

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 863**

51 Int. Cl.:

B04B 5/04 (2006.01)

B04B 13/00 (2006.01)

G01N 15/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08858277 .0**

96 Fecha de presentación: **08.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2227334**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2010**

54 Título: **CENTRÍFUGA PARA SEPARAR UNA MUESTRA EN POR LO MENOS DOS COMPONENTES.**

30 Prioridad:
07.12.2007 US 12361 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
**MILTENYI BIOTEC GMBH
FRIEDRICH-EBERT-STRASSE 68
51429 BERGISCH GLADBACH, DE**

72 Inventor/es:
**MILTENYI, Stefan;
SCHIMMELPFENNIG, Winfried;
LANTOW, Holger;
NEUSCHÄFER, Elmar, Niklas;
BIEHL, Martin;
KABAHA, Eiad y
SCHULZ, Jürgen**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 374 863 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

Centrífuga para separar una muestra en por lo menos dos componentes.

- 5 La presente invención se refiere a una centrífuga para separar una muestra en por lo menos dos componentes y a un procedimiento para separar una muestra en por lo menos dos componentes, en el que se utiliza dicha centrífuga.

Antecedentes de la invención

- 10 Se puede utilizar la centrifugación en un procedimiento físico para separar una muestra en por lo menos dos de sus componentes. En particular, se utiliza la centrifugación en la técnica para separar muestras de origen biológico en dos o más componentes. Dichos componentes se pueden continuar procesando por separado.

- 15 Cuando se realiza una centrifugación, resulta ventajoso poder controlar el progreso de la separación de los componentes que constituyen la muestra.

Por consiguiente, el problema subyacente de la presente invención comprende proporcionar unos medios para realizar una centrifugación que permita controlar el progreso del proceso de separación.

- 20 La patente US nº 5.260.598 describe un dispositivo de separación con una cámara de separación transparente, mediante la cual una fuente luminosa directa ilumina los componentes que se van a separar y los componentes individuales reflejan la intensidad de la luz como función de su color individual (brillo) a través de la óptica hacia un grupo lineal de fotodetectores. Las señales recibidas por los detectores se envían a una unidad informática en la que se procesan. Una unidad de regulación, que funciona con mucha exactitud debido a la precisión y a la velocidad
25 elevada del receptor y de la unidad informática, se controla con un programa y, de este modo, se garantiza un rendimiento óptimo de la separación del dispositivo de separación.

- La patente US nº 6.709.377 describe un dispositivo centrífugo. El dispositivo centrífugo comprende dos unidades
30 motrices, montadas coaxialmente y giratorias, unos dispositivos para accionar las unidades motrices primera y segunda, con un índice de velocidad de rotación de 2/1 entre sí, una unidad centrífuga circular provista de por lo menos tres canales que unen su centro con una cámara de separación periférica y tres tubos realizados de un material deformable elástico, presentando cada uno un primer extremo unido a la extremidad central de uno de los tres canales de la unidad centrífuga. Los primeros dispositivos de acoplamiento forman parte de la primera unidad de disco y los segundos dispositivos de acoplamiento forman parte de la unidad centrífuga, acoplados mediante
35 dispositivos elásticos. Una unidad de control móvil, que forma una pieza con un elemento de sujeción, se une a dichos dispositivos elásticos para liberar los dispositivos de acoplamiento entre sí.

- El documento EP 0 654 669 A2 describe un procedimiento de separación de una muestra líquida que presenta unas partes de fases con distintas densidades mediante centrifugación, en el que se utiliza un recipiente separador de
40 fases. El recipiente separador de fases comprende un alojamiento que presenta unas paredes cilíndricas concéntricas interior y exterior que definen un eje longitudinal y una pared superior y asimismo un cuerpo de pistón que constituye una pared en el fondo del alojamiento. El cuerpo del pistón define junto con la pared cilíndrica exterior, la pared cilíndrica interior y la pared superior, una cámara anular destinada a alojar la muestra líquida. El cuerpo del pistón se puede desplazar dentro de la cámara anular para drenar una parte de la fase separada de la muestra líquida a través de unos medios de conducto de drenaje que se comunican con la cámara anular. La cámara de separación de fases comprende además una cámara de reacción en la que se procesan las partes de la fase expuestas desde la cámara anular. El aparato comprende además unos medios de suministro de líquido para suministrar la muestra líquida a la cámara anular, unos medios motrices para girar el recipiente de separación de fases alrededor de su eje longitudinal a una cierta velocidad de rotación que provoca la separación de la muestra líquida en las partes de la fase y unos medios de accionamiento para desplazar el cuerpo del pistón dentro de la
50 cámara anular.

- La patente US nº 4.632.908 describe un sistema de calefacción para la calentar un producto de rotación rápida, que comprende unos medios estroboscópicos que pueden emitir energía radiante y que se disponen para irradiar
55 energía en el producto, una fuente luminosa dispuesta para iluminar unos medios sensores de la temperatura en el producto, unos medios de detección de la luz para medir los cambios en la luz reflejada por los medios sensores de la temperatura y unos medios de control para activar los medios estroboscópicos como respuesta a la luz reflejada por los medios de detección.

Breve sumario de la invención

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante una centrífuga y un procedimiento de utilización de dicha centrífuga, ambos descritos en la presente memoria.

- 65 En un aspecto de la presente invención, se proporciona una centrífuga para separar una muestra en por lo menos dos componentes. Dicha centrífuga comprende una cámara (o cámara de procesamiento o recipiente giratorio)

destinada a alojar una muestra que va a ser centrifugada y unos medios para controlar el progreso de la separación de la muestra dispuesta en la cámara. La separación de la muestra tiene como resultado que por lo menos un primer componente y un segundo componente se separan entre sí. Por lo tanto, los componentes forman capas en la cámara centrífuga que se pueden detectar.

5 En una forma de realización preferida de la presente invención, los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra comprenden una ventana, un espejo o un prisma que se dispone de tal modo que la luz de una fuente luminosa se puede transmitir a través de por lo menos una parte de la muestra y que la luz que sale del prisma se puede detectar mediante un detector de luz. Además, los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra pueden comprender un prisma doble, con dos secciones prismáticas alineadas con simetría especular.

15 La cámara de la centrífuga comprende una placa base circular, cuyo centro se orienta sustancialmente perpendicular al eje de rotación; un recubrimiento o una pared que se orienta sustancialmente perpendicular a la placa base de tal modo que la placa base y el recubrimiento forman entre sí una estructura similar a un depósito (parte inferior de la cámara); y una placa de cubierta circular (tapa; parte superior de la cámara), que se puede disponer en el borde del recubrimiento que se encuentra alejado de, o enfrentado a, la placa base y cuyo centro se orienta sustancialmente perpendicular al eje de rotación. Por lo tanto, se realiza una cámara de centrifugación cerrada, que comprende una parte inferior de tipo depósito y una parte superior en forma de tapa.

20 Los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra se disponen en la placa base o la placa de cubierta de la cámara. Se prefiere que los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra (por ejemplo, el prisma o el prisma doble) se dispongan en la placa de cubierta de la cámara.

25 Los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra se disponen en un canal o en un hueco que se encuentra en la placa base o en la placa de cubierta de la cámara de tal modo que la muestra puede entrar en el canal o en el hueco durante la centrifugación de tal modo que se puede detectar la muestra. Es decir, el canal o hueco se configura de tal modo que por lo menos una parte de la muestra puede circular hacia el mismo durante la centrifugación. En particular, se puede detectar la separación de la muestra, ya que la luz puede penetrar, por lo menos en parte en los distintos componentes de la muestra. De este modo, se genera una señal que permite determinar cuándo se ha completado la separación de la muestra. Además, la cámara puede comprender un orificio de salida que permite drenar un componente de la muestra desde la cámara durante la centrifugación.

35 Además de la formación de capas, la separación de la muestra se puede detectar asimismo utilizando el valor del pH y/o la temperatura. Ello se describirá más detalladamente haciendo referencia a las figuras.

40 El canal se orienta de tal modo que se extiende radialmente de un modo lineal desde una zona que se encuentra en el eje de rotación hasta una zona que se encuentra en el perímetro de la placa base o la placa de cubierta, dependiendo de dónde se disponen los medios de detección. El canal se dispone de tal modo que en cada lado puede pasar la luz desde el prisma o prisma doble hacia el canal que comprende la muestra durante la centrifugación. La detección de la luz que pasa a través de la muestra permite determinar hasta qué punto se ha realizado la separación de la muestra y determinar asimismo la posición de los límites entre los distintos componentes de la muestra. Basándose en el conocimiento de la posición de los límites entre los distintos componentes, se pueden drenar determinados componentes de la cámara a través de por lo menos un orificio de salida, que se encuentra en la cámara.

