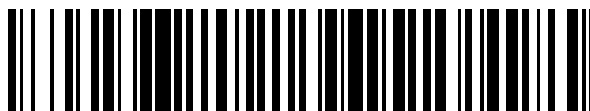


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 500**

51 Int. Cl.:

B03C 1/01 (2006.01)
B03C 1/28 (2006.01)
B01D 21/00 (2006.01)
B01D 21/26 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2011** **E 11190850 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2597153**

54 Título: **Método de separación celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE

72 Inventor/es:

KAULING, BURGUND y
HUPPERT, VOLKER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 602 500 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

Método de separación celular

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al campo de la inmunología, particularmente, a los procesos para la separación de células.

10 Antecedentes de la invención

Los métodos de separación celular están ampliamente extendidos en los laboratorios científicos y clínicos para la investigación, diagnóstico o aplicaciones clínicas. La mayoría de las estrategias de separación de células se basa en diferentes propiedades físicas tales como el tamaño y la densidad.

15 Normalmente uno tiene que deshacerse de los eritrocitos antes de tratar con las células de interés, los leucocitos. Esto puede hacerse entre otros métodos de separación de células usando, por ejemplo, la centrifugación en gradiente de densidad, de la preparación de la muestra de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o mediante la lisis de los eritrocitos, todos métodos bien conocidos en la técnica.

20 Después de la eliminación de eritrocitos, los métodos que usan partículas en fase sólida unidas a porciones de unión al antígeno, que reconocen los antígenos de superficie en las células, pueden usarse para separar los glóbulos blancos en subpoblaciones. Tales métodos pueden realizarse con perlas magnéticas (por ejemplo, la columna a base de tecnología MACS de Miltenyi Biotec GmbH, Alemania; US5411863, US5543289, US6020210, US6417011; o a base de no-
25 columna: Life Technologies, Carlsbad, California) o con perlas no magnéticas, por ejemplo, con perlas de alta densidad (US6730230, US5576185, US6900029, US6004743) que explotan la sedimentación por gravedad de las perlas densas para separar una población de células deseada o no deseada de una muestra biológica.

30 Hay algunos métodos que permiten la selección positiva de las células directamente de la sangre total, por ejemplo, el uso de micro perlas de la sangre total con la tecnología MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania). Pero estos métodos están limitados sólo a pequeñas cantidades de células.

35 Los polímeros no iónicos tales como polisacáridos y polímeros sintéticos promueven la agregación de los glóbulos rojos, es decir, eritrocitos, cuando se infunde in vivo o añaden in vitro a suspensiones de eritrocitos en tampón o plasma. Los ejemplos de polímeros que inducen la agregación de las RBC humanas son dextranos de pesos moleculares 60.000-500.000, polivinilpirrolidona de 360.000, y polioxietileno (POE) de 20.000.

40 Si se deja depositar la sangre anticoagulada en un tubo, los eritrocitos se sedimentan antes que los glóbulos blancos, y una capa de plasma rico en leucocitos puede eliminarse después de 1 ½ horas o más. Los eritrocitos se sedimentan más rápidamente que los leucocitos debido a la tendencia espontánea de los eritrocitos a aglomerarse. Es posible acelerar la sedimentación de los eritrocitos mediante la adición de uno de los reactivos de agregación anteriormente mencionados (Skoog y Beck, 1956, Blood, 11: 436).

45 La centrifugación en gradiente de densidad es una técnica que permite la separación de las células en función de su tamaño, forma y densidad. Un gradiente de densidad se crea en un tubo de centrifuga mediante la formación de capas de soluciones de diferentes densidades con el extremo denso en la parte inferior del tubo. Las células se separan generalmente, en un gradiente superficial de sacarosa u otros carbohidratos inertes, incluso a velocidades de centrifugación relativamente bajas.

50 La centrifugación en gradiente de densidad discontinuo se usa comúnmente, para aislar las células mononucleares de sangre periférica de los granulocitos y eritrocitos. Por ejemplo, en una denominada separación por densidad del Ficoll, se forma una capa de sangre total sobre el FICOLL-PAQUE®, y después se centrifuga. Los eritrocitos, granulocitos y aproximadamente 50 % de las células mononucleares se depositan en el sedimento celular mientras que el 50 % restante de las células mononucleares se depositan en la interfaz de plasma en el Ficoll. Todas las técnicas de
55 separación por densidad tienen las mismas limitaciones básicas: no pueden separar subpoblaciones de células con distribuciones de densidad que se superponen tales como subconjuntos de linfocitos e incluyen etapas de centrifugación laboriosas y que consumen tiempo.

60 Los anticuerpos monoclonales con afinidad a los antígenos de la superficie celular se usan para la separación adicional de las células específicas después de la centrifugación en gradiente de densidad. La técnica del anticuerpo específico y la técnica de centrifugación en gradiente de densidad pueden usarse simultáneamente. Varias publicaciones (US5.840.502, US5.648.223, US5.646.004, US5.474.687y US7.316.932) describen el uso de partículas densas para la selección positiva o negativa mediante la orientación selectiva y sedimentación de tipos de células deseadas/no deseadas usando separaciones en gradiente de densidad discontinuo.

65 Robert A Petri y otros (Journal of Hematotherapy, 1994, págs. 111-120) describe el uso de la aglutinina del frijol de soja

para sedimentar los eritrocitos y la subsiguiente reducción inmunomagnética de determinados linfocitos T a partir de los aloinjertos de médula ósea.

5 M.Hildebrandt y otros (Transfusion, vol. 40, núm. 5, 2000, págs 507-512) describe los métodos para el enriquecimiento de las células usando la selección inmunomagnética después de la reducción/sedimentación de los eritrocitos con hidroxietilo de almidón.

10 El documento de la patente WO00/73794 describe un método para la separación de células usando inmunorosetas. El método implica poner en contacto una muestra que contiene células nucleadas y glóbulos rojos con una composición de anticuerpo, que permite formar inmunorosetas de las células nucleadas, y los glóbulos rojos. La composición de anticuerpos contiene anticuerpos bifuncionales o complejos de anticuerpos tetraméricos. El concepto en la presente es (1) poner en contacto la muestra con una composición de anticuerpo que comprende (a) al menos un anticuerpo que se une a un antígeno en las células nucleadas que se une por separado a (b) al menos un anticuerpo que se une a los eritrocitos bajo condiciones que permiten formar inmunorosetas de las células nucleadas y los eritrocitos, y (2) eliminar las inmunorosetas de la muestra por centrifugación. Preferentemente, el anticuerpo específico para los eritrocitos es la anti-glicoforina A. Los protocolos para realizar las inmunorosetas usando Ficoll con y sin Hetastarch se describen en los manuales publicados de las tecnologías de células madre. La desventaja de este método es que incluye una etapa de centrifugación laboriosa y que consume tiempo.

20 En el documento de la patente WO02/083262A1 se describe un método que implica para poner en contacto una muestra que contiene células de la sangre con una composición de separación de las células. Esta composición es i) dextrano, ii) anticuerpo anti-glicoforina A, y iii) uno o más anticuerpos contra los antígenos de la superficie celular. En algunos casos, un anticuerpo se une al sustrato para inmovilizar esta molécula. La mezcla que contiene la muestra de células sanguíneas y el reactivo de separación se mezcla suavemente durante 30 a 45 minutos. Las células aglutinadas se dejan durante 30 a 50 minutos para la partición separada de las células no aglutinadas, que permanecen en suspensión. Este método se afecta por el proceso que consume tiempo de más de 1 hora hasta que las células deseadas están disponibles para las etapas de procesamiento adicionales. Además, desventajosamente, es la más baja recuperación de las células deseadas.

30 La presente invención se realizó con vista de la técnica anterior descrita anteriormente, y el objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado para separar las células deseadas y eliminar las células no deseadas de las muestras biológicas como la muestra de sangre total, muestra de cordón umbilical, y la muestra de médula ósea.

35 Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un método de sedimentación magnéticamente forzada para separar células directamente de una muestra que contiene eritrocitos, por ejemplo, sangre total. El método mejora la separación de las células deseadas y elimina las células no deseadas de la muestra en comparación con los métodos de la técnica anterior, es decir, no hay necesidad de eliminar primero los eritrocitos de la muestra ni de realizar las etapas laboriosas de centrifugación de la muestra durante el proceso de la presente invención, lo que resulta en un método de separación celular muy rápido con un estrés mínimo para las células que se separan. Todo el procedimiento se realiza en una única etapa que resulta en un proceso acelerado de separación de las células de la sangre total. El método descrito en este documento es más rápido que los métodos conocidos en la técnica que resultan en la prevención del daño de las células debido al estrés limitado en las células. Además, el procedimiento de la presente invención conduce a una mayor recuperación y pureza de las células en comparación con los métodos conocidos en la técnica.

50 Las células logradas con los métodos de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, para preparar eficazmente las células para el cultivo celular, purificación adicional, pruebas de diagnóstico o administración terapéutica. Regularmente, las células deseadas logradas por la presente invención son células intactas, es decir, que están en su estado natural. Ninguna interacción de las células con los componentes de las composiciones usadas en la presente invención, tales como anticuerpos unidos a los antígenos de superficie celular modifica, por ejemplo, estimula, las células deseadas. Además, la reducción del tiempo de separación necesario mediante el uso de la presente invención disminuye aún más el estrés que las células que normalmente se exponen durante el procesamiento. Por lo tanto, la presente invención proporciona el tratamiento con cuidado máximo para las células deseadas, lo que las conduce al mínimo estrés de las células que son valiosas para las aplicaciones posteriores.

60 Sorprendentemente, se encontró que la sedimentación de las células en una muestra se acelera si simultáneamente (1) los eritrocitos se agregan con un reactivo (por ejemplo agente formador de rouleaux), es decir, un reactivo de agregación de eritrocitos tal como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y (2) uno o más componentes celulares, es decir, otras células sanguíneas y/o trombocitos, se unen específicamente por partículas magnéticas, en donde se aplica un gradiente de campo magnético a las partículas magnéticas, inmovilizando a las células unidas a las partículas magnéticas, lo que resulta en un sedimento de células y una fase sobrenadante (fracción líquida). El sedimento contiene células sedimentadas por el reactivo de agregación de eritrocitos y las partículas magnéticas que se unieron a los componentes celulares. La fase de sobrenadante está sustancialmente libre de partículas y contiene las células que no estuvieron disponibles para la sedimentación o inmovilización. Generalmente, estas son las células deseadas. Por lo

tanto, la fase sobrenadante de la muestra puede eliminarse y usarse para análisis posteriores y/o procesamiento de las células deseadas en las etapas subsiguientes.

