



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 074**

51 Int. Cl.:
B03C 1/28 (2006.01)
B03C 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08803237 .0**
96 Fecha de presentación : **26.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2190585**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **Separación magnética de elevado gradiente de material biológico.**

30 Prioridad: **11.09.2007 DE 10 2007 043 281**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73 Titular/es: **X-ZELL BIOTECH Ltd.**
404 Soi Panit Anant (Pridi Panomyong 42)
Sukhumvit 71
Wattana, Bangkok 10110, TH

72 Inventor/es: **Malasit, Prida y**
Bhakdi, Sebastian Chakrit

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 074 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

Separación magnética de elevado gradiente de material biológico

La invención se refiere a una aplicación de la tecnología de separación magnética de elevado gradiente (HGMS) para la separación y la purificación de material biológico.

5 La separación y la purificación de determinadas partículas a partir de suspensiones de partículas heterogéneas tienen gran importancia para una variedad de métodos analíticos, especialmente en el campo de la investigación biomédica. Generalmente, las partículas que se van a purificar, denominadas "partículas diana" de aquí en adelante, difieren con frecuencia solamente de forma mínima del resto de las partículas contenidas en la suspensión, denominadas "partículas no diana" de aquí en adelante. En el caso de las partículas diana y las partículas no diana, se trata frecuentemente de células o de fragmentos de células, sin embargo, pueden ser cualquier otra sustancia biológica.

10 Algunos procedimientos de separación establecidos utilizan las propiedades magnéticas de las partículas diana, en donde las partículas diana pueden tener propiedades magnéticas "intrínsecas" naturales, o en donde las partículas diana se marcan mediante una fijación dirigida de partículas magnéticas sintéticas antes del procedimiento de separación real.

15 Las partículas magnéticas intrínsecas son, por ejemplo, glóbulos rojos, con la condición de que la hemoglobina contenida en ellos esté presente en forma desoxigenada u oxidada, pero no en forma oxigenada. En este sentido, desoxigenada significa que no es portadora de oxígeno y oxigenada significa que es portadora de oxígeno. En el último caso, la molécula de hemoglobina es portadora de una molécula de oxígeno con una unión no covalente, es decir, una unión reversible. De la que hay que diferenciar la forma oxidada de la hemoglobina, en la que los átomos de oxígeno u otros átomos oxidados, están unidos de forma covalente, es decir de forma irreversible, al átomo central de hierro de la molécula de hemoglobina. Entonces, los orbitales del átomo de hierro central, contenido en la molécula de hemoglobina, son portadores de electrones desapareados, tanto en la forma desoxigenada como en la forma oxidada (pero no en la forma oxigenada), cuya rotación desapareada posibilita la inducción de polos magnéticos en el átomo de hierro, mediante la aplicación de un campo magnético. Sin embargo, un campo magnético aplicado de tipo convencional, no ejerce ninguna fuerza magnética sobre una partícula que contiene tales átomos de hierro, puesto que debido al diámetro muy pequeño del átomo, las fuerzas magnéticas de atracción y repulsión en el polo norte y en el polo del sur de los átomos de hierro polarizados, mantienen el equilibrio. También la partícula perderá su polarización magnética después de la eliminación del campo magnético. Este tipo de magnetismo se conoce como "paramagnetismo". Una forma especial de paramagnetismo se denomina también a veces "superparamagnetismo". Entre ambas formas, sin embargo, no existe físicamente una separación clara, por lo tanto, a continuación, los términos "paramagnetismo" y "paramagnético" abarcarán los términos "superparamagnetismo" y "superparamagnético".

20 También las partículas sintéticas, ordinarias, utilizadas para marcar magnéticamente las partículas diana, son paramagnéticas y contienen generalmente, cantidades menores, muy similares a la hemoglobina oxidada, de hierro oxidado o de otras sustancias magnetizables. Por otra parte, son idealmente tan pequeñas que forman coloides estables en suspensión, es decir, no sedimentan durante largos períodos de tiempo (de meses a años); por lo tanto, su diámetro mide en general 30-200 nm. Las partículas de este tipo disponibles en el comercio, se distribuyen solas o unidas a anticuerpos, por ejemplo, por chemicell GmbH (Eresburgstrasse 22-23, D-12103 Berlín, Alemania), micromod Partikeltechnologie GmbH (Friedrich-Barnewitz-Str.4, D-18119 Rostock, Alemania) o Miltenyi Biotech GmbH (Friedrich Ebert Straße 68, D-51429 Bergisch Gladbach, Alemania).

25 Un método establecido para purificar partículas paramagnéticas, es decir, para separarlas de suspensiones de partículas, es la creación de gradientes de campos magnéticos extremadamente altos. Un gradiente de campo magnético suficientemente alto, conduce al hecho de que los polos norte y sur de las partículas paramagnéticas, experimentan una diferencia entre las fuerzas de atracción y repulsión y, por lo tanto, en conjunto una fuerza magnética dirigida. Esta tecnología se conoce bajo la denominación separación magnética de elevado gradiente (HGMS).

30 Hay que distinguir entre los separadores magnéticos de elevado gradiente llamados "internos" y los "externos". Las primeras descripciones de la tecnología de HGMS se referían a separadores internos. Estos se pueden encontrar en Oberteuffer (IEEE Transactions on Magnetics, Mag-9, nº 3, septiembre de 1973:303-306) y en el documento de patente de EE.UU. nº 3.676.337. Un material ferromagnético en un recipiente adecuado, no magnético que sirve como cámara de separación, se introduce en un fuerte campo magnético homogéneo que se puede generar con un electroimán o con un imán permanente en forma de herradura (dipolo magnético). En este caso, el material ferromagnético se denomina generalmente "matriz"; puede ser filamentosa (similar a un alambre o similar a un filamento), esférica (similar a una bola) o tener otra forma cualquiera, por ejemplo, puede consistir en una chapa de acero troquelada. El material ferromagnético de la matriz sufre una magnetización que se corresponde a su susceptibilidad magnética X, a través del campo aplicado externamente. Partiendo de la superficie del material de la matriz, se crean gradientes de campo magnético que pueden alcanzar más de 100 Teslas por centímetro; por lo que la magnitud del gradiente está en relación inversa al diámetro de los elementos filamentosos o esféricos utilizados. Los separadores magnéticos de elevado gradiente "externos" alcanzan gradientes elevados semejantes, a través de una

disposición técnica especial, más compleja de los imanes, fuera de la cámara de separación real, según lo descrito, por ejemplo, en los documentos WO 98/055236, WO 99/019071 o la patente de EE.UU. nº 6.241.894 B1. Como diferencia fundamental, no hay necesidad de una matriz, dentro de las cámaras de separación.

5 Hoy en día, los separadores magnéticos de gradiente elevado internos, son los más utilizados en la investigación biomédica. Los documentos de patente de EE.UU. nº 4.664.796 y nº 5.200.084 describen realizaciones especiales de tales separadores.

10 El documento de patente de EE.UU. nº 5.200.084 describe un aparato y un procedimiento que se dirige particularmente a la purificación de pequeñas cantidades de material biológico en los pocillos de una placa de microvaloración. Entre otros, se describen purificaciones de hasta 83% de células CD4 marcadas con partículas paramagnéticas, procedentes de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMCs).

15 Según los conocimientos del inventor, solamente una realización técnica de un separador magnético de gradiente elevado interno, consigue actualmente tasas elevadas de purificación, tal y como se describe en los documentos WO 96/26782 y EP 0.942.766 B1. Para evitar uniones no específicas de partículas que no son diana a la matriz, que perjudican el resultado de la purificación descrita en los documentos mencionados, la cámara de separación de ese separador contiene una matriz revestida con polímero. El polímero se estira sobre la matriz en distintas etapas, tal y como se describe detalladamente en el documento WO 96/26782. De acuerdo con la información dada por los autores, la cámara de separación fabricada de ese modo, se caracteriza por el hecho de que el polímero forma un revestimiento impermeable duro, cerrado, impermeable a los líquidos e impermeable a los iones que contiene menos de 1% de agua, en el material ferromagnético de la matriz; y que la matriz revestida con polímero llena el 60-70% del volumen total de la cámara de separación descrita.

20 Además de disminuir una unión no específica de las partículas no diana con la matriz, este revestimiento de acuerdo con las publicaciones mencionadas, se supone que también evita el deterioro del material biológico que se va a separar, mediante el contacto directo con el material ferromagnético de la matriz (deterioro físico), así como excluir una reacción química del material ferromagnético de la matriz, con la solución tampón utilizada para la suspensión del material biológico, puesto que los iones liberados también podrían conducir a un deterioro del material biológico que se va a separar (deterioro químico). Sin embargo, ambos tipos de deterioro, se deben considerar hipotéticos según los conocimientos del inventor, puesto que no existen descubrimientos científicos garantizados a este respecto. Por otra parte, Paul y otros informaban en *Clinical and Laboratory Haematology*, 7, 1985: 43-53, lo contrario sobre la falta de deterioro de la morfología y de la viabilidad de células sanguíneas y de fragmentos de células sanguíneas, que pasaban a través de una matriz de acero inoxidable sin tratar de una columna de separación HGMS.

25 Este tipo de cámaras de separación descritas son costosas debido al tiempo requerido para su proceso de producción, particularmente para el revestimiento de la matriz. Están a disposición comercial en Miltenyi Biotech GmbH (loc.cit.).

30 Se consiguen purificaciones altas, especialmente cuando se utilizan con partículas marcadas con partículas paramagnéticas sintéticas procedentes de suspensiones de partículas.

