujo bajas. Como resultado, la fuerza de radiación actúa como un filtro que evita que las partículas diana (por ejemplo, células biológicas) atraviesen el plano de la onda estacionaria. Como se ha explicado anteriormente, la capacidad de atrapamiento de la onda estacionaria puede modificarse a voluntad, por ejemplo, modificando la tasa de flujo del fluido, la fuerza de radiación acústica, y la forma del dispositivo de filtración acústico para maximizar la retención de células mediante el atrapamiento y el asentamiento. Esta tecnología ofrece una alternativa verde y sostenible para la separación de fases secundarias con una reducción significativa en el coste de energía. Se han demostrado eficiencias de separación de partículas excelentes para tamaños de partícula tan pequeños como un micrón.

Generalmente, la dispersión del campo acústico desde las partículas tiene como resultado una fuerza de radiación acústica tridimensional que actúa como un campo de atrapamiento tridimensional. La fuerza de radiación acústica es proporcional al volumen de partícula (por ejemplo, el cubo del radio) cuando la partícula es pequeña con respecto a la longitud de onda. Es proporcional a la frecuencia y al factor de contraste acústico. También se escala con la energía acústica (por ejemplo, el cuadrado de la amplitud de presión acústica). Para una excitación armónica, la variación espacial sinusoidal de la fuerza es lo que guía las partículas a posiciones estables dentro de las ondas estacionarias. Cuando la fuerza de radiación acústica ejercida sobre las partículas es más fuerte que el efecto combinado de la fuerza de arrastre de fluido y la flotación/fuerza gravitacional, la partícula es atrapada en el campo de onda estacionaria acústica. La acción de las fuerzas acústicas axial y lateral sobre las partículas atrapadas tiene como resultado la formación de grupos estrechamente empaquetados mediante la concentración, aglomeración y/o coalescencia de partículas que se asientan mediante una gravedad mejorada (partículas más pesadas que el fluido hospedador) o flotación (partículas más ligeras que el fluido hospedador). Adicionalmente, fuerzas interpartícula secundarias, tales como las fuerzas de Bjerkness, ayudan en la aglomeración de partículas.

La mayoría de los tipos celulares biológicos presentan una densidad mayor y una compresibilidad menor que la del medio en el que están suspendidos, de tal manera que el factor de contraste acústico entre las células y el medio tiene un valor positivo. Como resultado, la fuerza de radiación acústica (ARF) conduce a las células hacia los nodos de presión de onda estacionaria. El componente axial de la fuerza de radiación acústica guía las células, con un factor de contraste positivo, hacia los planos nodales de presión, mientras que las células u otras partículas con un factor de contraste negativo son conducidas a los planos antinodales de presión. El componente radial o lateral de la fuerza de radiación acústica es la fuerza que atrapa las células. El componente radial o lateral de la ARF es mayor que el efecto combinado de la fuerza de arrastre y la fuerza gravitacional. Para células pequeñas o emulsiones la fuerza de arrastre F_D puede expresarse como:

$$\vec{F}_D = 4\pi\mu_f R_p (\vec{U}_f - \vec{U}_p) \left[\frac{1 + \frac{3}{2}\hat{\mu}}{1 + \mu} \right]$$

en el que U_f y U_p son la velocidad de fluido y de la célula, R_p es el radio de partícula, μ_f y μ_p son la viscosidad dinámica del fluido y de las células, y $\hat{\mu} = \mu_p / \mu_f$ es la tasa de viscosidades dinámica. La fuerza de flotación F_B se expresa como:

$$F_B = \frac{4}{3} \pi R_p^3 (\rho_f - \rho_p) g$$

Para que una célula quede atrapada en la onda estacionaria ultrasónica multidimensional, el balance de fuerza sobre la célula debe ser cero, y, por lo tanto, una expresión para la fuerza de radiación acústica lateral F_{LRF} puede encontrarse, que viene dada por:

$$F_{LRF} = F_D + F_B$$

Para que una célula de tamaño y propiedad material conocidos, y para una tasa de flujo dada, esta ecuación puede utilizarse para estimar la magnitud de la fuerza de radiación acústica lateral.

El modelo teórico que se utiliza para calcular la fuerza de radiación acústica está basado en la formulación desarrollada por Gor'kov. La fuerza de radiación acústica F_A está definida como una función de un potencial de campo U , $F_A = -\nabla(U)$,

en el que el potencial de campo U está definido como

$$U = V_0 \left[\frac{\langle p^2 \rangle}{2\rho_f c_f^2} f_1 - \frac{3\rho_f \langle u^2 \rangle}{4} f_2 \right],$$

y f_1 y f_2 son las contribuciones de monopolo y dipolo definidas por

$$f_1 = 1 - \frac{1}{\Lambda \sigma^2}, \quad f_2 = \frac{2(\Lambda - 1)}{2\Lambda + 1},$$

donde p es la presión acústica, u es la velocidad de la partícula de fluido, Λ es la tasa entre la densidad de la célula ρ_p y la densidad del fluido ρ_f , σ es la tasa entre la velocidad del sonido de la célula c_p y la velocidad de sonido del fluido c_f , V_0 es el volumen de la célula, y $\langle \rangle$ indica el promediado de tiempo durante el periodo de la onda.

La teoría de Gor'kov está limitada a tamaños de partícula que son pequeños con respecto a la longitud de onda de los campos de sonido del fluido y de la partícula, y tampoco tiene en cuenta el efecto de la viscosidad del fluido y de la partícula sobre la fuerza de radiación. Se han desarrollado modelos numéricos adicionales para el cálculo de la fuerza de radiación acústica sin ninguna restricción en relación con el tamaño de partícula respecto a la longitud de onda. Estos modelos también incluyen el efecto de la viscosidad del fluido y la partícula, y por lo tanto son un cálculo más preciso de la fuerza de radiación acústica. Los modelos que fueron implementados están basados en el trabajo teórico de Yurii Ilinski y Evgenia Zabolotskaya descritos en AIP Conference Proceedings, Vol 1474-1, pp. 255-258 (2012).

De forma deseable, el (los) transductor(es) ultrasónico(s) genera(n) una onda estacionaria multidimensional en el fluido que ejerce una fuerza lateral sobre las partículas suspendidas para acompañar la fuerza axial. Los resultados típicos publicados en la literatura afirman que la fuerza lateral es menor en dos órdenes de magnitud que la fuerza axial. En contraste, la tecnología divulgada en esta solicitud prevé que la fuerza lateral sea del mismo orden de magnitud que la fuerza axial. Sin embargo, en ciertas formas de realización descritas más adelante en la presente memoria, el dispositivo utiliza tanto transductores que producen ondas estacionarias acústicas multidimensionales como transductores que producen ondas estacionarias acústicas planares. A efectos de la presente divulgación, una onda estacionaria en la que la fuerza lateral no es del mismo orden de magnitud que la fuerza lateral se considera una "onda estacionaria acústica planar". La componente de fuerza lateral de la fuerza de radiación acústica (ARF) total generada por el (los) transductor(es) ultrasónico(s) de la presente divulgación es significativa y es suficiente para superar la fuerza de arrastre del fluido a velocidades lineales de hasta 1 cm/s, y para crear grupos estrechamente empaquetados, y es del mismo orden de magnitud que el componente de fuerza axial de la fuerza de radiación acústica total.

Sería de ayuda contrastar la tecnología de la presente divulgación con la de tecnologías de filtración anteriores. La figura 40 muestra dos métodos de filtración pertenecientes a la técnica anterior. La parte izquierda de la figura 40 ilustra la filtración de flujo directo (DFF). En la DFF, la corriente de alimentación completa de fluido y partículas se

dirige hacia el filtro. El filtro 4010 retiene las partículas 4020 que son mayores que el tamaño de poro del filtro, mientras que las partículas 4030 más pequeñas y el fluido pasan a través del filtro. La parte derecha de la figura 40 ilustra la filtración de flujo tangencial (TFF). En la TFF, la corriente de alimentación no se dirige hacia el filtro. Más bien, la corriente de alimentación se dirige tangencialmente hacia el filtro, de tal manera que la mayoría de la corriente de alimentación pasa tangencialmente por encima del filtro. Típicamente, esta corriente de alimentación se recircula para pasar cerca del filtro más de una vez. Una corriente de filtrato 4006 mucho más pequeña que contiene las partículas más pequeñas 4030 se empuja a través de la membrana del filtro. Una de las ventajas de la TFF respecto a la DFF es que la corriente tangencial reduce el bloqueo y el colmatado del filtro y la formación de una capa de gel que se asienta sobre la parte superior del filtro.

En los dispositivos de la presente divulgación, durante el arranque, el fluido ensonificado mediante la onda estacionaria acústica se clarifica mediante el proceso de atrapamiento de células y acumulación en grupos estrechamente empaquetados, de tal manera que ocurra la separación gravitacional continua de los grupos de células. Ya que hay un número limitado de células nuevas que fluyen en este volumen, esto tiene como resultado una rápida clarificación del fluido sujeto a la onda estacionaria acústica. Cuando se alcanza este estado, el sistema puede describirse como que incluye dos fluidos: un primer fluido que contiene el producto deseado y pequeños fragmentos / residuos de células (que ha pasado a través de la onda estacionaria acústica), y un segundo fluido que contiene el fluido del biorreactor y todas las células (que han sido retenidas por la onda estacionaria acústica). Los dos fluidos pueden tener propiedades acústicas efectivas diferentes, tales como densidad y velocidad del sonido, con una interfaz bien definida entre estos dos fluidos. La interfaz está ubicada generalmente cerca del borde inferior del campo de onda estacionaria acústica generando un "efecto de borde acústico". El primer fluido (es decir, el fluido que ha sido clarificado y contiene el producto, algunas células y fragmentos de célula) se encuentra aguas debajo de la interfaz y representa el flujo de recolección y ocupa el volumen de fluido ensonificado por el campo de onda estacionaria acústica. El segundo fluido (es decir, el fluido que contiene el fluido de biorreactor y la mayoría de las células) se encuentra aguas arriba de la interfaz. Estos dos fluidos diferentes pueden verse en la figura 33.

El campo de onda estacionaria acústica ejerce una presión de radiación acústica (es decir, un aumento de presión) y una fuerza en el borde acústico del campo acústico sobre la interfaz entre los dos fluidos, evitando que las células aguas arriba entren en el campo acústico. La aparición de la presión de radiación y la fuerza en la interfaz permiten que el primer fluido que contiene el producto pase a través de la interfaz, mientras que retiene las células en el fluido aguas arriba. Las células que son retenidas por el efecto de la fuerza de radiación acústica en la interfaz entre los dos fluidos pueden retornarse de forma continua al biorreactor para asegurar que reciben la nutrición y el oxígeno para mantener la producción del cultivo de células global.

La moción circulante del campo de flujo debajo de la interfaz transporta las células que son retenidas por el campo acústico de vuelta al biorreactor. La moción de flujo circulante es conducida por la corriente de recirculación primaria y puede ser optimizada mediante variaciones de la geometría de la cámara acústica para una eficiencia máxima del sistema. Esto se discutirá más adelante con respecto a la figura 33 mostrada abajo.

Durante la perfusión, los dispositivos de perfusión acústica de la presente divulgación tienen múltiples posibles modos de operación. Uno de estos modos puede ser dominante en el dispositivo o pueden ocurrir de forma concurrente dependiendo de la distribución de células y fluido en el dispositivo. En un primer modo de operación ilustrado en la figura 41 (Modo 1), el fluido que contiene células 4020 (color claro) entra en el campo de onda estacionaria acústica 4040, que es producido aquí entre el transductor 4008 y el reflector 4009. Una onda estacionaria acústica multidimensional atrapa las células en puntos específicos, las agrupa en grupos estrechamente empaquetados 4022, y separa de forma continua los grupos mediante una decantación gravitacional mejorada. Los grupos de células se decantan, entran en la trayectoria del flujo tangencial (indicada por la flecha 4001) y son redirigidos al biorreactor mediante la corriente de recirculación. Las partículas más pequeñas 4030 (color más oscuro) no son atrapadas por, y pasan a través, de la onda estacionaria acústica, para ser recolectados. La dirección de flujo de recolección se indica mediante una flecha 4002. La orientación de este dispositivo es significativa, y la dirección de la gravedad también se indica.

El segundo modo de operación (Modo 2) se ilustra en la figura 42, en el que el sistema acustoforético crea una barrera fuerte para células y evita que las células entren en el campo acústico. Aquí, una barrera de células se establece entre los dos fluidos mediante el efecto borde de la onda estacionaria acústica. Una primera corriente de fluido clarificado 4050 contiene las partículas más pequeñas / subproductos deseados 4030 en el campo de onda estacionaria acústica y la corriente de recolección. Una segunda corriente de fluido 4055 contiene las células retenidas 4020 aguas arriba del campo de onda estacionaria acústica. La dirección de flujo de recolección se indica mediante una flecha 4002. En este modo de operación, se realiza un efecto de borde acústico (indicado por la línea de puntos 4007). De manera muy general, el efecto de borde acústico retiene las células y evita que entren en el campo acústico mientras que permite que una porción de la corriente de fluido que contiene las biomoléculas producidas y los fragmentos de células pase a través la barrera creada por el borde acústico. La trayectoria del flujo tangencial por debajo del borde acústico (flecha 4001) recoge las células retenidas y las hace fluir de vuelta a la corriente de recirculación principal y de vuelta al biorreactor. Esto también se discutirá más adelante con respecto a la figura 32. De nuevo, la dirección de la gravedad está indicada.

En aplicaciones de perfusión, la configuración del dispositivo acustoforético es similar al de la TFF. Una corriente de alimentación que contiene las células, residuos celulares, finos, y producto, es decir, proteína, fluye desde el biorreactor hasta dentro del sistema de perfusión. Una porción de la corriente fluye de una forma tangencial a lo largo del borde inferior de la onda estacionaria acústica y se recircula de vuelta al biorreactor. Una porción menor de la corriente de alimentación se recolecta, es decir, se divierte y fluye a través de la onda estacionaria acústica. Aquí, la onda estacionaria acústica funciona de forma muy similar al filtro en la TFF, evitando que las células entren en el campo acústico. La corriente de recolección contiene las partículas más pequeñas tales como los residuos celulares y finos, así como el producto de biomolécula deseado. Las células que son retenidas por la onda estacionaria acústica son transportadas mediante la corriente de recirculación de vuelta al biorreactor. La figura 32, que se discute a continuación en la presente memoria, también ilustra un dispositivo de perfusión que utiliza una corriente de flujo tangencial.

Las aplicaciones de perfusión implican típicamente densidades celulares elevadas, por ejemplo > 50 millones de células, y velocidades de recolección menores al contrario que las aplicaciones de clarificación de células o de aceite/agua. Las dos corrientes de fluido tienen asimismo diferentes propiedades acústicas efectivas, es decir, velocidad del sonido y densidad de la mezcla medio/células. A medida que se incrementa la densidad celular, la diferencia en las propiedades acústicas de las dos corrientes de fluido será asimismo más pronunciada. El campo de onda estacionaria acústica ejercerá ahora una presión de radiación acústica, es decir, un incremento de presión, sobre una segunda corriente de fluido, enriquecida con células, así como unas fuerzas de radiación acústica sobre las células suspendidas en el fluido. Esta presión de radiación y fuerza de radiación actúan en la interfaz entre los dos fluidos que coincide con el borde aguas arriba del campo acústico. Cuando este efecto de "borde acústico" de la fuerza de radiación acústica es suficientemente fuerte, evita que las células entren en el campo acústico. Es igual de importante una trayectoria de flujo tangencial para recoger las células retenidas y transportarlas de vuelta al biorreactor.

También puede referirse al efecto de borde acústico como un efecto de pared acústica y resulta de un borde del campo acústico que ejerce una fuerza lateral fuerte, es decir, en la dirección del flujo de recolección y perpendicular al eje de la onda estacionaria acústica, sobre las partículas suspendidas, evitando de esta forma que las partículas de tamaño relativamente mayor entren en el campo acústico y permitiendo que solamente entre en el campo acústico fluido clarificado (es decir, el fluido que contiene el producto de tamaño menor), creando de esta forma un dispositivo de retención de células de perfusión acústico. De esta forma, solamente el fluido clarificado puede escapar y las células son retenidas por la fuerza de radiación. Esta fuerza nunca es positiva, lo que significa que siempre retiene las células en la interfaz, es decir, la fuerza actúa en la dirección aguas arriba del flujo, no permitiendo que escapen del borde acústico. Los picos múltiples en la curva de potencia (ver discusión de la figura 37 más abajo) muestran la existencia de múltiples modos de operación que incluyen modos de resonancia planar y modos multidimensionales de operación, lo que indica que este tipo de operación puede generarse mediante la utilización de ondas estacionarias planares y multidimensionales por igual. En sistemas que tienen dimensiones de 1"x1", existe una resonancia planar aproximadamente cada 30 kHz. La figura 37 muestra una prueba de unos picos adicionales que indican la existencia de los modos multidimensionales. Por unidad de potencia, estos modos pueden ser igual o incluso más efectivos que los modos de resonancia planares. Como se ha explicado anteriormente, las células que son retenidas por la fuerza de radiación acústica pueden ser recogidas entonces por la moción de arrastre del campo de flujo (es decir, el flujo que recircula debajo de la interfaz) y ser devueltas de forma continua al biorreactor para asegurar que reciben la nutrición y el oxígeno para mantener la producción del cultivo celular global.

El fluido clarificado contiene tanto los productos deseados como los fragmentos de células, todos ellos más pequeños que las células viables enteras. De esta forma, el medio que se devuelve al biorreactor está clarificado de fragmentos de células. Los fragmentos de células absorben medio sin producir el producto deseado, haciendo el proceso de perfusión menos eficiente. Así, se producen una ganancia de eficiencia y un ahorro de costes obtenidos al eliminar estos fragmentos de células utilizando dispositivos de perfusión acústicos de la presente divulgación. Una clarificación adicional del fluido clarificado puede lograrse aguas abajo utilizando un segundo dispositivo o una cámara de flujo secundaria que contiene otro par transductor-reflector que opera a una frecuencia mayor. Éste atrapa y aglomera partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 10 micrones o menos que pueden haber pasado de forma inadvertida a través de la onda estacionaria acústica original, de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Asimismo, otro par transductor-reflector que opera a frecuencias todavía mayores, de 3 MHz a 20 MHz, puede ser utilizado para atrapar, aglomerar y retirar los fragmentos de células pequeños y residuos que hayan pasado a través de la onda estacionaria acústica inicial y del "efecto de borde". Este fluido triplemente clarificado que contiene las biomoléculas deseadas puede entonces entrar directamente en un filtro estéril. Por ejemplo, el dispositivo de perfusión acústico original puede operar a frecuencias de hasta aproximadamente 4 MHz. Se contempla que la frecuencia de estos segundo y tercer campos de onda estacionaria acústica sería de aproximadamente 6 MHz hasta aproximadamente 20 MHz, y posiblemente mayor, para atrapar los fragmentos de células de tamaño menor.

Durante el arranque de un biorreactor a una densidad celular baja, por ejemplo, 2 millones de células/mL, domina el modo de operación descrito en primer lugar (figura 33, imagen izquierda). A medida que la densidad celular en

el biorreactor aumenta a lo largo del tiempo, el modo de operación cambia gradualmente de modo 1 a modo 2, y ambos modos pueden coexistir al mismo tiempo.

5 Cuando se emplea una onda estacionaria acústica para perfusión en un biorreactor que ya presenta una densidad celular elevada, por ejemplo, 50 millones de células/mL, el dispositivo típicamente empieza en el primer modo de funcionamiento (figura 33, imagen izquierda), hasta que el volumen de fluido en la onda estacionaria acústica se ha clarificado, punto en el cual la operación cambia gradualmente al segundo modo de operación descrito (figura 33, imagen derecha). Algunas veces, durante el funcionamiento, una inestabilidad, a menudo manifestada como una perturbación u oscilación de la interfaz entre los dos fluidos, puede crecer de forma suficientemente fuerte de tal forma que células entren en el volumen de fluido en la onda estacionaria acústica, punto en el cual, durante un breve periodo de tiempo, el dispositivo actúa en un modo combinado de operación, en el que ambos modos están activos (es decir, el efecto de borde evita que las células entren en el campo acústico como se ha explicado más arriba, mientras que el campo acústico clarifica las células que han entrado en el volumen de fluido en el campo de onda estacionaria acústica). Una vez que los grupos de células estrechamente empaquetados se han asentado (es decir, una vez que el volumen de fluido en la onda estacionaria acústica ha sido suficientemente clarificado), el modo de funcionamiento es de nuevo el segundo modo de funcionamiento n descrito que incluye el efecto de borde. Es importante notar que el dispositivo puede operar en ambos o en uno cualquiera de los modos de operación, tal y como se ha descrito anteriormente, sin que se produzca un cambio desde el exterior. En otras palabras, las propiedades de las corrientes de fluido, por ejemplo, las concentraciones de células en las corrientes, y el campo acústico dictan qué modo domina.

Los dispositivos de perfusión de onda(s) estacionaria(s) acústica(s) de la presente divulgación se operan de forma diferente en comparación con usos de filtros acústicos anteriores, descritos previamente en la literatura. Anteriormente, la acustofóresis se operaba de tal forma que los materiales que producen proteínas, tales como las células de ovario de hámster chino (células CHO), el hospedador más común para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas, se atrapaban en la onda estacionaria ultrasónica (es decir, permanecían en una posición estacionaria). Las células se retenían en un campo acústico mediante la migración individual de células hacia los planos nodales de presión de una onda estacionaria acústica planar. Ahí, como las células estaban retenidas en la onda estacionaria, también se producía un arrastre físico del medio de cultivo celular que fluía a través, en el que más células quedaban atrapadas mientras entraban en contacto con las células que ya se estaban retenidas en la onda estacionaria. La onda estacionaria se apagaba de forma intermitente para permitir que las células se retiraran de la onda estacionaria y volvieran al biorreactor.

En contraste, en la presente divulgación, las ondas estacionarias ultrasónicas se utilizan como una manta o un selector o un "campo de fuerza". En lugar de atrapar las células biológicas en la onda estacionaria, el fluido fluye a través del dispositivo de perfusión de una forma que la gravedad opera primero sobre las células biológicas, provocando que estas se hundan. La onda estacionaria se crea cerca de la parte superior del dispositivo de filtración y actúa como un filtro para evitar que las células entren en el campo acústico y salgan a través de la parte superior del dispositivo de filtración (es decir, actuando de forma similar a un capo de fuerza que evita que las células entren en el campo acústico). Así, se crean dos corrientes de salida, una corriente de salida que retiene las células y que sale a través de la abertura en la parte inferior del dispositivo, y otra corriente de salida que está empobrecida de células y que sale a través de una abertura en la parte superior del dispositivo (siendo las concentraciones de células en las dos corrientes de salida comparadas entre sí). No existe casi dependencia de la aglomeración de las células en el campo acústico, lo que es particularmente ventajoso en ciertas aplicaciones ya que no se requiere ningún tiempo de retención de las células en el dispositivo de filtración acústico.

Descrito de otra forma, el dispositivo de perfusión acústico tiene dos corrientes de fluido que fluyen a diferentes tasas. La corriente de fluido principal, que lleva el cultivo celular que expresa, medio de cultivo, producto, y otros constituyentes de biorreactor, entra en el dispositivo y se desvía parcialmente hacia una corriente de fluido secundaria, de menor volumen y flujo. Esta corriente de fluido secundaria pasa a través de una onda estacionaria acústica multidimensional, donde la onda estacionaria acústica multidimensional (o generalmente una onda estacionaria acústica) retiene el cultivo celular principal y permite que las biomoléculas, los anticuerpos monoclonales y las proteínas recombinantes, junto con otras partículas pequeñas como residuos celulares de tamaño micrométrico o submicrométrico, pasen a través y sean adicionalmente recogidas y procesados fuera / aguas abajo del biorreactor. La corriente de fluido principal, que contiene el cultivo celular principal, se recicla entonces de vuelta al biorreactor.

En otra aplicación, los dispositivos de perfusión acústicos pueden actuar como un dispositivo de retención y un dispositivo de lavado de células para aplicaciones de terapia celular. En aplicaciones de cultivo celular continuo, tales como la terapia celular autóloga o alogénica, es necesario purificar, aislar, y después hacer proliferar células que se han recolectado inicialmente a densidades celulares muy bajas. Relativamente, pocas células se siembran en un biorreactor, en el que el número de células debe incrementarse. Etapas de procesamiento adicionales, tales como una concentración, un lavado, y un cambio de medio son todas necesarias para varias aplicaciones. El elemento común en todas estas aplicaciones es la necesidad de circular de forma continua, añadir, y/o eliminar medio, mientras se retienen las células en el biorreactor (que puede ser tradicional o de un solo uso) sin efecto sobre su viabilidad. Los sistemas de retención de células acústicos descritos en la presente memoria operan a lo

largo de un rango de tasas de recirculación de células, retienen células de forma eficiente en un rango de tasas de perfusión (o de tasas de eliminación de medio), y pueden ajustarse para retener por completo o dejar pasar de forma selectiva un determinado porcentaje de células mediante una manipulación de la potencia o la frecuencia. Las tasas de potencia y de flujo pueden monitorizarse y utilizarse como retroalimentación en un sistema de control automatizado. También pueden utilizarse trayectorias de flujo especializadas de tal forma que “se tome” un pequeño volumen del flujo de fluido principal y se separen las biomoléculas expresadas del cultivo celular principal.

Una ventaja de la acustofóresis es que la fuerza de radiación acústica no daña o afecta negativamente a las células biológicas o al producto de biomolécula deseado. Además, la perfusión es continua, de tal forma que el cultivo celular se mantiene viable y los productos deseados pueden recuperarse de forma continua a partir del mismo.

En un sistema de biorreactor de perfusión, es deseable que se puedan filtrar y separar las células biológicas viables de los materiales expresados que se encuentran en la corriente de fluido (es decir, el medio de cultivo celular) y los residuos celulares. Como se ha mencionado anteriormente, tales células biológicas pueden incluir células de ovario de hámster chino (CHO), el genoma de las cuales se manipula para expresar biomoléculas grandes. Tales biomoléculas pueden incluir proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales y son el producto deseado que debe recuperarse.

Los dispositivos de perfusión acústicos de la presente divulgación están diseñados para mantener una onda estacionaria acústica multidimensional de alta intensidad que puede actuar como filtro, permitiendo que las partículas más pequeñas (tales como, proteínas recombinantes o residuos celulares) pasen a través, mientras que se excluyen partículas más grandes (tales como, las células viables). Generalmente, el dispositivo es accionado por un oscilador y un amplificador (no se muestran), y el rendimiento del dispositivo es monitorizado y controlado por un computador (no se muestra). Algunas veces, puede ser necesario, debido a la transmisión acústica, modular la frecuencia o la amplitud del voltaje de la onda estacionaria acústica. Esto puede hacerse mediante la modulación de amplitud y/o mediante la modulación de frecuencia. El ciclo de trabajo de la propagación de la onda estacionaria puede asimismo utilizarse para alcanzar ciertos resultados (es decir, el haz acústico puede encenderse o apagarse en diferentes periodos o tasas de tiempo).

La figura 1 ilustra un sistema de onda estacionaria individual 100 que comprende una placa reflectora 101 y un transductor ultrasónico 103 que está configurado para resonar de tal forma que forme una onda estacionaria 102. Se aplican típicamente frecuencias de excitación en el intervalo de 100 kHz a 100 MHz mediante el transductor 103. Se crean una o más ondas estacionarias multidimensionales entre el transductor 103 y el reflector 101. Una onda estacionaria ideal es la suma de dos ondas que se propagan que son iguales en frecuencia e intensidad y que viajan en direcciones opuestas, es decir, desde el transductor al reflector y viceversa. Las ondas que se propagan interfieren constructivamente entre sí y generan así la onda estacionaria. Una línea punteada 105 se utiliza para indicar la amplitud cero de la onda. Un nodo es un punto en el que la onda tiene un mínimo de amplitud, y se indica con la referencia numérica 107. Un antinodo es un punto en el que la onda tiene un máximo de amplitud, y se indica con la referencia numérica 109.