50 En una forma de realización preferida, la cámara se configura de tal modo que puede actuar como, o alojar, un recipiente para el cultivo celular. De este modo, se puede utilizar la cámara de centrifugación tanto en el cultivo celular como en el procesamiento de las células cultivadas en el mismo. La cámara permite una amplia variedad de procedimientos de cultivo celular a realizar, tales como el cultivo de las células, la separación, el lavado, el enriquecimiento de las células o los distintos tipos de células, u otros. Para ello, la cámara puede comprender unos orificios adicionales de entrada/salida, por ejemplo, para gases, medios de cultivo celular o similares. Las condiciones del cultivo celular resultan conocidas en la técnica.

55 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para separar una muestra en por lo menos dos componentes. Dicho procedimiento comprende las etapas de proporcionar una muestra y centrifugar la muestra en una centrífuga, tal como se ha descrito anteriormente y en la presente memoria.

60 Tal como se ha descrito anteriormente y en la presente memoria, la muestra es preferentemente una muestra biológica, tal como sangre, médula ósea, células, composiciones que comprenden células o componentes celulares, o similares.

65 La centrífuga puede formar parte de una unidad de procesamiento de muestras. Dicha unidad de procesamiento de muestras puede comprender un orificio de entrada y un orificio de salida acoplados a la cámara de la centrífuga, tal como se describe en la presente memoria, presentando por lo menos una cámara de muestras, en la que la unidad de procesamiento de la muestra se configura para proporcionar una primera etapa de procesamiento de una

muestra o para girar el recipiente a fin de aplicar una fuerza centrífuga a una muestra depositada en la cámara y separar por lo menos un primer componente y un segundo componente de la muestra depositada. La unidad de procesamiento de la muestra se puede acoplar a una unidad de separación de muestras para formar un sistema. La unidad de separación de muestras se puede acoplar al orificio de salida de la unidad de procesamiento de la muestra, comprendiendo la unidad de separación de muestras un soporte para la columna de separación, una bomba y una pluralidad de válvulas configuradas para controlar por lo menos parcialmente la circulación de fluidos a través de un sistema circuitos de fluidos y una columna de separación dispuesta en el soporte, configurándose la columna de separación para separar componentes etiquetados y sin etiquetar de la muestra que circula a través de la columna.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una cámara de una centrífuga, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 1A representa una cámara de una centrífuga según una forma de realización de la presente invención con una fuente luminosa y un detector para detectar el progreso de la separación de las muestras en la cámara.

La figura 2 representa una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento de una centrífuga, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 2A representa una vista en planta superior de una cámara de procesamiento, según una forma de realización de la presente invención.

La figura 3 representa una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento, según otra forma de realización de la presente invención.

La figura 3A representa una vista centrada en una parte de una cámara de procesamiento, tal como se representa en la figura 3.

La figura 4 representa una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento, según otra forma de realización de la presente invención.

La figura 4A representa una vista de la parte inferior de la cámara de procesamiento con una abertura para suministrar gas y una membrana hidrófoba adherida.

La figura 4B representa una forma de realización de la parte inferior de la cámara con unos canales en espiral para la aireación a través de la membrana adherida a la parte inferior de la cámara.

La figura 5 representa una vista del interior de la tapa de una cámara giratoria con un canal o hueco en el que la circula la muestra durante la centrifugación, con unos medios para detectar el progreso de la separación de la muestra en forma de prisma.

La figura 6 representa la trayectoria de la luz a través de la muestra mediante un prisma. El prisma (prisma doble) se configura de tal modo que la luz de una fuente luminosa puede penetrar por lo menos parcialmente a través de por lo menos una parte de la muestra que se está separando por centrifugación y la luz que pasa a través de por lo menos una parte de la muestra se puede detectar mediante un detector de luz.

La figura 7 representa un prisma doble que forma parte de un nervio que se encuentra en la tapa de la cámara giratoria.

La figura 8 representa un sistema con una centrífuga según una forma de realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una centrífuga para separar una muestra en por lo menos dos componentes. Dicha centrífuga comprende una cámara o cámara de procesamiento para alojar una muestra que va a ser centrifugada y unos medios para controlar el progreso de la separación de la muestra que se encuentra en la cámara.

La cámara de muestras o cámara, que puede formar parte asimismo de una unidad de procesamiento (véase posteriormente), se describirá a continuación haciendo referencia a las figuras 1 a 4.

Se describirá una cámara de procesamiento de una centrífuga según una forma de realización de la presente invención haciendo referencia a la figura 1. La cámara 170 comprende una parte superior 172 y una parte inferior 174, con un eje de rotación 176 y los orificios para fluidos o conexiones de conductos 176, 178 conectados fluidamente con uno o más compartimentos interiores de la cámara 170. La parte superior 172 comprende una

estructura de soporte 182 que se orienta sustancialmente radialmente, que se extiende desde una zona que se encuentra en el eje de rotación 176 hasta una zona que se encuentra en el perímetro de la parte superior 172, así como la estructura 184 que comprende un canal 186, que puede comprender por lo menos una parte que es visible a través de una ventana o de un prisma 188. El canal 186 se puede acoplar fluidamente a un compartimento de contención de la muestra en la cámara 170 y configurarse para la supervisión o detección exterior de procesamiento de las muestras. Por ejemplo, un componente (por ejemplo, células) en el líquido del canal 186 puede separarse visiblemente durante las etapas de procesamiento, lo que indica la separación de las células o de los componentes de la muestra en uno o más compartimentos interiores de la cámara. Unos medios de rotación o de soporte 180 proporcionan un movimiento de rotación de la cámara 170 alrededor del eje 176.

La cámara 170 puede comprender asimismo por lo menos una válvula, que comprende preferentemente una membrana estéril e hidrófoba o tampón. Preferentemente, dichas membranas o tampones se pueden encontrar en la parte superior o inferior de la cámara. Por lo menos una válvula en la cámara presenta la ventaja particular de que el volumen de la cámara se puede cambiar fácilmente sin cambiar la presión de la cámara o disponer más orificios de entrada y/o salida para el intercambio de aire o gases.

Las centrifugadoras conocidas en la técnica permiten la centrifugación por lotes, es decir, si el volumen de la muestra que se va a reducir o concentrar es superior al de la cámara, se requieren diversas etapas de centrifugación para alojar el producto concentrado. En una forma de realización de la presente invención, el sistema permite la centrifugación continua: la muestra, los medios, los gases y los otros materiales pueden entrar y salir del sistema, por ejemplo, a través de los orificios de entrada y salida (por ejemplo, en la figura 1: el orificio de entrada 178 y el orificio de salida 180) sin detener el proceso de centrifugación y el llenado de la centrífuga (centrifugación por lotes). Ello permite una concentración constante de la muestra y el producto se podrá retirar únicamente una vez al final de la centrifugación, evitando de este modo la contaminación potencial debida a una manipulación adicional.

En la figura 1a, se representa un recipiente giratorio o cámara de centrifugación 500. En la parte inferior de la cámara giratoria 500 se dispone un área de enfoque de un microscopio 505 que comprende por lo menos una plataforma con sensor 504. Debajo de la cámara giratoria 500, se encuentra un módulo de cámara de microscopio 503 que comprende la óptica de un microscopio 501 y un motor de accionamiento del microscopio 502 para enfocar la óptica. La óptica del microscopio 501 se configura de tal modo que se puede enfocar automáticamente para detectar la muestra que se está separando en por lo menos dos componentes durante la centrifugación. De este modo, el módulo de la cámara del microscopio 503 se puede utilizar para detectar las distintas capas formadas por la muestra separada en la cámara 500 debido a las fuerzas centrífugas. Además, se puede determinar el valor del pH de los componentes de la muestra. Para ello, se utiliza un indicador en la cámara 500 que cambia de color en función del valor presente del pH. Además, resulta posible medir la temperatura de la muestra en la cámara utilizando cristales líquidos que se disponen en la cámara de tal modo que se puede detectar su posición con un módulo de cámara del microscopio 503 desde el exterior. De este modo, se puede determinar la temperatura en la cámara de 500.

El módulo de la cámara del microscopio 503 puede ser móvil, de tal modo que el módulo 503 se puede dirigir con la óptica de su microscopio 501 hacia distintas plataformas con sensores 504 dispuestas en la pared de la cámara de 500. Ello facilita la detección de las diversas capas formadas en la cámara de 500 o la detección del pH o la temperatura en distintas posiciones dentro de la cámara 500.