35 También se investigó la aplicación de dicha cámara de separación con una matriz revestida sobre partículas paramagnéticas intrínsecas (naturales). En este caso, glóbulos rojos infectados con malaria servían como partículas paramagnéticas intrínsecas. Los agentes patógenos de la malaria, parásitos del género *Plasmodium*, del grupo de los protozoos, atacan selectivamente los glóbulos rojos y tienen la propiedad de oxidar el átomo de hierro central, en hierro trivalente, de la molécula del grupo hemo libre en el glóbulo rojo infectado. Esto es, como se ha descrito anteriormente, paramagnético. Por lo tanto, los glóbulos rojos infectados con malaria se deben poder separar de glóbulos rojos no infectados y oxigenados, en cámaras de separación de separadores magnéticos de elevado gradiente. Esto fue observado primero en 1981, por Paul y otros (*Lancet*, 11 de julio de 1981: 70-71). Actualmente, las cámaras de separación descritas, disponibles en el comercio, con una matriz revestida, deben conseguir purificaciones de más del 80% (Uhlemann y otros, *MACS&more* 2000; 4 (2): 7-8, Trang y otros, *Malaria Journal* 2004; 3:1-7).

40 Las investigaciones especificadas, sin embargo, se refieren solamente a uno de los cuatro agentes conocidos de la malaria, en seres humanos, a saber *Plasmodium falciparum*, el agente de la malaria tropical, así como otro agente de la malaria en roedores, *Plasmodium berghei*. Otros estudios científicos sobre el total de casi 120 especies conocidas de *Plasmodium*, no están disponibles. Los inventores, sin embargo, saben que la aplicación de las cámaras de separación disponibles en el comercio, para la purificación de glóbulos rojos infectados con *Plasmodium vivax*, el agente de la malaria terciana, que también existe en seres humanos, no conducía siempre a unos resultados satisfactorios.

45 El documento de patente US 5200084 describe un procedimiento para la separación magnética, en la que, por ejemplo, a los líquidos corporales se añaden partículas magnéticas coloidales en una solución tampón. Como solución tampón, se puede utilizar una solución salina biocompatible con 5% de seroalbúmina bovina, así como preferentemente 0,1%-3% de Tamol 850. La solución tampón sirve en una primera etapa del procedimiento para que las partículas magnéticas se unan en gran medida a las partículas diana, en lugar de incurrir en uniones inespecíficas. Después de terminar la primera etapa, la solución así obtenida se coloca en un dispositivo de separación, en el que

se proporcionan bucles de alambre para potenciar un campo magnético exterior.

En el documento de patente US 3826365, se eliminan impurezas de titanio del caolín, a través de una separación magnética. Para ello se emplea una matriz de lana de acero.

5 Del documento de patente US 5536644 se conoce un procedimiento de separación de partículas, para separar una sustancia de un medio líquido. Para ello se añaden partículas magnéticas, bajo condiciones que favorecen una unión química inespecífica.

10 De las explicaciones anteriores es obvio que unas mejoras adicionales de la eficacia de la purificación de la tecnología de HGMS, serían de gran utilidad para el campo de la investigación biomédica. Esto también se aplica en relación a la rentabilidad, ya que las cámaras de separación complejas conocidas, en diferentes áreas, particularmente sin embargo, en la investigación de los agentes de la malaria, no están siempre disponibles, simplemente considerando los costes, lo que afecta particularmente a países con presupuestos médicos e investigativos más inferiores.

Por lo tanto, es un objeto de la invención, proporcionar una columna de separación HGMS que consiga mejores resultados de purificación de un modo más rentable.

15 Esta tarea se solventa con una columna de separación HGMS, según la reivindicación 1 y un procedimiento, según la reivindicación 11, en donde se emplea una HGMS interna. La solución según la presente invención se basa en el principio de resolver el problema de la unión inespecífica de las partículas no diana a la matriz de la columna de separación HGMS, con una solución tampón, para equilibrar la columna de separación y para suspender el material biológico que se va a separar, con las propiedades indicadas. Se puede renunciar entonces al revestimiento complicado y poco rentable, porque los sitios de unión inespecífica de la columna de separación se saturan con la solución tampón. Estos sitios de unión inespecífica se entienden como aquellos en los que las partículas, independientemente de las propiedades magnéticas, se unirían de forma mecánica, eléctrica, química, física u otra forma diferente. De tal modo las partículas no diana se seleccionarían independientemente del gradiente magnético, las cuales conducirían a unos resultados incompletos de la purificación o de la separación. El material biológico es preferiblemente células, agregados celulares o partes de la célula, que poseen propiedades paramagnéticas intrínsecas, o que se pueden marcar directa o indirectamente por medio de partículas paramagnéticas o superparamagnéticas.

20

25

La solución según la invención tiene la ventaja de que la solución tampón se puede preparar de forma relativamente sencilla y rentable. Un pretratamiento lento, poco rentable y con materiales costosos, de la columna de separación y de la matriz contenida en la misma, se puede evitar. Esta simplificación tiene de este modo, incluso la ventaja de que los resultados de la purificación se mejoran, comparados con las columnas de separación convencionales con sus revestimientos complejos de la matriz.

30

La solución tampón presenta preferiblemente una densidad que coincide con la densidad de las partículas de material biológico que se van a separar, en un grado tal, que una fuerza gravitatoria que actúe sobre las partículas está esencialmente compensada y, por lo tanto, las partículas casi flotan en la solución tampón, y/o la solución tampón presenta una viscosidad elevada, que posibilita un flujo laminar a través de la columna de separación, con una velocidad de flujo adecuada para el procedimiento de separación. De este modo, las partículas diana se pueden mantener el tiempo suficiente en el radio de acción del campo magnético con gradiente elevado, sin la molesta influencia de la fuerza de la gravedad, de modo que se sedimentan ahí en gran cantidad. De este modo se obtiene un grado especialmente alto de separación y de purificación.

35

De forma ventajosa, el imán es un imán permanente o un electroimán que se conforma de modo que la columna de separación se puede colocar dentro del campo magnético particularmente homogéneo, generado por él mismo, en donde la columna de separación puede estar opcionalmente bajo la influencia del campo magnético o no, mediante separación espacial y/o desconexión. Por el ajuste de la forma, el campo magnético se puede acercar a la matriz y proporcionar de este modo una intensidad de campo suficiente para el campo magnético externo. Por otra parte, el imán tiene que ser suficientemente fuerte, de modo que la combinación de las intensidades de campo a través de la matriz, produzca un campo magnético con gradiente elevado. A través de la separación espacial o la desconexión, las partículas diana se pueden sujetar y liberar deliberadamente, dependiendo de si el líquido que fluye de la columna de separación se supone que tienen que contener las partículas diana en la etapa particular del proceso o no.

40

45

Preferiblemente, la matriz no está revestida y/o presenta un material ordenado o no ordenado, filamentoso, esférico o con otra forma, particularmente, acero inoxidable o lana de acero magnéticos e inoxidables. Una matriz no revestida es especialmente rentable, y un revestimiento, de acuerdo con la presente invención, no es necesario. Sin embargo, alternativamente sería concebible, proporcionar adicionalmente un revestimiento, para seguir mejorando los resultados de la separación y de la purificación, pudiendo ser también por ello dicho revestimiento incompleto o de menor calidad que el convencional. La disposición con un tamaño de malla relativamente grande de la matriz, así como el uso de acero inoxidable de alta calidad, evitan un deterioro físico o químico del material biológico que se va a separar, por ejemplo, en los experimentos descritos más abajo, se podría evitar de forma eficaz el deterioro de células sensibles.

50

55

Preferiblemente, el recipiente de depósito está unido con la columna de separación, de modo que se puede introdu-