La figura 2 es un diagrama esquemático que compara un sistema de biorreactor de lote alimentado 201 (lado izquierdo) con un sistema de biorreactor de perfusión 202 (lado derecho). Empezando con el biorreactor de lote alimentado a la izquierda, el biorreactor 210 incluye un recipiente de reacción 220. El medio de cultivo de células es alimentado al recipiente de reacción a través de una entrada de alimentación 222. Un agitador 225 se utiliza para circular el medio por todo el cultivo celular. Aquí, el agitador se representa como una serie de palas giratorias, aunque se contempla cualquier sistema que cause una circulación. El biorreactor permite el crecimiento de un cultivo semilla pasando por un ciclo de crecimiento / producción, durante el que residuos, desechos y células inutilizables se acumulan en el biorreactor y el producto deseado (por ejemplo, biomoléculas tales como anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes, hormonas, etc.) serán asimismo producidas. Debido a esta acumulación, el recipiente de reacción de un proceso de lote alimentado es típicamente mucho mayor que en un proceso de perfusión. A continuación, el producto deseado se recolecta al final del ciclo de producción. El recipiente de reacción 220 también incluye una salida 224 para eliminar material.

Pasando ahora al biorreactor de perfusión 202 en el lado derecho, de nuevo, el biorreactor incluye un recipiente de reacción 220 con una entrada de alimentación 222 para el medio de cultivo celular. Un agitador 225 que se utiliza para circular el medio por todo el cultivo celular. Una salida 224 del recipiente de reacción que está conectado fluidicamente a la entrada 232 de un sistema de perfusión acústico 230 de la presente divulgación, y que alimenta de forma continua los contenidos del biorreactor (que contienen células y el producto deseado) al dispositivo de filtración. El dispositivo de perfusión está ubicado aguas abajo del recipiente de reacción, y separa el producto deseado de las células. El dispositivo de perfusión acústico 230 tiene dos salidas separadas, una salida de producto 234 y una salida de reciclado 236. La salida de producto 234 conecta fluidicamente el dispositivo de perfusión acústico 230 con un recipiente de contención 240 aguas abajo del dispositivo de perfusión, que recibe el flujo del producto deseado (más medio) desde el dispositivo de perfusión. Desde ahí, todavía más aguas abajo de este dispositivo de perfusión acústico puede haber filtros adicionales tales como un ATF, un TFF, un filtro de profundidad, una centrifuga, etc. La salida de reciclado 236 conecta fluidicamente el dispositivo de perfusión acústico 230 de vuelta con una entrada de reciclado 226 del recipiente de reacción 220, y se utiliza para enviar las

células y el medio de cultivo celular de vuelta al recipiente de reacción para un crecimiento / producción continuos. Dicho de otra forma, existe un bucle de fluido entre el recipiente de reacción y el dispositivo de perfusión. El recipiente de reacción 220 en el sistema de biorreactor de perfusión 202 presente un rendimiento continuo de producto y de esta forma puede ser fabricado de un tamaño menor. El proceso de filtración es crucial para el rendimiento del biorreactor de perfusión. Un proceso de filtración pobre solamente permitirá un rendimiento bajo y conllevará unos rendimientos bajos del producto deseado.

La figura 3 es una vista en sección transversal de un biorreactor genérico 300 que es útil para los sistemas de la presente divulgación. Como se ilustra en la presente figura, el biorreactor incluye un recipiente de reacción 320 que tiene un volumen interno 323. Una entrada de alimentación 322 en la parte superior del recipiente que se utiliza para alimentar el medio de cultivo celular en el recipiente. Está presente un agitador 325. Una salida 324 se muestra en la parte inferior del recipiente. Una chaqueta térmica 310 envuelve el recipiente de reacción, y se utiliza para regular la temperatura de las células / medio. Un aireador 312 está ubicado en la parte inferior del recipiente para proporcionar gas al volumen interno. Unos sensores 314 se muestran en la parte superior derecha del recipiente. Una bomba 316 para alimentar el medio de cultivo celular en el recipiente está ilustrada, al igual que otra bomba 318 para eliminar el medio de cultivo celular del recipiente.

Los sistemas de perfusión descritos anteriormente utilizan un dispositivo de perfusión acústico de la presente divulgación. Los contenidos del biorreactor se hacen fluir de forma continua a través del dispositivo de perfusión acústico para capturar los productos deseados.

La figura 4 muestra una primera forma de realización de un dispositivo de perfusión acústico 400 que puede ser utilizado con los sistemas descritos anteriormente. El dispositivo incluye una abertura de entrada 410, una abertura de salida 430, una primera abertura de recogida 470, una pared inferior 420, y una cámara acústica 450. Asimismo, es posible referirse a la cámara acústica 450 como una celda de fluido.

La abertura de entrada 410 está ubicada en un primer extremo 412 del dispositivo. Generalmente, la abertura de entrada 410 está conectada fluidicamente a un biorreactor asociado y sirve como la entrada a través de la cual el medio fluido con células, residuos finos, y producto se introduce en el dispositivo. Una trayectoria de fluido de entrada 451 va desde la abertura de entrada 410 hasta la cámara acústica 450, que contiene un volumen interno. Una pared superior 411 puede estar presente sobre la trayectoria de flujo de entrada que va desde la abertura de entrada hasta la cámara acústica, presentando la pared superior una orientación sustancialmente horizontal. La trayectoria de flujo de entrada presenta un área de sección transversal 452 (ilustrada por el cuadrado punteado).

La abertura de entrada 410 está ubicada a una primera altura 402 por encima de la abertura de salida 430, que define un extremo inferior del dispositivo. Dicho de otra forma, la abertura de salida 430 está ubicada debajo de la cámara acústica 450 o debajo de la abertura de entrada 410, o en el extremo inferior 416 del dispositivo. La ubicación de la conexión de salida 430 debajo de la abertura de entrada 410 garantiza que el fluido fluya a través del dispositivo de forma pasiva impulsado por la gravedad hacia la conexión de salida 430, y que una cabeza hidráulica se cree dentro del dispositivo. Asimismo, es posible referirse a la conexión de salida 430 como conexión de reciclado ya que el fluido hospedador es reciclado o retornado desde el dispositivo hasta el biorreactor asociado a través de la conexión de salida 430. Como se ilustra en esta figura, la conexión de salida 430 también está ubicada en un segundo extremo 414 del dispositivo, opuesto al primer extremo 412. El primer extremo 412 y el segundo extremo 414 pueden considerarse como los extremos opuestos de un eje X, mientras que el extremo inferior 416 y el extremo superior 418 pueden considerarse como los extremos opuestos de un eje Z.

La primera conexión de recogida 470 está ubicada por encima de la cámara acústica 450 en el extremo superior 418 del dispositivo y está conectada fluidicamente a la cámara acústica. El dispositivo puede incluir unas aberturas de recogida adicionales, tales como una segunda conexión de recogida 472, que está espaciada de la primera conexión de recogida 470. La primera y segunda aberturas de recogida 470, 472 se utilizan generalmente para recolectar y recuperar una porción de los subproductos de biomoléculas deseados del dispositivo. Una trayectoria de recolección o de recogida 453 va desde la cámara acústica hasta las aberturas de recogida 470, 472. La trayectoria de flujo de recogida tiene un área de sección transversal 454 (ilustrado por un cuadrado punteado). En algunas formas de realización particulares, el área de sección transversal 454 de la trayectoria de flujo de recogida es mayor que el área de sección transversal 452 de la trayectoria de flujo de entrada. Este es un procedimiento mediante el cual la tasa de flujo de fluido a través de las conexiones de recogida 470, 472 puede hacerse mucho menor que la tasa de flujo de fluido entrante. Cuando se utilizan en la biofabricación por perfusión, también es posible referirse a las aberturas de recogida como aberturas de recolección o de perfusión. Como el fluido empobrecido en células y enriquecido en productos de biomoléculas deseados, residuos celulares, y otros residuos finos se recolecta, también es posible referirse a las aberturas de recogida como aberturas de recolección, y también es posible referirse a la trayectoria de flujo de recogida como trayectoria de flujo de recolección.

En esta forma de realización, la pared inferior 420 se extiende desde la abertura de entrada 410 hasta la abertura de salida 430 del dispositivo. La forma exacta de la pared inferior 420 puede variar para obtener el flujo de fluido deseado. Tal y como se ilustra en la presente memoria, la pared inferior 420 se curva desde la abertura de entrada 410 hasta la abertura de salida 430 del dispositivo. Con respecto a una línea entre la abertura de entrada 410 y la

abertura de salida 430, ilustrada como una línea punteada 401, la pared inferior 420 tiene una curvatura cóncava. Una trayectoria de flujo de salida 432 va desde la cámara acústica 450 hasta la abertura de salida 430.

Como se ilustra en la presente memoria, un primer transductor ultrasónico 460 está ubicado en una pared lateral 440 del dispositivo a una segunda altura 404 que está por encima de la primera altura 402 (es decir, más cerca del extremo superior 418 del dispositivo) y debajo de las aberturas de recogida 470, 472. Este volumen por encima de la cámara acústica 450 y por debajo de las aberturas de recogida 470, 472, se identifica aquí como una zona de recogida o recolección 456. El primer transductor ultrasónico 460 incluye un material piezoeléctrico que puede ser actuado por una señal de voltaje para crear una onda estacionaria multidimensional en la cámara acústica 450 a través de la trayectoria de flujo de recogida 452. Por consiguiente, un campo de fuerza de radiación acústica separa la cámara acústica 450 de las aberturas de recogida 470, 472.

En la forma de realización de la figura 4, el dispositivo incluye un reflector 480 ubicado en una pared opuesta a la del primer transductor ultrasónico 460. El reflector también está ubicado a una segunda altura (es decir, la misma altura que el transductor). Juntos, el transductor 460 y el reflector 480 generan una onda estacionaria acústica multidimensional, como se ilustra en la figura 1.

En esta forma de realización ilustrada, la abertura de entrada 410, la abertura de salida 430, y las aberturas de recogida 470, 472, están todas ubicadas en una pared frontal 475 del dispositivo. Asimismo, se contempla que estas aberturas pueden estar encaradas hacia cualquier otra dirección, según se desee. La pared frontal 475 está ilustrada aquí presentando una cara plana o planar, y tiene un grosor constante. Sin embargo, la forma de la pared frontal puede asimismo variar si se desea, por ejemplo, para cambiar las áreas de sección transversal 452, 454. Finalmente, la pared trasera del dispositivo está unida a una pieza de montaje 490, que contiene unos orificios 492 para unir el dispositivo de perfusión a una superficie para la operación.

En uso, el medio fluido que contiene células biológicas y moléculas más pequeñas entra en la cámara acústica 450 a través de la abertura de entrada 410. Dentro de la cámara acústica, la gravedad actúa para arrastrar las células biológicas hacia abajo en dirección a la abertura de salida 430. Un proceso de asentamiento pasivo tiene lugar en la cámara acústica, creando un fluido con una concentración relativamente elevada de células biológicas en el extremo inferior 416 del dispositivo, y un fluido con una concentración relativamente menor de células biológicas en el extremo superior 418 del dispositivo. La gran mayoría del fluido entrante, y, por lo tanto, la gran mayoría de la población celular nunca pasa a través de la(s) onda(s) estacionaria(s) acústica(s). El fluido con la concentración elevada de células biológicas se bombea de vuelta al biorreactor, y el fluido con la concentración relativamente baja de células biológicas (y que también contiene biomoléculas deseadas) se bombea fuera y se recoge a través de la(s) abertura(s) de recogida 470, 472. La(s) onda(s) estacionaria(s) acústica(s) del dispositivo actúan para evitar que un número significativo de células biológicas salgan a través de la(s) abertura(s) de recogida 470, 472.

La tasa de flujo a través de la trayectoria de flujo de recogida o recolección 453 es, en varias formas de realización, por lo menos un orden de magnitud menor que la tasa de flujo a través de la trayectoria de flujo de entrada 451. En formas de realización más particulares, la tasa de flujo del medio fluido que entra en el dispositivo a través de la abertura de entrada es de aproximadamente 1 litro por minuto (L/min) y la tasa de flujo de fluido empobrecido en células que sale del dispositivo a través de la(s) abertura(s) de recogida es de aproximadamente 10 mililitros por minuto (mL/min). En algunas pruebas, unos biorreactores que tienen un tamaño de 2 litros a 10 litros se han probado con soluciones que contienen hasta un 10% de levadura y hasta 50 millones de células/mL. La tasa de flujo a través de la abertura de entrada ha sido de aproximadamente 0.75 L/min hasta aproximadamente 3 L/min, siendo la tasa de flujo a través de la trayectoria de flujo de recogida (es decir, todas las aberturas de recogida juntas) de aproximadamente 1 mL/min a aproximadamente 30 mL/min. Se ha logrado una tasa de recuperación de células de 95%.

Los dispositivos de perfusión acústicos de la presente divulgación pueden filtrar unas densidades celulares muy elevadas, de alrededor de 100 millones de células por mL y posiblemente en el rango de aproximadamente 60 millones a aproximadamente 120 millones de células por mL, mientras que otras tecnologías de filtración, tales como la ATF solamente pueden filtrar a densidades de menos de 80 millones de células por mL. A diferencia de las membranas de fibras huecas, la(s) onda(s) estacionaria(s) acústica(s) puede(n) asimismo ser ajustada(s) para permitir el paso de células si se desea, así como para permitir el paso de finos/residuos. Esto puede actuar como operación de limpieza para el biorreactor. Una operación continua en estado estacionario es posible sin fluctuaciones de presión, y la corriente de producto no se acumula en el biorreactor o en el dispositivo de filtración.

El dispositivo de perfusión acústico puede estar realizado a partir de materiales apropiados conocidos en el estado de la técnica. Tales materiales incluyen polietileno de alta densidad (HDPE), otros plásticos, y potencialmente metales y vidrios. Se ha descubierto que es muy conveniente para el dispositivo ser transparente, de tal manera que el flujo de fluido y la operación del transductor ultrasónico puedan confirmarse visualmente.

La figura 5 muestra otra forma de realización de un dispositivo de perfusión acústico 500. Esta forma de realización es muy similar a la del dispositivo 400 dibujado en la figura 4. La principal diferencia es que el dispositivo de

perfusión acústico 500 de la figura 5 tiene un primer transductor ultrasónico 460 en una pared lateral del dispositivo y un segundo transductor ultrasónico 562 en una pared lateral 440 opuesta a la primera en la zona de recogida 456. Dicho de otra forma, los dos transductores 460, 562 están ubicados en lados opuestos de la trayectoria de flujo de recogida 453. Con esta disposición, el reflector 580 está ubicado en la zona de recogida 456 entre el primer y el segundo transductores ultrasónicos 460, 562. Los transductores están orientados de tal manera que el reflector 580 y el primer y el segundo transductores ultrasónicos 460, 562 crean una(s) onda(s) estacionaria(s) multidimensional(es) en la celda de fluido 450 tal y como se ha descrito anteriormente, o dicho de otra forma los transductores están encarados el uno hacia el otro. También se ilustra la bomba de flujo de salida 592 unida a la abertura de salida 430 del dispositivo, que se utiliza para controlar la tasa de flujo del medio fluido que fluye a través del dispositivo. No se ilustra aquí la bomba unida a las aberturas de recogida (no visibles) del dispositivo de filtración 500.

Pasando ahora a la figura 6, se muestra un sistema de procesamiento que incluye un biorreactor asociado 610 y un dispositivo de perfusión acústico 630 de la presente divulgación. El sistema está configurado para su uso como biorreactor de perfusión. El biorreactor 610 incluye un recipiente de reacción 620 que presente una entrada de alimentación 622, una salida 624, y una entrada de reciclado 626. Se añade medio fresco a la entrada de alimentación 622 mediante un tubo de adición 650. Algunos reactores también incluirán una conexión de salida o de purga (no mostrada) para eliminar o "purgar" células con el fin de mantener una densidad celular constante dentro del reactor. Los contenidos del recipiente de reacción (referencia numérica 605) se mezclan mediante un agitador 625. El producto deseado (por ejemplo, proteínas recombinantes) es producido de forma continua por las células ubicadas dentro del recipiente 620, y están presentes en el medio del biorreactor. El producto y las células en el biorreactor de perfusión se retiran del recipiente de reacción a través del tubo 652, y entran en el dispositivo de perfusión acústico 630 a través de la conexión de entrada 632. Allí dentro, una porción del producto deseado se separa de las células. El producto deseado puede ser retirado a través de una primera abertura de recogida 634 (que es una abertura de recuperación de producto) y el tubo 654 hacia dentro de un recipiente de almacenamiento 640, o en el caso de un sistema de producción verdaderamente continuo, algún otro proceso de purificación aguas abajo. Las células son retornadas al biorreactor de perfusión después de la separación, pasando desde la abertura de salida 636 (que es una abertura de reciclado de fluido) del dispositivo de perfusión acústico a través del tubo 656 hasta la abertura de entrada de reciclado 626 del recipiente de reacción, lo que forma una trayectoria de reciclado. La(s) onda(s) estacionaria(s) multidimensional(es) del dispositivo de perfusión acústico se utilizan para crear una barrera de separación entre la celda de fluido del dispositivo y la abertura de recogida, de tal manera que un número muy reducido de células biológicas se recojan en la abertura de recogida 634.

Las figuras 7 y 8 son unas vistas de otra forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión acústico. La figura 7 es una vista en sección transversal frontal y la figura 8 es una vista en perspectiva exterior. De forma notable, esta forma de realización está específicamente diseñada de tal manera que puede ser fabricada con técnicas de mecanizado limpias, utilizando materiales de Clase VI (HDPE de grado de dispositivo médico, por ejemplo), o incluso como una parte moldeada por inyección individual o soldada. De esta manera, esta forma de realización es un ejemplo de un dispositivo desechable, que es gama estable. Los dispositivos se enjuagan para eliminar biocarga y a continuación se irradian con rayos gama (generalmente de 25-40 kGy) para esterilizar cualquier contaminación potencial que pudiera destruir un cultivo celular sano, tal que el que está presente en un biorreactor de perfusión.

Haciendo primero referencia a la figura 7, en este dispositivo 700 la abertura de entrada 710 y la abertura de recogida 770 están ambas ubicadas en el extremo superior 718 del dispositivo, o en la pared superior 776 del dispositivo. La abertura de salida 730 está ubicada en el extremo inferior 716 del dispositivo. Aquí, la abertura de entrada 710 y la abertura de salida 730 están ambas en un primer lado 712 del dispositivo. La trayectoria de flujo de entrada 751 tiene forma de canal 755 que recorre desde la abertura de salida hacia abajo hacia el extremo inferior y pasada la abertura de salida, estando el canal separado de la cámara acústica 750 (aquí, la separación se produce mediante una pared interior 756). El fluido fluirá hacia abajo en el canal, y después se elevará hacia arriba en la cámara acústica 750. La pared inferior 720 de la cámara acústica es una superficie planar inclinada que se inclina hacia abajo hacia la abertura de salida 730. La ubicación de los transductores ultrasónicos 760 se muestra aquí como dos cuadrados, entre el extremo superior y el extremo inferior del dispositivo. La trayectoria de flujo de recogida 753 está ubicada encima de los transductores.

Haciendo ahora referencia a la figura 8, el dispositivo 700 se muestra conformado dentro de una carcasa rectangular tridimensional 706. Se puede observar que la abertura de salida 730 en el extremo inferior 716 del dispositivo está ubicada en una pared frontal. De nuevo, la abertura de recogida 770 y la abertura de entrada 710 están ubicadas en una pared superior 776. Una ventana de observación 708 realizada de un material transparente está presente en una pared frontal. A través de esta ventana de observación, se puede ver que los transductores ultrasónicos están montados en una pared trasera 778 de la carcasa del dispositivo. La ventana de observación actúa como un reflector para generar las ondas estacionarias acústicas multidimensionales.

La figura 9 y la figura 10 son unas vistas de todavía otra forma de realización ejemplificativa de un dispositivo de perfusión acústico. La figura 9 es una vista en sección transversal frontal, y la figura 10 es una vista en perspectiva.

Haciendo referencia en primer lugar a la figura 9, en este dispositivo 900, hay una abertura de entrada 910 presente en un lado frontal 975 del dispositivo a lo largo de un primer lateral 912 del dispositivo. Una abertura de salida 930 (que se ve mejor en la figura 10) está ubicada directamente opuesta y a la misma altura de la abertura de entrada 910, y está asimismo ubicada en un primer lateral 912. En esta forma de realización, hay una corriente de fluido principal que fluye casi directamente desde la abertura de entrada 910 hasta la abertura de salida 930, y la trayectoria de flujo de entrada 951 desvía solamente un flujo lateral pequeño hacia el interior de la cámara acústica 950 desde el primer lateral 912 del dispositivo. Una abertura de salida secundaria 980 también está ubicada en un primer lateral 912 del dispositivo, extendiéndose desde una primera pared lateral 979, y ubicada debajo de la abertura de entrada 910, y puede actuar de abertura de purga. La pared inferior 920 de la cámara acústica tiene forma de tipo piramidal para estrecharse hacia abajo hacia un vértice. Una línea de drenaje 981 transcurre desde el fondo de la cámara acústica 950 hacia la abertura de salida secundaria 980. Se contempla aquí que, la abertura de salida secundaria puede ser utilizada para capturar un flujo pequeño de células altamente concentradas, que o bien puede descartarse (purga de células) o puede asimismo ser devuelto al biorreactor.

Haciendo referencia ahora a la figura 10, la pared frontal 975 del dispositivo presenta un espacio rectangular 960, y la pared trasera 978 del dispositivo presenta un espacio rectangular 962. Se contempla que un transductor y un reflector puedan ubicarse en estos dos espacios rectangulares 960/962 en cualquier orientación, o que dos transductores puedan ubicarse en estos espacios rectangulares. La abertura de entrada 910 y la abertura de salida 930 son ambas visibles en esta vista. La abertura de entrada 910 está ubicada en el lado frontal del dispositivo, y la abertura de salida 930 está ubicada en el lado trasero del dispositivo (aunque esto puede intercambiarse si se desea). La trayectoria de flujo de clarificación 953 está ubicada encima de los transductores. Aunque no está ilustrado aquí, una pieza de montaje similar a la de la figura 4 podría unirse al segundo lateral 914 del dispositivo.

Ahora puede ser de utilidad describir con más detalle el (los) transductor(es) ultrasónico(s) utilizados en el dispositivo de filtración acústica. La figura 11 es un diagrama de sección transversal de un transductor ultrasónico convencional. Este transductor tiene una placa de desgaste 50 en un extremo inferior, una capa de epoxi 52, un elemento piezoeléctrico cerámico 54 (realizado en, por ejemplo, Plomo Zirconato Titanato (PZT)), una capa de epoxi 56, y una capa de apoyo 58. En cada lado del elemento piezoeléctrico cerámico, se encuentra un electrodo: un electrodo positivo 61 y un electrodo negativo 63. La capa de epoxi 56 une la capa de apoyo 58 con el elemento piezoeléctrico 54. El conjunto entero está contenido en una carcasa 60 que puede estar realizada en, por ejemplo, aluminio. La carcasa se utiliza como electrodo tierra. Un adaptador eléctrico 62 proporciona una conexión para que los cables pasen a través de la carcasa y conecta con tomas (no mostradas) que se unen al elemento piezoeléctrico 54. Típicamente, las capas de apoyo están diseñadas para añadir amortiguación y para crear un transductor de banda ancha con un desplazamiento uniforme a través de un rango amplio de frecuencias y están diseñadas para suprimir la excitación de modos de eigen vibracionales particulares del elemento piezoeléctrico. Las placas de desgaste están habitualmente diseñadas como transformadores de impedancia para hacer corresponder mejor las características de impedancia del medio hacia el que el transductor irradia.

La figura 12 es una vista en sección transversal de un transductor ultrasónico 81 de la presente divulgación, que se utiliza en el dispositivo de filtración acústica de la presente divulgación. El transductor 81 tiene una forma cuadrada, y presenta una carcasa de aluminio 82. La carcasa de aluminio presenta un extremo superior y un extremo inferior. La carcasa del transductor puede asimismo estar compuesta por plásticos, tales como HDP de grado médico u otros metales. El elemento piezoeléctrico es una masa de cerámica perovskita, consistiendo cada uno en un ion metálico tetravalente pequeño, habitualmente titanio o zirconio, en una malla de iones más grandes, habitualmente plomo o bario, e iones O^{2-} . Como ejemplo, un elemento piezoeléctrico PZT (plomo zirconato titanato) 86 define el extremo inferior del transductor, y está expuesto desde el exterior del extremo inferior de la carcasa. El elemento piezoeléctrico está soportado en su perímetro por una capa elástica pequeña 98, por ejemplo, epoxi, silicona o un material similar, ubicada entre el elemento piezoeléctrico y la carcasa. Dicho de otra forma, no están presentes ninguna placa de desgaste o placa de apoyo. Sin embargo, en algunas formas de realización, una pequeña capa de plástico o de otro material se encuentra separando el elemento piezoeléctrico del fluido en el que la onda estacionaria acústica está siendo generada. El elemento piezoeléctrico/ cristal tiene una superficie exterior (que está expuesta) y asimismo una superficie interior.

Los tornillos 88 unen una placa superior de aluminio 82a con la carcasa al cuerpo 82b de la carcasa por medio de unas roscas. La placa superior incluye un conector 84 para alimentar el transductor. La superficie superior del elemento piezoeléctrico PZT 86 está conectado a un electrodo positivo 90 y un electrodo 92, que están separados mediante un material aislante 94. Los electrodos pueden estar realizados de cualquier material conductor, tal como plata o níquel. Se proporciona energía eléctrica al elemento piezoeléctrico 86 a través de los electrodos sobre el elemento piezoeléctrico. Nótese que el elemento piezoeléctrico 86 no presenta capa de apoyo o capa de epoxi. Dicho de otra manera, hay un volumen interior o un hueco de aire 87 en el transductor entre la placa superior de aluminio 82a y el elemento piezoeléctrico 86 (es decir, el hueco de aire está completamente vacío). En algunas formas de realización, puede proporcionarse una capa de apoyo 58 y/o de desgaste 50 mínima, como se muestra en la figura 13.

El diseño del transductor puede afectar el rendimiento del sistema. Un transductor típico es una estructura en capas con el elemento piezoeléctrico unido a una capa de apoyo y a una capa de desgaste. Como el transductor

está cargado con la elevada impedancia mecánica presentada por la onda estacionaria, las recomendaciones de diseño tradicionales para placas de desgaste, por ejemplo, un grosor de la mitad de la longitud de onda para aplicaciones de ondas estacionarias o un grosor de un cuarto de la longitud de onda para aplicaciones de radiación, así como los procedimientos de fabricación pueden no ser apropiados. En cambio, en una forma de realización de la presente divulgación los transductores, no hay placa de desgaste o de apoyo, permitiendo que el elemento piezoeléctrico vibre en uno de sus modos de eigen con un factor Q elevado, o en una combinación de varios modos de eigen. El elemento/disco piezoeléctrico cerámico está directamente expuesto al fluido que fluye a través de la célula de fluido.

Eliminar el apoyo (por ejemplo, realizando el elemento piezoeléctrico apoyado por aire) también permite que el elemento piezoeléctrico cerámico vibre a modos de vibración de orden más elevado como poca amortiguación (por ejemplo, un desplazamiento modal de orden más elevado). En un transductor que presenta un elemento piezoeléctrico con un apoyo, el elemento piezoeléctrico vibra con un desplazamiento más uniforme, como un pistón. Eliminar el apoyo permite que elemento piezoeléctrico vibre en un modo de desplazamiento no uniforme. Cuanto más elevado es el orden del modo de forma del elemento piezoeléctrico, más líneas nodales tiene el elemento piezoeléctrico. El desplazamiento modal de orden más elevado del elemento piezoeléctrico crea más líneas de atrapamiento, aunque la correlación entre línea de atrapamiento y nodo no es necesariamente una a una y accionar el elemento piezoeléctrico a una frecuencia más elevada no producirá necesariamente más líneas de atrapamiento.

Se contempla que, en algunas formas de realización del dispositivo de filtración acústico de la presente divulgación, el elemento piezoeléctrico puede tener un apoyo que afecte mínimamente al factor Q del elemento piezoeléctrico (por ejemplo, menos del 5%). El apoyo puede estar realizado a partir de un material sustancialmente transparente acústicamente tal que madera de balsa, espuma o corcho que permite que el elemento piezoeléctrico vibre en una forma de modo de orden más elevado y mantenga un factor Q elevado mientras todavía proporciona un cierto soporte mecánico para el elemento piezoeléctrico. La capa de apoyo puede ser un sólido, o puede ser una malla que presenta orificios a través de la capa, tal que la malla sigue los nodos del elemento piezoeléctrico que vibra en un modo de vibración de orden más elevado particular, proporcionando soporte a las ubicaciones de nodo y permitiendo a su vez el resto del elemento piezoeléctrico vibrar libremente. El objetivo del material trabajado en malla o acústicamente transparente es proporcionar soporte son reducir el factor Q del elemento piezoeléctrico o interferir con la excitación de una forma de modo particular.