La figura 2 representa una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento de las muestras según una forma de realización de la presente invención. La cámara 190 comprende una parte superior 192 y una parte de base 194, y uno o más compartimentos interiores. La cámara 190 se configura para girar sobre un eje a fin de aplicar una fuerza centrífuga a la muestra dispuesta en uno o más compartimentos en la cámara, separando de este modo por lo menos dos componentes de la muestra. La cámara comprende una línea central 196 conectada fluidamente con por lo menos un compartimento de la cámara. Los elementos de la cámara 190 comprenden además el conducto exterior 198; el soporte giratorio 200; los cierres herméticos giratorios 202, 204, 206; el conducto de entrada exterior a la cámara 205, el canal radial inferior 208, la entrada del conducto interior 210 hacia un compartimento de la cámara; la pendiente 212 y el deflector 214. Se proporciona un dispositivo de retención de la cámara 216 y se configura para disponer y acoplar el mismo en la cámara 190 con otros elementos de un sistema de la presente invención.

La cámara de centrifugación 190 comprende preferentemente un cierre hermético giratorio, opcionalmente con dos conductos para fluidos, preferentemente con dos conductos para fluidos. Los conductos para fluidos pueden entrar en la cámara 190 en una posición distinta. Por ejemplo, resulta posible disponer un primer conducto para fluidos en el perímetro exterior de la parte superior 192 (tapa). Un segundo conducto para fluidos se puede disponer más próximo al interior, por ejemplo, entre 2 mm y 20 mm más próximo al centro de la cámara 190. Opcionalmente, se puede disponer una válvula en la parte superior 192, por ejemplo, en forma de membrana.

Generalmente, la posición de las aberturas, tales como orificios o entradas de conductos en la cámara de centrifugación se puede configurar de tal modo que sea la más apta para la centrifugación de una muestra particular. En función de los componentes de una muestra particular y el volumen relativo de cada componente en la muestra,

se pueden disponer las aberturas de tal modo que se pueda realizar la extracción y/o detección de un componente particular.

5 La figura 2A representa una vista en planta superior de una cámara 201. La cámara 201 comprende un conducto interior 203, un canal inferior radial 205, una entrada del conducto interior 207 hacia la cámara, opcionalmente un deflector 209, una pendiente 211 y una entrada de luz.

10 La figura 3 representa una vista en sección transversal de una cámara según otra forma de realización de la presente invención. La cámara 220 comprende un eje alrededor del que gira la cámara, una conexión del conducto central 222 y una conexión del conducto exterior 224, y uno o más compartimentos interiores. Se representan asimismo los soportes giratorios 226, así como los cierres herméticos giratorios 228, 230, 232; el canal interior 234, el canal de detección óptica 236 (similar al descrito anteriormente); la entrada del conducto interior 238 a la cámara; el conducto interior 240 y el canal radial inferior 242. La cámara comprende además un refuerzo interior 246 y una cámara de retención 248. La figura 3A representa una vista centrada en parte de una cámara 220 tal como se ha descrito anteriormente. Se representan un canal de detección óptica 236, un prisma 237 y una entrada de 239 (que se indica además mediante flechas). Se puede observar que la luz de una fuente luminosa (no representada) se dirige mediante el prisma 237 de tal modo que pasa a través del canal 234 que se llena con la muestra durante la centrifugación. La luz que abandona el canal 234 se desvía mediante el prisma 237 y se puede detectar mediante un detector (no representado).

20 En otra forma de realización de la presente invención representada en la figura 4A, la parte inferior de la cámara de la centrifuga puede presentar una o más aberturas 291 que se pueden cubrir con una membrana hidrófoba 292. Dichas aberturas 291 se utilizan para suministrar gases a la cámara, por ejemplo para los procedimientos de los cultivo celulares (tales como CO₂, N₂, O₂, etc.) La membrana se puede pegar o unir térmicamente o mediante ultrasonidos o unir mediante otros medios a la parte inferior de la cámara de un modo que garantice una conexión estéril con la cámara.

25 En otra forma de realización de la presente invención (figura 4B), la parte inferior de la cámara puede presentar un sistema de canales para la circulación de gases, por ejemplo, unos canales acoplados como un sistema en espiral 293, lo que garantiza una gran superficie de contacto entre los gases y un membrana unida a los canales (no representada). El sistema de canales presenta por lo menos una entrada (abertura) 294 y una salida opcional (abertura) 295 para los gases.

30 Las entradas u orificios de los canales de las figuras 1 a 4A pueden variar en número y posición dentro del canal.

35 La figura 4 representa una vista en sección transversal de una cámara según una forma de realización adicional de la presente invención. La construcción de la cámara 250 es similar en muchos aspectos a las cámaras tal como se han descrito anteriormente, pero comprende además una pluralidad de estructuras en capas 252. Las estructuras en capas 252 se pueden configurar para proporcionar estructuras o capas de cultivos celulares. En su utilización, la muestra que comprende células se puede introducir en la cámara y verter sobre las capas 252. El procedimiento de separación puede comprender la rotación de la cámara de tal modo que las células que se adhieren a las capas se separen de las que presentan una afinidad inferior con respecto a las capas. Una rotación y/o interrupción intermitente durante la rotación puede continuar separando las células cultivadas de la superficie de las estructuras en capas 252 en el procedimiento de separación. La cámara comprende además un conducto central ilustrado 251, el conducto exterior 253, el soporte 255, los cierres herméticos giratorios 257, la entrada del conducto exterior 259 a la cámara, la parte superior 261, el canal interior 263, la parte de la base 265, el dispositivo de retención 267, el canal radial 269 y la entrada del conducto interior 271 a la cámara.

40 La cámara tal como se describe en la presente memoria puede comprender o se puede realizar de diversos materiales. En una forma de realización preferida, se utilizan materiales transparentes tales como plásticos, poliestirol (PS), poliestireno, cloruro de polivinilo, policarbonato, cristal, poliacrilato, poliacrilamida, polimetilmetacrilato (PMMA) y/o tereftalato de polietileno (PET). Politetrafluoretileno (PTFE) y/o poliuretano termoplástico (TPU), silicona o composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente. La cámara se puede realizar asimismo de polietileno (PE). En una forma de realización preferida, las capas de la cámara comprenden o están realizadas de colágeno, quitina, alginato y/o derivados del ácido hialurónico. Son posibles asimismo polilactida (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, que son biodegradables. Alternativamente, se pueden utilizar materiales no biodegradables, tales como el poliestirol (PS), poliestireno, policarbonato, poliacrilato, polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA), y/o tereftalato de polietileno (PET). Se pueden utilizar asimismo politetrafluoretileno (PTFE) y/o poliuretano termoplástico (TPU). Otras alternativas comprenden materiales de cerámica y cristal, tales como hidroxiapatita (HA) o fosfato de calcio. Las capas de la cámara pueden ser de material sólido o poroso.

50 En una forma de realización preferida, la cámara presenta un tamaño comprendido entre 2 cm y 50 cm de diámetro y una altura comprendida entre 5 mm y 50 cm. La centrifugación se realiza preferentemente hasta 1000 xg. El número de las capas y la distancia entre las capas es variable. En una forma de realización preferida, la cámara se puede calentar y enfriar para proporcionar una temperatura apta para la muestra que va a ser centrifugada. Para

ello, se pueden disponer unos medios de calefacción y/o refrigeración en la cámara o alrededor de la cámara.

La detección de capas ópticas en las cámaras de centrífugas se representa detalladamente en las figuras 5 a 7.

5 La cámara centrífuga conformada en forma cilíndrica representada en la figura 5 está limitada en su parte superior por una tapa 800, que puede presentar uno o más nervios de estabilización 805 en la parte superior plana. Por lo menos uno de dichos nervios radiales 805 cubre un espacio estrecho o canal 801, abierto al volumen interior de la centrífuga cuando la tapa 800 se encuentra unida a la cámara centrífuga. El espacio 801 se extiende en dirección axial desde la superficie de la tapa interior 800 pasando la tapa algunos milímetros en el nervio 805. Por lo tanto, puede ser visible desde el exterior dentro del nervio 805 cuando se utiliza material transparente. En la extensión radial, el espacio 801 se extiende desde la proximidad del centro hasta la pared cilíndrica de la centrífuga (figura 5).

15 Durante la centrifugación, las mismas fuerzas actúan en el espacio 801 y en toda la cámara centrífuga. El anillo conformado que limita con las capas en suspensión se extiende en paralelo hacia el espacio 801 y se representan como zonas finas que se mantienen axiales en la proximidad, como una capa fina transversal, que se puede detectar bien mediante sensores ópticos externos.

20 Se puede determinar libremente la anchura del espacio 801, pero tiene que ser suficientemente pequeña para poder realizar un análisis de la luz transmitida a todas las áreas asociadas a las capas en el espacio. Por lo tanto, resulta posible cuantificar las densidades ópticas y los colores de todas las capas de la suspensión en la cámara de centrifugación "sin contacto" desde el exterior mediante mediciones de la transmisión óptica.

25 Para permitir una iluminación vertical y la posición del sensor para observar los desplazamientos de las capas en el espacio, se puede añadir un prisma a un nervio, por ejemplo, en ambos lados del nervio, que se puede preformar mediante el propio material transparente del alojamiento.