La sedimentación e inmovilización simultánea de los componentes celulares tales como eritrocitos y otras células y/o trombocitos es la respuesta a las fuerzas que actúan sobre ellos. Estas fuerzas pueden deberse a, por ejemplo, la sedimentación por gravedad, la aceleración centrífuga y el electromagnetismo. Cada fuerza puede actuar solamente o en combinación con una o las otras fuerzas. Preferentemente, la sedimentación simultánea de los componentes celulares, tales como eritrocitos y otras células y/o trombocitos se realiza de 1 a 20 x g, con mayor preferencia de 1 a 2 x g, con preferencia superlativa a 1 x g, es decir, sin aceleración centrífuga adicional. La sedimentación por gravedad a 1x g ocurre si el contenedor que contiene la muestra a procesar está en un estado de reposo, es decir, sin balanceo o centrifugación, lo que permite sedimentar las partículas o células en el líquido, es decir, la muestra con los componentes celulares, en la parte inferior del contenedor. En cualquier variante, los eritrocitos se sedimentan antes que los glóbulos blancos.

Es una ventaja de la presente invención que no haya necesidad de ejercer fuerzas centrífugas para la rápida sedimentación de las células. Preferentemente, el método explota el efecto sinérgico de aplicar sólo la sedimentación por gravedad (1 x g) y las fuerzas magnéticas. Preferentemente, la fuente magnética se coloca en el lado del contenedor que contiene la muestra a procesar. Esta disposición da como resultado dos fuerzas que actúan sobre las células, una es la sedimentación por gravedad en la parte inferior y la otra es la fuerza magnética en el lado del contenedor que contiene la muestra a procesar. Sin embargo, la posición de la fuente o fuentes magnéticas puede variar, resultando en las diferentes direcciones en las que las fuerzas actúan sobre las células.

Inesperadamente, además, se constató que la sedimentación de las células en una muestra se acelera si al mismo tiempo (1) los eritrocitos se agregan mediante un reactivo de agregación de eritrocitos tal como HPMC-15 y (2) uno o más componentes celulares no deseados se unen específicamente por partículas magnéticas que tienen un tamaño de entre 100 y 1400 nm, en donde se aplica un gradiente de campo magnético a las partículas magnéticas, lo que inmoviliza a las células unidas a las partículas magnéticas.

Además, sorprendentemente, se encontró que la forma del sedimento celular puede influenciarse por la selección de la porción de reconocimiento del antígeno que se acopla a una partícula magnética y por la elección de la posición de la fuente magnética con relación al contenedor que contiene la muestra a procesar. Si se usa una porción de reconocimiento del antígeno, que reconoce una proteína de superficie de uno o más componentes celulares no deseados, pero que no reconoce a una proteína de superficie de los eritrocitos, el sedimento se separa en dos partes. Sólo se genera una transición ligera en el caso, si se coloca la fuente magnética en el lado del contenedor que contiene la muestra a procesar como se ilustra en la Figura 13. El uso de una o más porciones de reconocimiento del antígeno que reconocen a una proteína de superficie de los eritrocitos y también, una proteína de superficie de uno o más de otros componentes celulares no deseados, por ejemplo, CD36, resulta en una sedimentación magnéticamente forzada de todos los componentes celulares que se desean sedimentar y/o inmovilizar. Si la fuente magnética se coloca de la misma manera como se muestra en la Figura 13, el sedimento forma en estas condiciones una forma diferente, que se asemeja a una curva de función exponencial que resulta de una transición suave, como se ilustra en la Figura 14. Estas formas similares de sedimento son ventajosas para eliminar el sobrenadante si, por ejemplo, se usa una pipeta, lo que resulta en un aumento del volumen del sobrenadante que se recupera (Ejemplo 27).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Eficiencia de reducción de trombocitos de perlas magnéticas de diferentes tamaños conjugadas con anticuerpos monoclonales CD61 y CD 15 en una relación 1:1

Figura 2: Eficiencia de reducción de granulocitos de perlas magnéticas de diferentes tamaños conjugadas con anticuerpos monoclonales CD61 y CD15 en una relación de 1:1

Figura 3: Eficiencia de reducción de trombocitos y granulocitos de perlas magnéticas de 250 nm conjugadas con anticuerpos monoclonales CD61 y CD 15 en una relación 1:1

Figura 4: Eficiencia de reducción de trombocitos y granulocitos de perlas magnéticas de 1400 nm conjugadas con anticuerpos monoclonales CD61 y CD15 en una relación 1:1

Figura 5: Eficiencia de reducción de trombocitos y granulocitos de perlas magnéticas de 100 nm conjugadas con anticuerpos monoclonales CD 15 y CD61 en una relación 1:1

Figura 6: Eficiencia de reducción de células B de conjugados de perlas magnéticas de 240 nm conjugadas con el anticuerpo CD 19

Figura 7: Eficiencia de reducción de células NK de conjugados de perlas magnéticas de 240 nm conjugadas con el anticuerpo CD56

Figura 8: Perlas magnéticas se conjugaron con los anticuerpos de múltiples especificidades y el rendimiento de reducción se evaluó de acuerdo con los protocolos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3.

Figura 9: El tamaño de un conjugado de partículas magnéticas conjugadas con un anticuerpo CD56 se determinó mediante la medición en un instrumento Nano Delsa de Beckman Coulter.

Figura 10: Eficiencia de separación de un kit de células NK que contiene perlas magnéticas de 220 nm conjugadas con anticuerpos de las células no NK y almacenamiento HPMCAfter en formato líquido y liofilizado

Figura 11: Eficiencia de separación de un kit de células NK liofilizado que contiene perlas magnéticas de 220 nm conjugadas con anticuerpos de células no NK y HPMC reconstituido con diferentes tampones

Figura 12: Eficiencia de separación insuficiente de un anticuerpo CD19 conjugado con partículas magnéticas de 50 nm

Figura 13: Forma del sedimento cuando se usan los cócteles de anticuerpos sin CD36 u otras porciones de reconocimiento del antígeno, que no reconocen las proteínas de superficie de los eritrocitos sino de otros componentes celulares no deseados. El sedimento se compone de dos partes. La parte superior contiene células magnéticamente marcadas atraídas por el imán. La parte inferior contiene agregados (eritrocitos, trombocitos, agregados celulares) sin ningún o con débil etiquetado magnético, separado por sedimentación.

Figura 14: El sedimento de los eritrocitos y las células magnéticamente marcadas forman una forma diferente, en comparación con la situación en la Figura 13, cuando los anticuerpos se unen tanto a los eritrocitos como a otros componentes celulares no deseados, es decir, se usan los leucocitos no objetivos, tal como CD36.

Figura 15: El sedimento se rompe en dos partes, cuando el imán se coloca distante de la parte inferior del tubo. El sedimento superior contiene las células magnéticamente marcadas atraídas por el imán. El sedimento inferior contiene agregados (eritrocitos, trombocitos, agregados celulares) sin ningún o con débil etiquetado magnético.

Figura 16: Diseño de un yugo magnético para sostener 2 imanes de tierras raras cúbicos (88 * 24 * 10 mm). El tubo de centrífuga puede colocarse entre los imanes orientados perpendicularmente para la separación de células.

Figura 17: Diseño de un yugo magnético para sostener 1 imán de tierras raras cúbico (88 * 24 * 10mm), posición del imán y el tubo de centrífuga de 50 ml.

Figura 18: Resultados de un experimento para determinar la velocidad de sedimentación en combinación con HPMC-15 con diferentes tamaños de perlas magnéticas conjugadas con el cóctel de anticuerpos (Ejemplo 26)

Figura 19: Pureza y rendimiento de las células NK aisladas en combinación con un cóctel de anticuerpos conjugados con partículas magnéticas y diferentes reactivos de agregación de eritrocitos

Definiciones

A menos que se especifique de cualquier otra forma, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "componentes celulares" como se usa en la presente descripción se refiere a las células que son comunes en una muestra de sangre total, muestra de sangre periférica, muestra de leucoféresis, muestra de la capa leucocitaria, muestra de cordón umbilical, y muestra de médula ósea, incluyendo por ejemplo, eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Especialmente los leucocitos consisten en muchas subpoblaciones de células, tales como, por ejemplo, células T, células T reguladoras, células B, células NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos, células madre hematopoyéticas.

El término "partícula" tal como se usa en la presente descripción se refiere a una fase sólida tal como partículas coloidales, microesferas, nanopartículas, o perlas. Los métodos para la generación de tales partículas son bien conocidos en el campo de la técnica. Las partículas son partículas magnéticas en la presente invención. Las partículas pueden estar en una solución o suspensión o pueden estar en un estado liofilizado antes de su uso en la presente invención como se muestra en el ejemplo 16. La partícula liofilizada se reconstituye después, en un tampón conveniente antes de ponerse en contacto con la muestra que se procesa en relación con la presente invención. En una modalidad, la partícula puede tener un tamaño de diámetro de como mínimo 100 nm y como máximo 1400 nm, en otra modalidad, las partículas pueden tener un tamaño de 200 a 500 nm de diámetro. Al menos una porción de reconocimiento del antígeno se acopla a una partícula magnética, en donde dicha partícula con al menos dicha porción que reconoce un antígeno se une específicamente al menos a un antígeno específico para los componentes celulares.

El término "magnético" en "partículas magnéticas" como se usa en la presente descripción se refiere a todos los subtipos de partículas magnéticas que pueden prepararse con métodos bien conocidos por la persona experta en la

técnica, especialmente partículas ferromagnéticas, partículas superparamagnéticas y partículas paramagnéticas. Los materiales "ferromagnéticos" son fuertemente susceptibles a los campos magnéticos y son capaces de retener las propiedades magnéticas cuando se elimina el campo. Los materiales "paramagnéticos" sólo tienen una susceptibilidad magnética débil y cuando se elimina el campo pierden rápidamente su magnetismo débil. Los materiales "superparamagnéticos" son magnéticamente muy susceptibles, es decir, se convierten en fuertemente magnético cuando se colocan en un campo magnético, pero, como los materiales paramagnéticos, pierden rápidamente su magnetismo.