- 5 cir o no la solución tampón en la columna de separación con una velocidad de flujo ajustable, a través de un dispositivo de limitación del flujo de entrada, y/o la columna de separación tiene un dispositivo de limitación de la circulación, que es capaz de controlar el flujo de salida de la columna de separación y la velocidad de flujo en la columna de separación. Para ello, la conexión entre el recipiente de depósito y la columna de separación, se puede proporcionar como una construcción técnica, posiblemente a través de un tubo, pero también por goteo libre. De este modo, la velocidad de flujo se puede adaptar al material biológico, a la solución tampón y a la etapa concreta del proceso, siendo también posible un bloqueo completo del flujo de entrada de solución tampón, por ejemplo, para permitir una fase de descanso para equilibrar la columna de separación, o en las etapas del proceso en las que no se requiere una solución tampón.
- 10 La solución tampón incluye una solución básica y por lo menos una macromolécula. Por ejemplo, la solución tampón contiene de 80 a 99,8% en peso de solución básica y de 0,2 a 20% en peso de macromoléculas.
- 15 Preferiblemente, la solución tampón presenta preferentemente una solución básica, cuya fuerza iónica se adapta dependiendo de las macromoléculas, de modo que se compensan los efectos de la agregación de las macromoléculas sobre el material biológico. La solución básica presenta una concentración isoosmolar de los cationes sodio, potasio, magnesio o calcio y de los aniones cloruro, fosfato, sulfato o carbonato, particularmente es una solución salina o una de sacarosa tamponada con fosfato o una mezcla de las mismas. La solución básica, según el mecanismo descrito más abajo, también se tiene que adaptar en sus propiedades, tales como el valor del pH y otras, al material biológico y a las macromoléculas para la saturación de los sitios de unión no específica, para conseguir resultados aún mejores. Para ello, las agregaciones indeseadas del material biológico se evitan especialmente bien, si la solución salina tamponada con fosfato (fisiológica) isoosmolar, se sustituye por solución de sacarosa tamponada con fosfato isoosmolar, de forma total o parcial. Se pueden concebir también otras soluciones de azúcar, además de las soluciones de sacarosa.
- 20 Por ejemplo, la solución tampón contiene 0,2 a 10% en peso de gelatina, 9,5-10% en peso de sacarosa, 80-95% en peso de agua destilada y fosfato sódico para el agente tamponador, y/o 3-10% en peso de seroalbúmina de bovino, 0,85-0,95% en peso de cloruro sódico y 89-98% en peso de agua destilada y fosfato sódico para el agente tamponador y/o 0,5-20% en peso de colágeno hidrolizado, 5-10% en peso de sacarosa, 0,1-0,9% en peso de cloruro sódico y fosfato sódico para el agente tamponador.
- 25 Las macromoléculas pueden incluir de forma ventajosa polielectrolitos o polianfolitos naturales o sintéticos, que pueden ser fuertes o débiles, particularmente el polielectrolito sintético Orotan 1850 o el polielectrolito orgánico, ácido D-glucurónico, y/o las macromoléculas presentan un punto isoeléctrico que, a un valor de pH de la solución básica, conduce a una carga que se corresponde con la carga de las partículas del material biológico que se va a separar y/o las macromoléculas presentan un peso molecular de 10.000 a 100.000 kDa, particularmente de 30.000 a 70.000 kDa. Se ha observado que tales soluciones tampón conducen a resultados especialmente buenos.
- 30 Además, las macromoléculas pueden incluir preferiblemente proteínas globulares, albúminas particularmente, seroalbúmina bovina o humana, ovoalbúmina, lactoalbúmina o albúminas vegetales, β -lactoglobulina, κ -caseína, histonas, protaminas, globulinas, prolaminas o glutelinas, con una concentración de 3 a 7% en peso, particularmente de 4 a 5% en peso. Alternativamente o además, las macromoléculas incluyen adicionalmente de forma más preferible proteínas filamentosas, particularmente gelatinas, gelatinas bovinas, gelatinas porcinas o gelatinas de teleosteo en una concentración de 0,3 a 1,5% en peso, particularmente de 0,4 a 0,8% en peso, que tienen un poder de gelificación bajo de 150 Bloom o menor, particularmente 75 Bloom o menor. También, el colágeno hidrolizado enzimáticamente (hidrolizado de colágeno) se puede emplear alternativa o adicionalmente, preferiblemente en una concentración de 0,3 a 20% en peso, particularmente de 1 a 10% en peso.
- 35 Las macromoléculas de este tipo, especialmente en las concentraciones especificadas y con las viscosidades resultantes de esto, son excepcionalmente muy adecuadas para saturar los sitios de unión no específica, y por ello con una velocidad de flujo y una densidad adecuadas, crear condiciones en las cuales las partículas diana se adhieren especialmente bien a la matriz.
- 40 En el procedimiento de acuerdo con la invención, se puede utilizar como solución tampón cada solución tampón mencionada como adecuada en la descripción y en particular cada solución tampón descrita en las reivindicaciones secundarias del dispositivo.
- 45 La matriz y una columna de separación que la rodea se equilibran preferiblemente en esta disposición, antes de la circulación de la suspensión, mediante la preincubación con la solución tampón pura, es decir, una solución tampón que no contiene material biológico y durante un período de tiempo suficientemente largo, para saturar los sitios de unión no específicos en la matriz, particularmente con una duración de 3 a 20 o de 5 a 10 minutos, en donde la matriz se mantiene continuamente cubierta por la solución tampón durante el proceso de equilibrado. De una manera aún más preferida, la suspensión tiene una concentración crítica del material biológico para el procedimiento de separación, que es también dependiente de la solución tampón empleada. Los periodos de tiempo indicados son suficientes, de acuerdo con los hallazgos de los inventores, para saturar adecuadamente los sitios de unión específica por adelantado. El proceso de equilibrado preparativo evita que partículas indeseadas se unan inicialmente, durante la introducción de la suspensión en la matriz, a los sitios de unión no específicos de la suspensión que todavía no está totalmente saturada por la solución tampón. Durante el procedimiento completo, la matriz se debe
- 50
- 55
- 60

mantener cubierta, de modo que los sitios de unión inespecífica no se desbloqueen y las condiciones de flujo se mantengan constantes, puesto que ésto perjudicaría el resultado de la separación.

Para la separación del material biológico indeseado, el material eluido, es decir, un líquido que sale de la matriz, se recoge preferiblemente después de la circulación, en donde, después de la introducción de la suspensión en la matriz con el campo magnético todavía activado, mientras que una solución tampón pura adicional fluye a través de la matriz, hasta que la suspensión ha salido completamente de la matriz, y en donde la matriz se mantiene completamente cubierta por la solución tampón durante la circulación. En este caso, las partículas diana son una perturbación que hay que retirar y se fijan a la matriz hasta que los componentes realmente deseados del material biológico se aíslan totalmente por separación por lavado fuera de la matriz. El material eluido recogido ya no contiene más las partículas diana fijadas a la matriz mediante la fuerza magnética, se separan y su concentración se reduce considerablemente en el material eluido, es decir, en el caso ideal, el material eluido ya no contiene más tales partículas diana. Posteriormente, las partículas diana que permanecen en la matriz se pueden desechar por separado o utilizar para otros fines, separándolas por aclarado en una etapa del proceso conveniente.

Alternativamente, para la purificación del material biológico deseado, después de la introducción de la suspensión en la matriz, con el campo magnético externo todavía activado, se hace circular a través de la matriz un tampón puro adicional, hasta que la suspensión ha salido totalmente de la matriz, y posteriormente, la matriz se aclara con solución tampón pura adicional, con el campo magnético externo desactivado mediante separación espacial o mediante desconexión del mismo y el material eluido se recoge de este modo, manteniendo la matriz cubierta con solución tampón durante el procedimiento completo. En este caso, el líquido que sale de la matriz en la fase de campo magnético activado, no contiene material biológico de interés primario, este líquido se puede desechar o utilizar de otra manera. Solamente durante una separación por aclarado posterior, sin campo magnético, la matriz libera de nuevo las partículas diana que están contenidas en el material eluido, que se recoge entonces, después de la separación por aclarado de la matriz, con un grado de pureza muy elevado. Durante esta separación por aclarado, la solución tampón puede ser la misma, pero también puede ser una solución tampón diferente a la utilizada durante la fase real de HGMS, con el campo magnético activado. En este caso, las partículas diana están contenidas en la otra solución tampón del material eluido, o en una mezcla de ambas soluciones tampón.

Preferiblemente, el material eluido recogido se centrifuga y el procedimiento se repite preferiblemente una vez o varias veces, con el material biológico separado por centrifugación, sin la fase líquida del material eluido. En el procedimiento de separación, el material biológico permanece de este modo sin las partículas diana perturbadoras que se van a separar. Por el contrario, durante el procedimiento de purificación, las partículas diana permanecen en forma pura sin la solución tampón de la suspensión.

En caso de que el grado de separación o de purificación generalmente alto que ya se consigue después de que un pase a través, no sea suficiente, el procedimiento se puede realizar otra vez. Esto se aplica especialmente cuando la matriz estaba sobrecargada durante un procedimiento de separación, si no solamente se esperan mejoras claramente disminuidas, en comparación con el primer pase.

El procedimiento de acuerdo con la invención, se puede desarrollar adicionalmente con características similares, tal y como se precisa en las reivindicaciones secundarias que siguen a las reivindicaciones independientes, a modo de ejemplo pero no de forma exclusiva, y al mismo tiempo muestra ventajas similares.

La invención se describe a continuación con respecto a otras características y ventajas y haciendo referencia a las realizaciones a modo de ejemplo, y haciendo referencia a los dibujos. Las figuras de los dibujos muestran:

Fig. 1 una vista frontal esquemática del conjunto de una realización del dispositivo HGMS según la invención, y la columna de separación;

Fig. 2A/B un análisis citométrico del flujo de un primer ejemplo de una purificación según la invención, empleando una solución de sacarosa isoosmolar tamponada con fosfato, con 0,75% de gelatina como solución tampón (Fig. 2A: cultivo de *P. falciparum* antes del pase a través de la columna de HGMS; Fig. 2B: Material eluido después del pase, lavado y retirada de la columna de separación del campo magnético),

Fig. 3A/B una representación de acuerdo con la Fig. 2 de un segundo ejemplo con seroalbúmina bovina (BSA) que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) como solución tampón;

Fig. 4A/B un análisis citométrico del flujo de un tercer ejemplo como gráfico de puntos (Fig. 4A: Proporción de linfocitos sanguíneos positivos para CD8 en una suspensión de células mononucleares periféricas (PBMCs) antes de la purificación; Fig. 4B: material eluido de la columna de separación después del pase de los PBMCs, lavado y retirada de la columna de separación del campo magnético); uso de una solución de sacarosa isoosmolar tamponada con fosfato, con 0,75% de gelatina como solución tampón, como en el primer ejemplo; y

Fig. 5A/B una representación de acuerdo con la Fig. 4 de un cuarto ejemplo, pero usando seroalbúmina de bovino (BSA) que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) como solución tampón, como en el segundo ejemplo.

La Figura 1 muestra una vista frontal esquemática de una realización del dispositivo de purificación según la inven-

ción. El dispositivo de purificación incluye una columna de separación 1, un recipiente para el almacenamiento de líquido 11, a partir del cual se puede suministrar solución tampón a la columna de separación 1, un imán permanente o electroimán 7 para la generación de un campo magnético fuerte, y una solución tampón especial, que se explica detalladamente más abajo.