30 El prisma 810 refracta el rayo luminoso vertical generado a través del espacio (horizontal) y vuelve a la parte superior, de nuevo vertical (figura 6). Durante la centrifugación, la luz de un flash electrónico activado por una posición síncrona puede transmitir la luz hacia un lado del prisma 810, por ejemplo, el prisma izquierdo, iluminando el espacio mediante la refracción. El resultado de la transmisión se refracta mediante el otro lado del prisma 810, por ejemplo, el prisma derecho, volviendo a una cámara montada en la vertical, posiblemente en la proximidad de la fuente del flash superior. La unidad de sensor óptico resultante resulta tan fácil de manipular como un sensor réflex, pero al mismo tiempo permite realizar determinaciones de la transmisión a gran escala.

35 La disposición de los ángulos del prisma garantiza la "reflexión total" en la superficie del prisma interior de los rayos luminosos del flash y evita los reflejos directos en sus superficies exteriores entre la fuente luminosa y la cámara. Por lo tanto, no existe necesidad de recubrimientos especulares y se pueden utilizar tecnologías de moldeo por inyección sin necesidad de remodelar las instalaciones (figura 7).

40 En una forma de realización, la centrífuga de la presente invención puede formar parte de un sistema de procesamiento de la muestra, tal como se conoce a partir del documento EP 0 869 838 B1.

45 Dichos sistemas de procesamiento de la muestra integran tanto sistemas de separación de muestras como técnicas de procesamiento de la muestra. Un sistema puede comprender una unidad de procesamiento de muestras configurada para realizar determinadas etapas de procesamiento antes de los procedimientos de separación, tales como la separación magnética. Por lo tanto, la presente invención puede comprender la combinación de un sistema de procesamiento de muestras y un sistema de separación de muestras. Los sistemas o unidades de procesamiento de muestras pueden proporcionar el procesamiento de muestras tales como el cultivo, el lavado, la preparación, la incubación, el etiquetado y similares de las células. Además, los sistemas y unidades de procesamiento de muestras pueden comprender técnicas de separación basadas en la centrifugación, en las que se aplica una fuerza centrífuga a una muestra para separar por lo menos un primer componente y un segundo componente de una muestra.

55 Por lo tanto, un sistema de la presente invención comprenderá habitualmente tanto una unidad de procesamiento de muestras como una unidad de separación de muestras. La combinación del sistema de procesamiento y de separación de la presente invención puede comprender un sistema cerrado que se puede programar para que realice automáticamente diversas etapas complejas de procesamiento de células que comprenden separaciones basadas en la densidad, la separación por inunofinidad, separaciones inmunomagnéticas comprendiendo las magnéticas, las etapas de cultivo, estimulación y activación celular, lavado o formulación final. La presente invención proporciona un sistema que minimiza los errores de los usuarios, mantiene la esterilidad, realiza etapas complejas de procesamiento celular con poca o ninguna interacción manual, minimiza la exposición del usuario en el procesamiento de material infeccioso. Resulta posible el procesamiento junto al lecho del paciente o en el quirófano. El dispositivo se puede accionar conectado al paciente, por ejemplo, la médula ósea obtenida de un paciente se pueden procesar directamente en una bolsa de entrada del conjunto de conductos. A continuación se puede procesar la médula ósea, es decir, separar la misma en por lo menos dos componentes.

65 Por consiguiente, una forma de realización de dicho sistema de procesamiento de las muestras se describe

5 haciendo referencia a la figura 8. Se representa un sistema de procesamiento que comprende diversos elementos acoplados, canales de circulación, sustancias amortiguadoras, reactivos, etc. Se podrá reconocer que se encuentran disponibles numerosas configuraciones y que la configuración actual se proporciona a título ilustrativo. Haciendo referencia a la figura 8, los elementos comprenden una sustancia amortiguadora del sistema 300, el orificio perforable 301, un filtro estéril 302 la bolsa de plasma/en procesamiento 303, el recipiente con reactivos de etiquetado magnético 304, el orificio perforable 305, el filtro estéril de reactivos magnéticos 306, el filtro estéril 307, la bolsa de sustancia amortiguadora/medio 308, el orificio del medio de cultivo celular, el orificio auxiliar 309, la válvula descendente unidireccional 310, la válvula ascendente unidireccional 311, la bolsa de la muestra 312, el conector de la bolsa de la muestra 313, el filtro de la muestra 314, el orificio de la muestra 315, el filtro 316, el filtro de separación previa 320, la bolsa de almacenamiento durante el procesamiento 321, la columna de separación magnética 322, la bolsa de residuos 323, la unidad de reducción del volumen 324, la bolsa de la fracción positiva 325, la bolsa de la fracción negativa 326, el filtro de aire estéril 327, la bomba 328, el filtro de aire para el sensor de presión 1 329, el filtro de aire para el sensor de presión 2 330, la unidad de procesamiento de la muestra/células 332.

15 **Ejemplo: Cultivo celular**

La cámara de centrifugación de la presente invención se puede utilizar en el cultivo celular, de un modo similar a los frascos o bolsas de cultivo celular.

20 Se han aplicado 3,2 E5/ml de la estirpe celular humana K562 a una cámara de centrifugación en un volumen de 30 ml de medio de cultivo celular RPMI1640 enriquecido con suero bovino fetal al 10%. La cámara se dispuso en una incubadora con CO₂ al 5% de CO₂. Se retiraron cantidades iguales del contenido de la cámara para realizar el recuento celular y valorar la viabilidad tras 24, 48 y 70 horas. Las células sembradas se multiplicaron hasta 4,1 E5/ml, 6,4 E5/ml y 9,2 E5/ml células viables al 80%, 95% y 95% de viabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Centrífuga para separar una muestra en por lo menos dos componentes, que comprende:

- 5 - una cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) para recibir una muestra que va a ser centrifugada, y
- unos medios para controlar el progreso de la separación de la muestra (188; 237; 810) que se encuentra en la cámara,

10 en la que la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) comprende

- una placa base circular, cuyo centro está orientado sustancialmente perpendicular a un eje de rotación,
15 - un recubrimiento que está orientado sustancialmente perpendicular a la placa base, y
- una placa de cubierta circular (192; 800), que se puede colocar en el borde del recubrimiento que se encuentra alejado de la placa base,

20 en la que los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra (188; 237; 810) se colocan en la placa base o en la placa de cubierta (192, 800)

caracterizada porque

25 los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra (188; 237; 810) se colocan en un canal (186; 205; 801) o en un espacio (801) que se encuentra en la placa base o la placa de cubierta (192, 800), en el interior de los cuales la muestra puede entrar durante la centrifugación de tal modo que se pueda detectar la misma, y

30 estando orientado el canal (186; 205; 801) o espacio (801) de tal modo que se extiende radialmente desde una zona que se encuentra en el eje de rotación de la placa base o de la placa de cubierta (192; 800) hasta una zona que se encuentra en un perímetro de la placa base o la placa de cubierta (192; 800).

2. Centrífuga según la reivindicación 1, caracterizada porque los medios para controlar el progreso de la separación (188; 237; 810) están dispuestos de tal modo que

- 35 - la luz procedente de una fuente luminosa puede penetrar, por lo menos parcialmente, a través de por lo menos una parte de la muestra que se está separando, y
- la luz que pasa a través de por lo menos una parte de la muestra se puede detectar mediante un detector de luz.

40 3. Centrífuga según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque los medios para detectar el progreso de la separación (188; 237; 810) se encuentran en la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) esencialmente perpendiculares a un eje de rotación (176) de la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500).

45 4. Centrífuga según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque los medios para controlar el progreso de la separación de la muestra (188; 237; 810) comprenden una ventana, un espejo o un prisma que se dispone, de tal modo que la luz de una fuente luminosa se puede transmitir a través de por lo menos una parte de la muestra y que la luz que abandona la ventana, espejo o prisma, respectivamente, se puede detectar mediante un detector de luz.

50 5. Centrífuga según la reivindicación 4, caracterizada porque la ventana, prisma (188; 237; 810), o espejo está colocado para recubrir el canal (186; 205; 801) o espacio (801).

6. Centrífuga según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) es un recipiente para el cultivo celular.

55 7. Centrífuga según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) comprende por lo menos una capa para el crecimiento celular en la misma.

8. Centrífuga según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque la cámara (170; 190; 201; 220; 250; 500) es desechable y/o se puede esterilizar.