El término "reactivo de agregación de eritrocitos" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier molécula conocida en la técnica que desencadena la agregación de glóbulos rojos dentro de una muestra que contiene células sanguíneas. Preferentemente, el reactivo de agregación de eritrocitos se selecciona del grupo que consiste en proteínas de alto peso molecular (por ejemplo, fibrinógeno e inmunoglobulinas) y polímeros no iónicos tales como los polisacáridos y polímeros sintéticos. Con mayor preferencia, el reactivo de agregación de eritrocitos es un polímero no iónico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, hidroxietilo de almidón, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Con preferencia superlativa, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15.

La expresión "porción de reconocimiento del antígeno" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El término "anticuerpo" como se usa en la presente descripción se refiere a los anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser también anticuerpos modificados (por ejemplo, oligómeros, anticuerpos reducidos, oxidados y marcados). El término "anticuerpo" comprende tanto moléculas de anticuerpos intactos como fragmentos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla. Además, el término "fragmento de unión al antígeno" incluye cualquier porción que se une preferentemente a la molécula objetivo deseada de la célula que se sedimenta dentro de este método. Porciones adecuadas incluyen, sin limitación, oligonucleótidos conocidos como aptámeros que se unen a las moléculas objetivo deseadas (Hermann y Pantel (2000) Science 289: 820-825), carbohidratos, lectinas o cualquier otra proteína de unión al antígeno (por ejemplo, la interacción receptor-ligando).

Los términos "partículas mono-específicas" y "partículas multi-específicas" como se usa en la presente descripción se refieren a la unión de una porción de reconocimiento del antígeno a una partícula en el caso de una partícula mono-específica y dos o más porciones de reconocimiento de antígeno a una partícula en el caso de una partícula multi-específica, respectivamente. Las dos o más porciones de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, diferentes anticuerpos, de la partícula multi-específica unen preferentemente a los antígenos específicos para diferentes subpoblaciones de células, respectivamente. En lo adelante, "partículas mono-específicas" y "partículas multi-específicas" se refieren a las que se acoplan mediante las porciones de reconocimiento del antígeno. Por ejemplo, una partícula unida a anticuerpos contra los antígenos CD61 y CD15 se denomina como "partícula.CD61.CD15".

El anticuerpo anti-CD61 se une a las plaquetas y CD 15 se une a los granulocitos, es decir, la partícula multi-específica se une dos subpoblaciones de células. El enlace entre el anticuerpo y de partículas puede ser covalente o no covalente. Un enlace covalente puede ser, por ejemplo, el enlace con grupos carboxilo en perlas de poliestireno, o con grupos NH₂ o SH₂ en perlas modificadas. Un enlace no covalente es, por ejemplo, a través de biotina-avidina como se muestra en el Ejemplo 12 o una partícula acoplada a fluoróforo enlazada al anticuerpo anti-fluoróforo.

El término "muestra" como se usa en la presente descripción, se refiere a una muestra que contiene eritrocitos, por ejemplo, muestra de sangre periférica, cosecha de leucoféresis, preparación de la capa leucocitaria, muestra de cordón umbilical, y aspirado de médula ósea, como se muestra ilustrativamente en el Ejemplo 13. Las muestras pueden ser de animales, especialmente mamíferos. Preferentemente, las muestras son de seres humanos.

El término "agente de modificación de la célula" como se usa en la presente descripción, se refiere a, por ejemplo, los agentes de estimulación celular como citoquinas, anticuerpos o péptidos. Además, los agentes de modificación de la célula pueden ser anticuerpos acoplados a perlas magnéticas, por ejemplo, perlas superparamagnéticas, para la subsiguiente separación celular, usando, por ejemplo, tecnología MACS. Un agente de modificación de la célula adicional es un anticuerpo acoplado a fluorocromo, que se puede usar después de la separación celular de la presente invención para el análisis celular. Alternativamente, las perlas magnéticas, por ejemplo, perlas superparamagnéticas, que se conjugan con un reactivo de modificación de la célula, por ejemplo, un anticuerpo, pueden suministrarse a la composición final de células después de usar la presente invención para una separación celular adicional, usando, por ejemplo la tecnología MACS (ver el Ejemplo 25).

El término "sedimento" o "sedimento celular", como se usa en la presente descripción se refiere a la fase no-líquida como resultado de la presente invención. El sedimento consiste en el sedimento de eritrocitos (generado al menos en parte por la sedimentación por gravedad como resultado de aplicar el reactivo de agregación de eritrocitos en la muestra) y las partículas magnéticas inmovilizadas que contienen al menos en parte componentes celulares (como resultado de aplicar un gradiente de campo magnético a la muestra). El sedimento o sedimento celular es la entidad de todos los sedimentos generados mediante la sedimentación de las células y la inmovilización de las células mediante fuerzas magnéticas dentro del contenedor que contiene la muestra que se procesa usando el método de la presente invención. Si se usa una porción de reconocimiento del antígeno que reconoce una proteína de superficie de los eritrocitos, pero también, una proteína de superficie de uno o más de otros componentes celulares en la presente

invención después, los eritrocitos se inmovilizan también mediante las partículas magnéticas. En dependencia de la posición del imán, la forma del sedimento puede variar, de un sedimento cerrado sobre una transición suave de dos sedimentos a dos o incluso más sedimentos separados. Si dos o más sedimentos están presentes debido a la disposición de las fuentes magnéticas, el término sedimento como se usa en la presente descripción se refiere a todas los sedimentos, es decir, el sedimento es la suma de todos los sedimentos en partes dentro de un contenedor generado por la aplicación de la presente invención. Las partículas magnéticas se acumulan cerca de la superficie más cercana a la fuente de gradiente de campo magnético, es decir, el imán. Las partículas son las partículas mono o multiespecíficas de la presente invención y por lo tanto, una parte de las partículas en el sedimento puede tener células unidas, otra parte puede estar libre de células.

El término "sobrenadante" o "fase de sobrenadante" como se usa en la presente descripción, se refiere a la fase líquida como resultado de la presente invención, a diferencia del sedimento. La fase sobrenadante se compone de todos los componentes celulares que no forman parte de los complejos de agregación generados por la presente invención. Por lo que los subconjuntos de células que no se agregan se pueden seleccionar mediante la selección de la especificidad de la partícula mono o multiespecífica usada en la presente invención. Regularmente, las células de la fase sobrenadante son células intactas y son las células deseadas, es decir, las células objetivo, del proceso de separación.

El término "células objetivo" como se usa en la presente descripción se refiere a las células que son las células deseadas separadas por la presente invención. Los términos "células objetivo" y "células deseadas" son intercambiables y tienen el mismo significado en relación con la presente invención. Regularmente, las células objetivo son las células intactas del sobrenadante generado por el proceso de la presente invención. La selección de células deseadas, es decir, las células objetivo, que están en el sobrenadante, puede definirse mediante la selección de porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el proceso de la presente invención. Regularmente, las células objetivo no tienen antígeno para las porciones de reconocimiento del antígeno acopladas a la(s) partícula(s) usada(s) en el proceso de la presente invención.

El término "células no deseadas" como se usa en la presente descripción, se refiere a las células que se unen específicamente por al menos una porción de reconocimiento del antígeno que está acoplada a una partícula magnética de la presente invención. Estas células forman parte del sedimento generado por la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para aislar, enriquecer y/o purificar las células de una muestra que contiene eritrocitos.

La sedimentación de células de una célula sanguínea que contiene la muestra se acelera por la presente invención en comparación con los métodos conocidos en la técnica. Sorprendentemente, este problema se resuelve mediante la separación simultánea de los eritrocitos que se agregan en presencia de un reactivo de agregación de eritrocitos y la separación de otros componentes celulares no deseados que se sedimentan e inmovilizan en presencia de partículas magnéticas mono y/o multiespecíficas, que tienen especificidades para uno o más componentes celulares no deseados, respectivamente.

El reactivo de agregación de eritrocitos es el responsable de la generación de la formación de agregados de los eritrocitos y de algunas plaquetas, es decir, trombocitos, lo que resulta en la sedimentación de los eritrocitos y trombocitos. La partícula magnética es responsable de la agregación de los componentes celulares no deseados en un gradiente de campo magnético, que se reconocen por esta partícula lo que resulta en la inmovilización de la aglutinación mono y/o heterotípica de estas células. El gradiente de campo magnético se genera por una fuente magnética, por ejemplo, por un imán permanente o electroimán. Los dos complejos de agregación interfieren positivamente y dan como resultado la sedimentación rápida y/o inmovilización de ambos complejos de agregación.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para enriquecer y/o recuperar las células objetivo de una muestra que contiene las células objetivo, eritrocitos y otras células sanguíneas y/o trombocitos, que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con una composición, dicha composición que comprende:
 - i) un reactivo de agregación de eritrocitos, en donde el reactivo de agregación de eritrocitos se selecciona del grupo que consiste en dextrano, hidroxietilo de almidón, metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)
 - ii) al menos un fragmento de unión al antígeno acoplado a una partícula magnética, en donde dicha partícula con dicho al menos un fragmento de unión a antígeno se une específicamente con al menos un antígeno específico para uno o más de dichas otras células sanguíneas y/o trombocitos;
- b) aplicar simultáneamente
 - i) sedimentación por gravedad para la sedimentación de los eritrocitos; y
 - ii) un gradiente de campo magnético a dicha muestra para la inmovilización de dicha partícula magnética generando de ese modo un sedimento y una fase de sobrenadante, y
- c) recuperar las células objetivo de la fase de sobrenadante.

Además, sorprendentemente, se encontró que el tamaño de las partículas usadas en la presente invención tiene un impacto adicional en la presente invención. Se encontró que la sedimentación de las células en una muestra se acelera si simultáneamente (1) los eritrocitos se agregan por un reactivo de agregación de eritrocitos tal como HPMC-15 y (2) uno o más componentes celulares no deseados se unen específicamente mediante las partículas magnéticas que tienen un tamaño promedio de diámetro entre 100 y 1400 nm, preferentemente entre 200 y 500 nm, en donde se aplica un gradiente de campo magnético a las partículas magnéticas, lo que inmoviliza las células unidas a las partículas magnéticas. El uso de partículas que tienen un tamaño promedio de entre 100 y 1400 nm, preferentemente entre 200 y 500 nm, resulta en la presente invención en una separación superior adicional de las células en comparación con las partículas más pequeñas o más grandes, respectivamente (Ejemplo 1).