5 La columna de separación 1 tiene una envoltura y una matriz 2 dispuesta dentro de ella. La envoltura consiste en un material no magnético y posee por lo menos una entrada de líquido 6 y por lo menos una salida de líquido 3. La salida de líquido 3 está equipada con un dispositivo 4 para intervenir sobre la velocidad de flujo de la solución tampón en la columna de separación 1, que tiene una válvula múltiple 4 y un dispositivo de limitación de la circulación 5. Alternativamente, se pueden emplear otros dispositivos conocidos para la regulación de la velocidad de flujo en la columna de separación.

10 La matriz 2 se diseña de modo que en el interior de la columna de separación 1, se genera un gradiente magnético elevado por el imán dispuesto externamente, tal y como se requiere para la separación de HGM. Para esto, la matriz 2 presenta material ferromagnético, por ejemplo, acero inoxidable magnético u otros, que es ordenado o no ordenado, filamentosos, esférico o de forma diferente. Ejemplos para el diseño de la matriz 2, se mencionan más adelante en conexión con purificaciones experimentales.

15 La columna de separación 1 con la matriz 2 contenida dentro de ella, se sitúa en un campo magnético fuerte, preferiblemente homogéneo, que se puede crear por el imán permanente o el electroimán 7. El campo magnético se puede conectar y desconectar, por ejemplo, retirando la columna de separación del campo del imán permanente, o por desconexión del electroimán 7.

20 El recipiente para el almacenamiento de líquido 11 presenta un área de entrada de líquido 12, un área de depósito y un área de salida de líquido 10, a partir de la cual se puede llevar la solución tampón a la entrada de líquido 6 de la columna de separación 1. La salida de líquido 10 del recipiente de almacenamiento de líquido 11, está equipada con un dispositivo para influir sobre la velocidad del flujo de salida del líquido contenido en el mismo, que tiene una válvula unidireccional 8 y un dispositivo de limitación de flujo 9. Como con la salida de líquido 3 de la columna de separación 1, se pueden considerar también otros dispositivos conocidos para la regulación de la velocidad del flujo de salida desde el recipiente de almacenamiento de líquido 11. También, dependiendo de los requisitos, se pueden utilizar o intercambiar válvulas unidireccionales o múltiples.

25 La solución tampón mencionada anteriormente y empleada de acuerdo con la invención, sirve para equilibrar la columna de separación 1 y la suspensión del material biológico que se va a separar. Esta solución tampón contiene agua pura y uno o varios tipos diferentes de macromoléculas, que con la concentración suficiente, poseen la propiedad de ser capaces de saturar los sitios de unión no específicos en la columna de separación 1 y de la matriz 2 contenida en la misma. Además, la solución tampón tiene preferiblemente una densidad que es suficientemente similar a la densidad de las partículas que se van a separar, para reducir fuertemente o incluso posiblemente de forma total, los efectos de la fuerza de la gravedad sobre las partículas y, por lo tanto, mantenerlas en suspensión. De este modo se evita una sedimentación de las partículas que se van a separar, con velocidades lentas del flujo en la columna de separación (1). Además, la solución tampón posee preferentemente una viscosidad que conduce a una velocidad de flujo con propiedades de flujo laminar en la columna de separación 1, adecuada para el procedimiento de separación. Por último, en la solución tampón pueden estar contenidos diferentes iones, como por ejemplo, pero no exclusivamente, cationes tales como sodio, potasio, magnesio y calcio, o aniones tales como cloruro, fosfato, sulfato y carbonato. Este listado indicado no pretende de ninguna manera excluir otros cationes o aniones adicionales.

30 Las macromoléculas empleadas en la solución tampón deben ser suficientemente grandes para ser capaces de saturar con eficacia los sitios de unión inespecíficos, pero no tan grandes que aumenten la viscosidad de la solución tampón de forma decisiva, en las concentraciones que se van a emplear. Por lo tanto, las macromoléculas se prefieren con un peso molecular de 10.000 a 100.000 kDa, incluso más preferidas con un peso molecular de 30.000 a 70.000 kDa. De forma ventajosa, las macromoléculas añadidas llevan una carga que se corresponde con la carga de las partículas que se van a separar, puesto que se trata preferiblemente de una inhibición competitiva de la unión inespecífica de las partículas que se van a separar y de las macromoléculas, al material de la matriz 2. Por ejemplo, macromoléculas con una carga negativa se eligen preferiblemente si las partículas que se van a separar son células cuyas paredes celulares son portadoras, sobre todo, de cargas negativas.

35 Tales macromoléculas cargadas positiva o negativamente, se conocen bajo el nombre de polielectrolitos. Un subgrupo de los polielectrolitos se conoce además bajo el nombre de polianfolitos. Estos denominados polielectrolitos son portadores de grupos funcionales positivos y negativos. La carga neta de los polianfolitos se puede deducir fácilmente cuando se conoce su punto isoelectrico y el pH de la solución tampón que rodea a la molécula: Si el pH de la solución tampón se encuentra por debajo del punto isoelectrico del polianfolito, su carga neta se encuentra en la región positiva. Con un valor de pH de la solución tampón superior al punto isoelectrico, se comporta del modo contrario, así la carga neta se encuentra también en la región negativa. Si el valor del pH de la solución tampón es igual o está muy próximo al punto isoelectrico del polianfolito, entonces es neutro, así que no es portador de una carga neta.

60 Polielectrolitos que han mostrado ser especialmente ventajosos dentro del contexto de la presente invención, para

la separación de material celular son, por ejemplo, macromoléculas procedentes del grupo de las proteínas. El grupo de las proteínas se divide en dos subgrupos, el de las proteínas globulares (esféricas) y el de las proteínas filamentosas (similares a fibra). La división conceptual entre los dos subgrupos mencionados es, sin embargo, en sentido estricto, algo difusa, porque existen formas intermedias entre las proteínas globulares y las filamentosas. Por lo tanto, de aquí en adelante, los términos "globular" y "filamentoso" abarcarán proteínas de ambos subgrupos y las formas de transición.

Ahora, las proteínas globulares y filamentosas disueltas en líquidos poseen la propiedad de unirse de forma reversible e irreversible a las superficies sólidas, este fenómeno se denomina sobre todo adsorción o adhesión. En el contexto de la unión a superficies de acero inoxidable, las publicaciones científicas indican que al poner en contacto proteínas disueltas en líquido con superficies de acero inoxidable, se consigue el depósito de una monocapa (una capa única de moléculas) de moléculas proteicas sobre la superficie de acero inoxidable (Nakanishi y otros, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 2001:233-244, Fukuzaki y otros, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 1995:6-11). Aunque el grosor de esta monocapa se encuentra en el intervalo del diámetro hidrodinámico (radio de Stokes) de la molécula de proteína respectiva, que está en el intervalo de unos pocos nanómetros, la simetría del área exacta de la monocapa, todavía no se conoce con exactitud. Se puede suponer, sin embargo, que la monocapa no tiene una forma enteramente regular. Pradier y otros, indican que posiblemente existen incluso espacios de separación entre las moléculas depositadas, es decir, la superficie de acero inoxidable no se podría cubrir completamente con las moléculas de proteína (*Surface and Interface Analysis*, 34, 2002:50-54). Otros estudios no aclaran si la formación de tal monocapa influye en la corrosión de la superficie de acero inoxidable, de forma positiva o negativa (Omanovic and Roscoe, *Langmuir*, 15, 1999:8315-8321, Hansen y otros, *Corrosion Science*, 37, 1995:1423-1441). En conjunto se tiene que suponer que moléculas de agua e iones disueltos, no se pueden excluir de ninguna manera totalmente de la monocapa. Sin embargo, dentro del contexto de la presente invención, se ha mostrado que la formación de tal monocapa es capaz de evitar la unión no específica de partículas no diana a la matriz de un separador HGMS, con eficacia extrema; por otra parte, no se observó ni un deterioro físico ni químico del material biológico que se va a separar.

A continuación, se tratará de algunas proteínas que se ha probado especialmente que tienen valor en el contexto de la presente invención, sin limitar la invención a estas proteínas especialmente apropiadas.

En este punto, albúminas, tales como por ejemplo la seroalbúmina bovina o humana, se mencionan como particularmente preferibles como representantes del subgrupo de las proteínas globulares. Del grupo de las albúminas, también se pueden utilizar las seroalbúminas de cualquier otra especie, y también otras albúminas, tales como, pero no exclusivamente, la ovoalbúmina, la lactoalbúmina o albúminas vegetales, pero son menos preferidas.

Se encontró que para seroalbúmina bovina o humana en concentraciones (fisiológicas) isoosmolares de solución salina tamponada con fosfato, desde 3% hasta 7%, incluso más preferido desde 4% hasta 5% eran óptimas en el contexto de la presente invención para el procedimiento de separación de material celular. Concentraciones claramente más bajas (0,1%-1%), tales como las que se añaden generalmente a los tampones fisiológicos en la investigación celular, no condujeron a los resultados deseados, en el contexto de la presente invención. Esto se explica por un lado porque concentraciones de albúmina relativamente bajas no son capaces de saturar eficazmente los sitios de unión inespecífica de la columna de separación 1, con la matriz no revestida 2 empleada en esta invención. Por otra parte, estas concentraciones bajas de albúmina no confieren la densidad necesaria a la solución tampón, para mantener en suspensión las partículas que se van a separar y tampoco evitan una sedimentación inducida por la gravedad, en caso de velocidades de flujo lentas.