60 9. Centrífuga según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la cámara comprende o se puede realizar a partir de un material seleccionado de entre el grupo constituido por: plásticos, poliestirol (PS), poliestireno, cloruro de polivinilo, policarbonato, cristal, poliacrilato, poliacrilamida, polimetilmetacrilato (PMMA), tereftalato de polietileno (PET), politetrafluoretileno (PTFE), poliuretano termoplástico (TPU), silicona, polietileno (PE), colágeno, quitina, alginato, derivados del ácido hialurónico, polilactida (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, poliestirol (PS), poliestireno, policarbonato, poliacrilato, cerámica y materiales de cristal, tales como hidroxiapatita (HA) y

fosfato de calcio, y composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente

10. Procedimiento para separar una muestra en por lo menos dos componentes, que comprende

- 5
- proporcionar una muestra que se puede separar en por lo menos dos componentes, y
 - centrifugar la muestra en una centrífuga según las reivindicaciones 1 a 9.

10

11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende además: detectar el progreso de la separación, en particular detectando la formación de capas de la muestra, el cambio del valor del pH y/o el cambio de la temperatura.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11, en el que la muestra es una muestra biológica, tal como sangre, médula ósea, células, una composición que comprende células y/o componentes celulares, o similares.

Figura 1

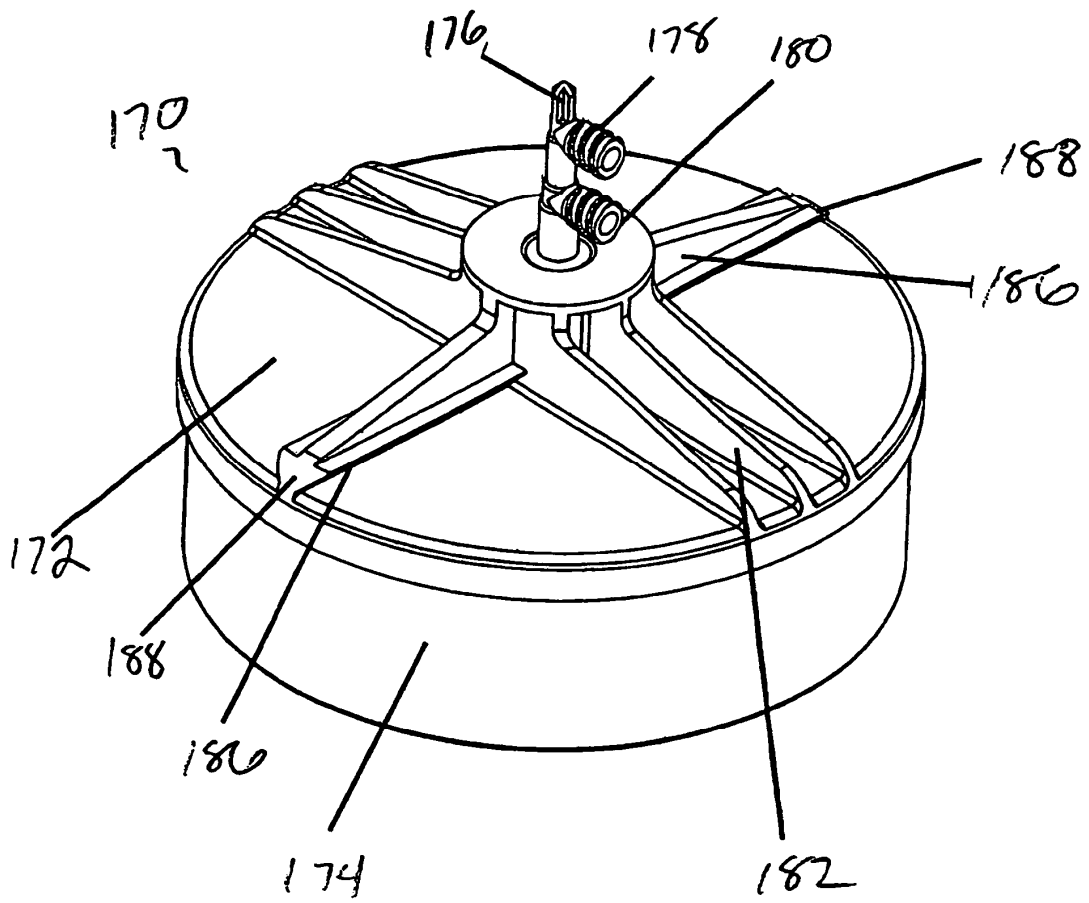


Figura 1A

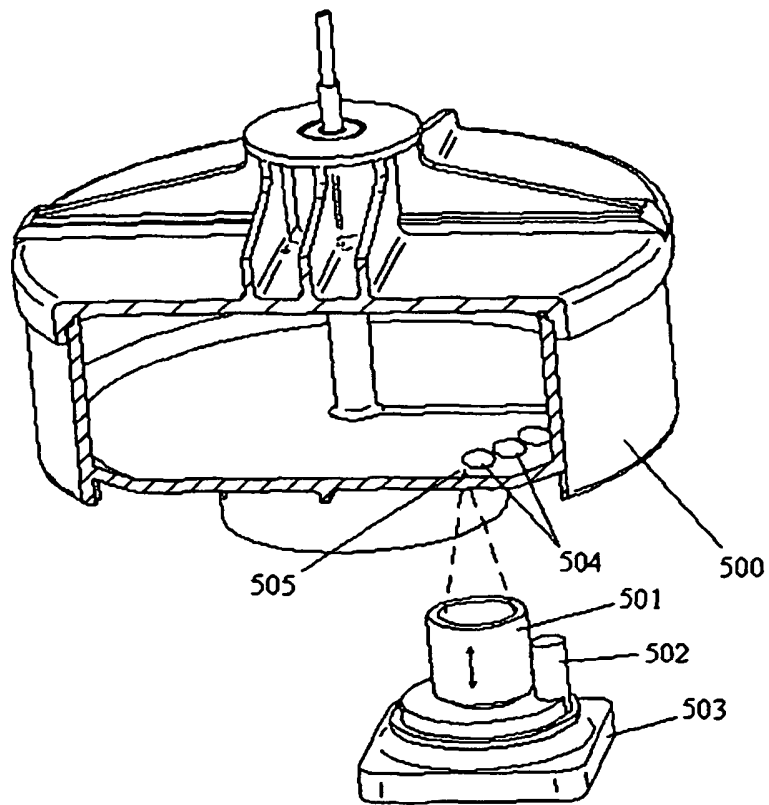


Figura 2

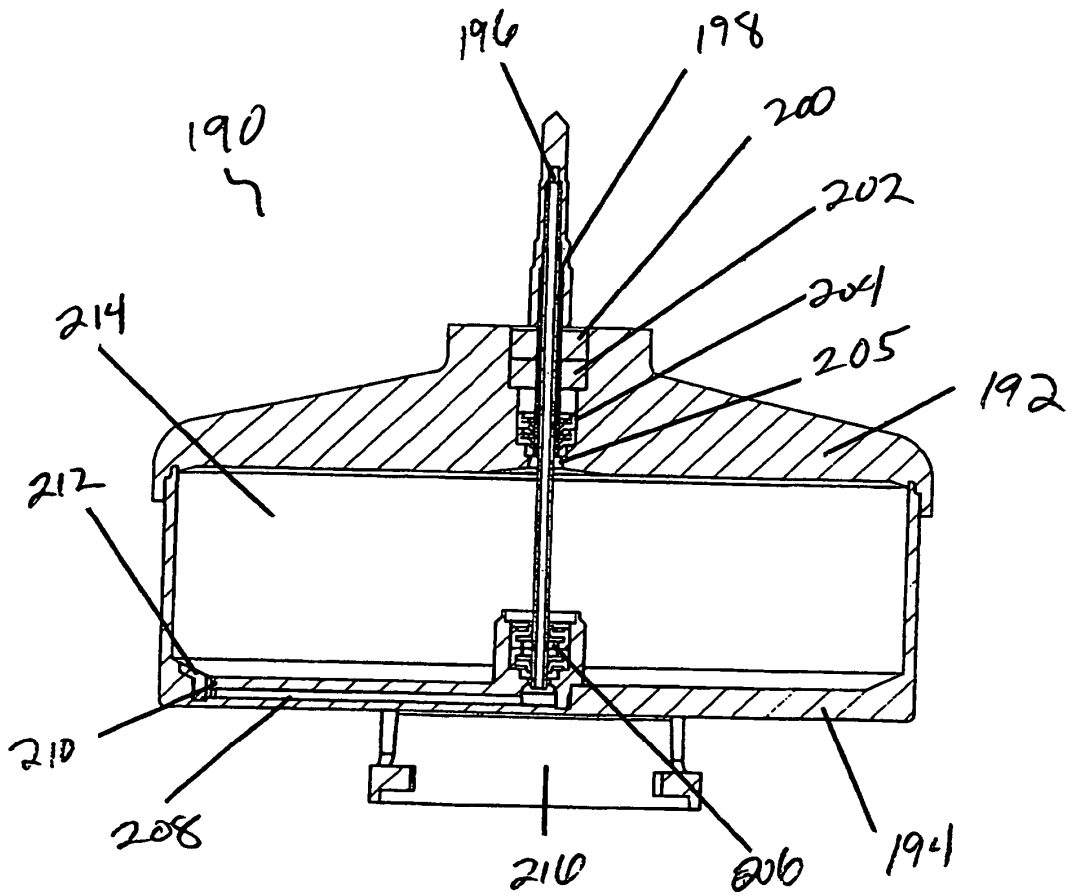


Figura 2A

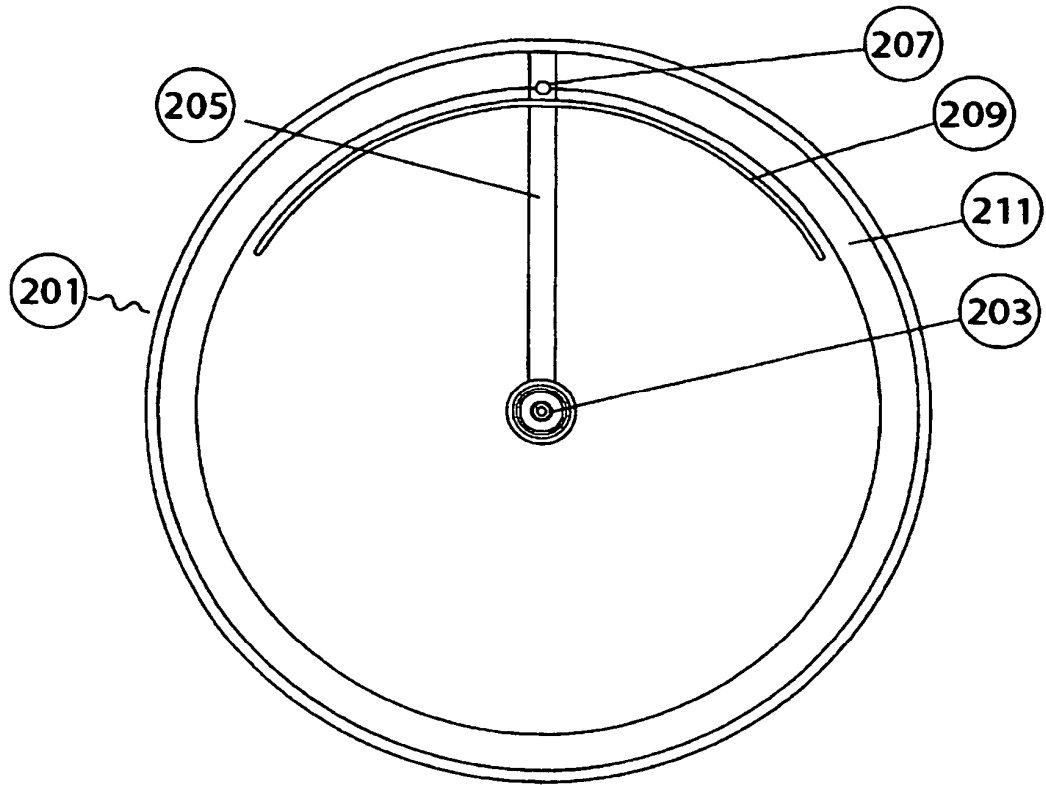
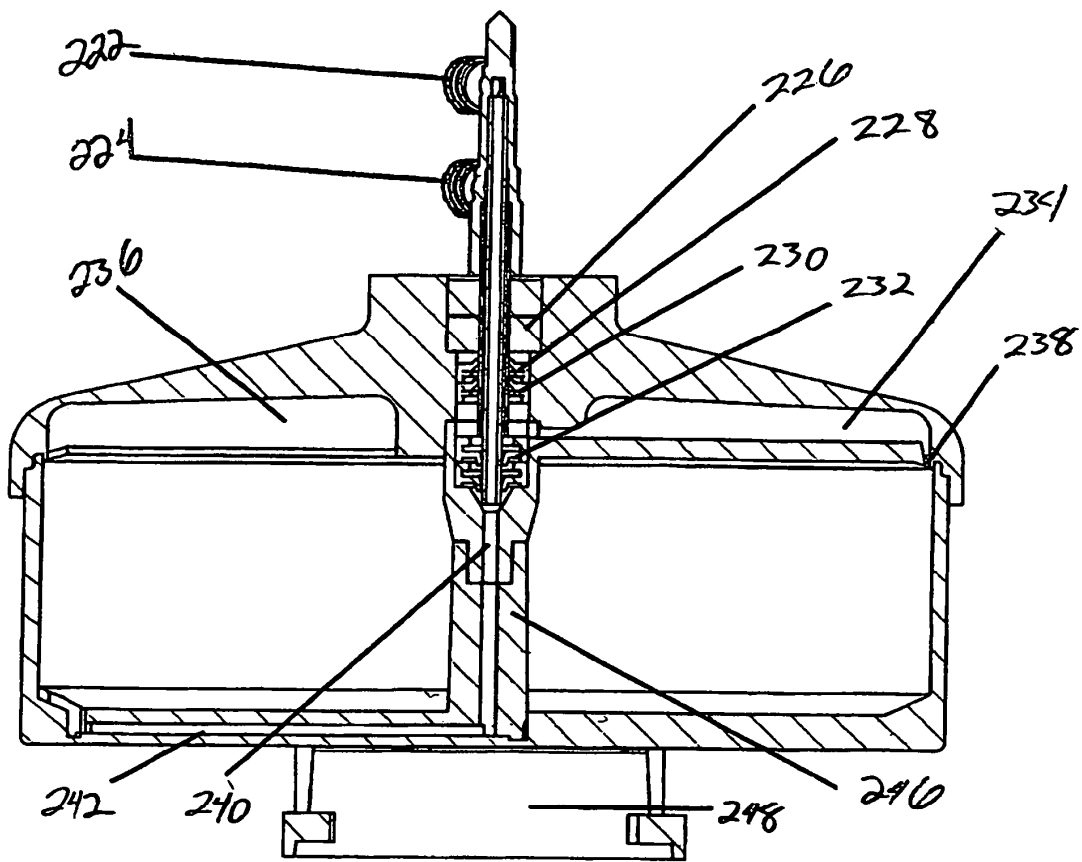
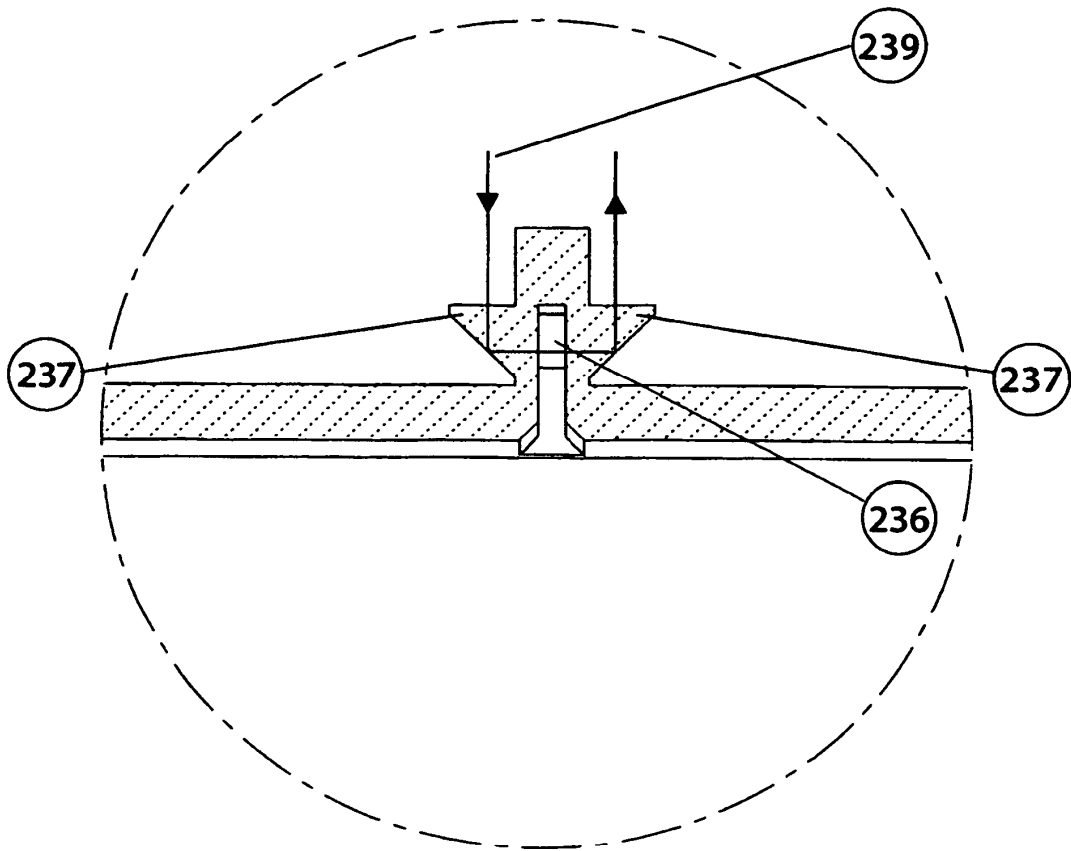