Las pequeñas partículas magnéticas de diámetro promedio de 50 nm tienen un impacto reducido sobre la aceleración de la sedimentación de los eritrocitos que las partículas de 200 nm (Figura 18) y resultan en una eficiencia de reducción subóptima para algunos anticuerpos conjugados con (CD19, Figura 12). Las partículas con un diámetro promedio de 260nm a 290nm mostraron una buena eficacia de reducción cuando se conjugan con todos los anticuerpos evaluados (ver ejemplos de la Figura 6 y Figura 7) y tuvieron una distribución de tamaño donde aproximadamente el 95 % estuvieron en el intervalo de 100 nm a 1400 nm y aproximadamente el 90 % en el intervalo de 200 nm a 500 nm (Figura 9). Las partículas con un tamaño promedio de diámetro de más de 1400 nm mostraron eficiencia de reducción insuficiente para los granulocitos y trombocitos cuando se conjugaron con los anticuerpos CD 15 y CD61.

No es necesario incluir una porción de reconocimiento del antígeno, que reconoce únicamente una proteína de superficie de los eritrocitos, tal como anti glicoforina A en la presente invención. El uso de una porción de reconocimiento del antígeno dirigida únicamente contra una proteína de superficie de los eritrocitos tales como anticuerpos anti glicoforina A no tienen ni efecto positivo ni uno negativo en la presente invención, a diferencia de la descripción de los métodos en los documentos de patentes WO00/73794 y US7160723 (Ejemplo 15).

Además, sorprendentemente, se encontró que la forma del sedimento celular generado por la presente invención puede estar influenciada por dos parámetros, i) la selección de la porción de reconocimiento del antígeno que se acopla a una partícula magnética y ii) la elección de la posición de la fuente magnética con relación al contenedor que contiene la muestra a procesar.

Si se usa una porción de reconocimiento del antígeno, que reconoce una proteína de superficie de uno o más componentes celulares no deseados, pero que no reconoce una proteína de superficie de los eritrocitos, el sedimento se separa en dos partes. Sólo se genera una transición ligera en el caso, si se coloca la fuente magnética en el lado del contenedor que contiene la muestra a procesar como se ilustra en la Figura 13. A diferencia de ello, el uso de uno o más porciones de reconocimiento del antígeno que reconocen una proteína de superficie de los eritrocitos, pero también una proteína de superficie de uno o más de otros componentes celulares no deseados, es decir, leucocitos no objetivo, tiene un impacto en la forma del sedimento celular. Tales marcadores, que reconocen las proteínas de superficie de eritrocitos y otros componentes celulares, son, por ejemplo CD35, CD36, CD44, CD45RB, CD47, CD49e, CD55, CD58, CD59, CD75, CD75S, CD99, CD108, CD111, CD139, CD147, CD220, y CD222. El uso de una porción de reconocimiento del antígeno de este tipo, por ejemplo, CD36, resulta en una sedimentación magnéticamente forzada de todos los componentes celulares que se desean sedimentar. Si la fuente magnética con el gradiente de campo magnético se coloca en el lado del contenedor que contiene la muestra a procesar como se ilustra en la Figura 14, el sedimento tiene forma similar a una curva de función exponencial. Pero, generalmente, el sedimento puede formar diferentes formas dependiendo de la posición de la fuente magnética. La forma del sedimento celular obtenido por el método de la invención es un resultado de las fuerzas que actúan sobre las células. Los eritrocitos se sedimentan en parte debido a la gravedad y en parte debido al magnetismo. Los eritrocitos se magnetizan si una o más porciones de reconocimiento del antígeno, que reconocen una proteína de superficie de los eritrocitos, pero también, una proteína de superficie de uno, o más de otros componentes celulares no deseados, se usan en la presente invención. Por lo tanto, si el imán se coloca casi en la parte inferior del contenedor que contiene la muestra que se procesa como se ilustra en la Figura 14, una transición suave de los dos tipos de sedimentos celulares, es decir, se genera un sedimento celular generado por sedimentación por gravedad y el otro sedimento generado por fuerzas magnéticas. Este o similares formas de sedimentos son ventajosas para eliminar el sobrenadante si por ejemplo, se usa una pipeta. Esta forma de sedimento permite la eliminación más fácil y más completa de la fase de no sedimento, es decir, la fase de sobrenadante que contiene regularmente las células deseadas. Sin embargo, el gradiente de campo magnético puede orientarse en cualquier posición con respecto al contenedor que contiene la muestra a procesar que resulta en diferentes formas de los sedimentos. Si el imán se coloca más distante de la parte inferior del contenedor que contiene la muestra a procesar dos sedimentos separados se generan como se ilustra en la Figura 15. El sedimento superior contiene las células que están fuertemente magnetizadas debido al marcaje con las partículas magnéticas. Si se usa una porción de reconocimiento del antígeno que reconoce las proteínas de la superficie de los eritrocitos este sedimento contiene eritrocitos y otros componentes celulares no deseados. Si no se usa ninguna porción de reconocimiento del antígeno que reconoce las proteínas de la superficie de los eritrocitos este sedimento contiene otros componentes celulares no deseados, pero no eritrocitos. El sedimento inferior contiene las células que se magnetizan más débiles debido al marcaje con las partículas magnéticas, es decir, en su mayoría los eritrocitos remanentes.

Por lo tanto, en otra modalidad de la presente invención, la partícula magnética se provee de al menos una porción de

reconocimiento del antígeno que reconoce un antígeno en la superficie celular de los eritrocitos y, además, un antígeno de al menos otro componente celular no deseado.

5 No se prefiere el uso de una fuente magnética en la parte inferior del contenedor que contiene la muestra a procesar. Esto resulta en una distancia superior que los agregados magnéticos tienen que moverse, es decir, 10 cm (altura del tubo) en comparación con 3 cm (diámetro del tubo).

10 La presente invención utiliza un gradiente de campo magnético generado por una fuente magnética, por ejemplo, por un imán permanente o electroimán. Cualquier tipo y forma de imán puede usarse dentro de la presente invención, como el Separador MACSiMAG™ disponible en el mercado por Miltenyi Biotec GmbH, Alemania. Diferentes diseños de imanes se han evaluado con la presente invención. El separador MACSiMAG™ se modificó además, con imanes superiores para atraer las partículas magnéticas y las células magnéticamente marcadas en la pared del tubo sobre la altura completa del tubo. Imanes disponibles en el mercado para tubos de centrifuga de 50 ml se han evaluado incluyendo un imán de SensScreen Technologies (Alemania) y de Stem Cell Technologies (imán Easy Sep "Easy 50"). Limpiadores magnéticos de vidrio acuario se han evaluado en la presente invención. Estos limpiadores consisten en imanes fuertes permanentes combinados con un yugo magnético, embebidos en un material protector de plástico y que tienen un material de limpieza unido a la superficie del imán interior para limpiar el cristal del acuario. Varios diseños se han desarrollado para el uso de imanes de tierras raras cuboides permanentes con un tamaño de 88 mm * 24 mm * 10 mm en diferentes yugos magnéticos, incluyendo yugos en forma de U y yugos perpendiculares (ver Figura 16 y Figura 17).

20 Las matrices de Halbach se han usado exitosamente también con la presente invención.

Además de colocar los imanes fuera de la pared del tubo, los imanes pueden sumergirse también en el tubo, ya sea de tipo cilíndrico, cuboide o esférico.

25 Una composición de separación de células para su uso en el presente método comprende un reactivo de agregación de eritrocitos y una o más partículas magnéticas mono y/o multiespecíficas. La especificidad de las partículas es para un antígeno de una célula que se sedimenta o inmoviliza, es decir, una célula no deseada. Las composiciones de la separación de células contienen porciones de reconocimiento del antígeno, por ejemplo, anticuerpos, contra los antígenos de superficie de células sanguíneas, incluyendo, por ejemplo, CD11b, CD123, CD14, CD15, CD16, CD19, CD193, CD2, CD25, CD27, CD3, CD335, CD36, CD4, CD43, CD45RO, CD56, CD61, CD7, CD8, CD34, CD1c, CD23, CD304, CD235a, anti Fc_epsilon, anti receptor de células T alfa/beta, anti receptor de células T gamma/delta, anti biotina, anti IgE, anti HLA-DR y sus combinaciones.

30

35 Preferentemente, las partículas magnéticas de dicha composición tenga un diámetro promedio de tamaño entre 100 y 1400 nm, preferentemente entre 200 y 500 nm.

Dichas composiciones pueden comprender un tipo de partícula mono o multiespecífica, o pueden comprender más de una partícula mono o multiespecífica o una mezcla de partículas mono o multiespecíficas. Una composición conveniente para la separación de células intactas de una subpoblación específica de células debe comprender las porciones de reconocimiento del antígeno acoplados a una partícula magnética en donde tales porciones de reconocimiento del antígeno no reconocen el subconjunto de células, que son las células de interés, es decir, las células deseadas o células objetivo que deben permanecer intactas. Por ejemplo una porción de reconocimiento del antígeno contra CD61, CD62, CD41, respectivamente, se puede usar si se desean eliminar las plaquetas del sobrenadante. Las porciones de reconocimiento del antígeno contra CD66b, CD15, CD16, respectivamente, pueden usarse si se desean eliminar los granulocitos. Pueden usarse CD14, CD33, respectivamente, si se desean eliminar los monocitos/macrófagos. Pueden usarse CD19, CD20, respectivamente, si se desean eliminar las células B. Pueden usarse CD3, CD4, CD8, receptor de células T alfa/beta, respectivamente, si se desean eliminar las células T. Pueden usarse CD56, CD335, respectivamente, si se desean eliminar las células NK.

40

45

50 En general, el uso de una porción de reconocimiento del antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, acoplado a las partículas resulta en la separación constante de las células deseadas dentro de la presente invención (Ejemplo 2). El uso de dos o más porciones de reconocimiento del antígeno, por ejemplo los anticuerpos, acoplados a las partículas, preferentemente a partículas de tamaño promedio de diámetro entre 100 y 1400 nm, con mayor preferencia entre 200 y 500 nm, resulta en una separación superior de las células deseadas o no deseadas en comparación con los métodos de la técnica anterior (ver Ejemplo 3).

55

60 El uso de al menos una porción de reconocimiento del antígeno, por ejemplo, el anticuerpo, acoplado a las partículas dentro de la presente invención incluye - pero no se limita a - las partículas acopladas con 2, 3, 4, 6, 8, 10 ó 12 porciones de reconocimiento del antígeno, por ejemplo, los anticuerpos, respectivamente, lo que resulta en propiedades de separación equivalentes o incluso superiores de las partículas, como se muestra en el Ejemplo 3.