Ubicar el elemento piezoeléctrico en contacto directo con el fluido también contribuye a un factor Q más elevado impidiendo los efectos de amortiguación y de absorción de energía de la capa de epoxi y la capa de desgaste. Otras formas de realización del (de los) transductor(es) pueden presentar placas de desgaste o superficies de desgaste para evitar que el PZT, que contiene plomo, entre en contacto con el fluido hospedador. Esto puede ser deseable, por ejemplo, en aplicaciones biológicas tales que la separación de sangre, la perfusión de biofarmacéutica, o la filtración en lote alimentado de células de mamífero. Tales aplicaciones pueden utilizar una capa de desgaste tal que cromo, níquel electrolítico, o níquel químico. La deposición por vapor también puede ser utilizada para aplicar una capa de poli(p-xilileno) (por ejemplo, Parileno) u otro polímero. Recubrimientos orgánicos y biocompatibles, tales como silicona o poliuretano también son utilizables como superficie de desgaste.

En algunas formas de realización, para aplicaciones tales como la separación de emulsiones agua/aceite y otras tales que la perfusión, el transductor ultrasónico tiene una frecuencia de resonancia nominal de 2 MHz. Cada transductor puede consumir aproximadamente 28 W de potencia por atrapamiento de gotita a una tasa de flujo de 3 GPM. Esto se traduce en un coste de energía de 0.25 kW h / m³. Esto es una indicación del muy bajo coste de energía de esta tecnología. De forma deseable, cada transductor está alimentado y controlado por su propio amplificador. En otras formas de realización, el transductor ultrasónico utiliza un elemento piezoeléctrico cuadrado, por ejemplo, con unas dimensiones de 1" x 1". De forma alternativa, el transductor puede utilizar un elemento piezoeléctrico rectangular, por ejemplo, con unas dimensiones de 1"x2.5". La disipación de energía por transductor fue de 10 W por área en sección de transductor de 1"x1" y por pulgada de envergadura de onda estacionaria acústica con el fin de obtener suficientes fuerzas de atrapamiento acústico. Para una envergadura de 4" de un sistema de escala intermedia, cada transductor cuadrado de 1"x1" consume 40 W. El transductor rectangular de 1"x2.5" más grande utiliza 100 W en un sistema de escala intermedia. El grupo de tres transductores cuadrado de 1"x1" consumiría un total de 120 W y la serie de dos transductores de 1"x2.5" consumiría aproximadamente 200 W. Grupos de transductores espaciados estrechamente representa potenciales formas de realización alternativas de la tecnología. El tamaño, forma, número y ubicación del transductor puede variar como se desee para generar patrones de ondas estacionarias acústicas multidimensionales deseados.

El tamaño, la forma, y el grosor del transductor determinan el desplazamiento del transductor a diferencias frecuencias de excitación, que a su vez afecta a la eficiencia de separación. Típicamente, el transductor se opera a frecuencias cercanas a la frecuencia de resonancia del grosor (mitad de la longitud de onda). Los gradientes en el desplazamiento del transductor típicamente conllevan más ubicaciones de atrapamiento para las células/biomoléculas. Desplazamientos modales de orden más elevado generan ondas estacionarias acústicas tridimensionales con fuertes gradientes en el campo acústico en todas las direcciones, creado con ello fuerzas de radiación igualmente fuertes en todas las direcciones, provocando múltiples líneas de atrapamiento, en donde el

número de líneas de atrapamiento está correlacionado con el modo de forma particular del transductor.

Para investigar el efecto del perfil de desplazamiento del transductor sobre la fuerza de atrapamiento acústica y las eficiencias de separación, un experimento se repitió diez veces utilizando un transductor cuadrado de 1"x1", con todas las condiciones idénticas excepto por la frecuencia de excitación. Diez frecuencias de resonancia acústica consecutivas, indicadas por números del 1-9 marcados con círculos y la letra A en la figura 14, se utilizaron como frecuencias de excitación. Las condiciones fueron duración del experimento de 30 min, una concentración de aceite de 1000 ppm de aproximadamente gotitas de aceite SAE-30 de 5 micrones, una tasa de flujo de 500 ml/min, y una potencia aplicada de 20W. Las gotitas de aceite se utilizaron ya que el aceite es menos denso que el agua, y puede separarse del agua utilizando acustoforesis.

La figura 14 muestra la amplitud de impedancia eléctrica medida de un transductor cuadrado en función de la frecuencia en proximidad de una resonancia de transductor de 2.2 MHz. Los mínimos en la impedancia eléctrica del transductor corresponden a resonancias acústicas de la columna de agua y representan frecuencias potenciales de operación. Existen resonancias adicionales a otras frecuencias en las que las ondas estacionarias multidimensionales son excitadas. El modelado numérico indica que el perfil de desplazamiento del transductor varía significativamente a estas frecuencias de resonancia acústicas, y por lo tanto afecta directamente a la onda estacionaria acústica y a la fuerza de atrapamiento resultante. Como el transductor opera cerca de su resonancia de grosor, los desplazamientos de las superficies de los electrodos están esencialmente fuera de fase. El desplazamiento típico de los electrodos del transductor no es uniforme y varía dependiendo de la frecuencia de excitación. Por ejemplo, a una frecuencia de excitación con una única línea de gotitas de aceite atrapadas, el desplazamiento tiene un único máximo en el medio del electrodo y mínimos cerca de los bordes del transductor. A otra frecuencia de excitación, el perfil del transductor tiene múltiples máximos lo que lleva a múltiples líneas de gotitas de aceite atrapadas. Patrones de desplazamiento del transductor de orden más elevado tienen como resultado fuerzas de atrapamiento mayores y múltiples líneas de atrapamiento estables para las gotitas de aceite capturadas.

Mientras la emulsión de aceite-agua pasaba por el transductor, las líneas de atrapamiento de gotitas de aceite se observaron y se caracterizaron. La caracterización implicó la observación y el patrón del número de líneas de atrapamiento a través del canal de fluido, como se muestra en la figura 15, para siete de las diez frecuencias de resonancia identificadas en la figura 14. Perfiles de desplazamiento diferentes pueden producir diferentes (más) líneas de atrapamiento en las ondas estacionarias, con más gradientes en el perfil de desplazamiento, creando generalmente mayores fuerzas de atrapamiento y más líneas de atrapamiento.

La figura 16 es un modelo numérico que muestra el campo de presión que corresponde con el patrón de 9 líneas de atrapamiento. El modelo numérico es un modelo bidimensional; y por lo tanto solamente se observan tres líneas de atrapamiento. Dos conjuntos de tres líneas de atrapamiento más existen en la tercera dimensión perpendicular al plano de la página.

La fuerza lateral de la fuerza de radiación acústica generada por el transductor puede incrementarse mediante el accionamiento del transductor en formas de modo de orden más elevado, al contrario que una forma de vibración en la que el cristal se mueve efectivamente como un pistón que presenta un desplazamiento uniforme. La presión acústica es proporcional al voltaje de accionamiento del transductor. La potencia eléctrica es proporcional al cuadrado del voltaje. El transductor es típicamente una placa piezoeléctrica fina, con un campo eléctrico en el eje z y un desplazamiento primario en el eje z. El transductor está típicamente acoplado en un lado por aire (por ejemplo, el hueco de aire dentro del transductor) y por el otro lado por el medio fluido del medio de cultivo celular. Los tipos de onda generados en la placa son conocidos como ondas compuestas. Un subconjunto de ondas compuestas en la placa piezoeléctrica es similar a ondas Lamb simétricas permeables (también referidas como compresionales o extensionales). La naturaleza piezoeléctrica de la placa conlleva típicamente la excitación de ondas de Lamb simétricas. Las ondas son permeables porque irradian en la capa de agua, lo que conlleva la generación de ondas estacionarias acústicas en la capa de agua. Las ondas de Lamb existen en placas finas de extensión infinita con condiciones libre de estrés sobre sus superficies. Ya que los transductores de esta forma de realización son de naturaleza finita, los desplazamientos modales reales son más complicados.

La figura 17 muestra la variación típica del desplazamiento en el plano (desplazamiento x) y del desplazamiento fuera del plano (desplazamiento y) a través del grosor de la placa, siendo el desplazamiento en el plano una función par a través del grosor de la placa y siendo el desplazamiento fuera del plano una función impar. A consecuencia del tamaño finito de la placa, los componentes de desplazamiento varían a través de la anchura y la longitud de la placa. En general, un modo (m,n) es un modo de desplazamiento del transductor en el que hay m ondulaciones en el desplazamiento del transductor en la dirección de anchura y n ondulaciones en la dirección de longitud, a con la variación de grosor como se describe en la figura 17. El número máximo de m y n es una función de la dimensión del cristal y de la frecuencia de excitación. Existen modos tridimensionales adicionales que no son de la forma (m,n).

Los transductores son accionados de tal forma que el elemento piezoeléctrico vibra en modos de orden más elevado de fórmula general (m,n), en donde m y n son independientemente 1 o mayor. Generalmente, los

transductores vibrarán en modos de orden más elevado que (2,2). Modos de orden más elevado producirán más nodos y antinodos, tendrán como resultado ondas estacionarias tridimensionales en la capa de agua, caracterizadas por fuertes gradientes en el campo acústico en todas las direcciones, no solamente en la dirección de las ondas estacionarias, sino también en las direcciones laterales. Como consecuencia, los gradientes acústicos tienen como resultado fuerzas de atrapamiento más fuertes en la dirección lateral.

En unas formas de realización, la señal de voltaje que acciona el transductor puede presentar una forma de onda sinusoidal, cuadrada, de diente de sierra, pulsada o triangular; y presentara una frecuencia de 500 kHz hasta 10 MHz. La señal de voltaje puede ser conducida mediante modulación de anchura de pulso, lo que produce cualquier forma de onda deseada. La señal de voltaje también puede presentar una capacidad de empezar/detener la modulación de amplitud o frecuencia para eliminar la transmisión.

Los transductores se utilizan para crear un campo de presión que genera fuerzas de radiación acústicas del mismo orden de magnitud, en ambas, ortogonal a la dirección de la onda estacionaria y en la dirección de la onda estacionaria. Cuando las fuerzas son aproximadamente del mismo orden de magnitud, partículas de tamaño de 0.1 micrones hasta 300 micrones se moverán de forma más efectiva hasta "líneas de atrapamiento", de tal forma que las partículas no pasarán a través del campo de presión y continuarán saliendo a través de los puertos de recogida del dispositivo de filtración. En su lugar, las partículas se quedarán dentro de la cámara acústica para ser recicladas de vuelta al biorreactor.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los dispositivos, componentes, y procedimientos de la presente divulgación. Los ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden limitar la divulgación a los materiales, condiciones, o parámetros de proceso que se exponen en ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1

La figura 18 muestra una instalación experimental para un dispositivo de perfusión acústico como se ha descrito en detalle anteriormente. Este dispositivo de perfusión acústico es muy similar al que se ilustra en la figura 5, excepto que la parece inferior no es curvada, sino que discurre horizontalmente desde el primer extremo y después tuerce en ángulo directamente hacia la abertura de salida. Unos tubos están conectados a la abertura de entrada, la abertura de salida, y a las dos aberturas de recogida. También se conecta fluidicamente una bomba de forma visible a la abertura de salida.

La figura 19 es una imagen de otro dispositivo de perfusión de la presente divulgación, similar a la forma de realización mostrada en la figura 5, que presenta dos transductores ultrasónicos y una pared inferior cóncava que conduce desde la abertura de entrada hasta la abertura de salida en el extremo inferior del dispositivo. Una celda que contiene medio fluido también está presente en el dispositivo. En esta imagen, las ondas estacionarias acústicas se crean en la zona de recogida entre el reflector y el primer y el segundo transductor como se ha descrito arriba. El campo acústico generado de esta forma se indica con ondas y la referencia numérica 1664. El patrón de flujo del medio fluido a través del dispositivo desde la abertura de entrada hasta la abertura de salida se muestra mediante una flecha (referencia numérica 1610) que indica la dirección de flujo de fluido a través del dispositivo y flechas (referencia numérica 1630) que indican la dirección del flujo de fluido hacia la abertura de salida. Finalmente, el patrón de flujo general del producto deseado hacia fuera del dispositivo a través de la primera y la segunda abertura de recogida se muestra mediante flechas (referencia numérica 1670) que indican la dirección de flujo.

La separación acustoforética ha sido probada utilizando el dispositivo de perfusión acústica de la figura 19 y los procedimientos de separación de la presente divulgación en diferentes líneas de células de ovario de hámster chino (CHO). Las figuras 20-28 muestran varios resultados de pruebas variando diferentes parámetros y midiendo diferentes valores utilizando un Analizador de Viabilidad Celular Beckman Coulter.

Las tasas de flujo de perfusión con el dispositivo de filtración acústico fueron desde aproximadamente 2 mL/min hasta aproximadamente 10 mL/min, o las tasas de flujo fueron de aproximadamente 1 VVD hasta aproximadamente 5 VVD para un biorreactor de volumen de trabajo de 2.7L. La VVD hace referencia al "volumen de recipiente por día", o cuantos veces el volumen del recipiente del biorreactor se cicla a través del dispositivo de filtración acústico en un día. La tasa de flujo de perfusión (Q_p) se recogió a través de las aberturas de perfusión. En contraste, las tasas de flujo de alimentación (Q_f) fueron de aproximadamente 40 mL/min hasta aproximadamente 200 mL/min.

La solución de alimentación presentaba una densidad de células CHO de 50×10^6 células/mL. El tamaño del reactor fue de 2.7L y el volumen de alimentación de los fluidos hospedadores fue de 1.5L. En total, una serie de siete pruebas (T1-T7) se realizaron para estudiar el efecto de variar el VVD y la separación de flujo en el reactor de volumen de 2.7L. Los parámetros para las pruebas se muestran en la Table 1 abajo.

Tabla 1: Resultados del sistema para un reactor de 2.7L y un volumen de alimentación de 1.5L.

Qf	Separación de flujo (Qp/Qf)	Qp			
		1 VVD	1.5 VVD	2 VVD	5.2 VVD
		T1	T2	T3	T7
	5.0%				
	2.5%	T4	T5	T6	

Los resultados incluyeron una eficiencia de clarificación de células de entre 89-93% a un voltaje DC de 45V, independientemente de la tasa de flujo como se muestra en la figura 20. Cabe mencionar que el voltaje DC para T1 se fijó a 60V, mientras que para las pruebas T2-T7 el voltaje DC se redujo a un valor fijo de 45V. La amplitud de voltaje del transductor es la mitad de estos valores.

Los resultados incluyeron además una reducción de la turbidez del perfusato de 90-94% comparado con la alimentación, como se muestra en la figura 21. Esta figura muestra la turbidez de la alimentación, el fluido recirculado (Qc) y el perfusato (Qp). La alimentación entró en la abertura de entrada, el fluido recirculado salió por la abertura de salida y fue recirculado, y el perfusato salió por la abertura de perfusión del dispositivo de filtración acústica. Cabe mencionar que las mediciones de turbidez para las pruebas T1 y T2 tuvieron como resultado un error de equipo, así que solamente se muestran las pruebas T3-T7, que equivalieron a una turbidez de 6-10% en la corriente de perfusión en relación con la corriente de alimentación, con independencia de la tasa de flujo.

La figura 22 se produjo con un Analizador de Viabilidad Celular Beckman Coulter y reveló una viabilidad celular para cada tasa de flujo que estaba en el rango de error del instrumento (es decir, $\pm 6\%$), con el control en el rango de 79-84% en todas las pruebas.

Se realizaron más pruebas utilizando una solución denominada "Línea CHO A". La solución tenía una densidad celular inicial de 50×10^6 células/mL, una turbidez de 2,400 NTU, y una viabilidad celular de aproximadamente 80%. La solución se separó utilizando un dispositivo de la presente divulgación en un sistema que tiene un tamaño de reactor de 2.7L. El volumen del fluido de alimentación fue de entre 1.5L y 2.0L. Las tasas de flujo perfundido fueron de 2 mL/min hasta 10 mL/min, o de 1 a 5 VVD. Una serie de seis pruebas se realizaron para estudiar el efecto de variar el VVD y la separación de flujo sobre el rendimiento de filtración acústica para el reactor de volumen 2.7L. Los parámetros para estas pruebas se muestran en la Tabla 2 abajo.

Tabla 2: Resultados del sistema para un reactor de 2.7L y un volumen de alimentación desde 1.5L-2.0L

T1		T2		T3	
VVD	1.5	VVD	2	VVD	1
Separación de flujo	5.00%	Separación de flujo	5.00%	Separación de flujo	2.50%
Flujo perfundido (ml/min)	2.8	Flujo perfundido (ml/min)	3.8	Flujo perfundido (ml/min)	1.9
Flujo de alimentación (ml/min)	56	Flujo de alimentación (ml/min)	75	Flujo de alimentación (ml/min)	75
T4		T5		T6	
VVD	1.5	VVD	2	VVD	5.2
Separación de flujo	2.50%	Separación de flujo	2.50%	Separación de flujo	5.00%
Flujo perfundido (ml/min)	2.8	Flujo perfundido (ml/min)	3.8	Flujo perfundido (ml/min)	10
Flujo de alimentación (ml/min)	112.5	Flujo de alimentación (ml/min)	150	Flujo de alimentación (ml/min)	194.2

La figura 23 muestra la densidad celular total medida del flujo de alimentación, del flujo de recirculación y del flujo de perfusión. La retención celular del biorreactor para las pruebas muestra una eficiencia de perfusión de 90% aproximadamente. La figura 24 muestra la viabilidad celular medida para las pruebas, no revelando ningún cambio significativo de viabilidad a través de las pruebas.

A continuación, se realizaron pruebas adicionales utilizando una solución denominada "Línea CHO B". La solución tenía una densidad celular inicial de 75×10^6 células/mL, una turbidez de 2,300 NTU, y una viabilidad celular de

aproximadamente 80%. La solución fue separada utilizando un dispositivo de la presente divulgación en un sistema que presenta un tamaño de reactor de 2.7L. Se realizaron cuatro pruebas (T1-T4). Dos de las pruebas (T1, T3) utilizaron un dispositivo que presenta un único transductor. Las otras dos pruebas (T2, T4) utilizaron un dispositivo que presenta dos transductores en serie (de forma que el fluido discurrió a través de ambas ondas estacionarias). Los parámetros para las pruebas se muestran en la Tabla 3 abajo.

Tabla 3: Resultados del sistema para un reactor de 2.7L y un volumen desde 1.5L-2.0L.

T1		T2	
Transductores	1	Transductores	2
VVD	1	VVD	1
Flujo Perfundido (mL/min)	1.9	Flujo Perfundido (mL/min)	1.9
Flujo de alimentación (mL/min)	75	Flujo de alimentación (mL/min)	75
T3		T4	
Transductores	1	Transductores	2
VVD	2	VVD	2
Flujo Perfundido (mL/min)	3.8	Flujo Perfundido (mL/min)	3.8
Flujo de alimentación (mL/min)	150	Flujo de alimentación (mL/min)	150

La figura 25 muestra la densidad celular total medida de los flujos de alimentación, de recirculación, y de perfusión. La retención celular del biorreactor para las pruebas muestra una eficiencia de perfusión superior a 90%. Los resultados ponen en evidencia además una eficiencia un 3-5% superior aproximadamente cuando se utilizan dos transductores en vez de un único transductor. La figura 26 muestra la viabilidad celular medida para las pruebas, no revelando ningún cambio significativo en la viabilidad a través de las pruebas. En términos prácticos, operar a bajas VVD ofrece un número de ventajas, tales como una reducción del coste de medio.

En aplicaciones biológicas, está contemplado que todas las partes del sistema (es decir, el biorreactor, el dispositivo de filtración acústico, los tubos que conectan fluidicamente los mismos, etc.) puedan separarse los unos de los otros y ser desechables. Evitar centrífugas y filtros permite una mejor separación de las células CHO sin reducir la viabilidad de las células. Los transductores también pueden accionarse para crear cambios de presión rápidos para prevenir o liberar bloqueos causados por aglomeración de células CHO. La frecuencia de los transductores también puede variarse para obtener una efectividad óptima para una potencia determinada.

Ejemplo 2

La figura 27 muestra otra instalación experimental para un dispositivo de perfusión acústica similar a la ilustrada en la figura 8. Unos tubos están conectados a la abertura de entrada, la abertura de salida y la abertura de recogida.

El dispositivo se probó con un voltaje de transductor de 40 V pico a pico, una tasa de flujo de perfusión de 15-30 mL/min, y una tasa de flujo de recirculación de 2 L/min. Se tomaron muestras cada 45-60 minutos, y la tasa de retención celular se determinó. La figura 28 muestra los resultados. El eje y es la retención, expresada en términos de porcentaje (calculado comparando el contejo celular de salida con el contejo de entrada o de cultivo celular/biorreactor). El eje x representa ambos, el voltaje DC aplicado (en V) y la tasa de flujo de perfusión, o recogida (en mL/min); es meramente una coincidencia que el rango de valores para V y mL/min sea el mismo. La eficiencia de retención celular permaneció por encima del 95% para tasas de flujo de perfusión hasta 20 mL/min, y permaneció por encima de 90% hasta aproximadamente 25 mL/min. La figura 33 es una imagen compuesta que muestra el dispositivo en un modo de inicio o de asentamiento de células (izquierda) y en un modo de retención celular de estado estacionario (derecha).

A continuación, se realizaron experimentos para determinar qué factores afectarían a la retención celular. La tasa de flujo de perfusión se varió, así como el voltaje del transductor. Cuando se varió la tasa de flujo de perfusión, el voltaje del transductor se mantuvo a 40V pico a pico y la tasa de flujo de recirculación se mantuvo a 2 L/min. Cuando se varió el voltaje del transductor, la tasa de flujo de perfusión se mantuvo a 20 L/min y la tasa de flujo de recirculación se mantuvo a 2 L/min. Los resultados indicaron que, para esta forma de realización particular, una tasa de flujo de perfusión de aproximadamente 15 mL/min hasta aproximadamente 28 mL/min fue óptima, y un voltaje de transductor de aproximadamente 15V pico a pico hasta 28V pico a pico fue óptimo.

Un mejor entendimiento de la funcionalidad añadida proporcionada por el dispositivo de perfusión acústico puede demostrarse examinando las muestras de células observadas que entran y se recolectan del dispositivo. La figura 29A es una imagen de microscopio (de un contador de células Vi-Cell) de la suspensión de alimentación, aquí una población de cultivo celular viable con aproximadamente 56 millones de células/mL. Se pueden observar varias

células sanas, redondas y grandes. La figura 29B es un histograma que muestra la distribución de diámetro celular en la población. La distribución de diámetro es fuertemente bimodal, alrededor de valores de aproximadamente 11 micrones y aproximadamente 23 micrones. Estos dos modos corresponden aproximadamente con los residuos más pequeños y las células no viables, y las células viables más grandes. Debe notarse que esta muestra es de una población celular particularmente "sucio". En general, una línea celular de producción sería mucho más limpia, y el pico a aproximadamente 11 micrones sería mucho más pequeño, o incluso inexistente.

La figura 30A es otra imagen de microscopio (de un contador de células Vi-Cell), esta vez del flujo recolectado del dispositivo de perfusión acústico. En esta imagen, se observan muy pocas células grandes, brillantes, en contraste con la figura 29A. Más bien, la imagen está llena de más partículas o residuos oscuros más pequeños. Las condiciones experimentales en este caso fueron una tasa de perfusión de 4 mL/min y una tasa de recirculación de 2 L/min con un voltaje de entrada DC de 30V. Esta observación cualitativa se confirma mediante el histograma en la figura 30B, que muestra la distribución de diámetros en el perfusato. Mirando la figura 30B, la distribución de partículas es ahora unimodal, con el pico de aproximadamente 9 micrones. Esto indica que las células viables, más grandes han sido atrapadas y retenidas, o de otra forma se les ha impedido en gran parte salir en el perfusato. Solamente células más pequeñas han pasado a través, junto con residuos celulares, finos y fragmentos de un tamaño de submicrométrico a micrométrico.

Se realizó un modelo de dinámica de fluido computacional (CFD) de este dispositivo. La figura 31 muestra las distribuciones de velocidad dentro del dispositivo después de 500 segundos. Las unidades están en metros/segundo(m/s). Como se esperaba, las velocidades más elevadas de encontraron en el canal que conduce hacia abajo desde la abertura de entrada a la abertura de salida. La velocidad es cercana a cero en la celda de fluido y fuera a través de la abertura de recogida. Esto es importante por dos razones: el campo acústico es más eficaz con un flujo que presenta una velocidad menor, más uniforme y porque las células utilizadas en bio-fabricación son sensibles al flujo, y al índice de cizallamiento inducido.

La figura 32 es un diagrama que ilustra varios aspectos de esta forma de realización. El fluido fluye dentro del dispositivo a través de la abertura de entrada 710 (flecha 780) y dentro de la cámara acústica, por encima del borde acústico 783. El volumen de fluido 750 debajo de la cámara acústica contiene una trayectoria de flujo tangencial, indicada por la flecha 782. El fluido con una cantidad relativamente elevada de células viables saldrá a través de la abertura de salida 730, tal como se indica mediante la flecha 781. El efecto de borde acústico creado por las ondas estacionarias está marcado con la referencia numérica 783, y separa células grandes de fragmentos celulares más pequeños, residuos particulados, biomoléculas deseadas, etc. que pueden pasar a través del campo de onda estacionaria acústica 784. Esta corriente de flujo de recolección 785 sale a continuación a través de la abertura de recolección 770. La trayectoria de flujo tangencial es parte de la trayectoria de flujo de entrada, y está ubicada debajo del borde acústico 783 generado por la onda estacionaria acústica. La trayectoria de flujo tangencial transportará fuera ambos, los grupos de células que caen del campo de onda estacionaria acústica 784 debido a efectos de gravedad y las células que son retenidas por el efector de borde acústico.

Ejemplo 3

Otra forma de explicar el funcionamiento del dispositivo de perfusión acústico puede entenderse mirando a los resultados de un estudio numérico. En el estudio numérico, dos fluidos con propiedades acústicas efectivas diferentes (es decir, velocidad del sonido y densidad), se modelaron con una interfaz entre ellos en COMSOL, un programa de simulación numérica. El campo acústico se calcula y de ahí se calcula la fuerza de radiación lateral que actúa sobre una partícula en la dirección de la velocidad de fluido utilizando la ecuación de Gorkov.

La figura 34 muestra la geometría de la simulación, utilizando un transductor piezoeléctrico, un reflector de acero, una carcasa de aluminio, y dos fluidos: siendo el primer fluido agua en el campo acústico y siendo el segundo fluido una solución de agua con una concentración de células CHO de 15% fuera del campo acústico, presentando el segundo fluido una densidad y una velocidad del sonido mayores que el fluido de agua.

Los dos fluidos se separaron como se indica mediante la línea sólida en el modelo de la figura 34. En esta instalación, la velocidad de fluido a través del sistema fue en una dirección horizontal de izquierda a derecha. Por lo tanto, para actuar como un dispositivo de retención, el campo acústico necesita generar una fuerza sobre las células que actúa en la dirección x negativa (es decir, opuesta a la velocidad del fluido). El agua se modeló con una densidad de fluido de 1000 kg/m³ y una velocidad del sonido de 1550 m/s. Se realizó una simulación numérica multifísica que incluyó una simulación piezoeléctrica completa del material piezoeléctrico, una simulación acústica de los dos fluidos, y una simulación elástica lineal sobre los cuerpos de acero y aluminio a varias frecuencias de excitación. El transductor se accionó a un voltaje pico de 40 V.

Las figuras 35A-35C muestran la presión acústica en los dos fluidos y el desplazamiento del material piezoeléctrico, la carcasa de aluminio, y el reflector de acero de modelo a frecuencias de operación de 2.218 MHz, 2.2465 MHz, y 2.3055 MHz. La fuerza de radiación lateral (es decir, horizontalmente en la dirección del flujo de fluido), se calculó en la interfaz entre los dos fluidos junto con la energía eléctrica real consumida por el transductor. Se muestran el desplazamiento estructural del transductor y el acero, junto con la presión acústica en el fluido.