Figura 3



220

Figura 3A



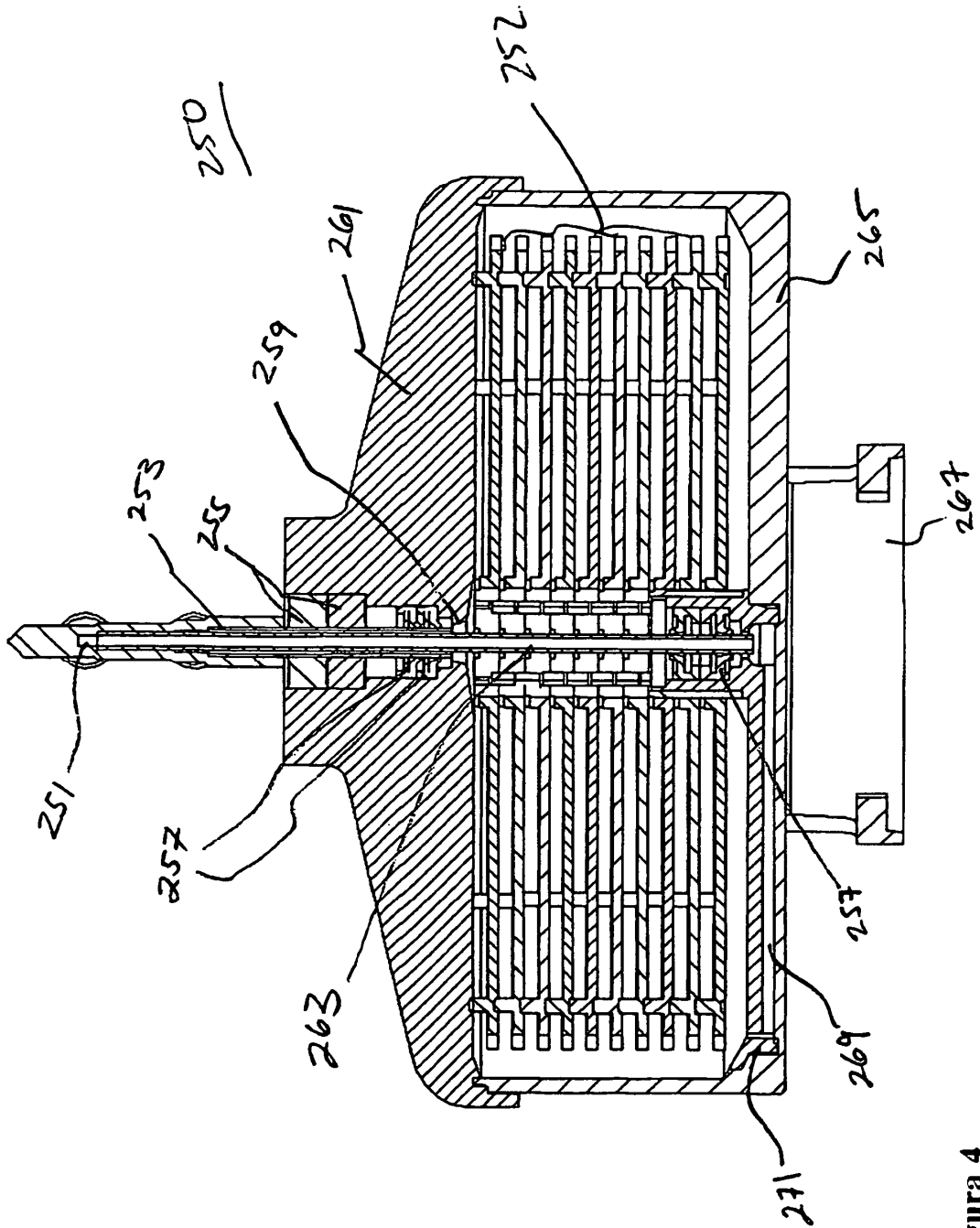


Figura 4

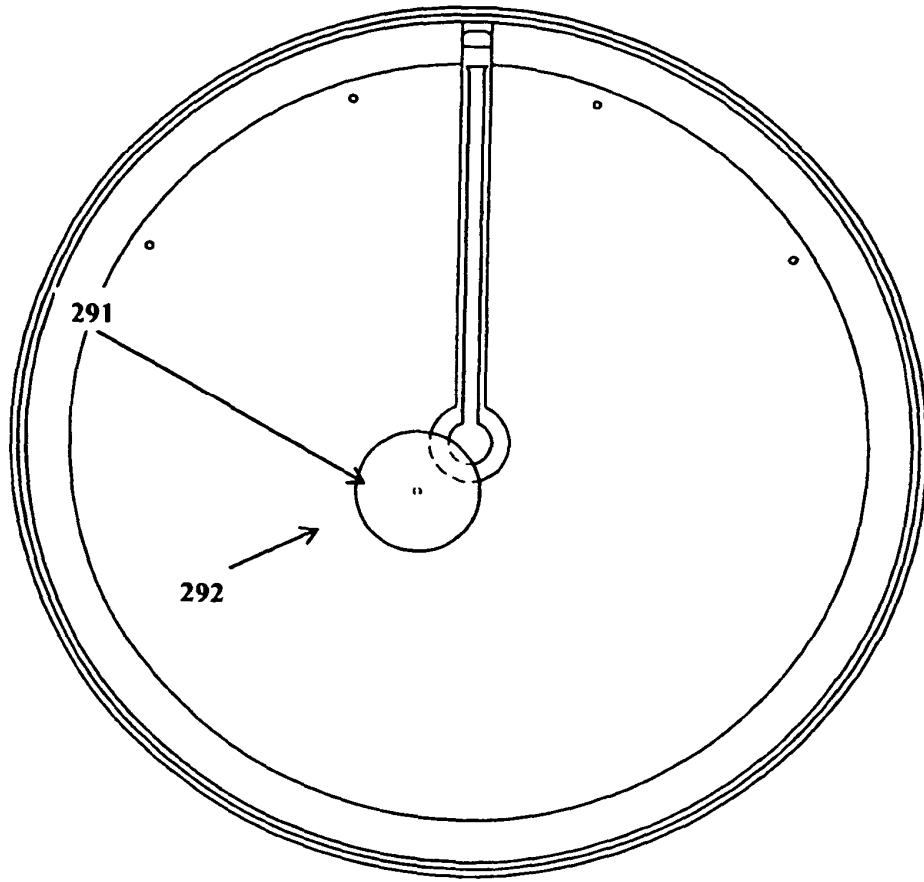


Figura 4A

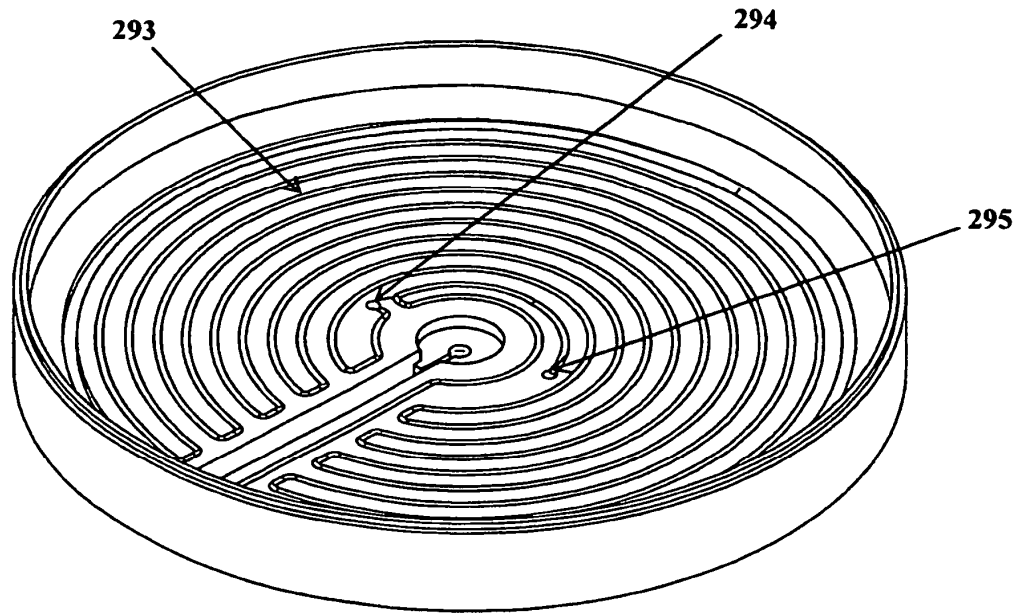


Figura 4B