La relación de diferentes porciones de reconocimiento del antígeno, por ejemplo los anticuerpos, acoplados a una partícula puede variar. Preferentemente, la relación es entre 1:1 y 1:50, con mayor preferencia entre 1:1 y 1:20 (ver Ejemplo 3). Si porciones adicionales de reconocimiento del antígeno se acoplan a la partícula, cada porción adicional de reconocimiento del antígeno está en una relación de 1:1 a 1:20 con respecto a la primera o segunda porción de reconocimiento de antígeno.

65

La presente invención reduce el período de incubación para la reducción de las células no deseadas a 5 minutos o menos (ver Ejemplo 5). Además, el período de sedimentación se puede reducir a 8 minutos o menos, lo que resulta en una separación total más rápida de las células objetivo dentro de aproximadamente 15 minutos en comparación con los métodos conocidos en la técnica (Ejemplo 5).

La presente invención está fuertemente acelerada por el uso de partículas magnéticas y la aplicación de un gradiente de campo magnético a estos. El método funciona peor sin el uso de un gradiente de campo magnético, lo que resulta en un tiempo adicional de sedimentación necesario y peor pureza de las células en comparación con la aplicación de un gradiente de campo magnético (ver Ejemplo 6).

La presente invención funciona bien en un amplio intervalo de volumen de la muestra, por ejemplo, funciona con un 1,5 ml o 50 ml de la muestra (ver Ejemplo 7).

La presente invención funciona bien independientemente a si las células que se separan se diluyen con medio de cultivo celular o en tampón convencional (ver Ejemplo 8).

La presente invención es reproducible y muestra una variación menor en el rendimiento entre diferentes muestras (ver Ejemplo 9). El método también es independiente de la concentración de las plaquetas (trombocitos) disponibles en la muestra (ver Ejemplo 10).

El reactivo de agregación de eritrocitos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en dextrano, hidroxietilo de almidón, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como se muestra en el Ejemplo 11. HPMC-15 es superior a otros reactivos de agregación de eritrocitos, como se muestra en el Ejemplo 11. La concentración óptima de HPMC-15 usada en la presente invención es 0,2-0,5 % de HPMC15, por ejemplo en la sangre entera o capa leucocitaria (Ejemplo 11).

En algunas modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula monoespecífica es una partícula magnética, preferentemente entre 100 y 1400 nm en tamaño, con mayor preferencia entre 200 y 500 nm de tamaño, acoplada con, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti CD61. El anticuerpo anti CD61 se une específicamente a los trombocitos. La partícula.CD61, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre se combinan en un tubo, que contiene, por ejemplo, un volumen de muestra de 1,5 a 45 ml, y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo.

En principio, las células se pueden recuperar a partir del sobrenadante o del sedimento celular en el cual el sedimento consiste en el sedimento de eritrocitos en la parte inferior del tubo y las células magnéticamente marcadas retenidas en las paredes laterales del tubo por el imán. Normalmente, las células deseadas se encuentran en la fase de sobrenadante.

En algunas modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y las partículas usadas son al menos dos partículas magnéticas monoespecíficas, preferentemente entre 100 y 1400 nm en tamaño, con mayor preferencia entre 200 a 500 nm de tamaño, acopladas con por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD61 y el anticuerpo monoclonal anti CD15, respectivamente. La partícula.CD 15, la partícula.CD61, y el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre se combinan en un tubo, que contiene, por ejemplo, un volumen de muestra de 1,5 a 45 ml, y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante.

En algunas modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula usada es una partícula magnética bi-específica, acoplada con, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD61 y el anticuerpo monoclonal anti CD 15 en una relación de 1:1. Para lograr resultados óptimos la relación de acoplamiento de anticuerpos a la partícula puede variar y depende de los subconjuntos de células seleccionados. El anticuerpo anti CD61 se une específicamente a los trombocitos y el anticuerpo anti CD 15 se une a los granulocitos.

La partícula CD61.CD15, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo, que contiene, por ejemplo, un volumen de muestra de 1,5 a 45 ml, y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula usada es una partícula magnética biespecífica, acoplada con por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti CD61 y anticuerpo monoclonal anti CD15 en una relación de 1:20. La perla CD61.CD15., el reactivo de agregación de eritrocitos y la

muestra de sangre entera se combinan en un tubo y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante. El sobrenadante puede concentrarse mediante por ejemplo filtración, ya sea filtración de final ciego o filtración de flujo cruzado / en módulo de fibra hueca. Para la filtración de final ciego, las células se proporcionan en un filtro con un tamaño de poro de por ejemplo 1µm. Las células objetivo se retienen en el filtro mientras que el líquido (es decir suero diluido con tampón) gotea a través del filtro. Las células objetivo después se recuperan de la superficie del filtro mediante pipeteo. Para aplicaciones tal como el perfil de expresión génica el filtro que contiene las células objetivo puede colocarse en un contenedor con la solución de lisis para el aislamiento de ARNm.

Para la filtración de flujo cruzado las células se colocan en una jeringuilla y se pasan a través de un módulo de fibras huecas a una segunda jeringuilla. Algún líquido (generalmente 10 - 30 %) pasa a través de los poros de las membranas a una tercera jeringuilla. La suspensión celular se pasa después, de la segunda a la primera jeringuilla y el proceso se repite varias veces, aumentando gradualmente la concentración celular. Cuando se logra el volumen deseado, las jeringuillas pueden atornillarse del módulo de fibra hueca para recuperar las células objetivo.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula usada es una partícula magnética trispecífica, acoplada con, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD14, anticuerpo monoclonal anti CD36 y el anticuerpo monoclonal anti CD61 en una relación de 2,5:2,5:1. La perla.CD14.CD36.CD61, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula magnética biespecífica es una partícula magnética liofilizada, acoplada con por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD61 y el anticuerpo monoclonal anti CD 15. Antes de usar las partículas.CD61.CD15 se solubilizan dentro de un líquido como H₂O o cualquier tampón o medio de cultivo celular adecuado. Después las partículas.CD61.CD15, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula usada es una partícula magnética biespecífica, acoplada con, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD61 y el anticuerpo monoclonal anti CD15. La partícula.CD61.CD15, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo y esta mezcla se incuba durante 5 a 10 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante. Durante una segunda ronda de separación de los subconjuntos de células, se usa el sobrenadante directamente o después del lavado o concentración de las células en los métodos adecuados para la separación de las células que normalmente se usan para PBMC o muestras tipo PBMC, por ejemplo Dynal-Perlas o MicroPerlas (Miltienyi Biotec GmbH, Alemania). Por ejemplo, el enriquecimiento de células CD3+ se realiza usando MicroPerlas CD3+. Para otro ejemplo el enriquecimiento de células T se realiza usando un kit de aislamiento de células T.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula usada es una partícula magnética biespecífica, acoplada con, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti CD61 y el anticuerpo monoclonal anti CD15. La partícula.CD61.CD15, el reactivo de agregación de eritrocitos, un agente de modificación celular como por ejemplo el anticuerpo CD3, y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo y esta mezcla se incuba durante 5 a 15 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante. Durante una segunda ronda de separación de los subconjuntos de células, se aplica el sobrenadante directamente o después de la concentración de las células para la separación celular adicional con una columna de MACS. Las células objetivo pueden ser ya sean las células seleccionadas positivas o negativas.

En otras modalidades de la presente invención, el reactivo de agregación de eritrocitos es HPMC-15 y la partícula es una partícula magnética mono o multiespecífica, acoplada con anticuerpos monoclonales. Las partículas conjugadas con el anticuerpo, el reactivo de agregación de eritrocitos y la muestra de sangre entera se combinan en un tubo y se incuba esta mezcla durante 5 a 15 minutos y se mezcla suavemente, por ejemplo, en una plataforma oscilante o por mezcla manual. Después, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente

se separan en un campo magnético durante 8 - 15 minutos. Durante este tiempo los eritrocitos sedimentan en la parte inferior del tubo. Las células pueden recuperarse del sobrenadante. Durante una segunda ronda de separación las partículas conjugadas con el anticuerpo (por ejemplo, partículas CD235a y/o CD15) se añaden al sobrenadante, esta mezcla se incuba durante 5 minutos, el tubo se coloca en posición vertical en una gradilla y las células marcadas magnéticamente se separan en un campo magnético durante 5 minutos. Las células se recuperan del sobrenadante.

En algunas modalidades de la presente invención, una composición de separación celular para su uso en el presente método comprende un reactivo de agregación de eritrocitos y un conjunto de una o más partículas magnéticas mono y/o multiespecíficas, con al menos una porción de reconocimiento del antígeno acoplada a las partículas, en donde dichas partículas con dicha al menos una porción de reconocimiento del antígeno se unen específicamente al menos a un antígeno específico de uno o más componentes celulares no deseados.

En algunas modalidades de la presente invención, una composición de separación celular para su uso en el presente método comprende un reactivo de agregación de eritrocitos y un conjunto de una o más partículas magnéticas mono y/o multiespecíficas, con al menos una porción de reconocimiento del antígeno acoplada a las partículas, en donde dichas partículas con dicha al menos una porción de reconocimiento del antígeno se unen específicamente al menos a un antígeno específico de uno o más componentes celulares no deseados, en donde dicho conjunto comprende especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno en los granulocitos, por ejemplo, CD15, y en las plaquetas, por ejemplo, CD61. Esto resulta en una composición celular en el sobrenadante de la presente invención que se reduce de eritrocitos, trombocitos y granulocitos (Ejemplo 18).

En algunas modalidades de la presente invención, una composición de separación celular para su uso en el presente método comprende un reactivo de agregación de eritrocitos y un conjunto de una o más partículas magnéticas mono y/o multiespecíficas, con al menos una porción de reconocimiento del antígeno acoplada a las partículas, en donde dichas partículas con dicha al menos una porción de reconocimiento del antígeno se unen específicamente al menos a un antígeno específico de uno o más componentes celulares no deseados, y en donde dicho conjunto comprende uno o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno seleccionadas del grupo que consiste en CD2, CD14, CD15, CD36, CD43, CD56, CD61, algE. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de células B en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 19).

En otras modalidades de la presente invención, una o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de células T en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 20).

En otras modalidades de la presente invención, una o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, algE, aTCRab. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de células NK en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 21).

En otras modalidades de la presente invención, una o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRg/d. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de células T colaboradoras en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 23).

En otras modalidades de la presente invención, una o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD4, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRg/d. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de células T citotóxicas en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 24).