La figura 36 muestra la fuerza de radiación lateral (N) y la fuerza de radiación normalizada por la energía (N/W) frente a la frecuencia que actúa sobre las células CHO suspendidas. Este gráfico muestra que a frecuencias de resonancia (es decir, máximos locales en energía), la fuerza de radiación lateral promedio sobre la interfaz es negativa, lo que significa que está en la dirección x negativa. El resultado es la creación de un efecto de pared acústica o de un efecto de borde acústico. Esto es, el borde del campo acústico ejerce una fuerte fuerza lateral sobre las partículas suspendidas, impidiendo mediante esto que las partículas más grandes entren en el campo acústico y permitiendo que solamente el primer fluido (es decir, el fluido que contiene solamente las partículas más pequeñas, tales como el producto deseado y excluyendo células enteras) entre en el campo acústico, creando mediante esto un dispositivo de retención celular de perfusión acústico. De esta forma, solamente el fluido clarificado puede escapar y las células son retenidas por la fuerza de radiación. Esta fuerza nunca es positiva, lo que significa que siempre mantiene las células contra la interfaz, no permitiéndoles escapar del borde acústico. Los múltiples picos en la curva de energía muestran la existencia de múltiples modos de operación que incluyen modos de resonancia planar y modos de operación multidimensionales, indicando que este tipo de operación puede generarse a través de la utilización de ondas estacionarias planares y multidimensionales indistintamente. En sistemas que presentan unas dimensiones de 1"x1", existe una resonancia planar cada 30 kHz. El gráfico muestra evidencia de picos adicionales que indican la existencia de modos multidimensionales. Por unidad de energía, estos modos pueden ser igual o incluso más efectivos que los modos de resonancia planares. Como se ha explicado anteriormente, las células que son retenidas por la fuerza de radiación acústica pueden ser recogidas entonces por la moción de arrastre del campo de flujo (por ejemplo, del flujo que recircula por debajo de la interfaz), y ser devueltas de forma continua al biorreactor para asegurar que reciben la nutrición y el oxígeno para mantener la producción del cultivo celular global.

Ejemplo 4

La figura 37 y la figura 38 muestran otra instalación experimental para un dispositivo de perfusión acústico similar al que se ilustra en la figura 9. Unos tubos están conectados a la abertura de entrada, a la abertura de salida, a la abertura de recogida, y a la abertura de salida secundaria (para un flujo de células concentradas). Se incluyen unas flechas para ilustrar el flujo de fluido. Unas flechas indican el flujo dentro de la abertura de entrada; el flujo fuera de la abertura de salida; el flujo de perfusato fuera de la parte superior del dispositivo y el flujo de concentrado fuera de la parte inferior del dispositivo. El flujo a través de la abertura de entrada hasta la abertura de salida es la tasa de flujo de recirculación. El flujo de perfusato fuera de la parte superior del dispositivo es la tasa de flujo de perfusión que contiene fluido clarificado empobrecido en células y que contiene el producto deseado. El flujo de concentrado fuera de la parte inferior del dispositivo es el flujo de células concentrado. El flujo de células concentrado puede ser utilizado para una operación de purga de células o si se desea, las células pueden ser devueltas al biorreactor.

El dispositivo se probó a un voltaje de transductor de 40 V pico a pico, a una tasa de flujo de perfusión (fuera por la parte superior) de 1-10 mL/min, una tasa de flujo de recirculación de 0.75-1 L/min, y una tasa de flujo de concentrado (fuera por la parte inferior) de 15 mL/min. La tasa de retención celular se determinó para tasas de flujo de perfusión diferentes. La figura 39 muestra los resultados. El eje y es la retención con 1.00 indicando 100% de retención. La eficiencia de retención celular permaneció por encima de 98% para tasas de perfusión de hasta 7 mL/min, y estuvo justo por debajo de 90% a 10 mL/min.

La presente divulgación se ha descrito haciendo referencia a formas de realización ejemplificativas. Obviamente, se les ocurrirán modificaciones y alteraciones a terceros al leer y entender la descripción detallada que precede. La presente divulgación pretende ser interpretada como que incluye tales modificaciones y alteraciones siempre y cuando estas estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de perfusión acústico, que comprende:

- 5 una cámara acústica; una abertura de entrada, una trayectoria de flujo de entrada que conduce de la abertura de entrada a la cámara acústica;
- una abertura de salida ubicada debajo de la cámara acústica para recircular una mezcla de fluido/células;
- 10 por lo menos una abertura de recogida ubicada por encima de la cámara acústica para recoger un fluido de recolección a partir de la mezcla de fluido/células; y
- por lo menos un transductor ultrasónico y por lo menos un reflector opuesto a dicho por lo menos un transductor ultrasónico, en el que dicho por lo menos un transductor ultrasónico incluye un material piezoeléctrico accionado por una señal de voltaje para crear una onda estacionaria acústica multidimensional a través una trayectoria de flujo de recogida desde la cámara acústica hasta dicha por lo menos una abertura de recogida.
- 15

2. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende por lo menos una de las siguientes características:

- 20
- la trayectoria de flujo de entrada está conformada para generar una trayectoria de flujo tangencial por debajo de un campo acústico generado por la onda estacionaria acústica;
 - un incremento de presión y una fuerza de radiación sobre células son generados en un borde de la onda estacionaria acústica para clarificar un fluido que pasa a través de la onda estacionaria acústica;
 - 25
 - dicho por lo menos un transductor ultrasónico está montado en una pared trasera o en una pared delantera del dispositivo;
 - dicho por lo menos un reflector está realizado a partir de un material transparente;
 - 30
 - la abertura de salida está por debajo de la abertura de entrada;

3. Dispositivo según la reivindicación 1, que presenta un total de dos o más transductores ultrasónicos ubicados en múltiples lados de la trayectoria de flujo de recogida.

4. Dispositivo según la reivindicación 3, en el que dicho por lo menos un reflector está ubicado entre los dos o más transductores ultrasónicos.

5. Dispositivo según la reivindicación 3, en el que los dos o más transductores ultrasónicos están dentro de la trayectoria de flujo de recogida y dicho por lo menos un reflector está opuesto a los dos o más transductores ultrasónicos en una pared del dispositivo.

6. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende por lo menos una de las siguientes características:

- 45
- dicho por lo menos un transductor es un conjunto;
 - la onda estacionaria acústica tiene como resultado una fuerza de radiación que presenta una componente de fuerza axial y una componente de fuerza lateral que son del mismo orden de magnitud;
 - 50
 - el dispositivo presenta dos o más aberturas de recogida espaciadas una de la otra en el extremo superior del dispositivo;
 - una cámara de flujo secundaria en la que el fluido de recolección pasa a través de una segunda onda estacionaria acústica que presenta una frecuencia más elevada que la primera onda estacionaria acústica ultrasónica para clarificar aún más el fluido de recolección;
 - 55
 - tanto una onda estacionaria acústica planar como una onda estacionaria acústica multidimensional son creadas a través de la trayectoria de flujo de recogida;

7. Procedimiento para separar células biológicas de un medio fluido, que comprende:

hacer fluir el medio fluido que contiene las células biológicas a través de un dispositivo de perfusión acústico, comprendiendo el dispositivo:

- 65 una cámara acústica;

una abertura de entrada, una trayectoria de flujo de entrada que conduce desde la abertura de entrada hasta la cámara acústica;

una abertura de salida ubicada por debajo de la cámara acústica para recircular el medio fluido y las células biológicas;

por lo menos una abertura de recogida ubicada por encima de la cámara acústica para recoger el fluido de recolección; y

por lo menos un transductor ultrasónico por debajo de dicha por lo menos una abertura de recogida y por lo menos un reflector opuesto a dicho por lo menos un transductor ultrasónico, en el que dicho por lo menos un transductor ultrasónico incluye un material piezoeléctrico accionado por una señal de voltaje para crear una onda estacionaria acústica multidimensional a través de la trayectoria de flujo de recogida que conduce desde la cámara acústica hasta dicha por lo menos una abertura de recogida;

accionar dicho por lo menos un transductor ultrasónico para crear la onda estacionaria acústica y crear un efecto de borde acústico que evita que las células biológicas entren en el campo acústico, mientras que permite el paso de las biomoléculas producidas y los fragmentos de células; y

recoger un fluido enriquecido en células a partir de la abertura de salida y recoger un fluido de recolección empobrecido en células a partir de dicha por lo menos una abertura de recogida.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que una tasa de flujo a través de la trayectoria de flujo de recogida es por lo menos un orden de magnitud menor que una tasa de flujo a través de la trayectoria de flujo de entrada.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la trayectoria de flujo de entrada conduce desde la abertura de entrada hacia abajo en dirección a la abertura de salida y a continuación hacia arriba hasta la cámara acústica, creando una corriente de fluido de recirculación que es de manera local sustancialmente tangencial a dicha por lo menos una onda estacionaria acústica.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la corriente de fluido de recirculación transporta unas células que están constantemente cayendo de una región de borde de la onda estacionaria acústica.

11. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende por lo menos una de las siguientes características:

- un incremento de presión y una fuerza de radiación son generados en un borde de la onda estacionaria acústica para clarificar un fluido que pasa a través de la onda estacionaria acústica;
- una tasa de flujo del medio fluido que entra en el dispositivo a través de la abertura de entrada es de aproximadamente 1 litro por minuto y una tasa de flujo del fluido de recolección empobrecido en células que sale del dispositivo a través de dicha por lo menos una abertura de recogida es de aproximadamente 10 mililitros por minuto;
- una cámara de flujo secundaria en la que el fluido de recolección pasa a través de una segunda onda estacionaria acústica que tiene una frecuencia más elevada que la primera onda estacionaria acústica ultrasónica para clarificar más el fluido de recolección;

12. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende asimismo una abertura de purga para extraer una mezcla concentrada de fluido/células.

13. Dispositivo según la reivindicación 12, que comprende asimismo una cámara de flujo secundaria en la que la corriente de fluido de recolección secundaria pasa a través de una segunda onda estacionaria acústica que presenta una frecuencia más elevada que la primera onda estacionaria acústica ultrasónica.

14. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que la cámara de flujo secundaria se utiliza para clarificar más la corriente de fluido de recolección secundaria atrapando y aglomerando unos materiales que presentan un tamaño de aproximadamente 10 micrones o menos, de tal forma que el material aglomerado se separa de la corriente de fluido de recolección secundaria debido a la gravedad.

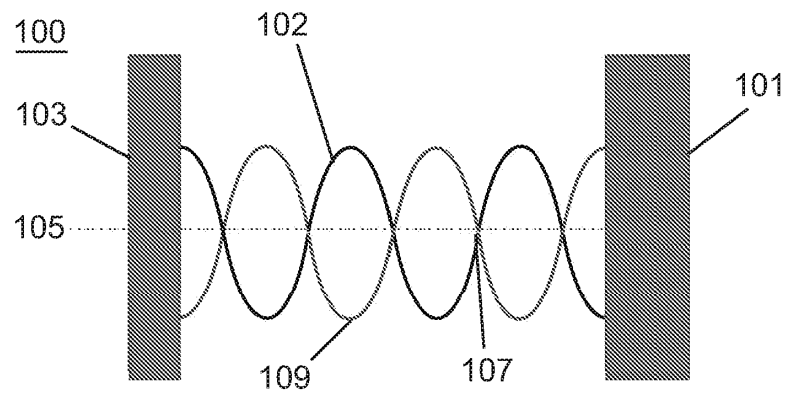


FIG. 1

300

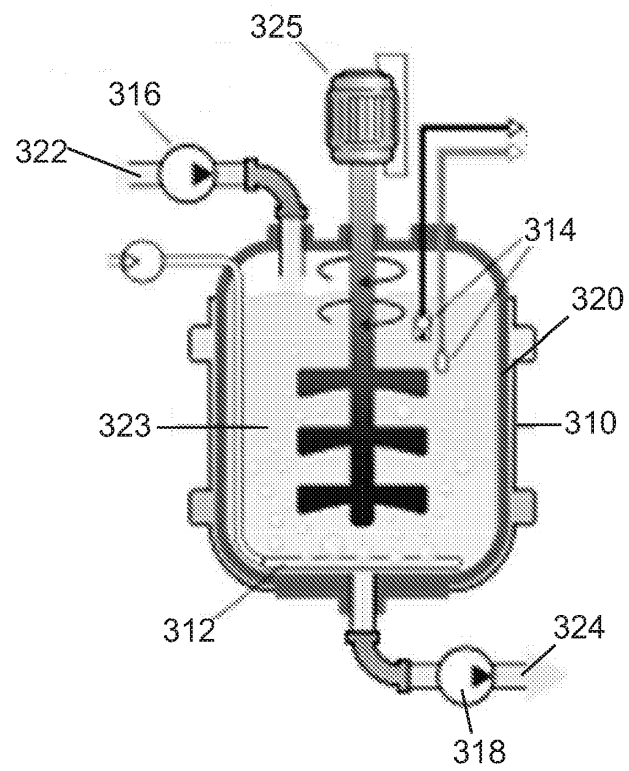


FIG. 3

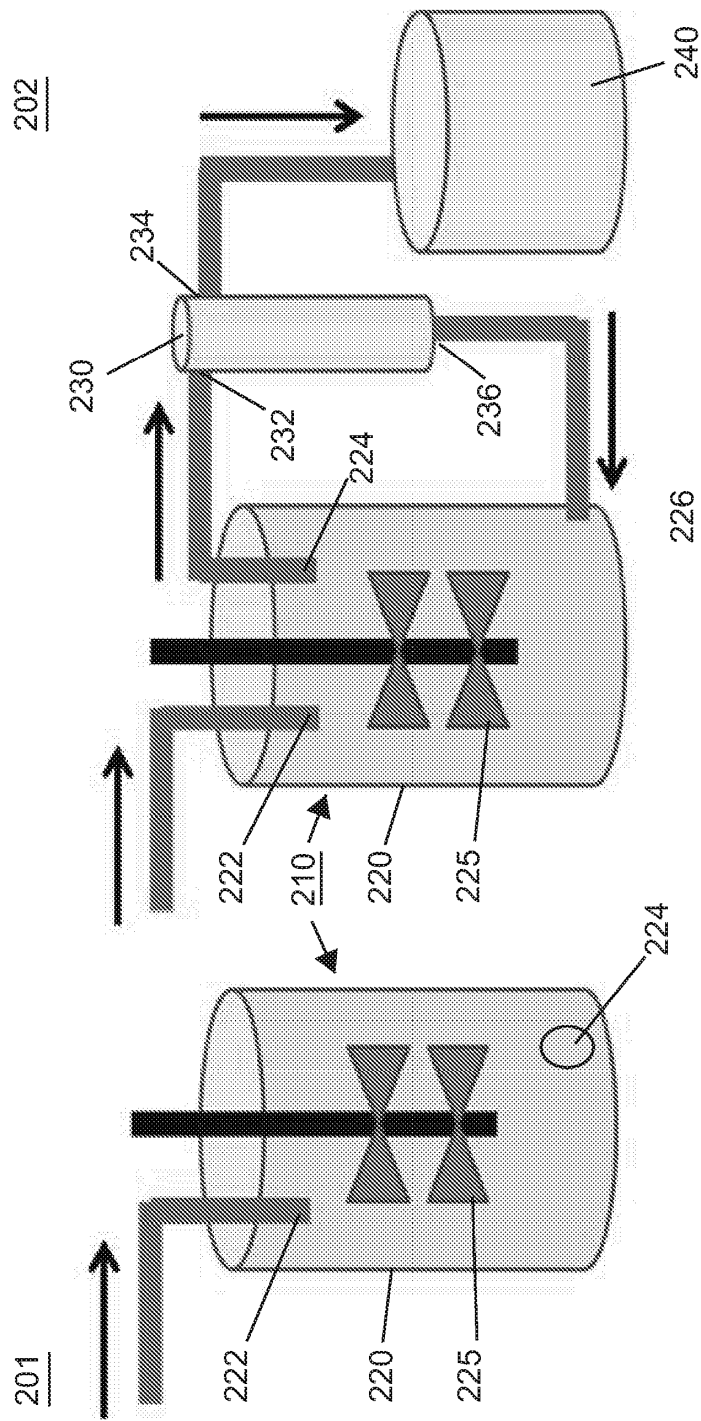


FIG. 2

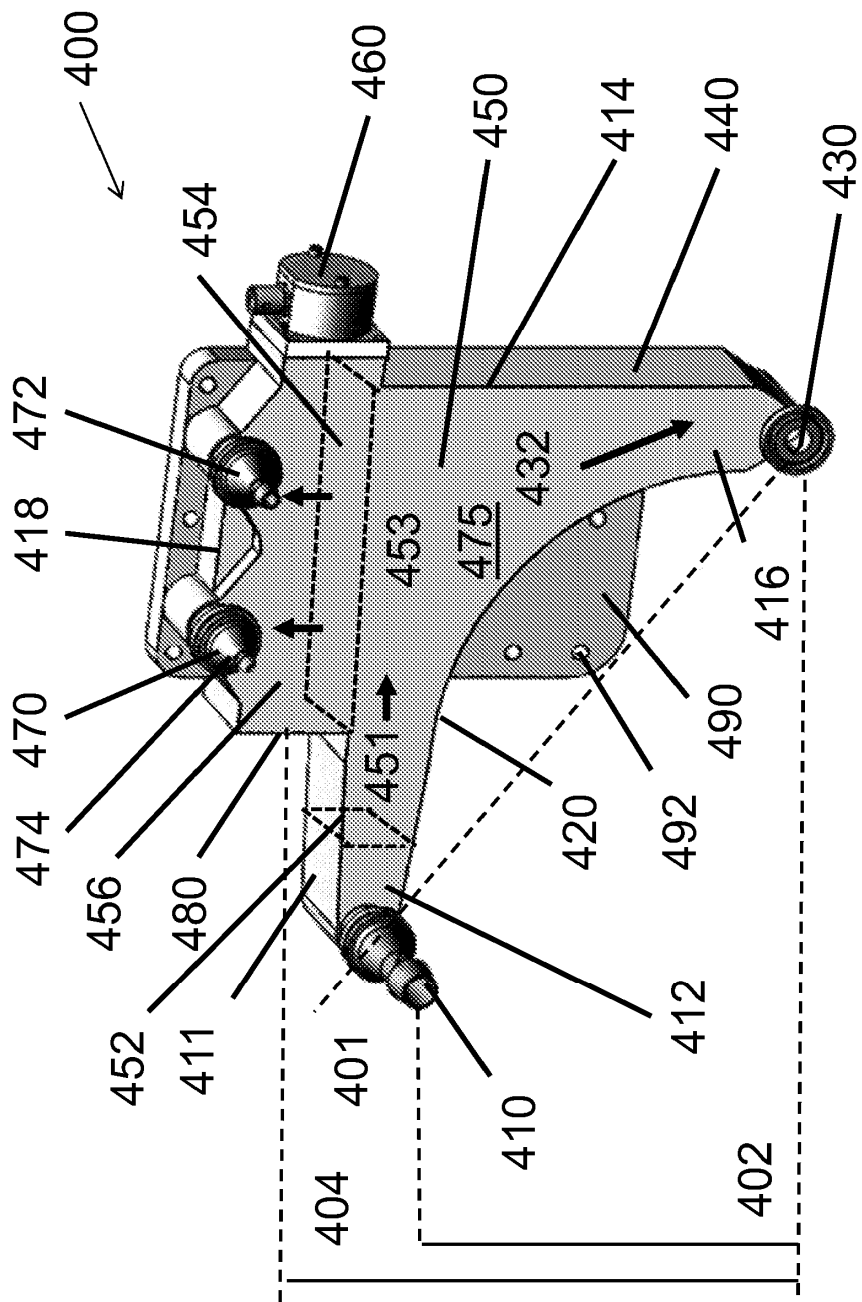


FIG. 4

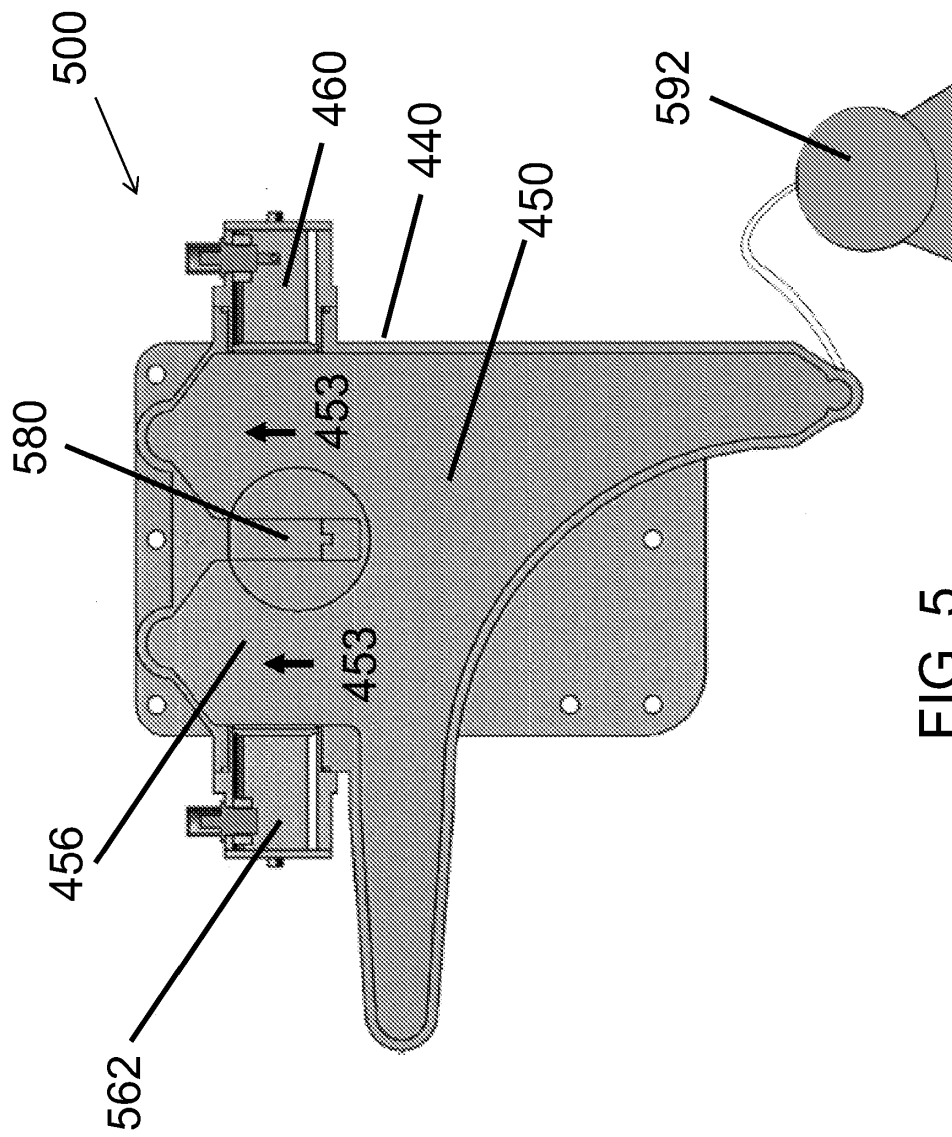
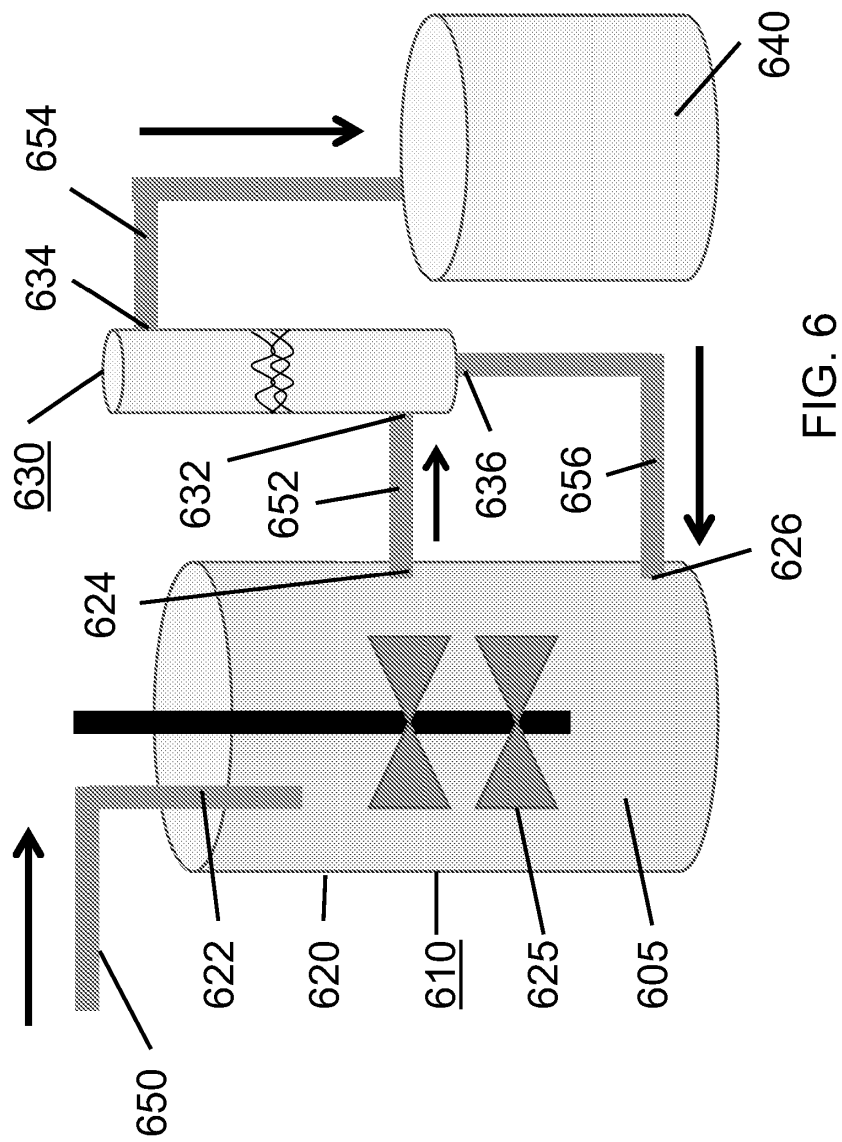