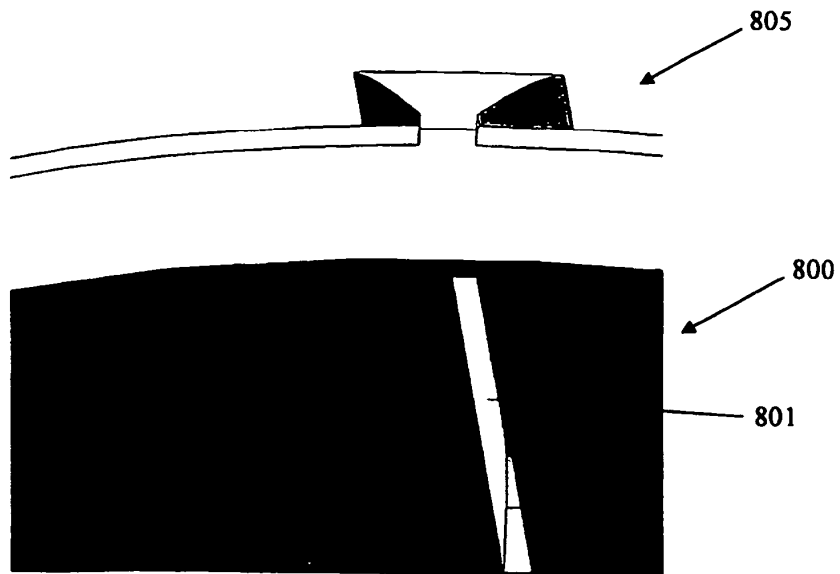


Figura 5

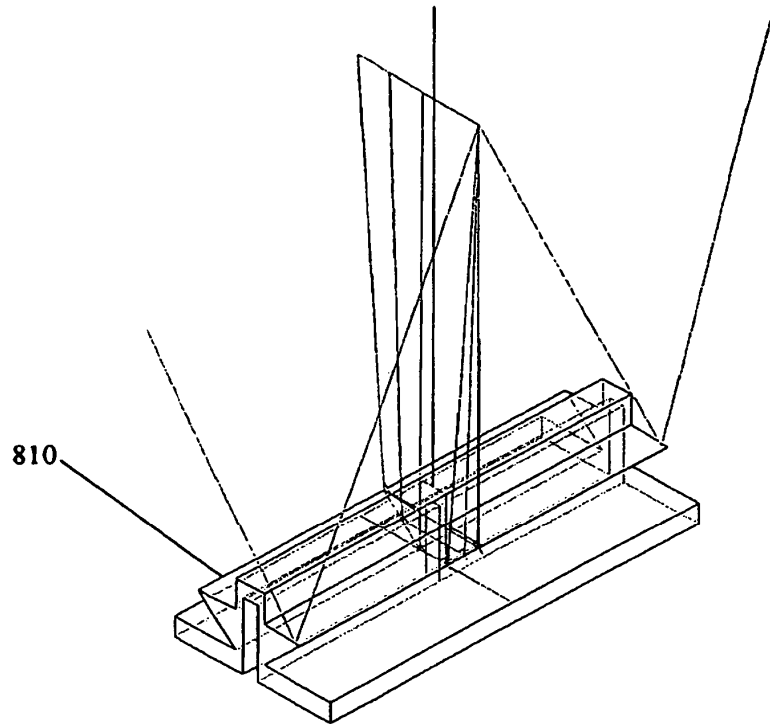


Figura 6

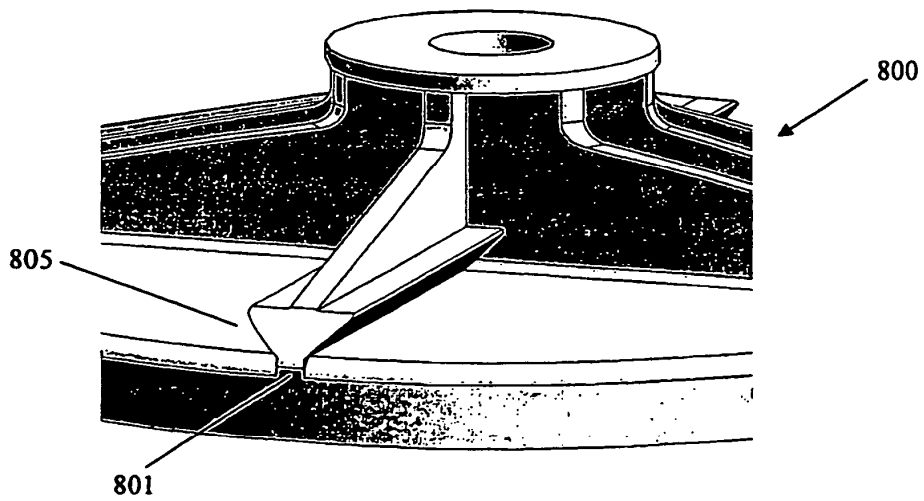


Figura 7

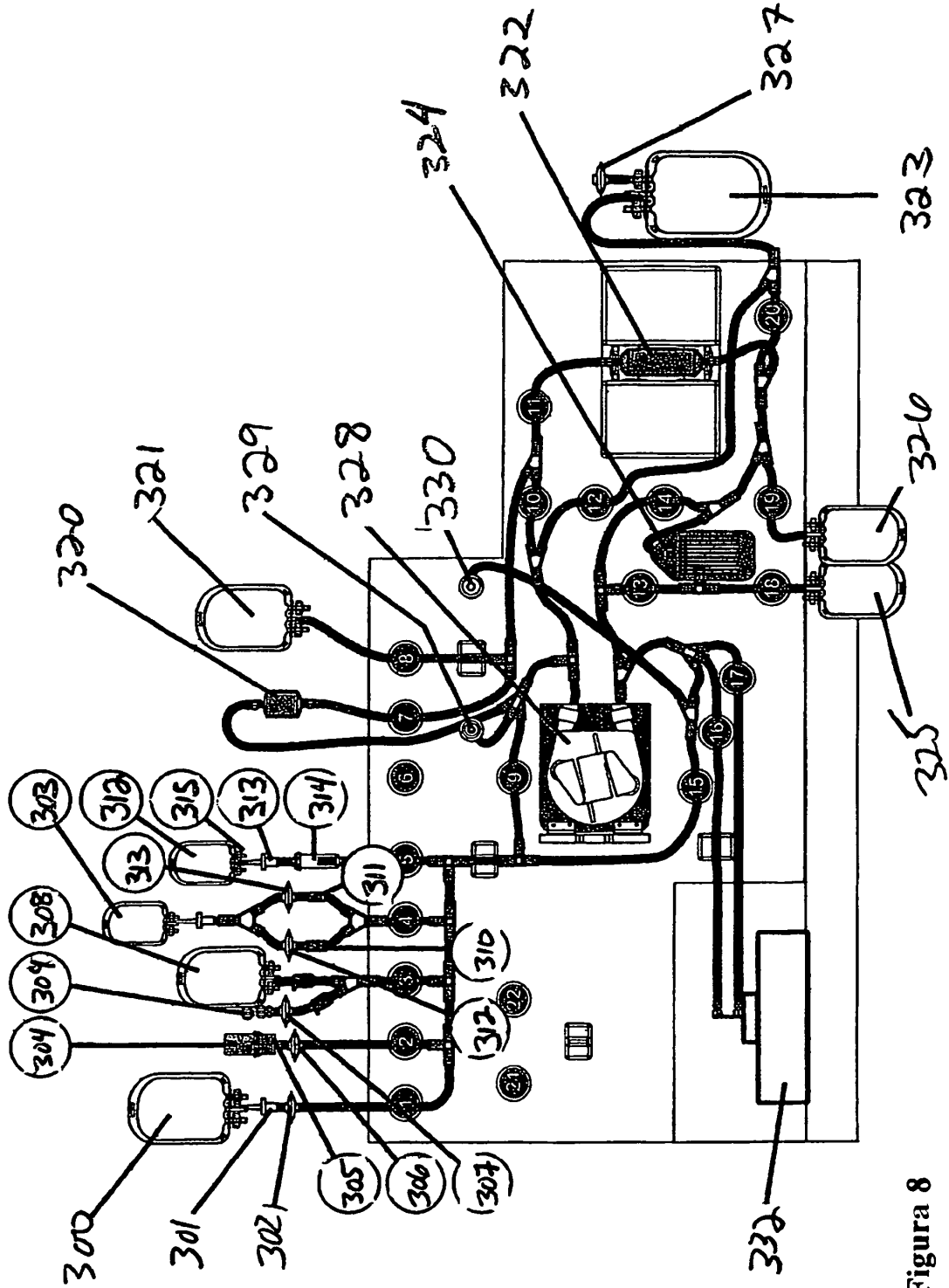


Figura 8