En otras modalidades de la presente invención, uno o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRg/d. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura del receptor de células T de células T α/β positivas en el sobrenadante de la presente invención.

En otras modalidades de la presente invención, uno o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRab. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura del receptor de células T de células T γ/δ positivas en el sobrenadante de la presente invención.

En otras modalidades de la presente invención, uno o más, preferentemente todas, las especificidades antigénicas de

las porciones de reconocimiento del antígeno usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en CD61, CD2, CD15, CD19, CD56, CD304, algE. El uso de todas las especificidades resulta en una composición celular pura de monocitos en el sobrenadante de la presente invención (Ejemplo 22).

5 Los componentes de separación celular para su uso en el presente método mencionado son adecuados para proporcionarse como kit. Cada kit contiene los componentes necesarios para realizar la separación de las células deseadas a partir de una muestra que contiene las células sanguíneas con el método descrito en la presente descripción resultando en las composiciones celulares mencionadas anteriormente.

10 Los componentes esenciales son los reactivos de agregación de eritrocitos y las partículas mono o multiespecíficas que se mencionan en la presente descripción. Las partículas mono y/o multiespecíficas pueden estar disponibles en el kit en líquidos, por ejemplo, tampones, o en forma liofilizada. Los kits pueden usarse para el aislamiento de células B, células T, células T colaboradoras, células T citotóxicas, células asesinas naturales, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células madre hematopoyéticas, células T alfa/beta y células T gamma/delta.

15 El presente método en todas sus modalidades presentadas en el documento puede usarse además, para las aplicaciones clínicas. Las células ilustrativas se aíslan de las cosechas de leucoféresis. El volumen de aféresis que se procesa será típicamente de 150 - 250 mL, procesado en un sistema cerrado tal como una bolsa de sangre. La eliminación del sobrenadante se hará por ejemplo mediante un separador de plasma, ya sea manual o automatizado.

20 Las células objetivo se proporcionan ya sea directamente a un paciente (por ejemplo, infusión de linfocitos del donante) o se manipulan (por ejemplo se cultivan, estimulan y/o expanden o diferencian) antes de la aplicación terapéutica. Las células objetivo pueden derivarse del paciente (uso autólogo) o de un donante sano (uso alogénico).

25 Las poblaciones de células objetivo, tales como poblaciones de células T, poblaciones de células NK, monocitos generadas por el presente método pueden administrarse ya sea solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2, IL-7, IL-15 u otras citoquinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células objetivo como se describe en la presente invención, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como

30 solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares, carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Una composición farmacéutica puede comprender a) una población de células T, en donde dichas células T se proliferan hasta cantidades terapéuticamente efectivas de conformidad con los procedimientos estándar; y b) uno o más

35 portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables.

Otra composición farmacéutica puede comprender a) una población de monocitos, en donde dichos monocitos se cultivan para generar células dendríticas de conformidad con los procedimientos estándar; y b) uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables.

40 Otra composición farmacéutica puede comprender a) una población de células asesinas naturales (NK), en donde dichas células NK se proliferan hasta cantidades terapéuticamente efectivas de conformidad con los procedimientos estándar; y b) uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera adecuada para la enfermedad que se trata (o previene). La cantidad y frecuencia de la administración se determinarán por factores tales como la afección del paciente, y el tipo y severidad de enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse por ensayos clínicos.

50 Ejemplos

De aquí en adelante, se describe con más detalle la presente invención y específicamente con referencia a los ejemplos, sin embargo, que no pretenden limitar la presente invención.

55 Ejemplo 1: Tamaño de las partículas

Las perlas magnéticas se fabricaron con diferentes parámetros del proceso de conformidad con el Ejemplo 4, resultando en diferentes tamaños de las partículas. El tamaño de partícula se caracterizó con el instrumento Delsa Nano de Beckman Coulter. Los anticuerpos monoclonales que reconocen a los antígenos CD 15 y CD61 se conjugaron

60 covalentemente a las perlas magnéticas en una relación 1:1, resultando en 40ug del anticuerpo por mL de suspensión de perla a una concentración de OD450 = 10.

Se proporcionaron diferentes cantidades de perlas conjugadas y 0,2 mL de una solución concentrada 2 % de hidroxipropilmetilcelulosa a 1 mL de la capa leucocitaria de la sangre entera humana dentro de un tubo FACS de 5 mL, se mezclaron durante 15 minutos dentro del rotador de Tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec) y se colocaron en un Separador MACSiMag™ durante 20 minutos. El sobrenadante se eliminó completamente usando una pipeta, se

transfirió a un tubo FACS, las células se contaron usando un analizador hematológico Sysmex KX21 y las células se analizaron usando un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec).

- 5 Los eritrocitos, trombocitos y granulocitos se eliminaron de la sangre entera con una eficiencia >99 % cuando se usaron las partículas conjugadas con un diámetro de 214 μm , 250 μm , 290 μm . La eliminación de trombocito y granulocito fue menos eficiente, cuando se usaron partículas de 1.400 μm . (ver Figura 1 a la Figura 4)

Ejemplo 2: Partículas Monoespecíficas

- 10 Los anticuerpos monoclonales que reconocen CD15 y CD61 se conjugaron individualmente a las perlas magnéticas (Ejemplo 4, diámetro promedio de 100 nm). Los anticuerpos conjugados a la perla se proporcionaron a 1,3 mL de sangre entera, 0,7 mL de tampón PBS y 200 μL de solución concentrada de HPMC15. Los granulocitos y las plaquetas, respectivamente o combinadas, se eliminaron de 98 % a > 99 %, (ver la Figura 5).
- 15 Los anticuerpos monoclonales que reconocen CD19 y CD56 se conjugaron individualmente a las perlas magnéticas (Ejemplo 4, diámetro promedio de 220 μm). Los anticuerpos conjugados a la perla se proporcionaron a 1,3 mL de sangre entera, 0,7 mL de tampón PBS y 200 μL de solución concentrada de HPMC15. Las células B y las células NK, respectivamente, se eliminaron a > 98 % (ver Figura 6 y Figura 7).

20 Ejemplo 3: Partículas Multiespecíficas

- Ya sea 2, 3, 4, 6 u 8 diferentes anticuerpos se conjugaron ya sea a las perlas magnéticas de 100 nm o 200 nm (ver el Ejemplo 4) en las relaciones de anticuerpos previamente evaluadas. Las relaciones de anticuerpos se determinaron mediante la titulación de conjugados monoespecíficos y determinando individualmente la menor cantidad de anticuerpo suficiente para la eliminación completa de un subconjunto de células. Las concentraciones de anticuerpos individuales se usaron para calcular las relaciones. Los anticuerpos conjugados a las perlas se proporcionaron a 1,3 mL de sangre entera, 0,7 mL de tampón PBS y 200 μL de solución de HPMC15 al 2 %, se mezclaron durante 15 minutos dentro del rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec) y se colocaron en un Separador MACSiMag™ durante 20 minutos. El sobrenadante se eliminó completamente usando una pipeta, se transfirió a un tubo FACS, las células se contaron usando un analizador hematológico Sysmex KX21 y las células se analizaron usando un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec). Más del 92 % de las poblaciones celulares analizadas se redujeron, ver la Figura 8.

Ejemplo 4: Generación de las partículas

- 35 La generación de partículas superparamagnéticas como se usa en la presente descripción, se describe en la patente US5543289 que se incluye en la presente como referencia. El intervalo de tamaño de las perlas obtenidas puede influenciarse mediante la concentración usada de dextrano durante la precipitación de las perlas y mediante las sales de hierro usadas.
- 40 Otras perlas fueron las comercialmente disponibles: KiskerPerlas de 250 nm se adquirieron de Kisker Biotech (Alemania), las partículas de tamaño de micrómetro fueron de SensScreen Technologies (Alemania) o Miltenyi Biotec (MACSiBeads).
- 45 La Figura 9 muestra la distribución del tamaño de una partícula magnética conjugada con un anticuerpo CD56 generado por el método modificado del documento de la patente US5543289. El tamaño de un conjugado de partículas magnéticas conjugadas con un anticuerpo CD56 se determinó mediante la medición en un instrumento Nano Delsa de Beckman Coulter. El diámetro promedio es de 260 nm. Aproximadamente 95 % de las perlas están dentro del intervalo de 100 nm a 1400 nm de diámetro, aproximadamente el 90 % de las perlas están dentro del intervalo de 200 nm a 500 nm de diámetro

50 Ejemplo 5: Períodos de incubación y sedimentación

La presente invención se usó de conformidad con los protocolos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3 usando un conjugado de perlas magnéticas CD61/CD4 (200 nm de diámetro).

- 55 Se compararon los tiempos de incubación de 0, 5, 10 y 15 minutos. El tiempo de sedimentación fue siempre de 20 minutos. Un tiempo de incubación de 5 minutos resultó en la reducción comparable con la que se obtiene con el tiempo de incubación de 15 minutos.
- 60 En un segundo experimento los tiempos de sedimentación de 8, 10, 12, 15 y 20 minutos se compararon después del tiempo de incubación de 5 minutos. Un tiempo de sedimentación de 8 minutos resultó en la reducción comparable con la que se obtiene con el tiempo de sedimentación de 20 minutos. Además el tiempo de sedimentación reducido no se evaluó ya que el eritrocito no había sido totalmente sedimentado con el tiempo de sedimentación de menos de 8 minutos.

65 Ejemplo 6: Separación por la fuerza gravitacional

Los cócteles de perlas magnéticas conjugadas con los anticuerpos (tamaño de 200 nm, ver Ejemplos 19 y 21) se usaron de conformidad con los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3 para comparar la sedimentación mediante la sedimentación por gravedad y mediante la sedimentación magnéticamente forzada.

- 5 Las células NK se enriquecieron de 6,4 % en la sangre entera a 8,1 % y 70,2 %, respectivamente. Las células B se enriquecieron de 4,5 % a 23,4 % y 85,5 %, respectivamente.

10 Por lo tanto, el enriquecimiento de las células objetivo es posible, en general, mediante la sedimentación no magnéticamente forzada pero es claramente peor que si se aplica la sedimentación magnéticamente forzada. La pureza de las células objetivo se mejora significativamente, si la sedimentación es magnéticamente forzada.