FIG. 5



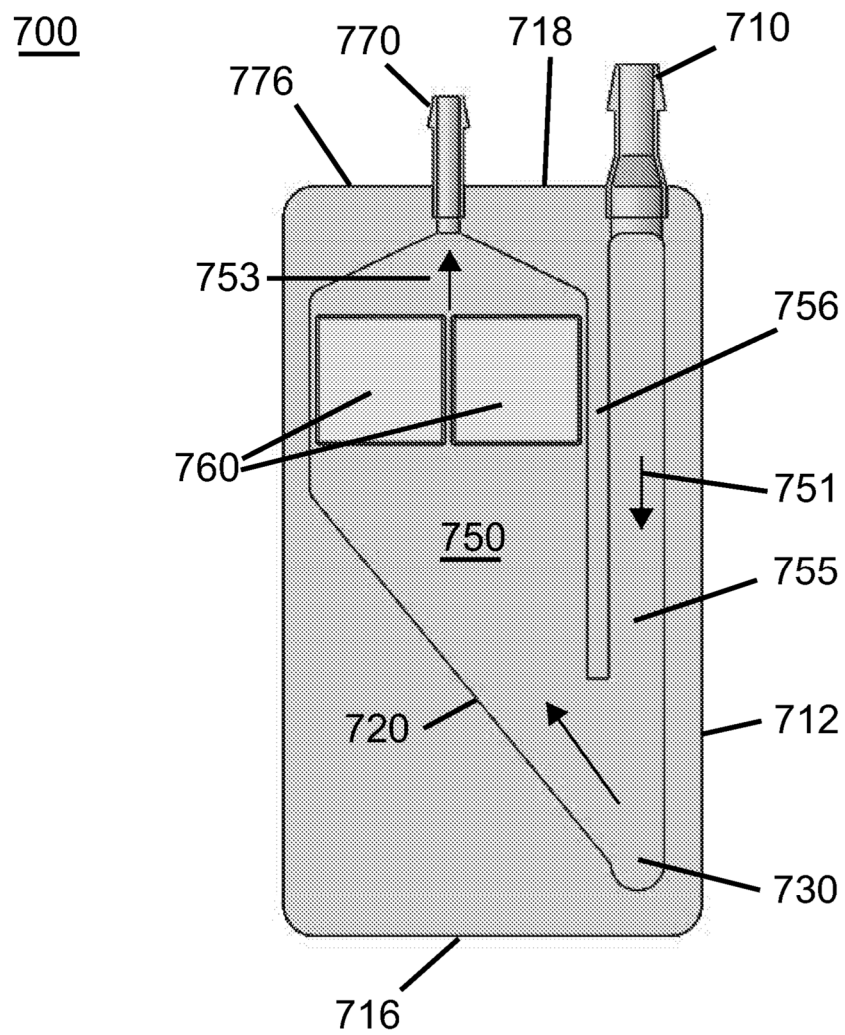


FIG. 7

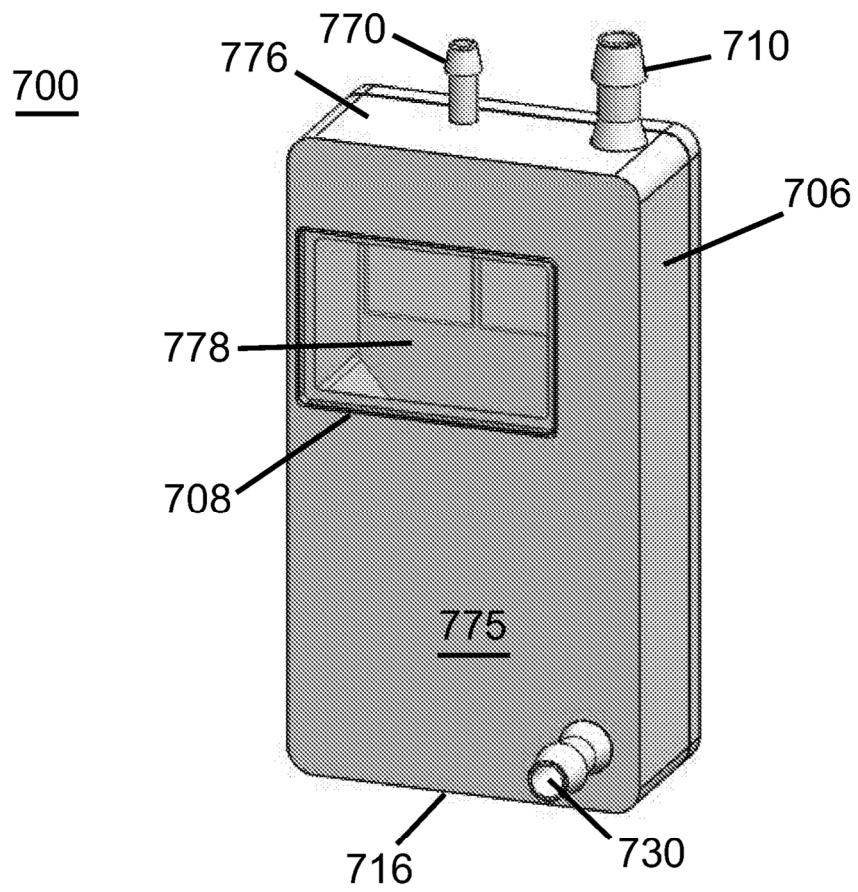


FIG. 8

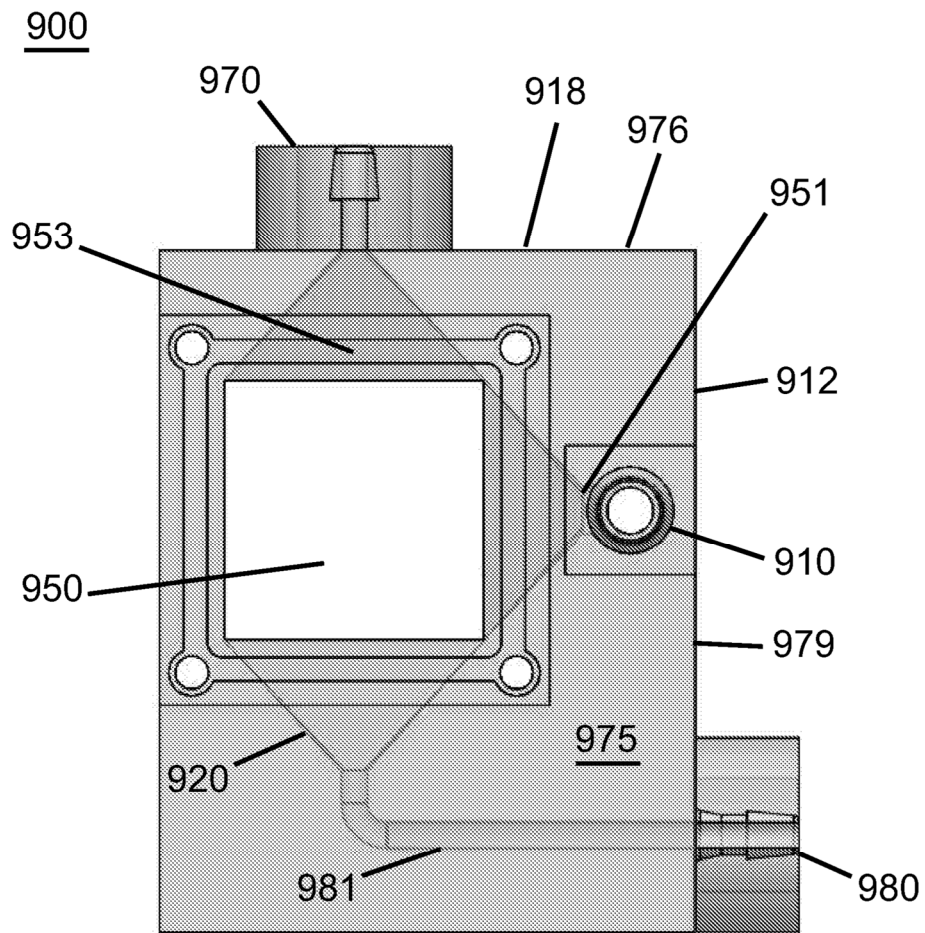


FIG. 9

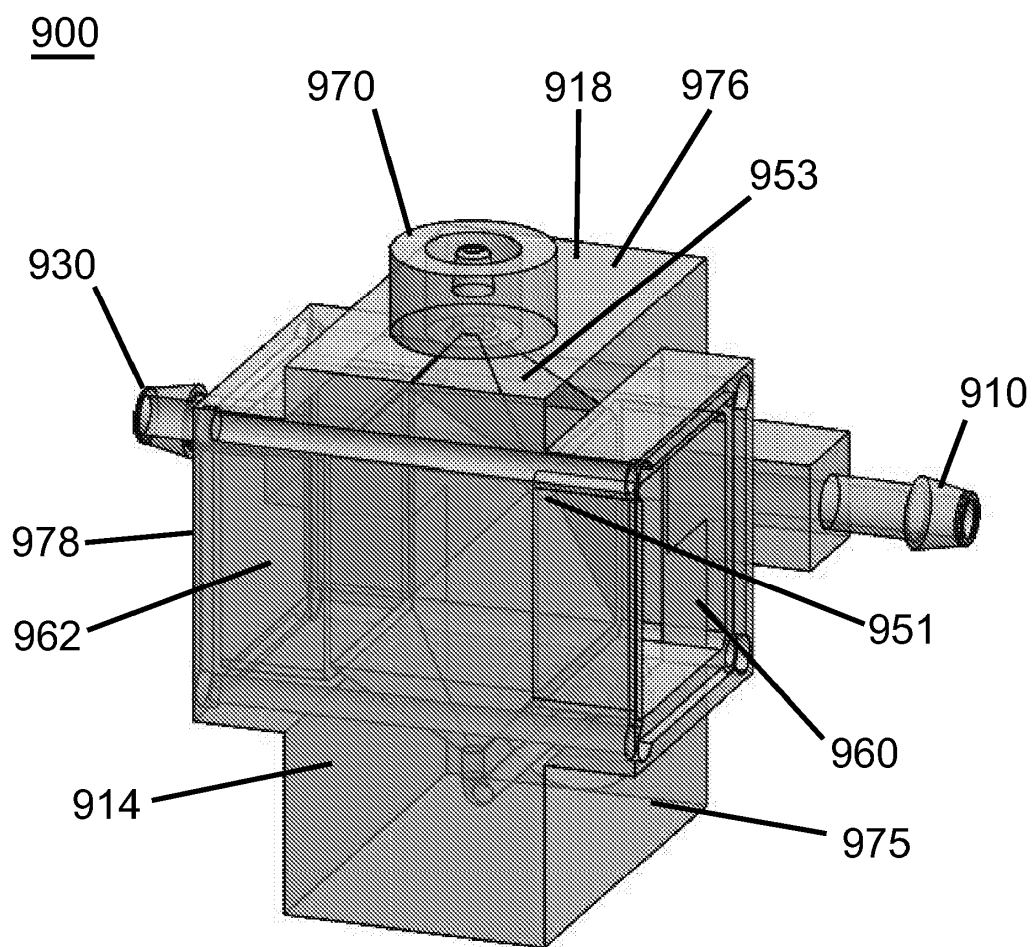


FIG. 10

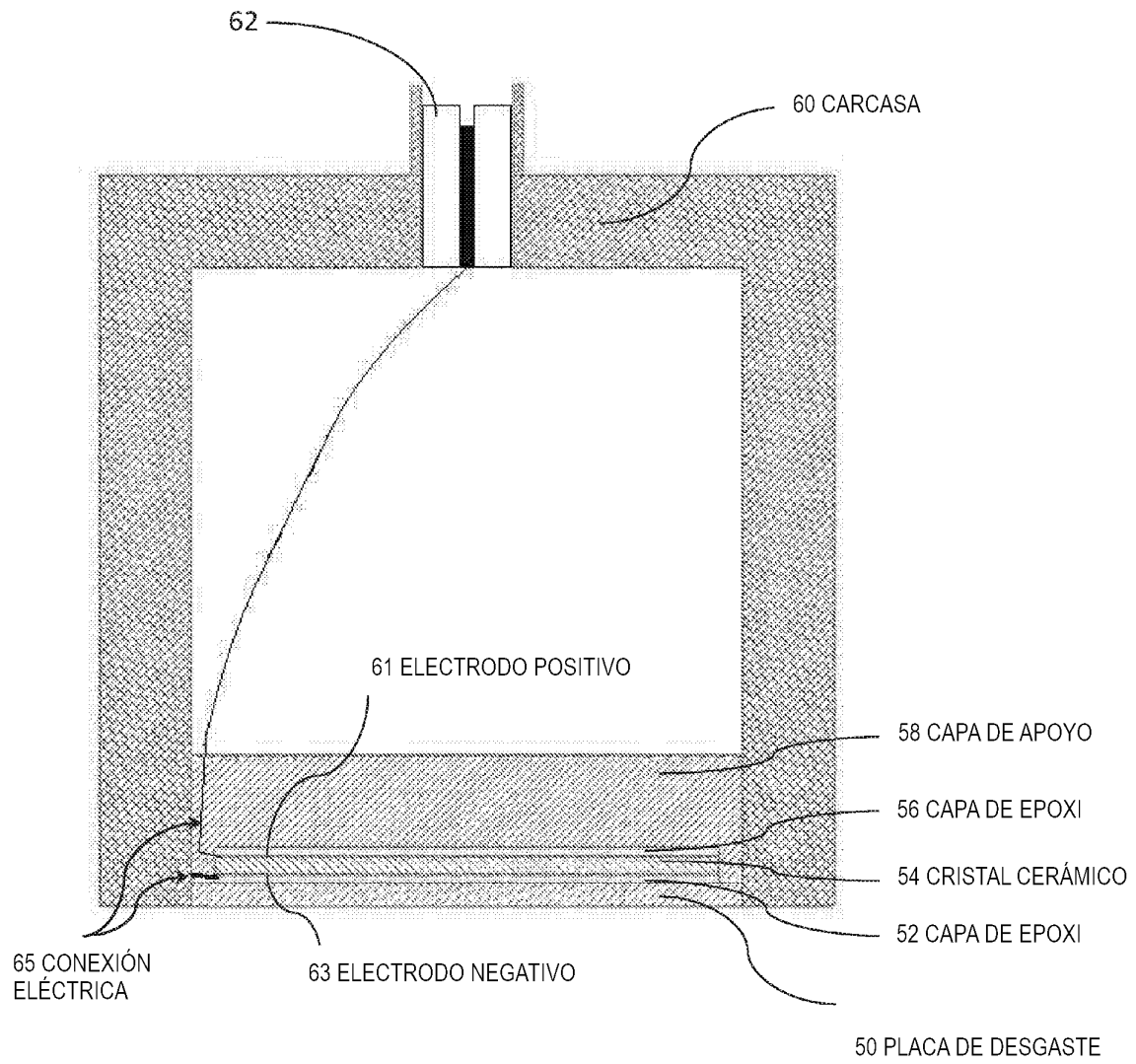


FIG. 11

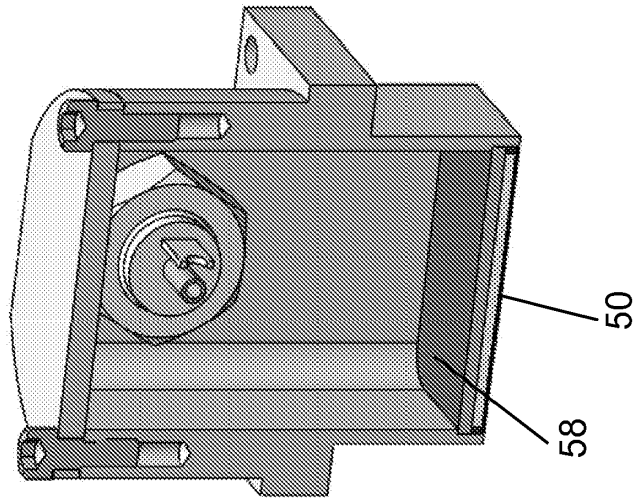


FIG. 13

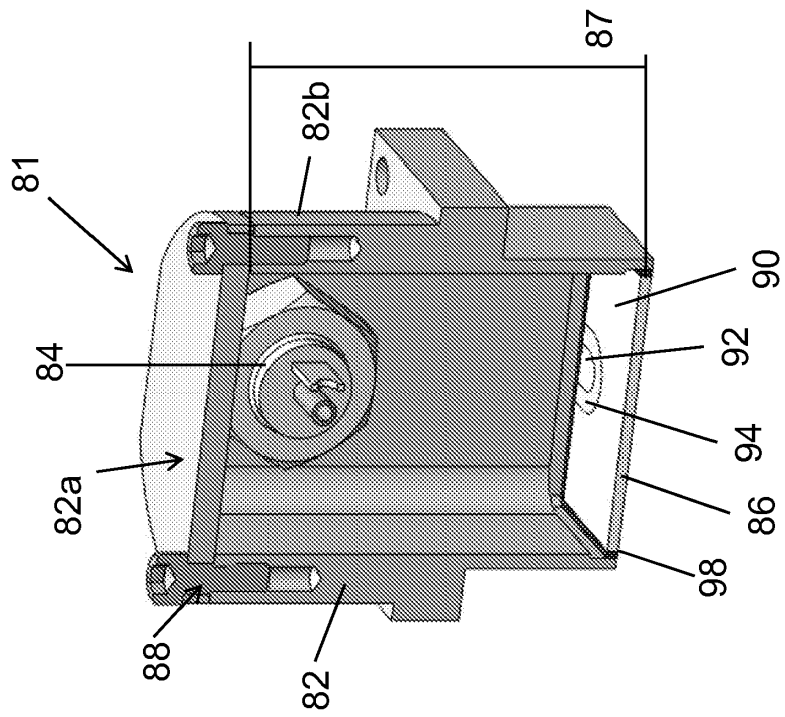


FIG. 12

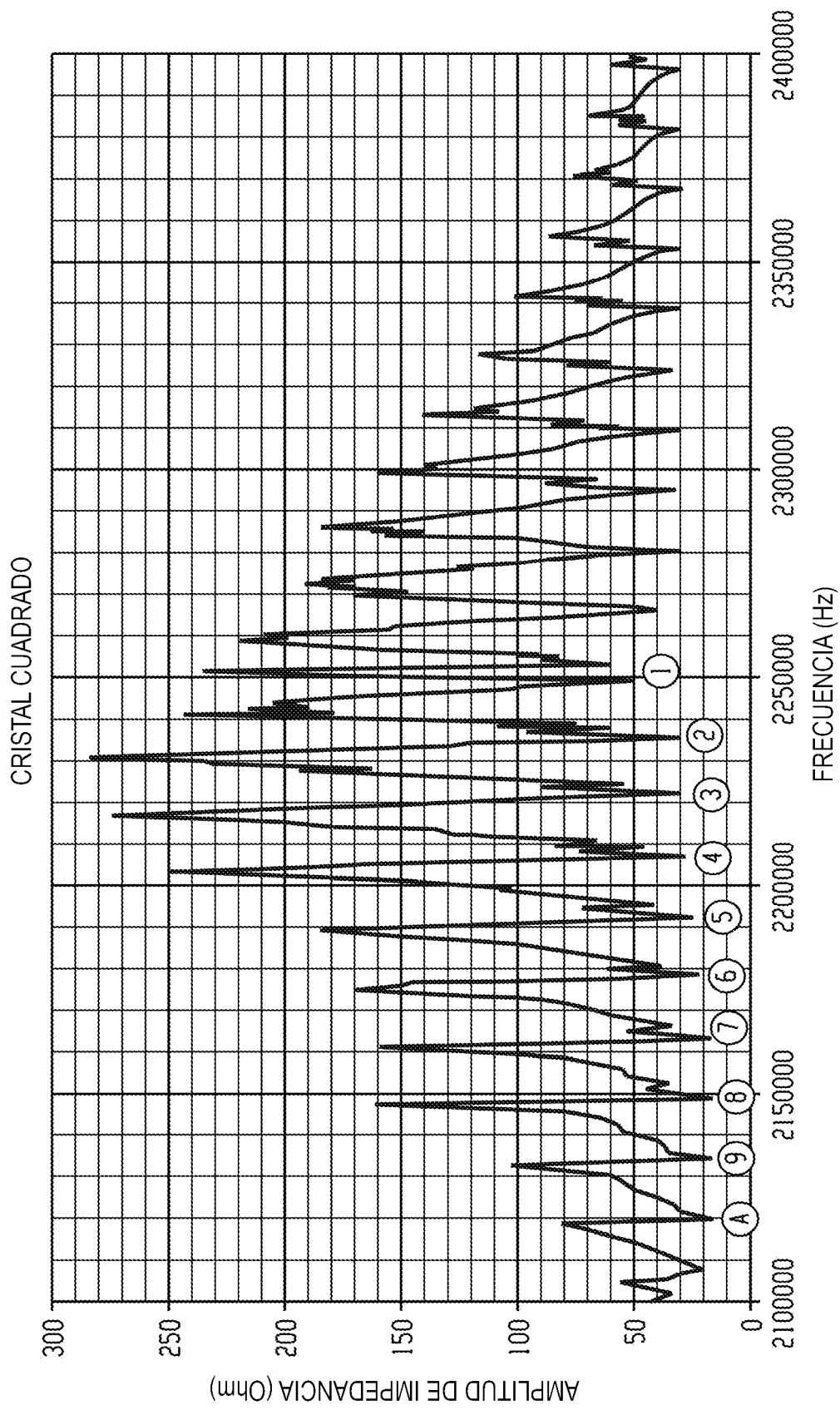


FIG. 14