Del subgrupo de las proteínas filamentosas, se mencionan de forma particularmente preferida las gelatinas, en el contexto de la presente invención. Debido a su favorable punto isoeléctrico, a un pH de aproximadamente 4,5 a 5,6 y, por lo tanto, a su carga negativa en un intervalo de pH neutro, las gelatinas de la clase B (gelatinas bovinas) son particularmente preferidas, dentro de las gelatinas para separaciones de material celular en el intervalo de pH fisiológico. Un intervalo de concentración que es particularmente favorable para el procedimiento de separación del material celular, se ha encontrado para las gelatinas bovinas desde 0,3% hasta 1,5%, incluso más preferido desde 0,4% a 0,8%. Otras gelatinas, tales como las gelatinas de la clase A (gelatinas porcinas) o las gelatina de teleosteo (gelatinas de pez), o cualquier otra gelatina y los colágenos hidrolizados enzimáticamente (hidrolizados de colágeno) como otro subgrupo de las gelatinas, se pueden utilizar igualmente pero se prefieren menos debido a sus puntos isoeléctricos menos favorables, por lo menos para separaciones en el intervalo de pH fisiológico. Generalmente, entre las diferentes gelatinas B y las gelatinas de los otros grupos mencionados, se prefieren las que presentan un poder de gelificación bajo (fuerza bloom), preferiblemente menor de 150 Bloom e incluso más preferido menor de 75 Bloom.

Otras macromoléculas del grupo de las proteínas, que se pueden emplear dentro del contexto de la presente invención, son, entre otras, en un listado no exclusivo, otras proteínas globulares, como por ejemplo β -lactoglobulina o κ -caseína, u otras proteínas globulares procedentes de los subgrupos de las histonas o de las protaminas, de las globulinas, de las prolaminas y de las glutelinas, así como otras proteínas filamentosas.

En otras realizaciones de la invención, se puede concebir el empleo de otras macromoléculas procedentes del grupo de los polielectrolitos orgánicos o sintéticos, por ejemplo, el uso del polielectrolito sintético Orotan 1850[®] (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, EE.UU.) o del polielectrolito orgánico ácido D-glucurónico.

Algunas de las macromoléculas mencionadas que se pueden añadir a la solución tampón para disminuir la unión inespecífica del material biológico que se va a separar, al material de la matriz, conducen, junto con soluciones tampón particulares, a una agregación del material biológico que se va a separar en suspensión. La tendencia a la agregación de los glóbulos rojos en suspensión, se correlaciona positivamente con el peso molecular y la concentración de las macromoléculas añadidas, así como con la fuerza iónica de la solución tampón. La fuerza iónica se entiende como la concentración de la carga total de los iones disueltos en la solución tampón. Las fuerzas iónicas bajas pueden actuar contra una agregación, que está causada por las macromoléculas añadidas e incluso son capaces de evitarla totalmente. La consideración del diámetro hidrodinámico (radio de Stokes), que se puede deducir a partir del peso molecular y de la medida de la viscosidad intrínseca, posibilita incluso más exactamente que con la única consideración del peso molecular de una macromolécula particular, la predicción de su efecto promotor de la agregación sobre una suspensión de glóbulos rojos (compárese con los trabajos de Jan y Chien (*Journal of General Physiology*, 61, 1973:638-654, 655-668) y Armstrong y otros, (*Biophysical Journal*, 87, 2004:4259-4270)). De aquí en adelante, la expresión "peso molecular" de una macromolécula será siempre representativo del diámetro hidrodinámico (radio de Stokes) de esa macromolécula que se puede deducir a partir de él.

En el contexto de la invención, se ha observado que es ventajoso explotar estos hallazgos y adaptar la fuerza iónica de la solución tampón para evitar con eficacia una agregación del material biológico que se va a separar. Por ejemplo, los inventores observaron una agregación de células sanguíneas, particularmente en suspensión en la solución salina fisiológica, tamponada con fosfato que contenía gelatina. Para evitar esta agregación, se observó que era particularmente ventajoso, para la separación de las células sanguíneas usando gelatinas, sustituir parcial o totalmente la solución salina fisiológica tamponada con fosfato, por una solución de sacarosa fisiológica, tamponada con fosfato.

Partiendo de la conexión descrita entre la agregación de partículas y las propiedades especiales de la solución tampón (particularmente la concentración y el peso molecular de las macromoléculas, así como la fuerza iónica de la solución tampón), se pueden hacer predicciones sobre qué combinación de macromoléculas y de soluciones tampón es particularmente adecuada para la separación de un material biológico específico que se va a separar, y se puede elegir una solución tampón que contiene macromoléculas, cuyas propiedades fisicoquímicas se adaptan a las condiciones de separación necesarias para una partícula específica. Para ello, la expresión propiedades fisicoquímicas de una solución tampón, en el contexto de la presente invención, debe abarcar la viscosidad, la densidad, la fuerza iónica, la osmolaridad y el valor de pH del líquido, además del tipo, del peso molecular, de la carga y de la concentración de las macromoléculas disueltas en ella y otros parámetros fisicoquímicos manipulables tanto de las macromoléculas como del líquido que las rodea.

A continuación, el procedimiento de purificación de acuerdo con la invención, se explicará con más detalle paso a paso.

En una primera etapa, la columna de separación 1 se equilibra con solución tampón para saturar los sitios de unión inespecíficos. Aquí, el equilibrado tiene lugar mediante la preincubación de la columna de separación 1 con una solución tampón adecuada, tal y como se ha descrito anteriormente, para el procedimiento de separación de la suspensión de partículas específica que se va a investigar, llamada a continuación, solución tampón A, durante un periodo de tiempo suficientemente largo, que se ajusta según las macromoléculas empleadas en la solución tampón. En general, este periodo de tiempo dura de 3 a 20 minutos, incluso más regularmente 5 a 10 minutos, sin embargo, en casos raros, pueden ser necesarios periodos de tiempo más largos o más cortos.

Después de equilibrar el material biológico que se va a separar, se suspende en la solución tampón A y se añade en el área de entrada 6 de la columna de separación 1, estando localizada la columna de separación 1 en el campo magnético homogéneo del imán de herradura o del electroimán 7. Al mismo tiempo, la salida de líquido 3 de la columna de separación 1 se abre con ayuda de la válvula múltiple 4. Aquí hay que tener cuidado para mantener la matriz 2 siempre cubierta con la solución tampón. El material biológico fluye a través de la columna de separación 1 y las partículas diana paramagnéticas intrínsecas o las partículas diana previamente marcadas con partículas paramagnéticas sintéticas, se adhieren a la matriz 2. Todas las partículas que no son magnéticas, sin embargo, pasan sin dificultades a través de la columna de separación 1 y salen por la salida de líquidos 3.

Después de la adición completa del material biológico que se va a separar, tiene lugar el lavado de la columna de separación 1. Esto sirve para el aclarado de las partículas no magnéticas que no son diana que permanecen en la columna de separación 1. La salida de líquido 10 del recipiente de almacenamiento de líquido 11, que contiene la solución tampón A, se abre con ayuda de la válvula unidireccional 8, de modo que ahora solo fluye la solución tampón A como una solución de lavado a través de la columna de separación 1. Aquí de nuevo hay que poner atención para mantener la matriz 2 esté siempre cubierta con la solución tampón. La cantidad de solución tampón A que se va a utilizar para el lavado, depende del tamaño de la columna de separación 1. Por ejemplo, la cantidad de solución tampón A necesaria para el lavado adecuado para una columna de separación 1, con un volumen de 3 ml, es de aproximadamente 30-60 ml, para columnas de separación con otros tamaños, se debe adaptar de forma correspondiente.

Después de completar el lavado de la columna de separación 1, se cierra la salida de líquido 3 de la columna de separación 1 y del recipiente de almacenamiento de líquido 11. La columna de separación 1 se retira del campo magnético del imán de herradura 7, o el campo magnético se desconecta en caso del empleo de un electroimán 7.

Sin la influencia del campo magnético, las partículas diana se liberan a continuación de la matriz 2 y se pueden separar con un lavado anterógrado o retrógrado de la columna de separación 1, con la solución tampón A o, puesto que la separación ya se ha realizado, con cualquier otra solución tampón deseada.

5 Este procedimiento es adecuado tanto para la purificación de partículas diana porque están contenidas en el material eluido que se ha obtenido por el aclarado de la columna, como para la eliminación de partículas diana del material biológico que se va a separar. En el segundo caso, tiene interés la solución de lavado que sale de la columna de separación 1, porque contiene el material biológico reducido por las partículas diana. A continuación, la solución del lavado se recoge durante la introducción del material biológico suspendido en la solución tampón A en la columna de separación 1 y durante el lavado subsiguiente de la columna de separación 1, con la solución tampón A pura.

10 Aquí es importante tener cuidado de que la matriz 2 no esté sobrecargada con un número de partículas diana que sea demasiado elevado, porque en caso de agotamiento de la capacidad de la matriz 2, las partículas diana no unidas pueden salir por la salida de líquidos 3 de la columna de separación 1, con el resto del material biológico que se va a separar.

15 El procedimiento se puede repetir con las partículas diana obtenidas y purificadas, en caso de que se tenga que conseguir una pureza más elevada. Lo mismo se aplica a la solución de lavado recogida después de fluir a través de la columna de separación 1, en caso de que se desee una eliminación más exhaustiva de las partículas diana del material biológico que se va a separar. Esto, sin embargo, ya no suele ser necesario debido al alto grado de pureza según la invención.

20 Los siguientes ejemplos de ensayo pretenden ilustrar la invención adicionalmente, pero sin limitar la aplicabilidad a los ejemplos de ensayo.

Ejemplo 1

Purificación de glóbulos rojos infectados con el agente de la malaria (plasmodios) procedente de un cultivo de *P. falciparum* con solución de sacarosa isoosmolar tamponada con fosfato que contiene gelatina.