Ejemplo 7: Separación de diferente volumen de la muestra

- 15 Diferentes escalas de separación celular se compararon usando protocolos similares a los Ejemplos 1, 2 y 3. Se usó la capa leucocitaria de sangre entera humana, la escala de separación fue 2 mL vs 13,5 mL vs. 45 mL usando 1,3 mL / 9 mL / 30 mL de la capa leucocitaria diluida con la mitad del volumen de solución salina tamponada con fosfato. Los conjugados de anticuerpos usados fueron los anticuerpos CD61 y CD15 conjugados biespecíficamente con las perlas magnéticas de 100 nm y 200 nm.

- 20 La eliminación de eritrocitos, plaquetas y granulocitos fue equivalente en las tres escalas. La eliminación fue > 99 % para los eritrocitos, > 99 % para las plaquetas y > 95 % para granulocitos.

Ejemplo 8: Separación con el medio en vez de con tampón

- 25 La separación se realizó con medio de cultivo celular RPMI 1640 en vez de con tampón PBS para las etapas de dilución, resultando en una suspensión celular en 67 % de suero autólogo y 33 % de medio de cultivo celular, una configuración que puede usarse directamente para el ensayo de cultivo celular. La separación se evaluó en escala de 2 mL en tubos FACS de 5 mL, usando sangre entera humana, 200 uL de solución concentrada de HPMC 15 y perlas magnéticas de 200 nm conjugadas a un cóctel de anticuerpos dirigidos contra anticuerpos CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123. La pureza y el rendimiento de las células NK aisladas fueron equivalentes usando tanto medio de cultivo celular RPMI 1640 como tampón PBS suplementado con 0,5 % de albúmina de suero bovino.

Ejemplo 9: Variación del rendimiento inducido por diferentes muestras de pacientes

- 35 Se aislaron células NK a partir de 10 donantes usando la presente invención y el rendimiento de la separación se comparó con un kit de aislamiento de células NK en la sangre entera disponible en el comercio (kit de aislamiento de células NK Rosette Sep, Stem Cell Technologies).

- 40 La presente invención se evaluó usando un cóctel de conjugados de perlas magnéticas con anticuerpos biespecíficos (200 nm de diámetro) que consiste en perlas CD61.CD3, perlas CD61.CD14, perlas CD61.CD15, perlas CD61.CD19, perlas CD61.CD4, todas ellas con una relación de anticuerpos de 1:19. Se usó 200 ul de una solución concentrada de HPMC15 al 2 %. Los reactivos se incubaron durante 15 minutos, la sedimentación magnéticamente forzada se realizó durante 20 minutos usando un separador MACSiMAG™ (Miltenyi Biotec). La pureza de las células NK aisladas entre los linfocitos fue de 76,1 % ± 10,2 % en comparación con 74,1 % ± 11 % usando el sistema Rosette Sep. El rendimiento de células NK fue 66±11 % (presente invención) vs. 44±19 %.

La pureza y el rendimiento de las células NK son equivalentes o superiores a los productos disponibles en el comercio, la variabilidad del rendimiento es significativamente menor.

- 50 Ejemplo 10: Independencia de la concentración de las plaquetas

- En la presente invención se realiza la reducción paralela de los eritrocitos, las plaquetas y las células no deseadas, es decir, los leucocitos no objetivos. Se ha evaluado si el contenido alto o bajo de las plaquetas en la sangre entera impacta el rendimiento de la separación y la pureza de las células objetivo. Las muestras de sangre se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos, sedimentando los eritrocitos y leucocitos y dejando la mayor parte de las plaquetas en el sobrenadante. El sobrenadante de las muestras de sangre o bien se eliminó o añadió a otras muestras para reducir o aumentar la concentración de las plaquetas. La separación de las células se realizó de conformidad con los protocolos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3. La pureza y el rendimiento de las células objetivo (células NK) fueron idénticas. Por lo tanto, la concentración de las plaquetas de la muestra que se procesa no afecta el rendimiento de la separación de la presente invención.

Ejemplo 11: Reactivo de agregación de eritrocitos

- 65 Diferentes cantidades y concentraciones del reactivo de sedimentación de los eritrocitos HPMC-15 se evaluaron como componentes de un procedimiento de selección de las células NK: 100, 200, 300, 400, 500, 600 ul de una solución concentrada de HPMC15 al 2 % se usaron por mL ya sea de sangre entera o capa leucocitaria humana en una escala

de 2 mL. Mayor concentración de HPMC 15 redujo el rendimiento de las células objetivo (células NK) y aumentó la pureza de las células NK. La cantidad óptima de solución concentrada de HPMC15 al 2 % fue 200-250 ul/mL de sangre entera o de capa leucocitaria, resultando en una concentración final de aproximadamente HPMC15 al 0,2 %.

HPMC15 se comparó con otros reactivos de sedimentación de eritrocitos, a saber, Dextrano T250, Dextrano T500, PVP 360 usando un cóctel de anticuerpos CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61 y CD123 conjugados a perlas magnéticas de 200 nm. Todas las combinaciones resultaron en el enriquecimiento de las células NK, el HPMC15 resultó en la más alta pureza y rendimiento de las células NK (61,8 % de pureza y 86 % de rendimiento vs 53,8 %, 52,0 %, 49,4 % de pureza y 63 %, 63 %, 66 % de rendimiento para Dextrano T250, Dextrano T500 y PVP, respectivamente; Figura 19)

Los reactivos de agregación de eritrocitos se compararon además cuando no se combinaron con partículas magnéticas conjugadas con anticuerpo. El contenido en plaquetas se redujo en 76 % usando HPMC-15, sólo en 8 % usando Dextrano T250, sólo en 13 % usando Dextrano T500 y sólo en 47 % usando PVP. La alta eficacia de eliminación de las plaquetas del HPMC-15 puede combinarse de forma sinérgica con el anticuerpo de unión a las plaquetas (tal como CD61) conjugado con partículas magnéticas.

Ejemplo 12: Partículas acopladas indirectamente con los anticuerpos

Las perlas magnéticas (diámetro <100 nm) conjugadas con anticuerpos que reconocen las regiones constantes de un anticuerpo secundario o fluorocromos de anticuerpos conjugados se cargaron con anticuerpos secundarios / anticuerpo conjugados que reconocen los antígenos CD3 y CD 19. Las células T y B, respectivamente, se redujeron en 91,5 % y 99,1 % usando CD3-PE y CD19-PE, en 94 % y 99,9 % usando CD3-APC y CD19-APC, en 95,3 % y 98,6 % usando CD3-FITC y CD19-FITC, en 94,1 % y 99,4 % usando anticuerpos CD3 y CD19 (y perlas magnéticas anti IgG), en 88 % y 98,6 % usando CD3-Biotina y CD19-Biotina, respectivamente.

Todos los sistemas indirectos de separación mostraron rendimientos de separación equivalentes en comparación con el uso de los anticuerpos que se conjugaron directamente a las perlas magnéticas.

Ejemplo 13: Uso de diferentes muestras

La presente invención se evaluó en diferentes productos celulares que contienen eritrocitos, a saber, cosecha de leucoféresis, cordón umbilical, aspirados de médula ósea usando anticuerpos CD 15 y anticuerpos CD61 conjugados a perlas magnéticas de 200 nm. En todos los casos se eliminaron >99 % de granulocitos y >96 % de las plaquetas.

La presente invención se evaluó en aspirados de médula ósea usando anticuerpos CD19 y CD56 conjugados a las perlas magnéticas de 200 nm. Se eliminaron 99 % de células B y 87 % de células NK.

La presente invención se evaluó en las preparaciones de la capa leucocitaria de la sangre entera usando anticuerpos CD61 y CD 15 conjugados a las perlas magnéticas de 100 nm y anticuerpos CD61 y CD 19 conjugados a las perlas magnéticas de 100 nm. Se eliminaron 99,7 % de las plaquetas y 97 % de los granulocitos y 99,4 % de las plaquetas y 97 % de las células B.

La presente invención puede usarse con éxito por lo tanto, para las muestras tales como sangre entera, preparaciones de la capa leucocitaria, cosechas de leucoféresis, sangre del cordón umbilical y aspirados de médula ósea, pero no se limita a estas muestras. La presente invención funcionará con cualquier muestra que contiene eritrocitos y otros componentes celulares. Estas muestras además pueden generarse artificialmente, por ejemplo, añadiendo eritrocitos a una muestra que no contiene originalmente eritrocitos, por ejemplo, el cultivo de células.

Ejemplo 14: Principio de Rosette sep sin centrifugación

Para evaluar si la tecnología actual es factible para la separación celular directamente de la sangre entera sin etapas de centrifugación, se evaluó un método de formación de rosetas con eritrocitos (RosetteSep, Stem Cell Technologies) de conformidad con los Ejemplos proporcionados en la patente de los Estados Unidos 6.872.567 B2 usando Dextrano o HPMC15 como reactivos de agregación de eritrocitos. El cóctel para el aislamiento de monocitos RosetteSep se incubó con 5 mL de la Capa Leucocitaria de sangre entera humana y, Dextrano T 500 o HPMC15 durante 10 minutos. Los glóbulos rojos no sedimentaron aunque lo hicieron en los experimentos de control sin el cóctel de anticuerpos.

La suspensión se centrifugó a 50 × g durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se analizó por citometría de flujo. Los monocitos se enriquecieron de 8,92 % a 37,9 % (Dextrano) y 35,2 % (HPMC), respectivamente, con un rendimiento de 28,3 % / 11,5 %, en comparación con los valores de referencia proporcionados por el proveedor del 71±9 % de pureza y 57±23 % de rendimiento, al usar el Kit con un procedimiento de Ficoll.

La combinación de la sedimentación de eritrocitos y la formación de rosetas con los eritrocitos de células no objetivo no funcionó en absoluto sin centrifugación y no proporcionó suficiente rendimiento de separación después de la centrifugación.

Ejemplo 15: Método de separación de la sangre entera con y sin anticuerpos CD235a

Un cóctel de anticuerpos (ver Ejemplo 3, especificidades ver Ejemplo 21) se conjugó con las partículas magnéticas (> 200 nm) y se usó de conformidad con los protocolos proporcionados en los Ejemplos 1, 2 y 3 y el rendimiento de la separación se comparó con un experimento donde un anticuerpo CD235a (Glicoforina) se conjugó con el mismo tipo de partículas magnéticas y se usó ya sea en una segunda etapa para reducir además el contenido de eritrocitos o en combinación con el cóctel de anticuerpo conjugado. La pureza de las células NK aisladas no se mejoró significativamente con la adición del conjugado CD235a (94,2 % vs. 92,8). El contenido de eritrocitos en la preparación celular final se redujo sólo por 44 % (4,6E + 06 RBC vs. 8.2E+06, es decir, 0,073 % vs. 0,130 % de la cantidad inicial). Por el contrario, el contenido de eritrocitos puede reducirse en una segunda etapa, por debajo del límite de detección mediante la reducción de eritrocitos positivos a CD235a. Es decir, además de las perlas conjugadas con CD235a no es necesario obtener purezas altas y no es suficiente eliminar completamente los eritrocitos. La eliminación completa de los eritrocitos puede lograrse usando perlas magnéticas con CD235a en una segunda etapa de separación.