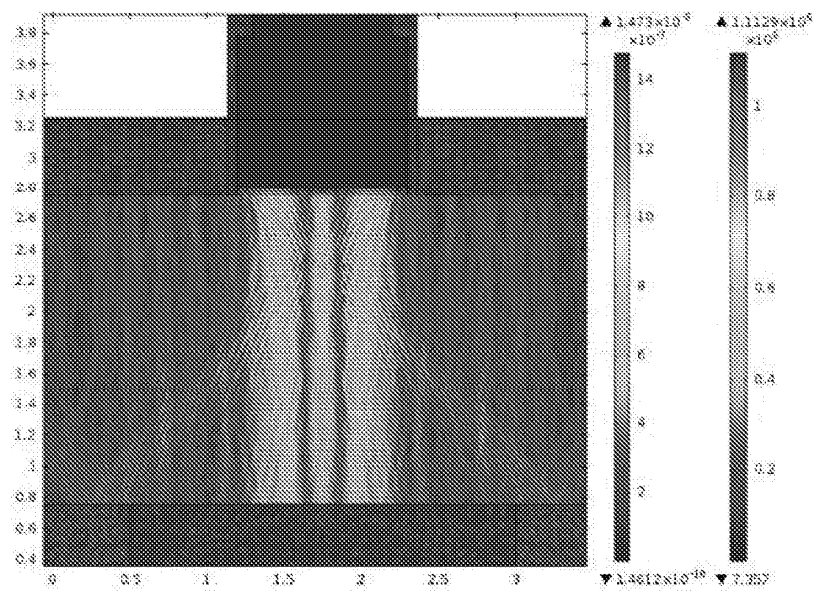


FIG. 16

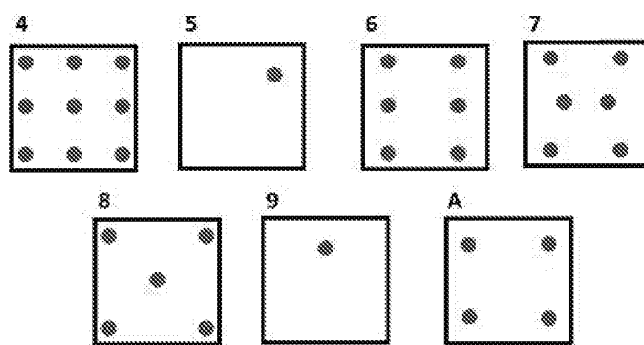


FIG. 15

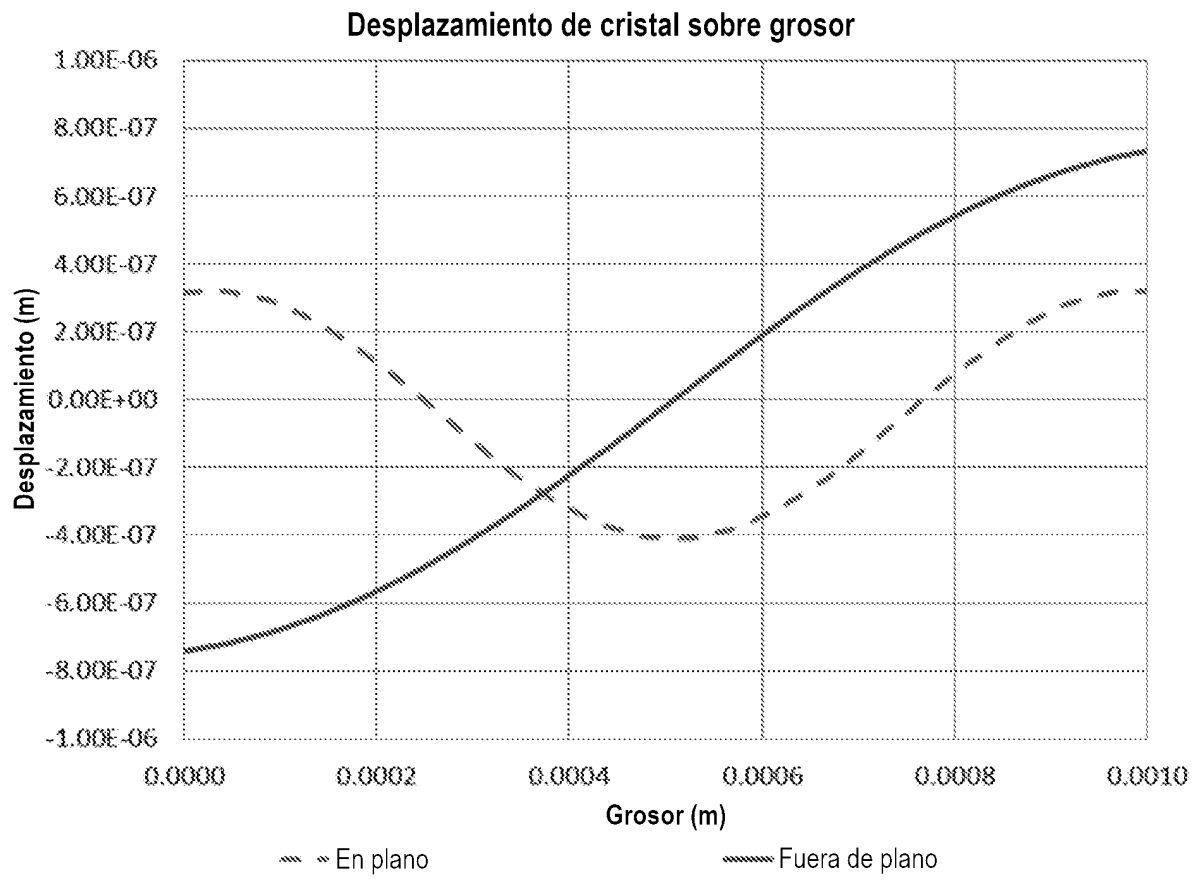


FIG. 17

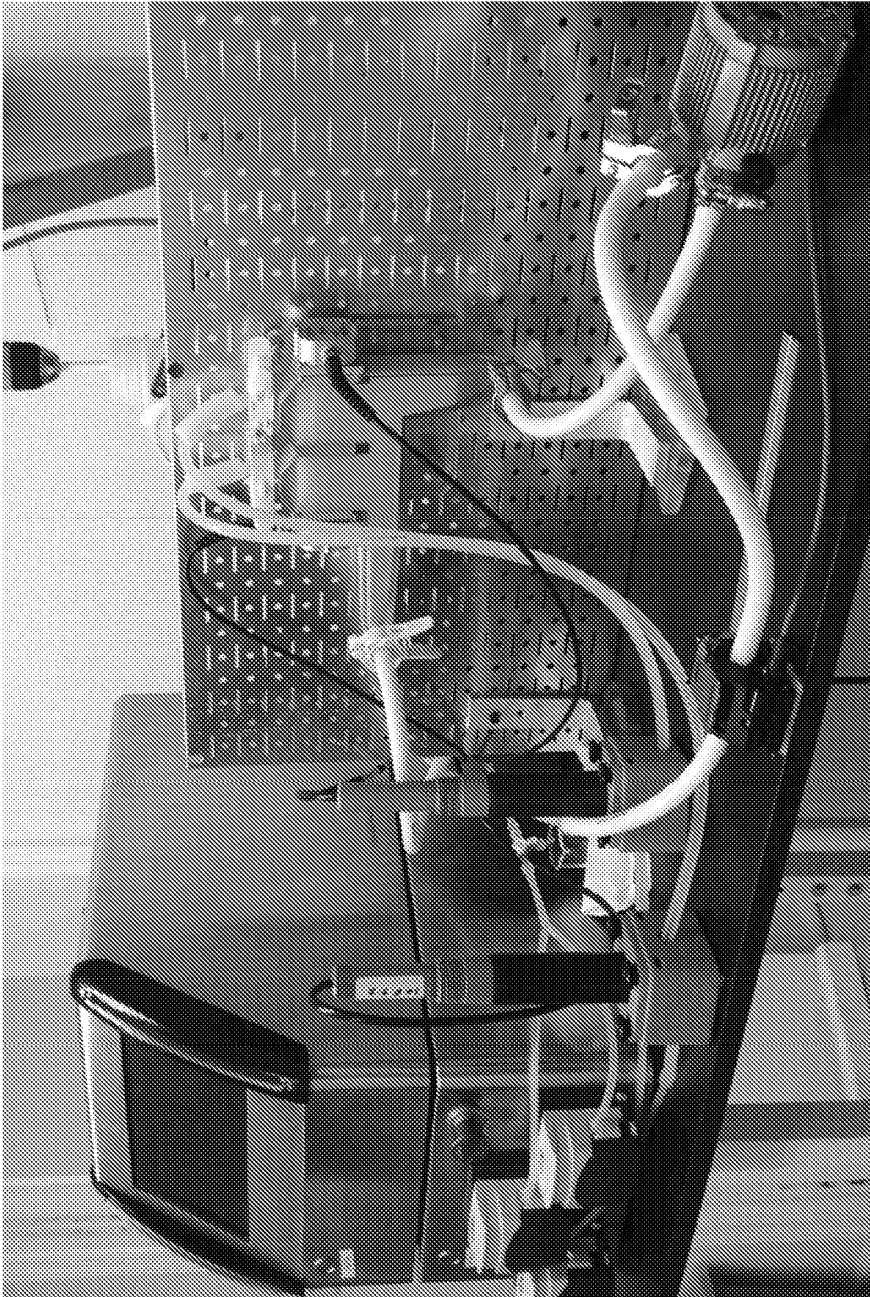


FIG. 18

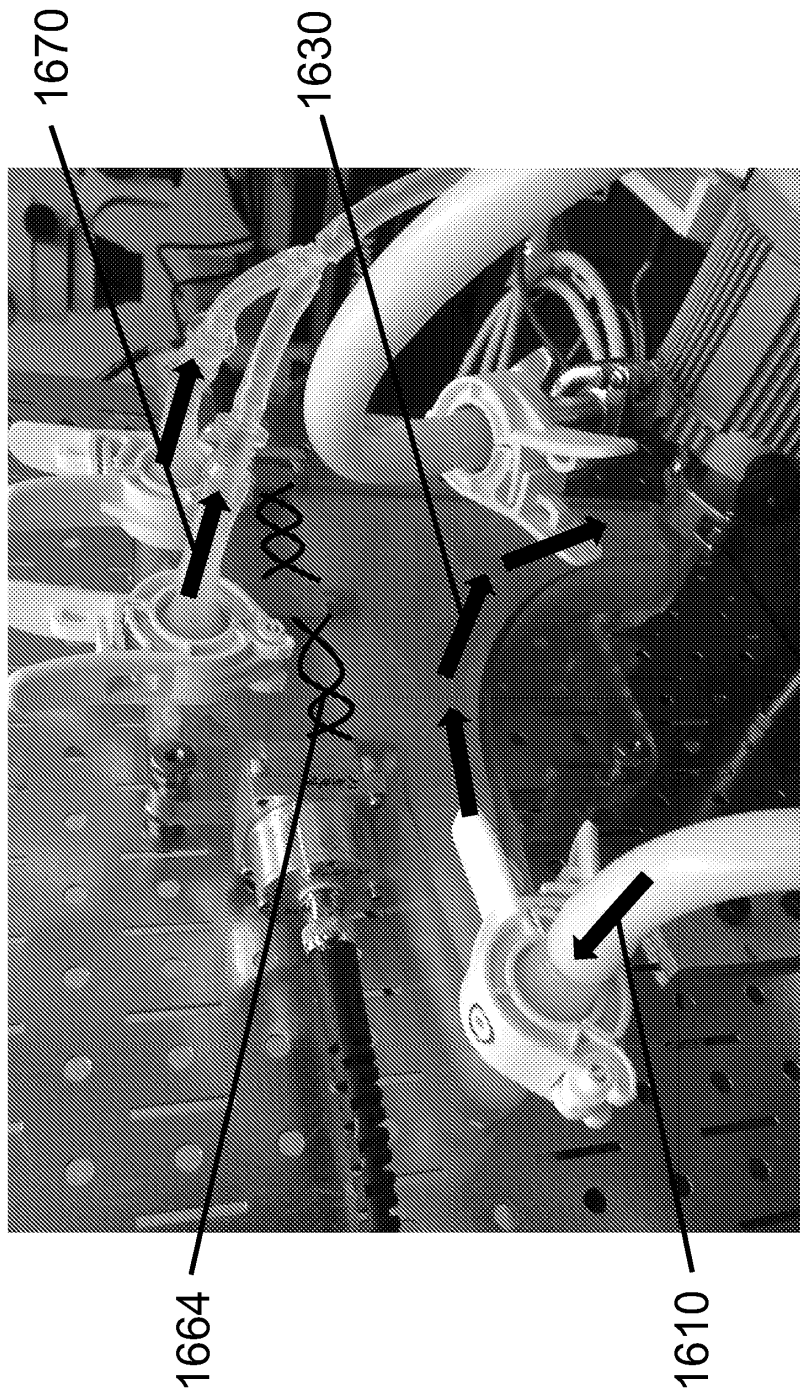


FIG. 19

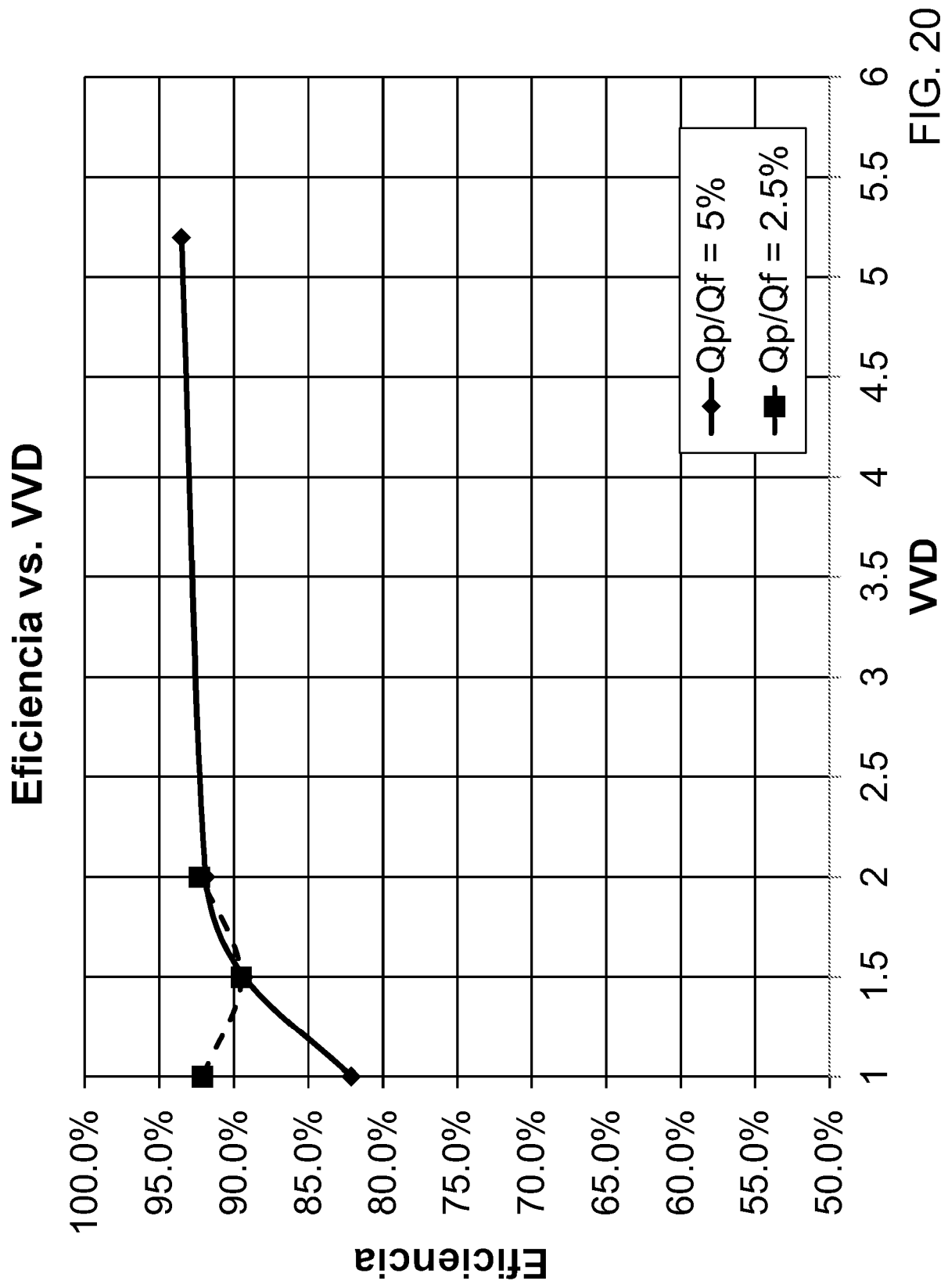


FIG. 20

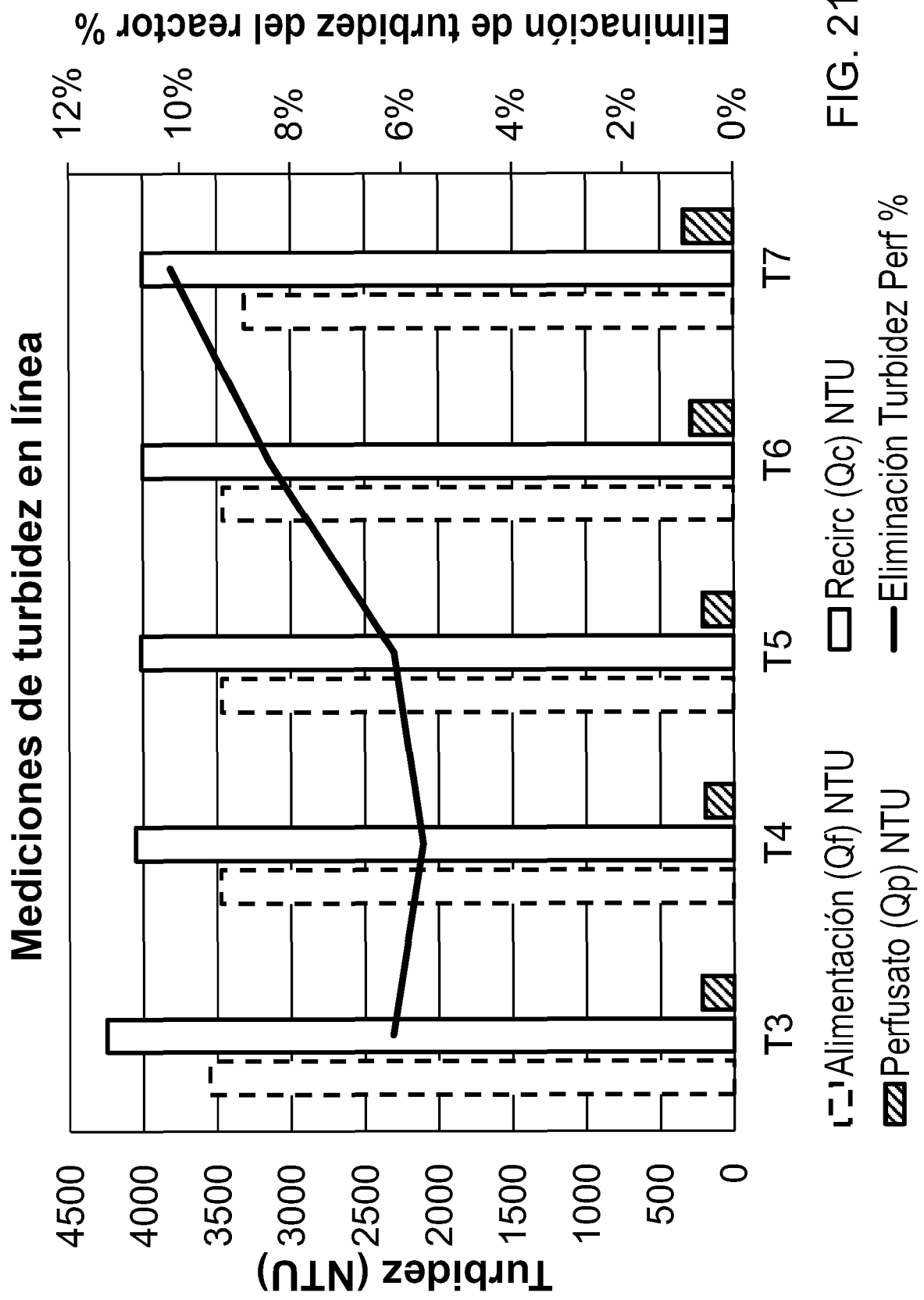


FIG. 21

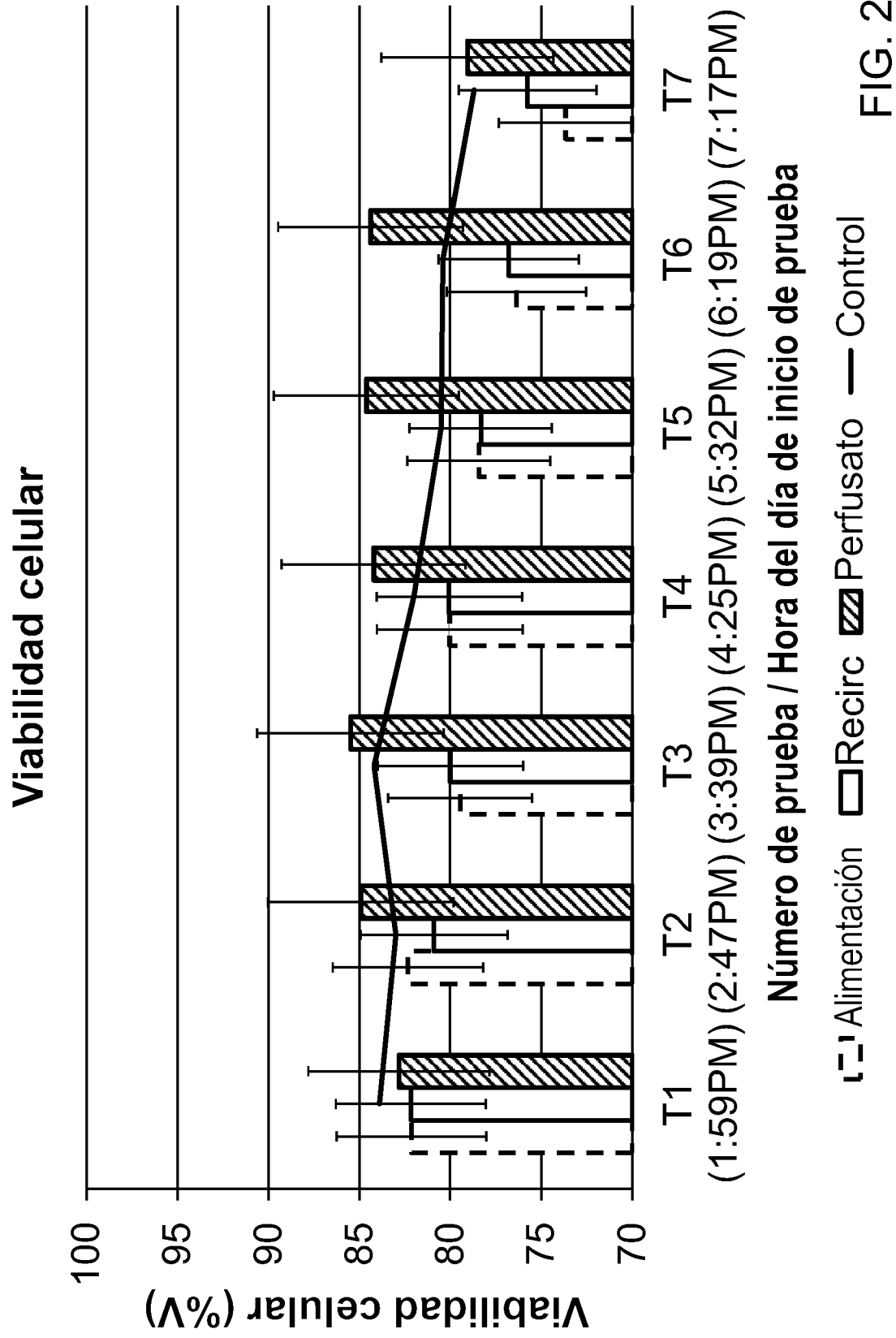
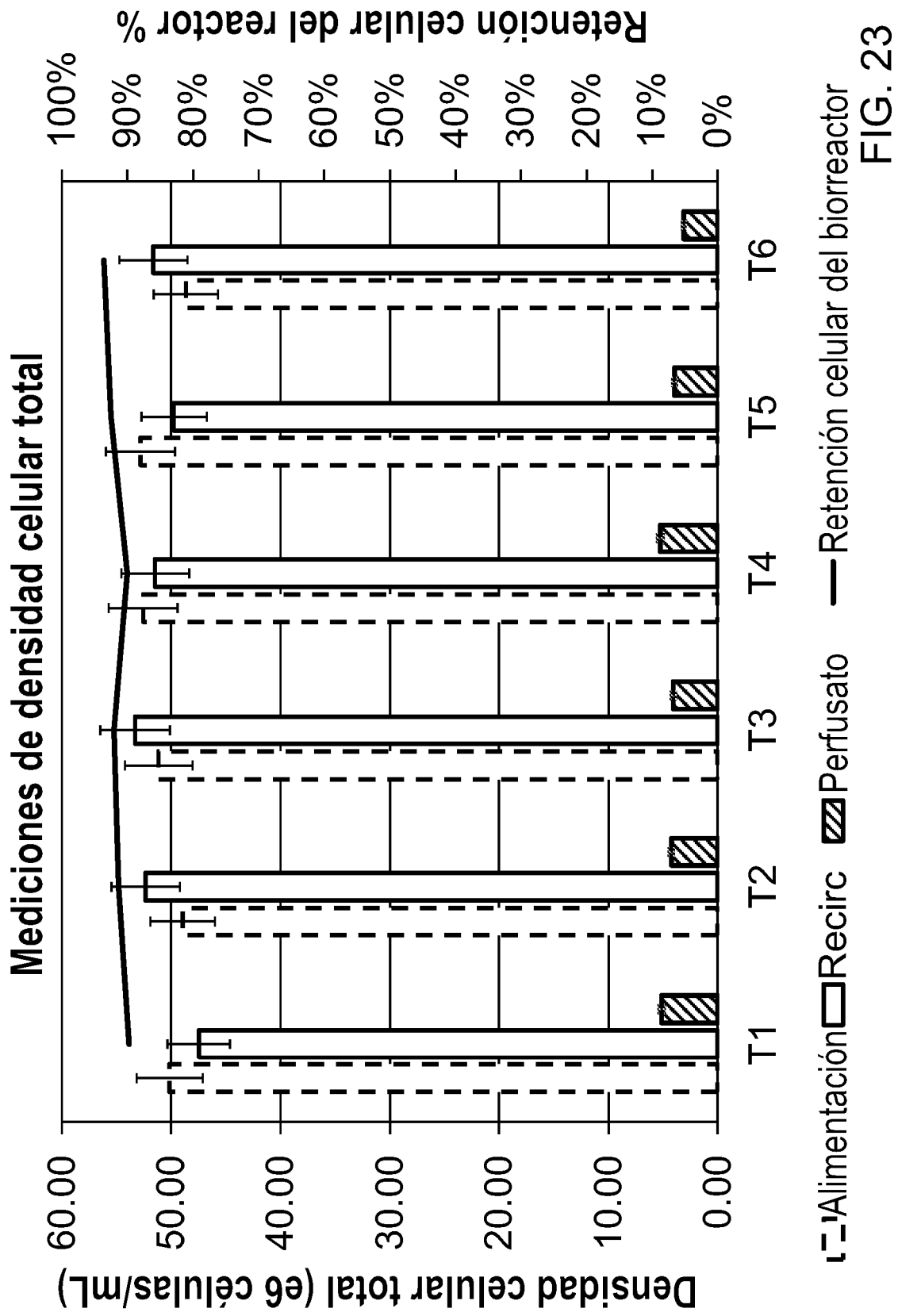