Material:

25 Solución tampón A₁: solución de sacarosa isoosmolar tamponada con fosfato con 0,75% de gelatina
1 g de lana de acero inoxidable
Válvula unidireccional
Válvula de tres vías
Aguja de inyección de 20 G

30 Jeringa desechable de 3 ml
Jeringa desechable de 10 ml
Jeringa desechable de 50 ml
1 imán de herradura de neodimio

a) Preparación del equipo para la purificación

35 Preparación de la columna de separación

Una jeringa desechable de 3 ml como columna de separación 1, se llenó hasta dos tercios de su volumen total con un gramo de lana de acero inoxidable, como matriz 2. Aquí se tuvo que cuidado de que la mayoría de las fibras de la lana de acero inoxidable se orientara en la dirección longitudinal del cuerpo de la jeringuilla. Una válvula de tres vías 4 y la aguja de inyección de 20 G, como dispositivo de limitación del flujo 5, se conectaron a la salida de líquido 3 del cuerpo de la jeringa. El tercio superior de la jeringa desechable que no estaba relleno con lana de acero inoxidable, servía como zona de entrada 6 a la columna de separación 1.

40

Equilibrado de la columna de separación

La columna de separación 1, preparada de este modo, se llenó de forma retrógrada con la solución tampón en posición vertical, a través de la válvula de tres vías 4. Las burbujas de aire se evacuaron lo más posible, golpeando ligeramente con el dedo, sin embargo, se observó que las burbujas de aire más pequeñas que permanecían, no influían negativamente sobre el procedimiento de separación. Después, la columna de separación 1 se situó entre los polos del imán de herradura 7, de modo que toda la matriz 2 estaba expuesta al campo magnético homogéneo y se equilibró durante 10 minutos.

45

Construcción y colocación del recipiente de almacenamiento de líquido

50 Una válvula unidireccional 8 equipada con una aguja de 18 G como dispositivo de limitación del flujo 9, se encajó en la salida de líquido 10 de la jeringa desechable de 50 ml, que sirvió como recipiente de almacenamiento de líquido 11. Este se colocó a continuación sobre la columna de separación 1 de modo que el líquido que salía de la aguja, pudiera gotear en la zona de entrada 6 de la columna de separación 1.

b) Preparación y realización del procedimiento de separación

Preparación del cultivo de *P. falciparum* para la purificación de glóbulos rojos infectados con agentes patógenos de la malaria

5 50 µl de glóbulos rojos de un cultivo de *P. falciparum* con una parasitemia de 13,51%, se resuspendieron en 450 µl de medio RPMI y se oxigenaron durante 10 minutos bajo la influencia de aire ambiental. El cultivo se separó por centrifugación a continuación y se resuspendió en 5 ml de solución tampón A₁.

Realización del procedimiento de separación

10 Después de completar el equilibrado durante 10 minutos de la columna de separación 1, su salida de líquido 3 se abrió y al mismo tiempo se introdujeron lentamente las células resuspendidas en la zona de entrada de la columna de separación 1, de modo que la matriz 2 permaneciera permanentemente cubierta con líquido. Después de la adición completa del cultivo resuspendido, se abrió la salida de líquido 10 del recipiente de almacenamiento de líquido 11 que contenía 45 ml de solución tampón A₁. Aquí se debía evitar un cambio de la velocidad de flujo en la columna de separación 1 mediante la manipulación de la salida de líquido 3 de la columna de separación 1, y se vigiló para mantener la matriz 2 de la columna de separación 1, siempre cubierta con la solución tampón A₁. Después de completar la adición de la solución tampón A₁, se detuvo el flujo en la columna de separación 1 desde el recipiente de almacenamiento de líquido 11, mediante el cierre de la salida de líquido 3 y la columna de separación 1 se retiró del campo magnético. Una jeringa desechable de 10 ml que se había llenado con la solución tampón A₁ se colocó en la válvula de tres vías 4 y la columna de separación 1 se lavó de forma retrógrada. Aquí se recogió el material eluido en un recipiente adecuado y la suspensión se separó por centrifugación durante 5 minutos a 1500 g. El material sobrenadante fue desechado y el sedimento se resuspendió en 300 µl de solución salina tamponada con fosfato.

c) Valoración y resultado

25 Se realizó una tinción de las células con naranja de acridina y a continuación un análisis citométrico del flujo, tal y como se ha descrito en otra parte (Bhakdi y otros, Cytometry A 2007: (71A) 662-667). La Fig. 2 muestra el resultado de la purificación por medio de histogramas del análisis citométrico del flujo. A) Cultivo de *P. falciparum* antes del pase a través de la columna de separación con un gradiente magnético elevado. M1: glóbulos rojos normales, M2: glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* (13,51%). B) Material eluido de la columna de separación 1 después del pase del cultivo, lavando con 45 ml de solución tampón A₁ y retirando la columna de separación 1 del campo magnético. M1: glóbulos rojos normales, M2: glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*, purificado hasta el 99,54%. Por consiguiente, un frotis de sangre teñido con Giemsa mostraba exclusivamente los glóbulos rojos infectados con los agentes de la malaria. Los agentes de la malaria en los glóbulos rojos purificados se podían seguir cultivando durante varios días sin problemas.

Ejemplo 2

Purificación de glóbulos rojos infectados con agentes de la malaria procedentes de un cultivo de *P. falciparum* con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene seroalbúmina de bovino (BSA).

35 Material:

Tal y como se ha enumerado en el Ejemplo 1, pero la solución tampón A₁ está sustituida por la solución tampón A₂ (PBS con 5% de BSA).

a) Preparación del equipo para la purificación

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1

40 b) Preparación y realización del procedimiento de separación

Preparación del cultivo de *P. falciparum* para la purificación de glóbulos rojos infectados con agentes patógenos de la malaria

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. La parasitemia del cultivo de *P. falciparum* era del 14,47% en este experimento. La solución tampón A₁ se sustituyó por la solución tampón A₂.

45 Realización del procedimiento de separación

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1, con las siguientes diferencias:

La solución tampón A₁ se sustituyó por la solución tampón A₂. La separación por centrifugación del material eluido se realizó a continuación, a 800 g durante 5 min.

c) Valoración y resultado

50 La valoración se realizó de forma análoga al Ejemplo 1. La Fig. 3 muestra el resultado de la purificación por medio de histogramas del análisis citométrico del flujo. A) Cultivo de *P. falciparum* antes del pase a través de la columna

- de separación con un gradiente magnético elevado. M1: glóbulos rojos normales, M2: glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* (14,47%). B) Material eluido de la columna de separación 1 después del pase del cultivo, lavando con 45 ml de solución tampón A₂ y retirando la columna de separación 1 del campo magnético. M1: glóbulos rojos normales, M2: glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*, purificado hasta el 97,03%. Por consiguiente, un frotis de sangre teñido con Giemsa mostraba exclusivamente glóbulos rojos infectados con los agentes de la malaria. Los agentes de la malaria en los glóbulos rojos purificados se podían cultivar durante varios días sin problemas.

Ejemplo 3

Purificación de leucocitos que son portadores del antígeno de superficie CD8 (células positivas para CD8) procedentes de una suspensión de leucocitos (células mononucleares de la sangre periférica, PBMCs).

- 10 Material:

Tal y como se ha enumerado en el Ejemplo 1.

a) Preparación del equipo para la purificación

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1

b) Preparación y realización del procedimiento de separación

- 15 Marcación de células positivas para CD8 con partículas paramagnéticas sintéticas conjugadas con un anticuerpo (microperlas)

1,5 x 10⁷ células mononucleares periféricas humanas (PBMCs) se incubaron con anticuerpos IgG CD8 monoclonales anti-humanos de rata durante 30 minutos en PBS/BSA al 1% sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con la misma solución tampón y se incubaron posteriormente con microperlas conjugadas con IgG anti-rata (Miltenyi Biotech GmbH, loc. cit.) durante otros 10 minutos, sobre hielo. Las células se lavaron de nuevo dos veces en la misma solución tampón y se incubaron posteriormente durante 30 minutos adicionales, con anticuerpos marcados con fluorescencia (PE-anti CD8 y FITC-anti CD3, Simultest[®], BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, California. EE.UU. 95131) sobre hielo. A continuación, se realizó de nuevo un lavado doble de las células con PBS/BSA al 1%. Las células se separaron después por centrifugación y se resuspendieron en 1,5 ml de la solución tampón A₁.

- 25 Realización del procedimiento de separación

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1.

c) Valoración y resultado

La Fig. 4 muestra el resultado de la purificación de las células positivas para CD8 procedentes de la suspensión de PBMCs. A) Población celular de la muestra. Ambos cuadrantes superiores muestran las células positivas para CD8 (23,21%). B) Material eluido desde la columna de separación 1 después del pase de las PBMCs, lavando con 45 ml de solución tampón A₁ y retirando la columna de separación 1 del campo magnético. Ambos cuadrantes superiores muestran las células positivas para CD8, purificadas hasta el 99,17%.

Ejemplo 4

Eliminación (agotamiento) de las células positivas para CD8 a partir de una suspensión de PBMCs.

- 35 Material:

Tal y como se ha enumerado en el Ejemplo 2, pero empleando una aguja de inyección de 25 G como dispositivo de limitación del flujo, en lugar de una aguja de inyección de 20 G.

a) Preparación del equipo para la purificación

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1

- 40 b) Preparación y realización del procedimiento de separación

Marcación de células positivas para CD8 con partículas paramagnéticas sintéticas conjugadas con un anticuerpo (microperlas)

Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3

Realización del procedimiento de separación

- 45 Tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando 15 ml de solución tampón A₂. Para este ensayo, el líquido que pasaba a través de la columna de separación 1 era de interés. Se recogió en un recipiente adecuado, las células se separaron por centrifugación a 800 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 300 µl de PBS.

c) Valoración y resultado

La Fig. 5 muestra el resultado de la eliminación de las células positivas para CD8 desde la suspensión de PBMCs. A) Población de células de la muestra. Ambos cuadrantes superiores muestran las células positivas para CD8 (35,41%). B) Material eluido desde la columna de separación 1 después del pase de las PBMCs, lavando con 15 ml de solución tampón A₂ y retirando la columna de separación 1 del campo magnético. Ambos cuadrantes superiores muestran las células positivas para CD8, agotadas hasta el 0,57%.

Todas las publicaciones mencionadas anteriormente, se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia.

En resumen, la invención se basa en la idea de utilizar un dispositivo técnico con materiales de tipo consumible, para realizar una separación magnética con gradiente elevado sobre material biológico, también denominado "equipo", que incluye o consiste en:

1.1. una columna de separación que contiene una matriz que consiste en un material ferromagnético que es adecuado para generar un campo magnético con gradiente elevado, dentro de un campo magnético externo, fuerte y homogéneo,

1.2. un recipiente para el almacenamiento de líquido, a partir del cual la solución tampón A se puede llevar a la zona de entrada de la columna de separación,

1.3. un imán permanente o un electroimán para generar un campo magnético fuerte y homogéneo,

1.4. una solución tampón A para equilibrar la columna de separación y la suspensión del material biológico que se va a separar,

en donde la solución tampón A muestra al menos una de las tres propiedades ventajosas siguientes:

1.5. la solución tampón A contiene macromoléculas para equilibrar la columna de separación y para la suspensión del material biológico que se va a separar, la cual posee la propiedad de ser capaz de saturar los sitios de unión inespecífica en la columna de separación, y/o

1.6. la solución tampón A tiene una densidad, que es suficientemente similar a la densidad de las partículas que se van a separar, para reducir lo más posible los efectos de la fuerza de la gravedad sobre las partículas y por lo tanto para mantenerlas suspendidas en la solución tampón A, y/o

1.7. dicha solución tampón A posee una viscosidad, que contribuye a una velocidad de flujo con propiedades de flujo laminar en la columna de separación, adecuada para el proceso de separación.

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo de separación magnética con gradiente elevado para la separación o la purificación de material biológico magnético o marcado magnéticamente que presenta un imán (7), una columna de separación (1) y una matriz ferromagnética (2) que se puede disponer en un espacio interior de la columna de separación, así como un recipiente de almacenamiento (11) que contiene una solución tampón para equilibrar la columna de separación (1) y/o la suspensión del material biológico, en donde durante el funcionamiento, un campo magnético generado por el imán (7) puede generar un campo magnético de gradiente elevado en la matriz (2) y la solución tampón desde el recipiente de almacenamiento de líquido (11) puede fluir a través de la columna de separación (1), caracterizado porque la solución tampón incluye una solución base y macromoléculas que son capaces de saturar los sitios de unión inespecífica de la matriz (2), en donde las macromoléculas comprenden proteínas filamentosas, en particular gelatinas.
- 2.- Dispositivo según la reivindicación 1, en donde la solución tampón presenta una densidad que coincide con la densidad de las partículas del material biológico que se van a separar, en un grado tal, que la fuerza de la gravedad que actúa sobre las partículas está esencialmente compensada y, por lo tanto, las partículas están casi suspendidas en la solución tampón, y/o la solución tampón tiene una viscosidad elevada, que posibilita un flujo laminar a través de la columna de separación (1), con una velocidad de flujo adecuada para el procedimiento de separación.
- 3.- Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, en donde el imán (7) es un imán permanente o un electroimán que se conforma de modo que la columna de separación (1) se pueda colocar dentro del campo magnético, en particular homogéneo, generado por él mismo, en donde la columna de separación (1) puede estar opcionalmente bajo la influencia del campo magnético o no, mediante una separación espacial y/o desconexión.
- 4.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la matriz (2) no está revestida y/o comprende un material ordenado o no ordenado, filamentosos, esférico o con otra forma, particularmente, acero inoxidable o lana de acero inoxidable magnéticos.
- 5.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el recipiente de depósito (11) está conectado con la columna de separación (1), de modo que se puede introducir o no la solución tampón en la columna de separación (1), a través de un dispositivo de limitación del flujo (8, 9) con una velocidad de flujo ajustable, y/o en donde la columna de separación (1) comprende un dispositivo de limitación de la circulación (4, 5), que es capaz de controlar el flujo de salida de la columna de separación (1) y la velocidad de flujo dentro de la columna de separación (1).
- 6.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuerza iónica de la solución base se adapta dependiendo de las macromoléculas, de modo que se compensan los efectos de la agregación de las macromoléculas sobre el material biológico, en donde la solución básica tiene una concentración isoosmolar de cationes sodio, potasio, magnesio o calcio y de aniones cloruro, fosfato, sulfato o carbonato, particularmente es una solución salina o de sacarosa tamponada con fosfato o una mezcla de las mismas.
- 7.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde las macromoléculas incluyen de forma ventajosa polielectrolitos o polianfolitos naturales o sintéticos, particularmente un polielectrolito sintético o un polielectrolito orgánico ácido D-glucurónico, y/o en donde las macromoléculas presentan un punto isoeléctrico que, con el valor de pH de la solución básica, conduce a una carga que se corresponde con la carga de las partículas del material biológico que se van a separar y/o en donde las macromoléculas tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 kDa, particularmente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 70.000 kDa.
- 8.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde las macromoléculas incluyen proteínas globulares, particularmente albúminas, seroalbúmina bovina o humana, ovoalbúmina, lactoalbúmina o albúminas vegetales, β -lactoglobulina, κ -caseína, histonas, protaminas, globulinas, prolaminas o glutelinas, con una concentración desde aproximadamente 3 a aproximadamente 7% en peso, particularmente desde aproximadamente 4 a aproximadamente 5% en peso, en relación con la solución tampón.
- 9.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde las proteínas filamentosas incluyen colágenos hidrolizados en una concentración desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 20% en peso, especialmente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10% en peso.
- 10.- Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, en donde las gelatinas incluyen gelatinas bovinas, gelatinas porcinas o gelatinas de teleósteo y/o tienen una concentración desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 1,5% en peso, particularmente desde aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 0,8% en peso, y/o tienen un poder de gelificación bajo de aproximadamente 150 Bloom o menor, particularmente de aproximadamente 75 Bloom o menor.
- 11.- Procedimiento para la separación o la purificación de material biológico magnético intrínseco o marcado de forma magnética preparativa, mediante una separación magnética de gradiente elevado, en donde una suspensión con el material biológico fluye a través de una matriz (2) ferromagnética dispuesta en un campo magnético externo,

- de modo que el material se adhiere a la matriz (2), caracterizado porque la matriz (2) no está revestida, porque el material biológico está suspendido en una solución tampón con una solución base y macromoléculas que saturan los sitios de unión inespecífica de la matriz (2) durante la circulación a través de la matriz, y porque la matriz (2) y una columna de separación (1) que la rodea, se equilibran antes de la circulación de la suspensión, mediante una incubación previa con solución tampón pura, es decir, una solución tampón que no contiene material biológico y durante un periodo de tiempo suficientemente largo para saturar los sitios de unión inespecífica en la matriz (2).
- 5
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, en donde la matriz (2) se equilibra durante un tiempo de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos, y en donde la matriz (2) se mantiene continuamente cubierta por la solución tampón durante el proceso de equilibrado.
- 10
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en donde para la separación de material biológico indeseado, el material eluido, es decir, un líquido que sale de la matriz (2), es recogido preferiblemente después de la circulación, en donde, después de la introducción de la suspensión en la matriz (2), una solución tampón adicional pura fluye a través de la matriz (2), con el campo magnético todavía activado, hasta que se asegura que la suspensión ha salido completamente de la matriz (2), y en donde la matriz (2) se mantiene siempre cubierta por la solución tampón durante la circulación.
- 15
- 14.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde para la purificación de material biológico deseado, después de la introducción de la suspensión en la matriz (2), con el campo magnético externo todavía activado, se hace circular a través de la matriz (2) una solución tampón pura adicional hasta que se asegura que la suspensión ha salido totalmente de la matriz (2), y posteriormente, la matriz (2) se lava con solución tampón pura adicional, con el campo magnético externo desactivado mediante separación espacial o mediante desconexión del mismo y en donde el material eluido se recoge, manteniendo la matriz (2) siempre cubierta con la solución tampón durante el procedimiento completo.
- 20
- 15.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el material eluido recogido se centrifuga y el proceso se repite una o varias veces, con el material biológico separado por centrifugación sin la fase líquida del material eluido.
- 25