FIG. 22



Mediciones de viabilidad celular

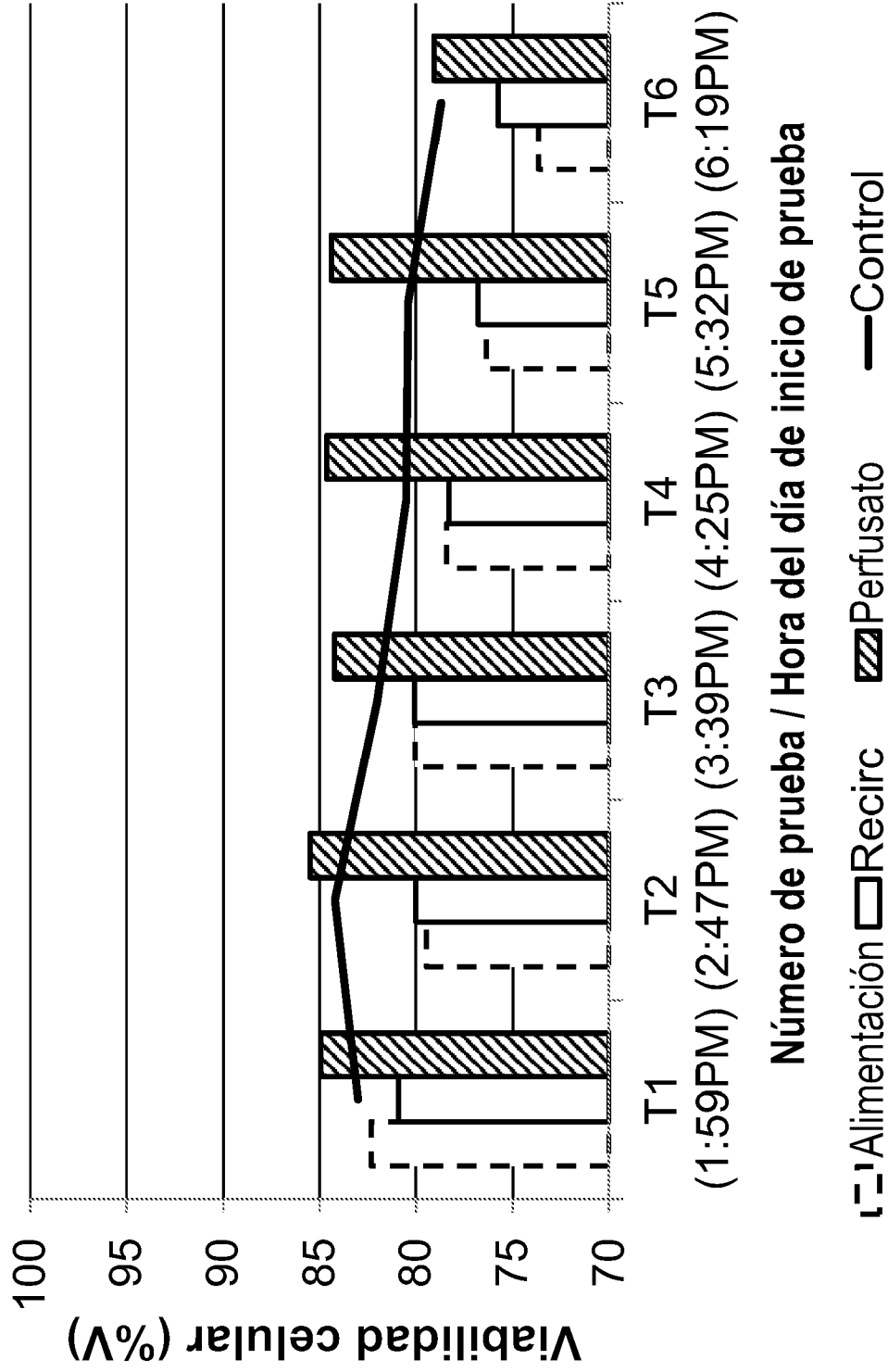


FIG. 24

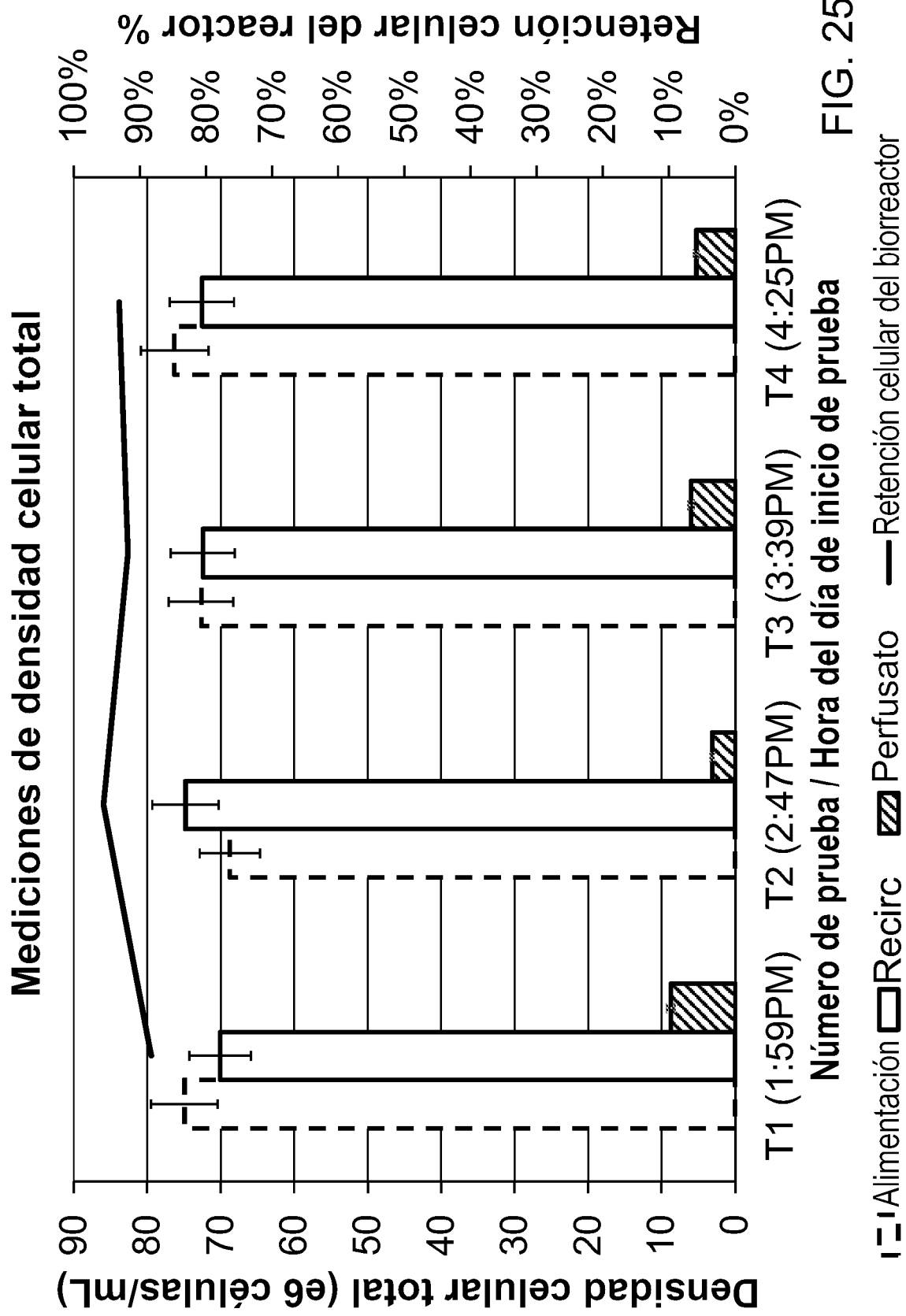


FIG. 25

Mediciones de viabilidad celular

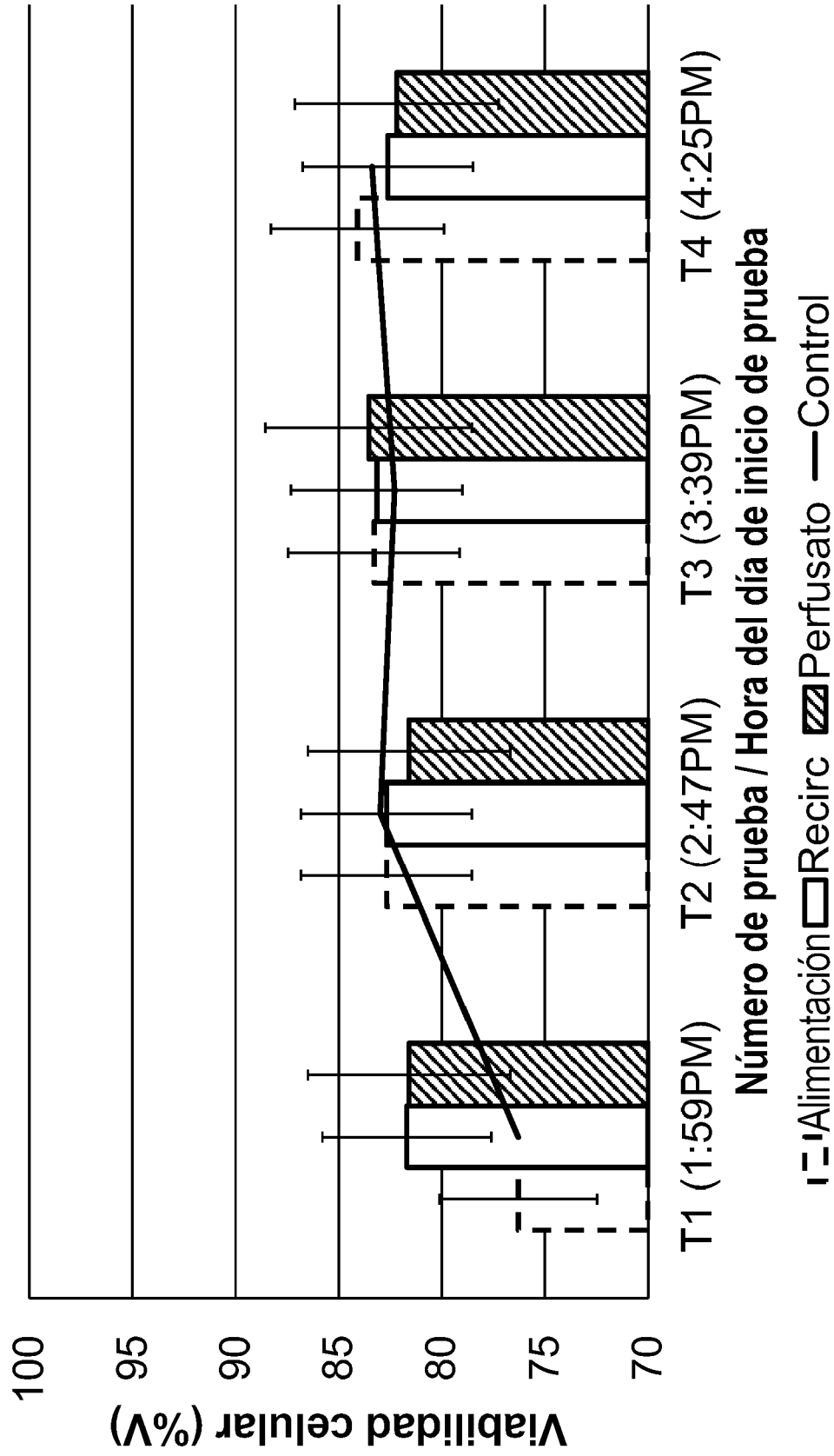


FIG. 26

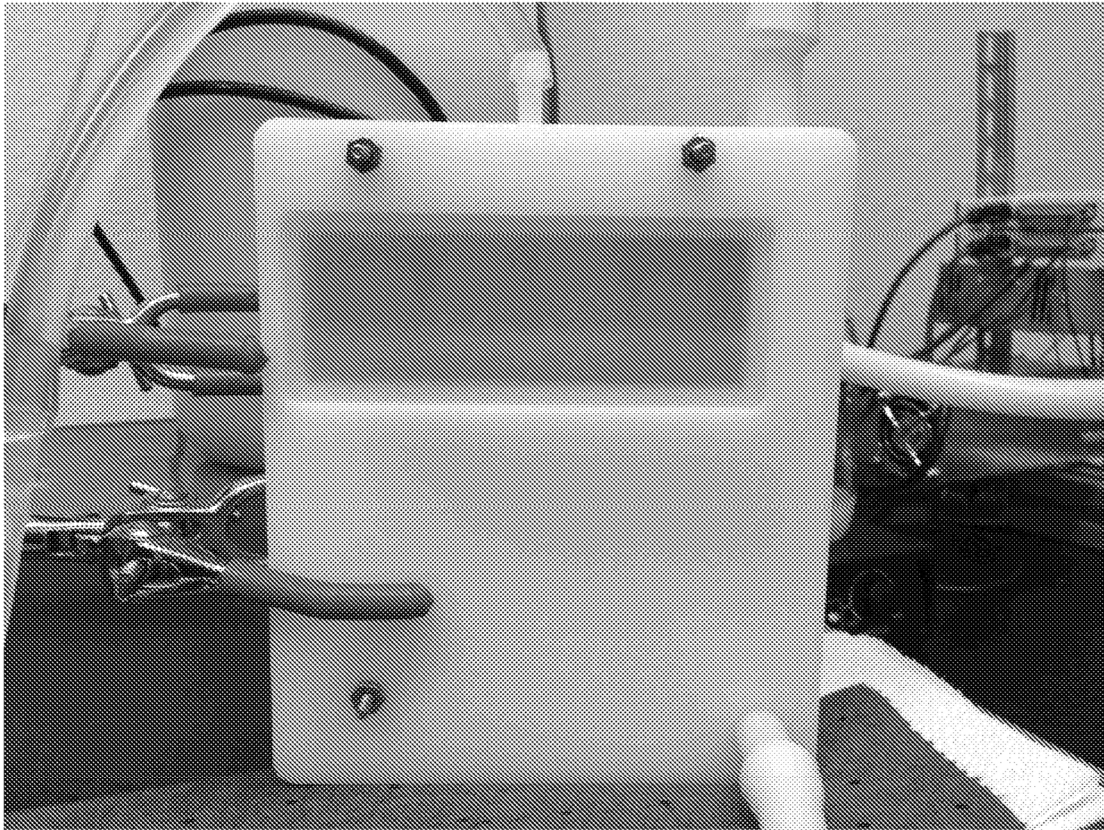


FIG. 27

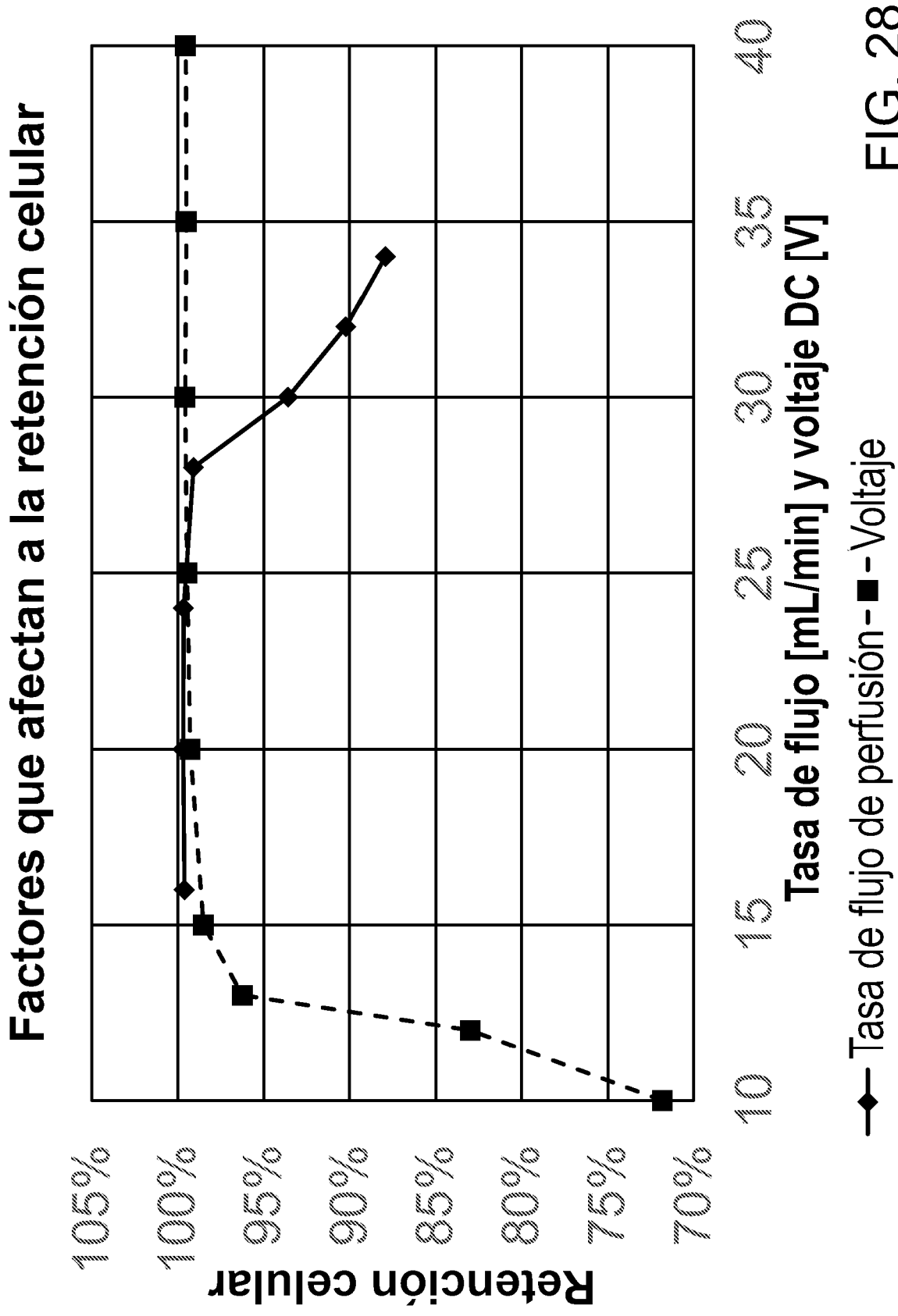


FIG. 28

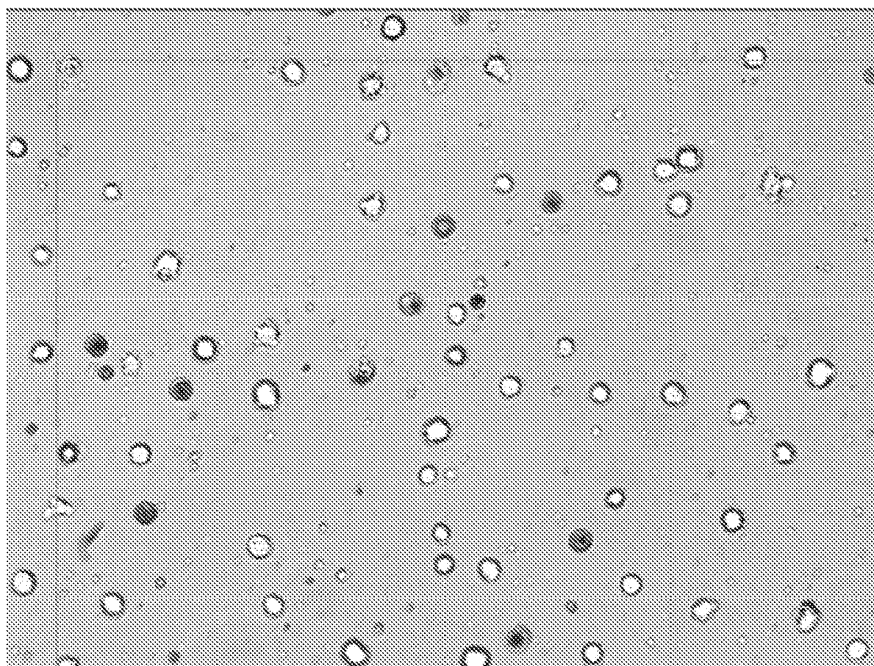


FIG. 29A

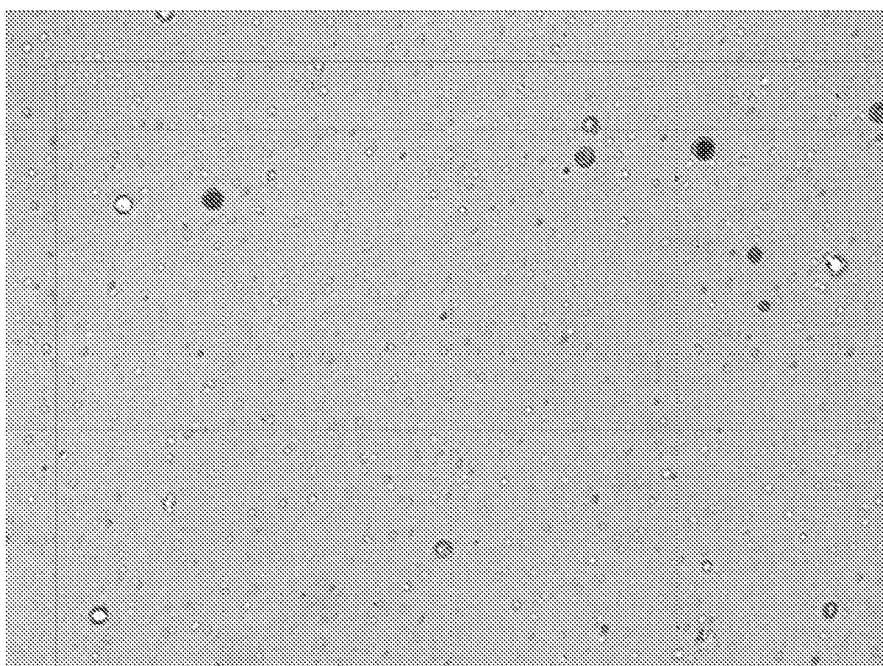
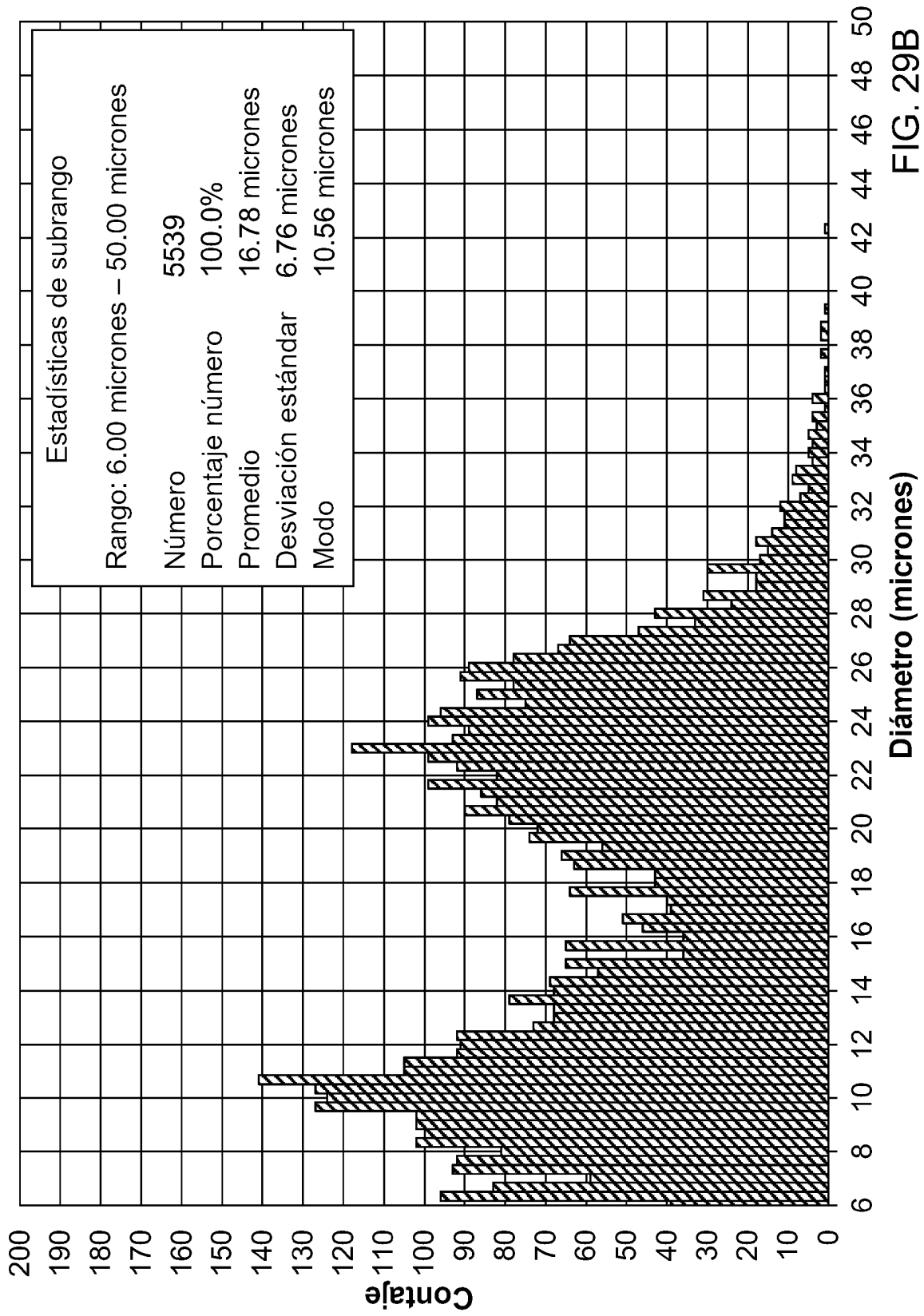
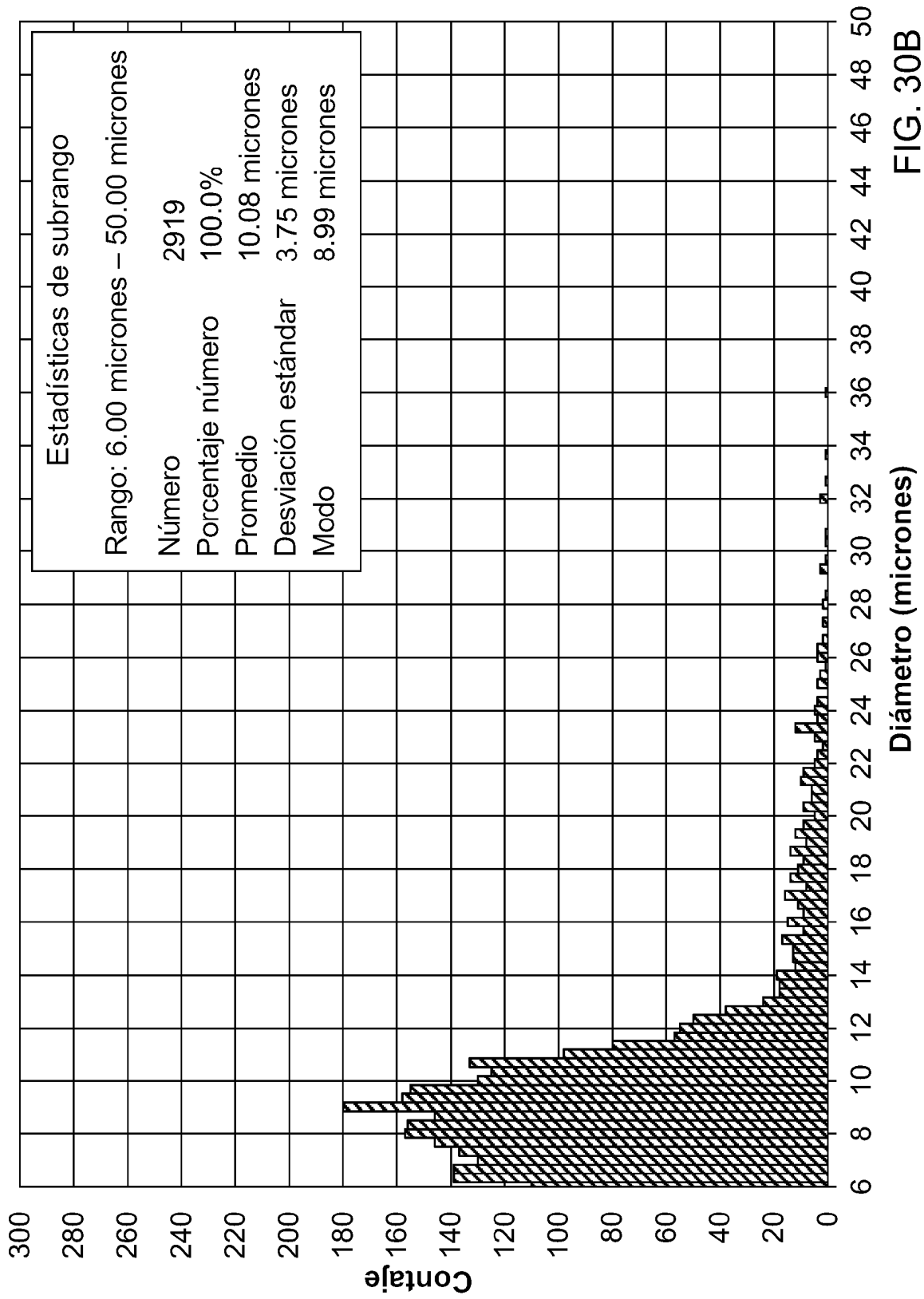


FIG. 30A

Distribución de diámetro



Distribución de diámetro



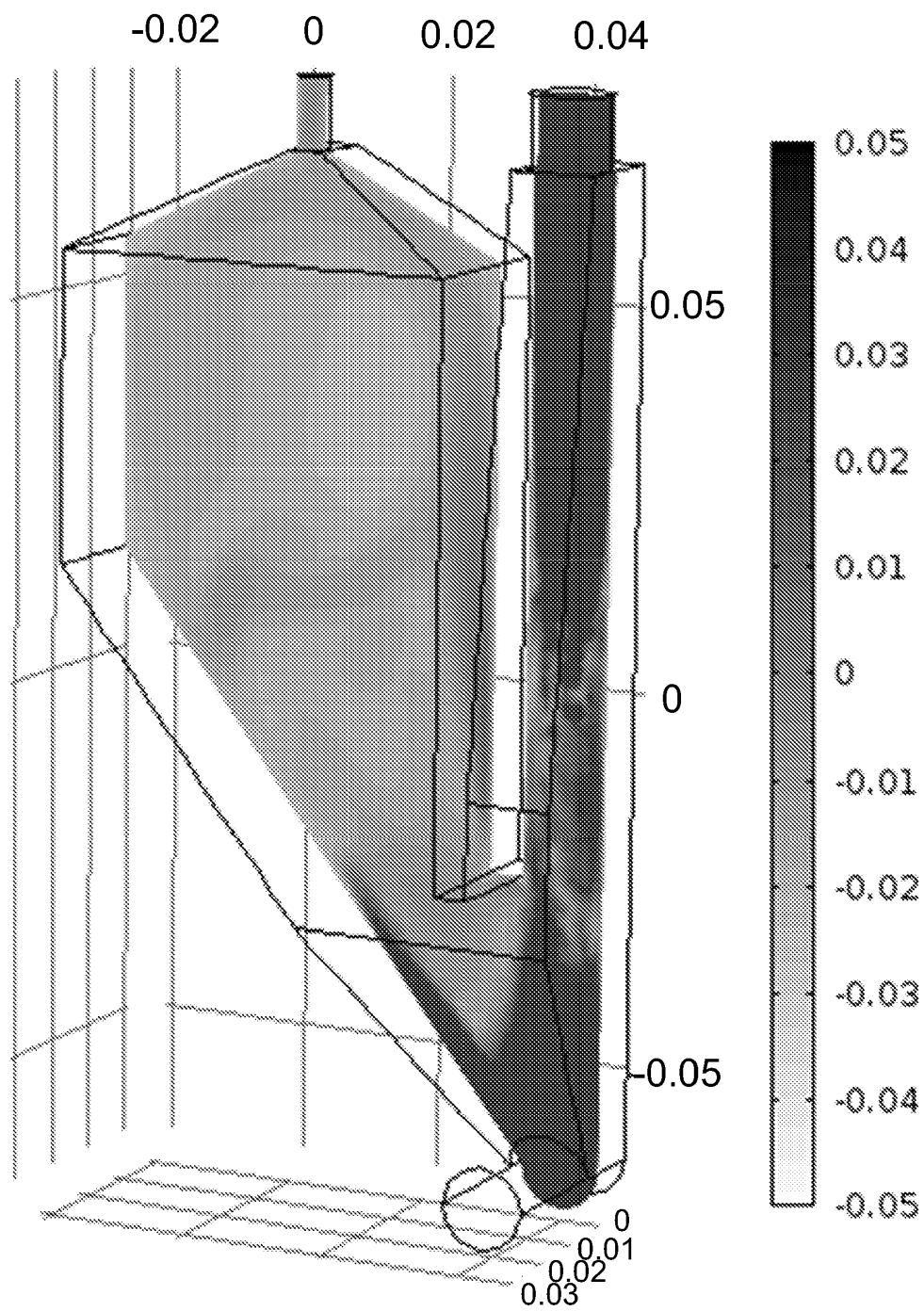


FIG. 31

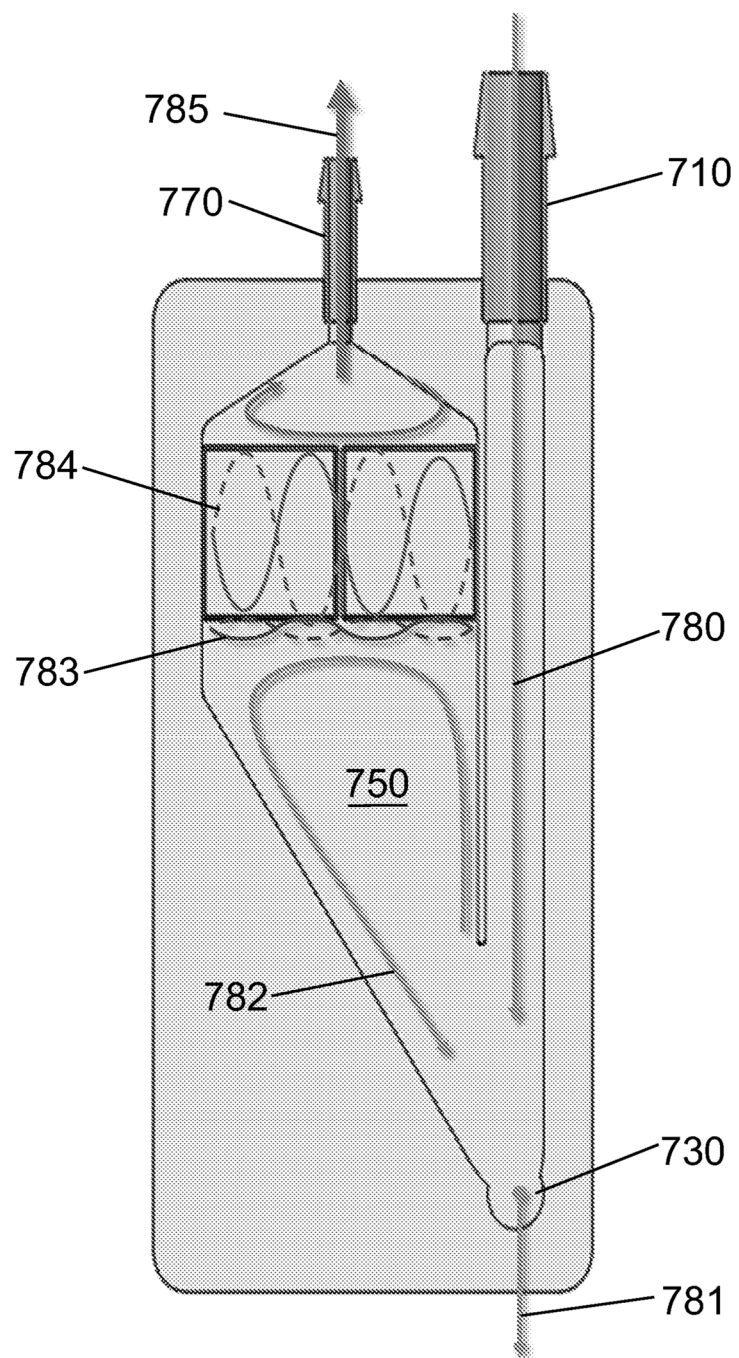


FIG. 32

FIG. 33

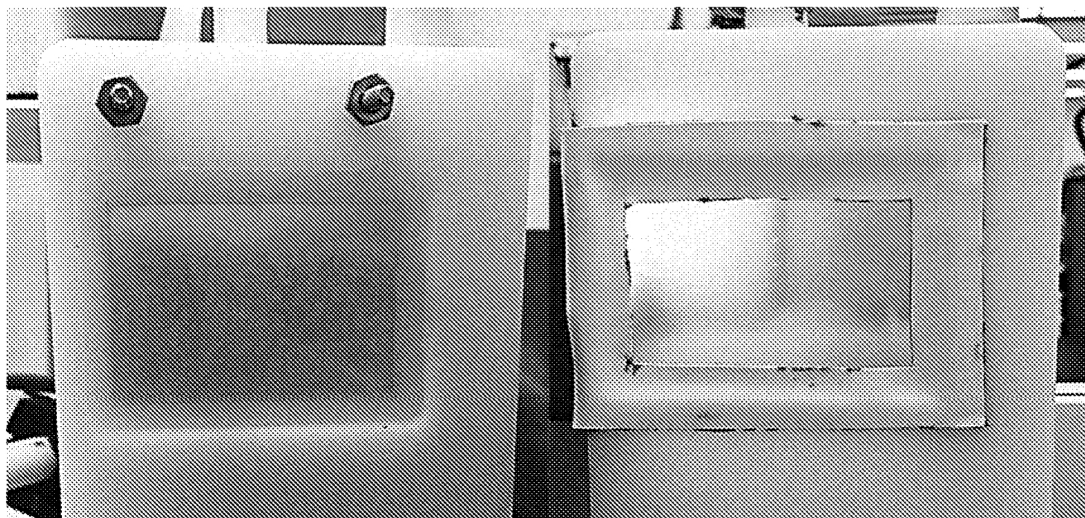


FIG. 33

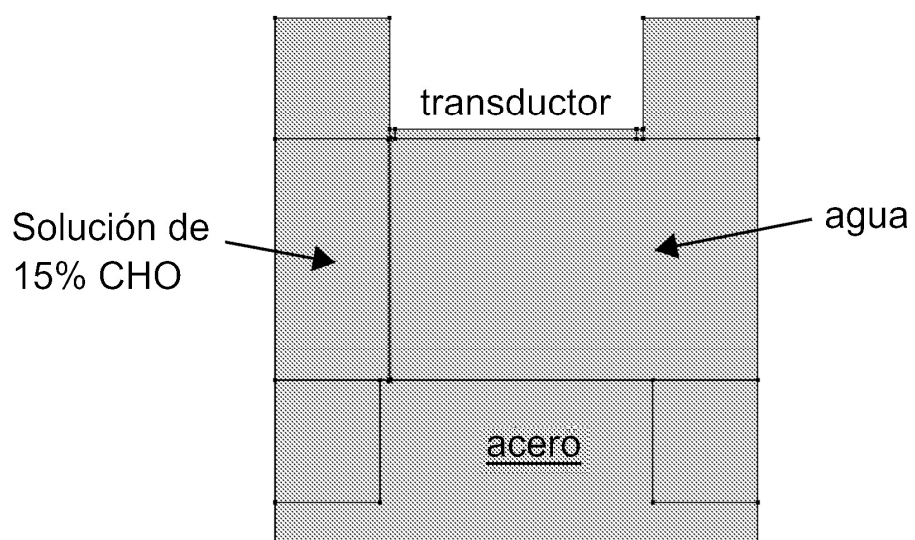


FIG. 34

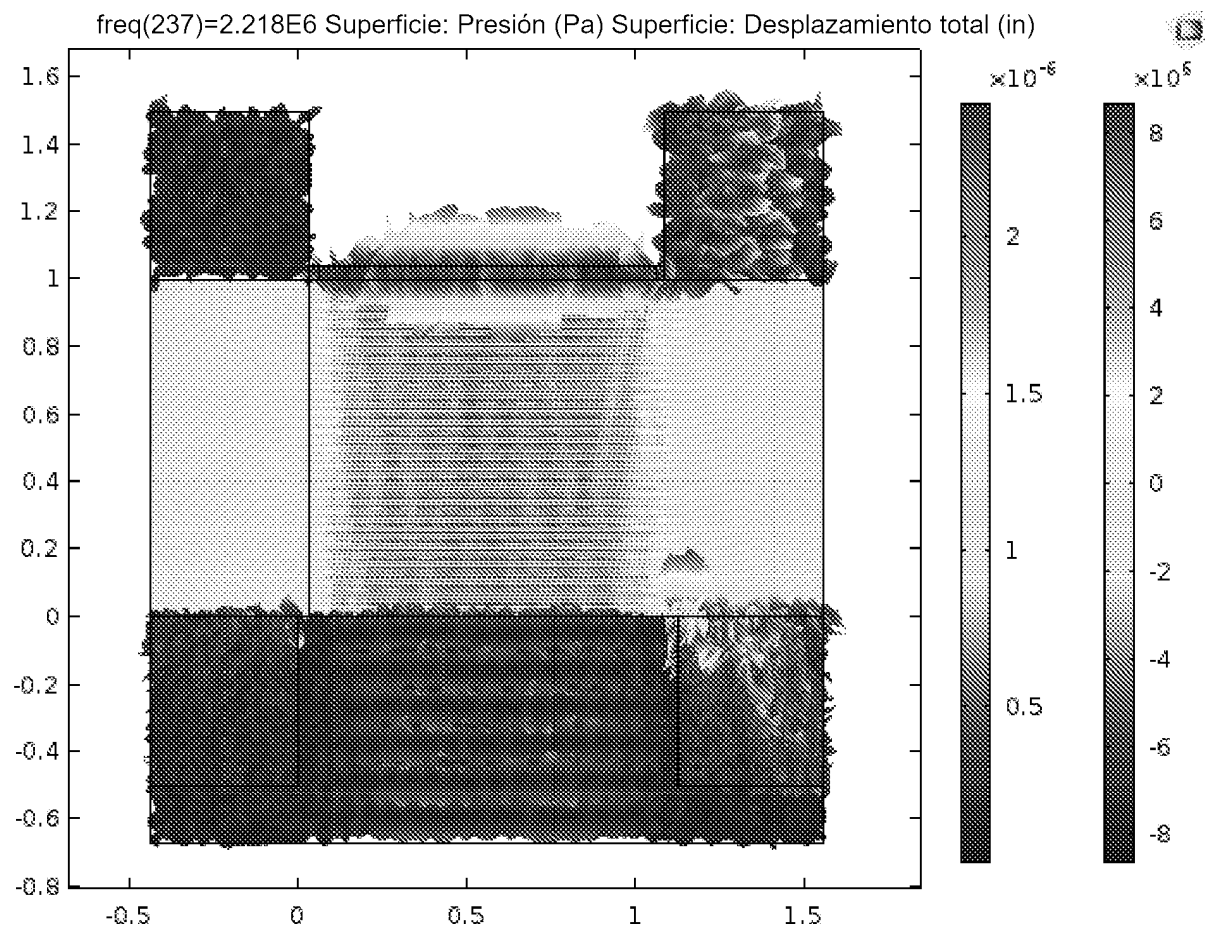


FIG. 35A
p

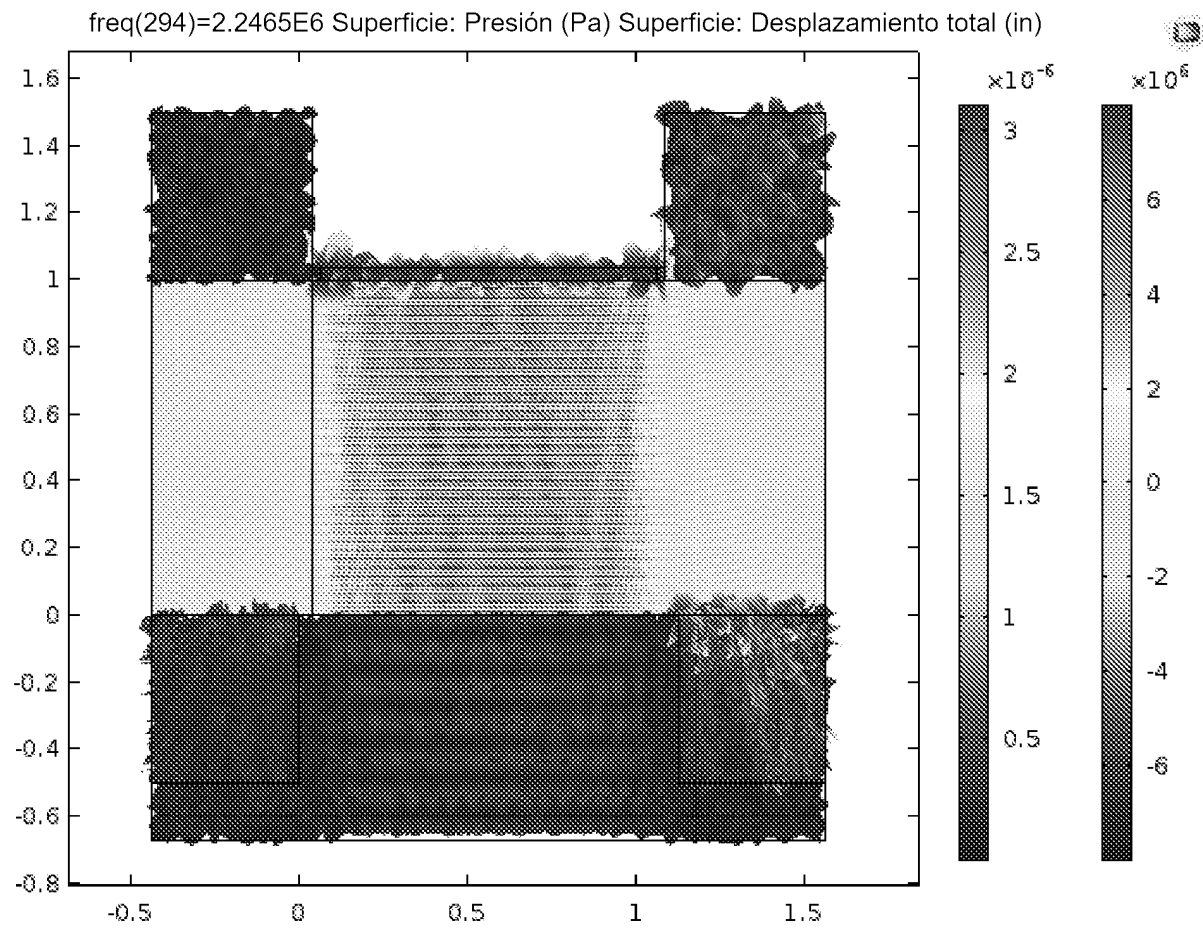


FIG. 35B

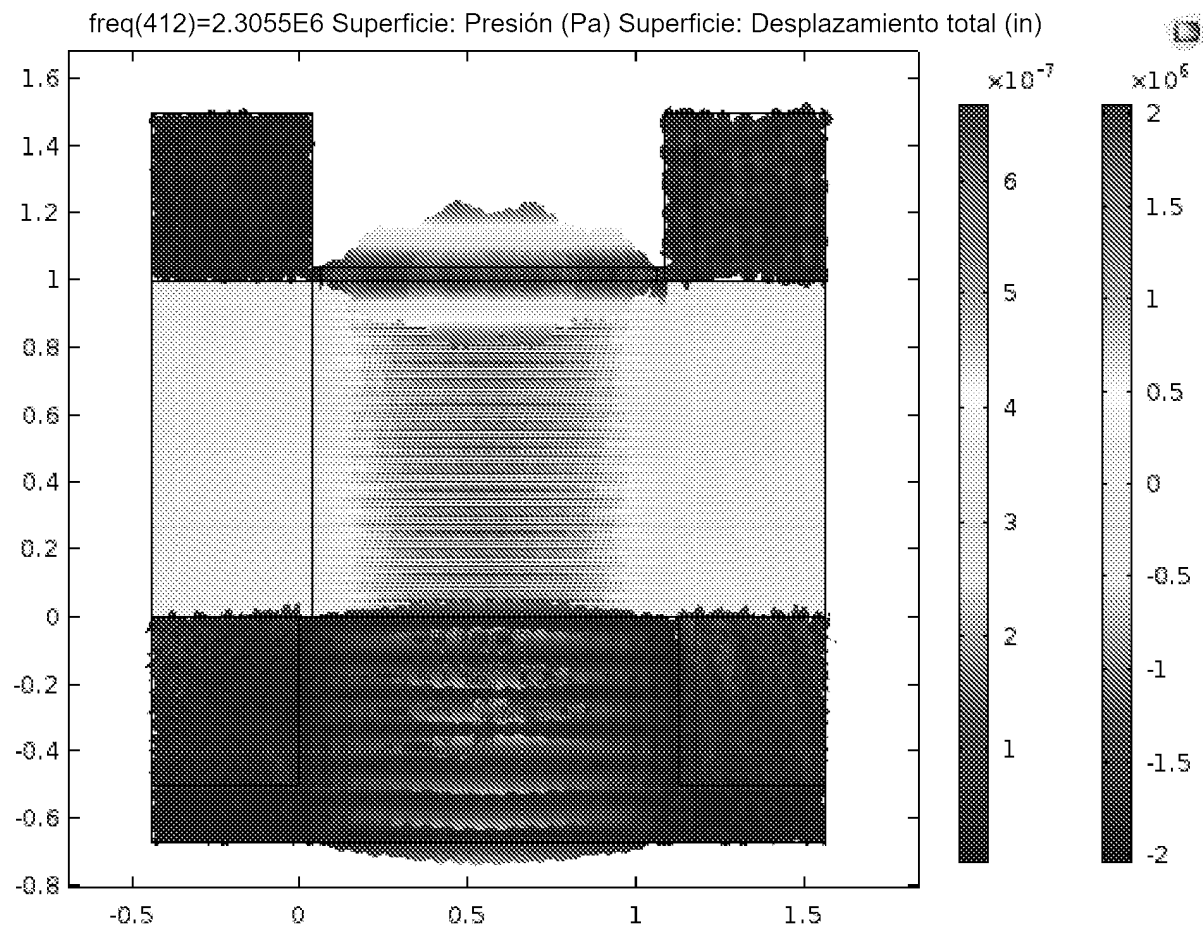
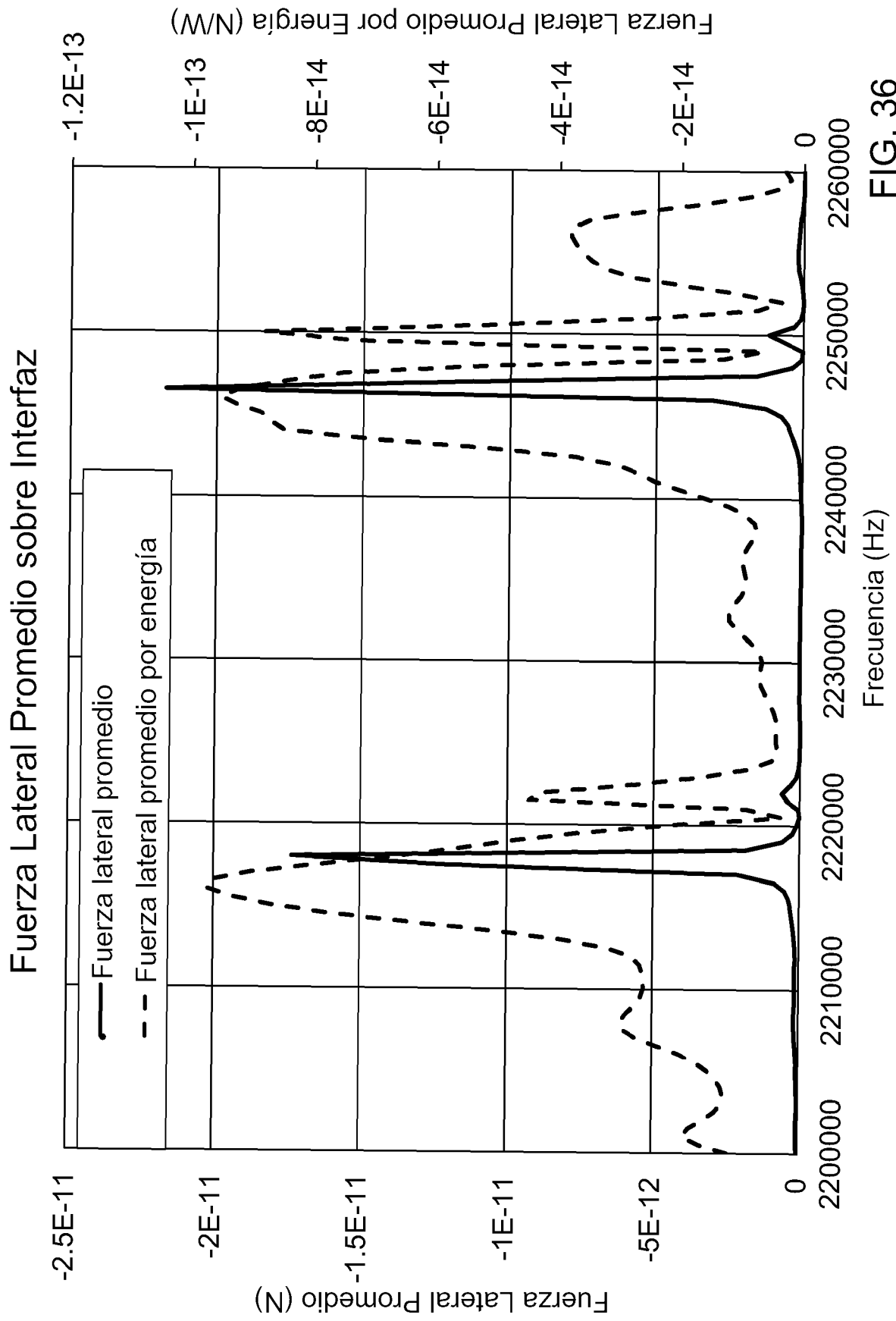


FIG. 35C



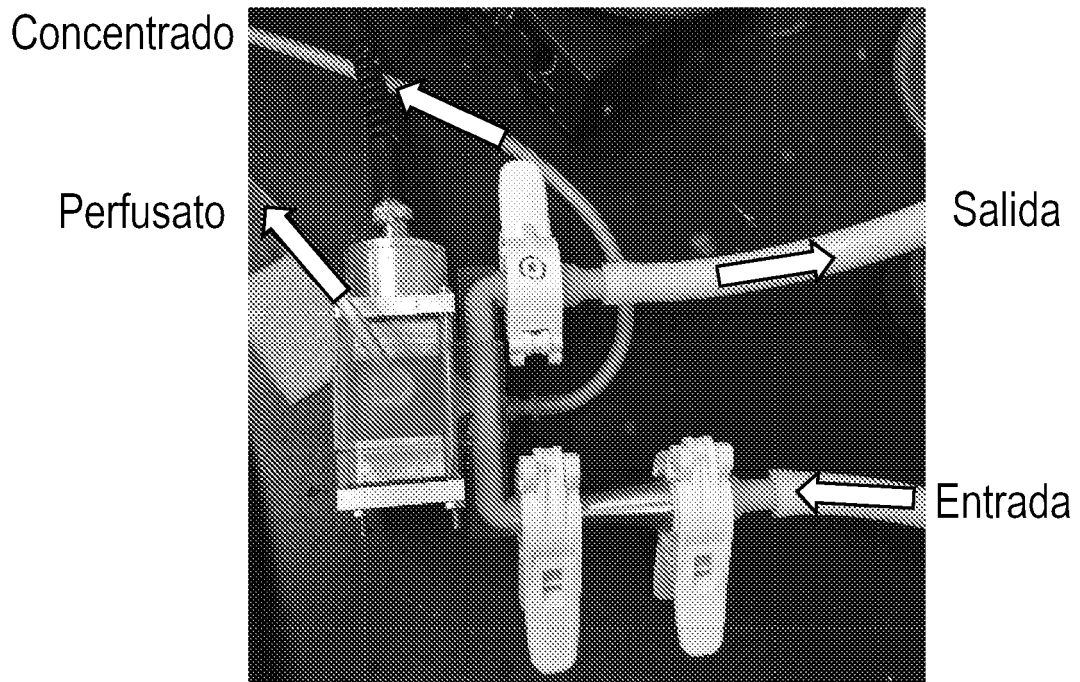


FIG. 37

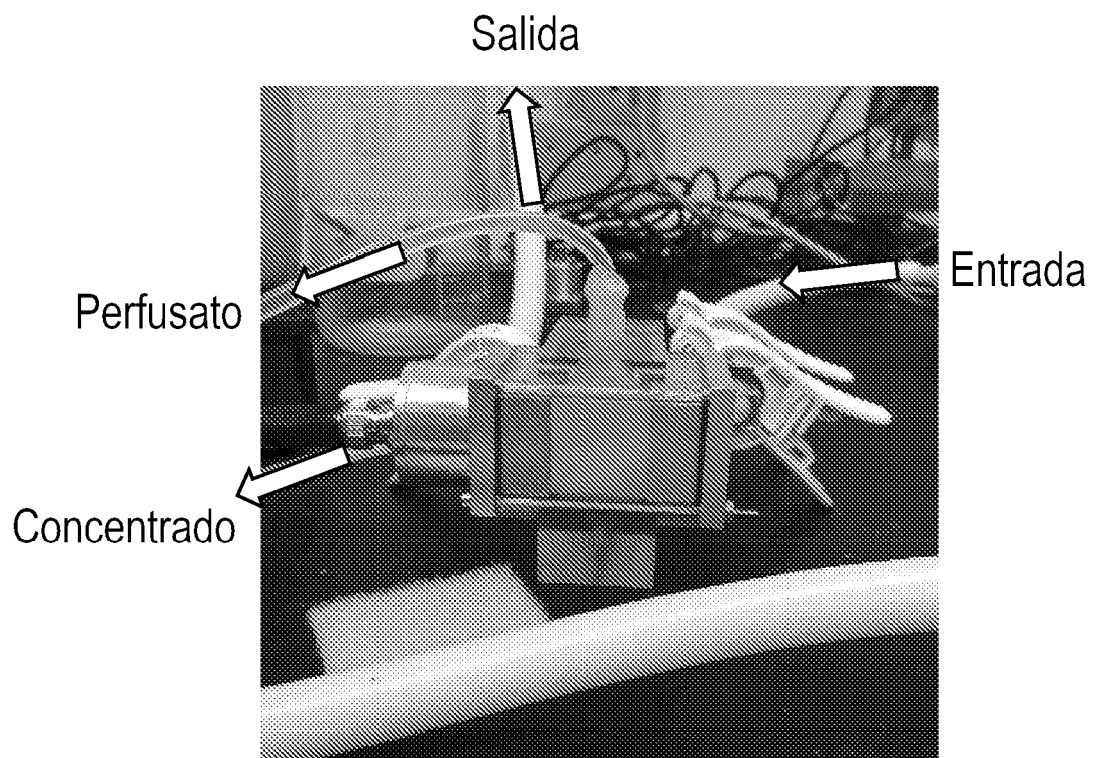


FIG. 38

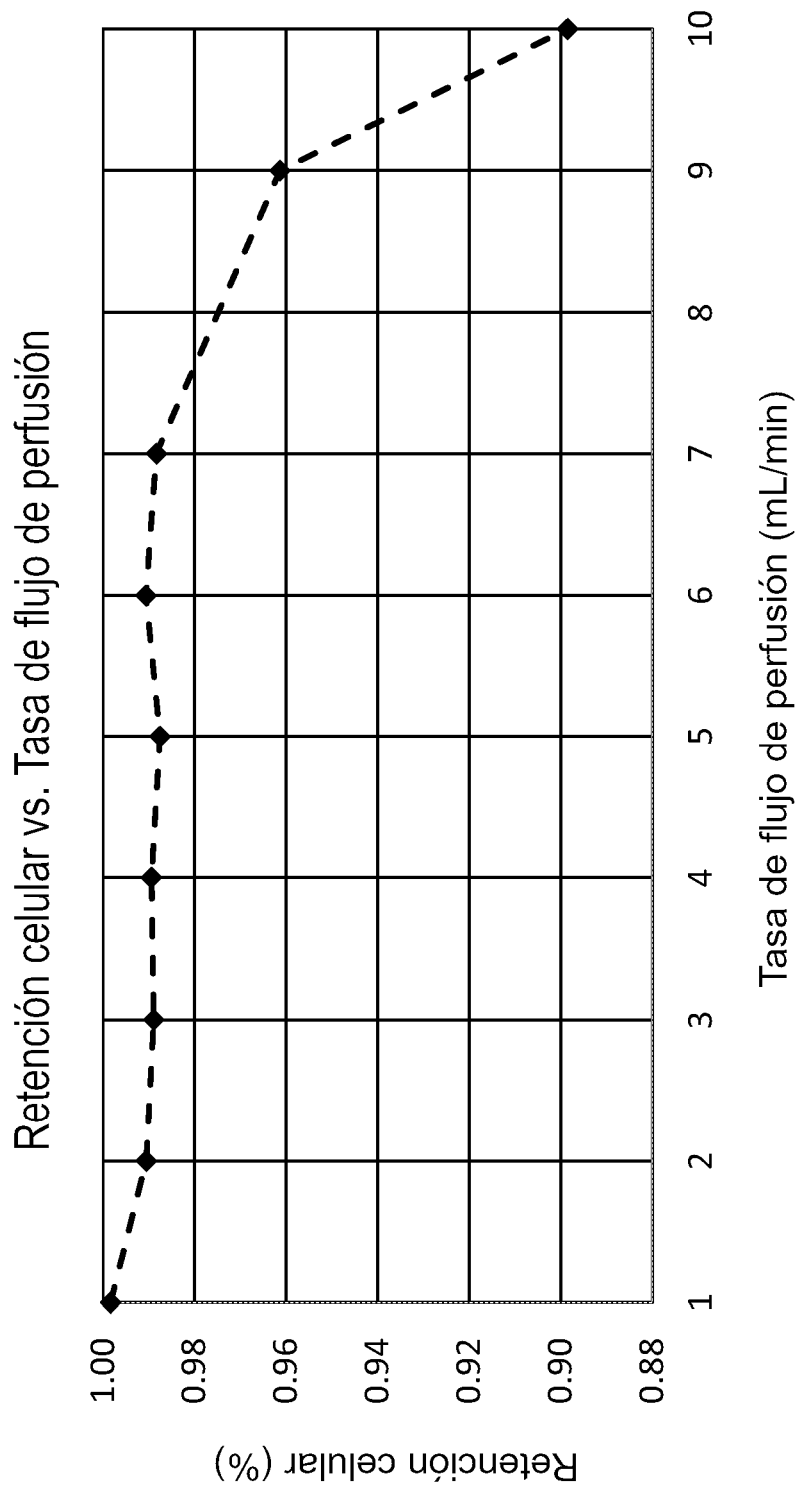


FIG. 39

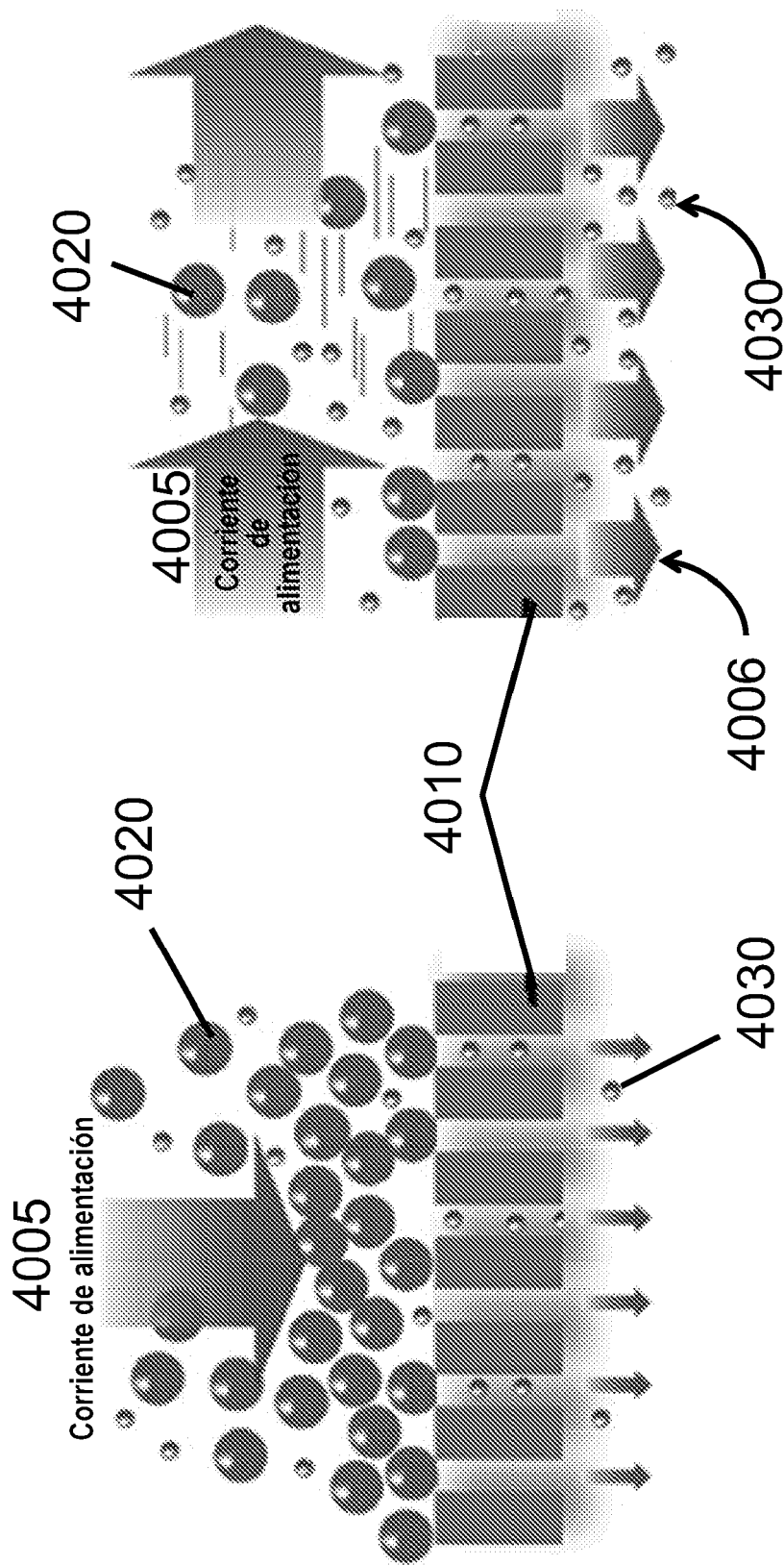


FIG. 40