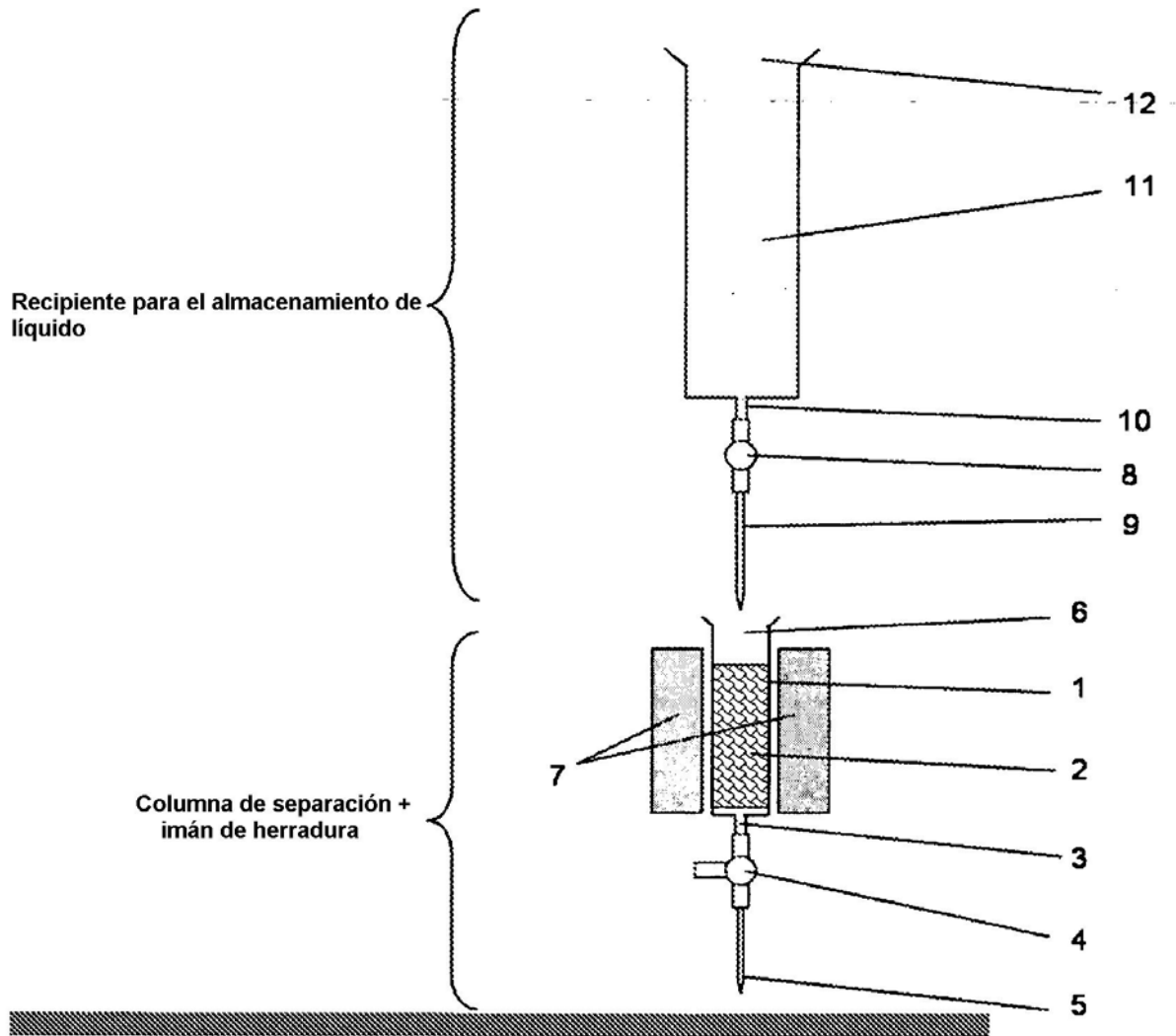


Fig. 1

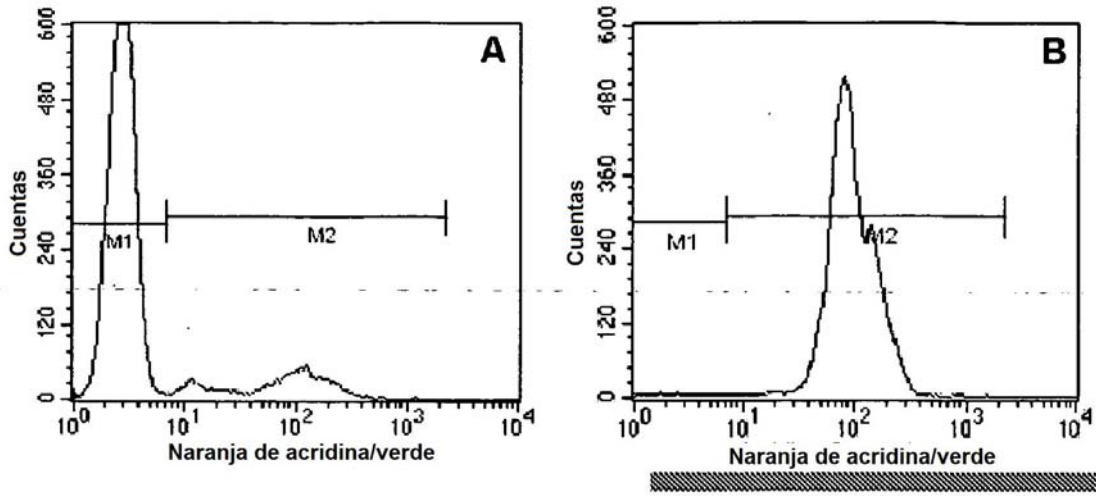


Fig. 2

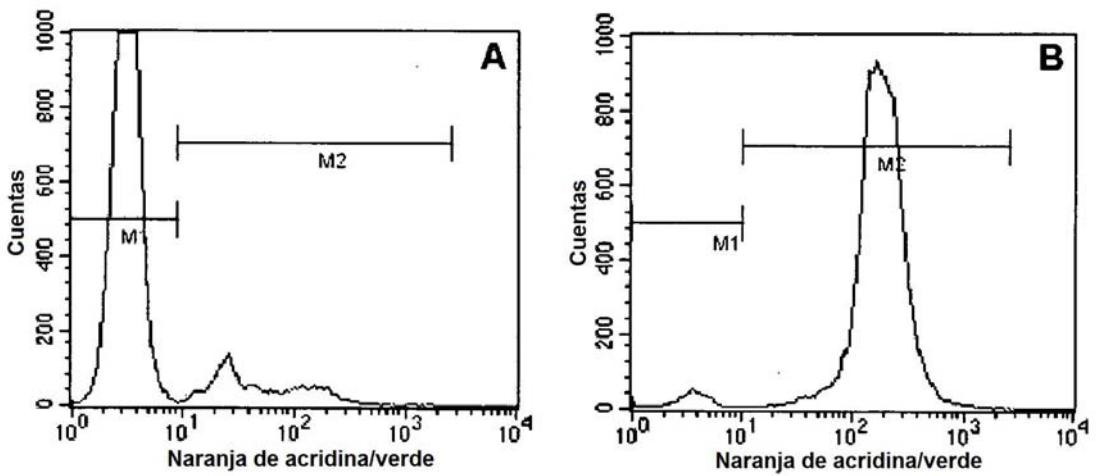


Fig. 3

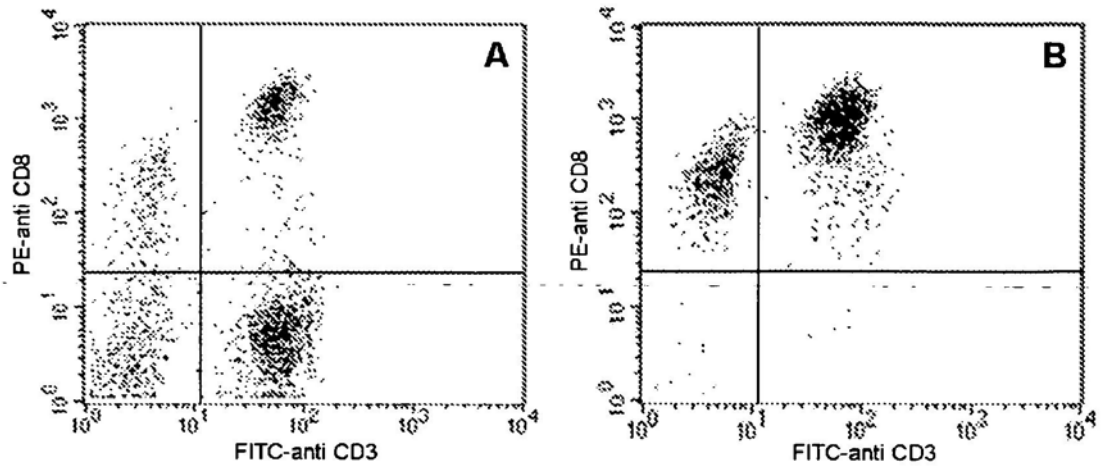


Fig. 4

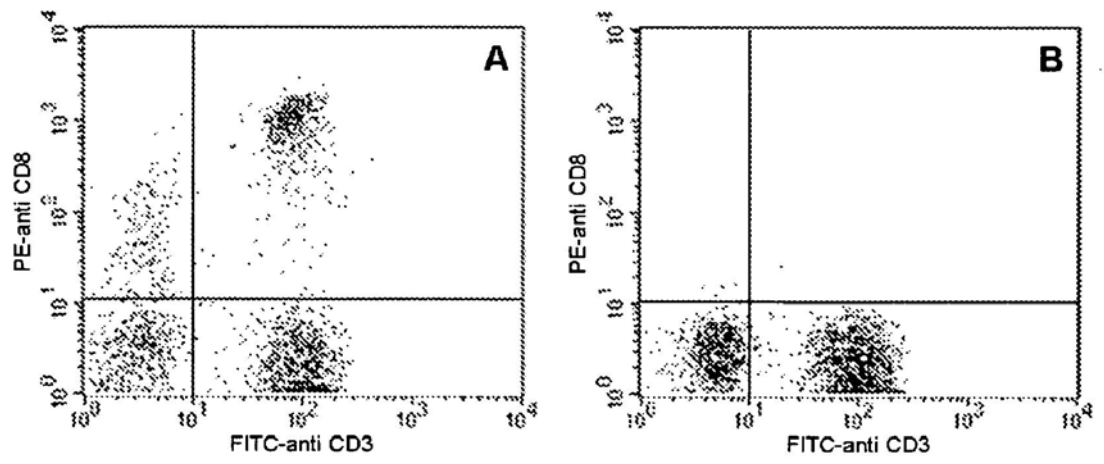


Fig. 5