Ejemplo 16: Reactivo liofilizado vs. líquido

Un kit de aislamiento de células NK se configuró para su uso en la presente invención (ver Ejemplo 21). Los reactivos se almacenaron ya sea a 4°C, a -70°C después de la congelación o se liofilizaron con suplementos y procedimientos como es conocido en la técnica. Los reactivos liofilizados se reconstituyeron con 0,75x de solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones se usaron para el aislamiento de las células NK de conformidad con la presente invención. Las células NK se purificaron a 90 %, 92 %, 90 % de pureza, respectivamente, con un rendimiento de 72 %, 71 %, 83 %, respectivamente. (ver Figura 10)

Ejemplo 17: Reactivo liofilizado reconstituido con diferentes tampones

Un kit para el aislamiento de las células NK se configuró basado en la presente invención (ver Ejemplo 21). Los reactivos se liofilizaron con suplementos y procedimientos como es conocido en la técnica. Los reactivos liofilizados se reconstituyeron con 0,75x de fosfato con diferentes suplementos:

- 0,3125 % de BSA/ 0,75 % de HPMC
- 0,3125 % de BSA/ 0,75 % de HPMC/ 0,03 % de Pluronic/ 0,05 % de Azida Na
- 0,75 % de HPMC/ 0,03 % de Pluronic/ 0,05 % de Azida Na
- 0,75 % de HPMC/ 0,03 % de Pluronic
- 0,75 % de HPMC/solución salina tamponada.

Las composiciones se usaron para el aislamiento de las células NK de conformidad con la presente invención. Las células NK se purificaron hasta 87-88 % de pureza con un rendimiento de 63 - 71 % (ver Figura 11).

Ejemplo 18: Combinación del kit de células mononucleares de sangre periférica

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con anticuerpos que reconocen CD15 y CD61. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los anticuerpos conjugados con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células mononucleares de sangre periférica aisladas se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 19: Combinación del kit de células

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con anticuerpos que reconocen CD2, CD 14, CD15, CD36, CD43, CD56, CD61 y algE. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células B aisladas se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 20: Combinación del kit de células T

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con anticuerpos que reconocen CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células T aisladas se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 21: Combinación del kit de células NK

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con anticuerpos que reconocen CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, algE, aTCRab. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células NK aisladas se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 22: Combinación del kit de Monocitos

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con los anticuerpos que reconocen CD3, CD7, CD15, CD19, CD56, CD61, CD123, CD193, CD304, CD335, algE. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Los monocitos aislados se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 23: Combinación del kit de células T colaboradoras

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con los anticuerpos que reconocen CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRg/d. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células T colaboradoras aisladas se analizaron en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 24: Combinación del kit de células T citotóxicas

Las partículas magnéticas (Ejemplo 4) se conjugaron con anticuerpos que reconocen CD4, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD36, CD56, CD61, CD123, algE, aTCRg/d. Los conjugados de perla con anticuerpos se titularon en sangre entera humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpo con perla magnética se combinaron con un cóctel en las cantidades previamente determinadas.

El cóctel de anticuerpos se proporcionó a 1,5 mL de sangre entera humana, mezcló, incubó durante 5 minutos en un rotador de tubo MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y colocó en un imán (Figura 17) durante 8 minutos. El sobrenadante se recuperó pipeteando en un tubo nuevo. Las células T citotóxicas aisladas se han analizado en un citómetro de flujo analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) usando una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Ejemplo 25: Clasificación de dos parámetros

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de 20 ml de sangre entera humana usando la invención descrita de conformidad con el Ejemplo 18. Las células mononucleares de sangre periférica aisladas se lavaron mediante una etapa de centrifugación 300 x g y se aplicaron a una columna LS MACS equilibrada (Miltenyi Biotec). El flujo que atraviesa se recogió, se contaron las células y los glóbulos blancos 1E7 se marcaron magnéticamente en 100 µl usando micropelotas CD 19 de conformidad con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec GmbH). Las células B se purificaron hasta 81,2 % de pureza con un rendimiento del 79,8 % usando una columna MS MACS. Para la

comparación se aislaron las células mononucleares de sangre periférica usando la presente invención de conformidad con el ejemplo 18. Las células mononucleares de sangre periférica aisladas 1E7 se marcaron magnéticamente en 100 ul usando un kit MACS de aislamiento de células B. Las células B se purificaron a 89,7 % con un rendimiento de 95 %.

5 Ejemplo 26: Velocidad de sedimentación

La velocidad de sedimentación de la sangre entera humana suplementada ya sea con la solución de agregación eritrocitaria (HPMC-15) o solución de agregación eritrocitaria y perlas magnéticas de diferentes tamaños (50 nm, 200 nm, 3500 nm) conjugadas con un cóctel de anticuerpos monoclonales (CD3, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, anti IgE) se evaluaron mediante la determinación del volumen del sobrenadante que puede eliminarse. Sorprendentemente, la combinación de HPMC-15 y las perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos de tamaño 200 nm resultaron en la sedimentación completa de los eritrocitos dentro de los 3 minutos en comparación con 8,5 minutos cuando sólo se usó la solución de agregación eritrocitaria (HPMC). La sedimentación fue más lenta cuando se usaron perlas magnéticas más pequeñas o más grandes. La Figura 18 muestra los resultados del experimento.

15 Ejemplo 27: Uso de perlas magnéticas conjugadas con CD36

2,5 mL de sangre entera se usaron para el aislamiento de linfocitos citotóxicos CD8 positivos por la presente invención, usando HPMC-15 y un cóctel de partículas magnéticas monoespecíficas (220 nm) conjugadas con anticuerpos CD4, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD56, CD61, CD123, aIgE, aTCRg/d. Las perlas conjugadas con el anticuerpo CD36 se añadieron ya sea al cóctel o el cóctel se usó sin la adición del anticuerpo CD36. 2,4 mL del sobrenadante pudo recuperarse con el enfoque sin partículas conjugadas con el anticuerpo CD36, que contiene 73 % de la cantidad inicial de células CD8 positivas a una pureza del 80,4 %. La forma de los sedimentos fue como se representa en la Figura 13, que proporciona una interfaz plana entre la píldora sedimentada y la fase de sobrenadante. Cuando se usaron los conjugados de anticuerpos CD36 con partículas magnéticas, la forma exponencial de la píldora sedimentada (Figura 14) permitió un mayor volumen de sobrenadante (2,6 ml; + 8 %) que se recupera, aumentando el rendimiento de 78 % a una pureza de 80,7 %.

30 Ejemplo 28: Comparación de los diseños de imanes

A 8 mL de la capa leucocitaria de la sangre entera se le redujeron los eritrocitos, las plaquetas y los granulocitos usando la presente invención (anticuerpos CD61 y CD15 conjugado con las partículas magnéticas de 200 nm en una relación 1:1, el HPMC-15 que contiene tampón para la dilución con 4 mL) combinada con diferentes imanes. El separador MACSiMAG redujo el 99,1 % de los granulocitos y 99,2 % de las plaquetas, el limpiador magnético de cristales de acuario el 97,6 % y 98,7 % respectivamente, un diseño con 3 imanes en un yugo en forma de U el 99,7 % y 98,0 % respectivamente, el imán SensScreen el 96,7 % y 98,6 %, respectivamente.

El imán según la Figura 17 se comparó con el separador MACSiMAG usando 1 mL de sangre entera, el HPMC-15 que contiene tampón de PBS, un kit de aislamiento de células NK que consiste en anticuerpos de unión a las células no NK se conjugó con partículas magnéticas de 240 nm. La sangre se incubó con los reactivos durante 5 minutos, el tiempo de sedimentación fue de 8 minutos. Las células NK se purificaron a 81 % de pureza en un rendimiento del 67 % usando el imán de acuerdo con la Figura 17 y en 77,6 % de pureza en 66 % de rendimiento usando el separador MACSiMAG.

45 Ejemplo 29: Reducción de las células B usando partículas magnéticas de 50nm

Un anticuerpo monoclonal que reconoce CD 19 en las células B se conjugó con las perlas magnéticas (Ejemplo 4, diámetro promedio de 50 nm, MicroBeads, Miltenyi Biotec). El anticuerpo conjugado a perlas se proporcionó a 1,3 mL de la capa leucocitaria de la sangre entera, 0,7 ml de tampón PBS y 200 ul de solución madre de HPMC15. Las células B se redujeron sólo insuficientemente con más del 75 % de las células B restantes en la muestra (ver Figura 12).

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para enriquecer y/o recuperar las células objetivo de una muestra que contiene las células objetivo, los eritrocitos y otras células sanguíneas y/o trombocitos, que comprende:
 - 10 a) poner en contacto la muestra con una composición, dicha composición que comprende:
 - ii) al menos un fragmento de unión al antígeno acoplado a una partícula magnética, en donde dicha partícula con dicho al menos un fragmento de unión a antígeno se une específicamente con al menos un antígeno específico para uno o más de dichas otras células sanguíneas y/o trombocitos;
 - 15 b) aplicar simultáneamente
 - i) sedimentación por gravedad para la sedimentación de los eritrocitos; y
 - ii) un gradiente de campo magnético a dicha muestra para la inmovilización de dicha partícula magnética generando de ese modo un sedimento y una fase de sobrenadante, y
 - c) recuperar las células objetivo de la fase de sobrenadante.
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha partícula es de tamaño entre 100 nm y 1400 nm.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho al menos un fragmento de unión al antígeno reconoce un antígeno en la superficie celular de los eritrocitos y también, un antígeno en la superficie celular de al menos una de otras dichas células sanguíneas y/o trombocitos.
- 25 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho al menos un fragmento de unión al antígeno acoplado a una partícula magnética es un anticuerpo.
- 30 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicha partícula se acopla con dos o más fragmentos de unión al antígeno, y en donde dicha partícula con dichos dos o más fragmentos de unión al antígeno se unen específicamente al menos a dos antígenos específicos para otras células sanguíneas y/o trombocitos diferentes.

FIG 1

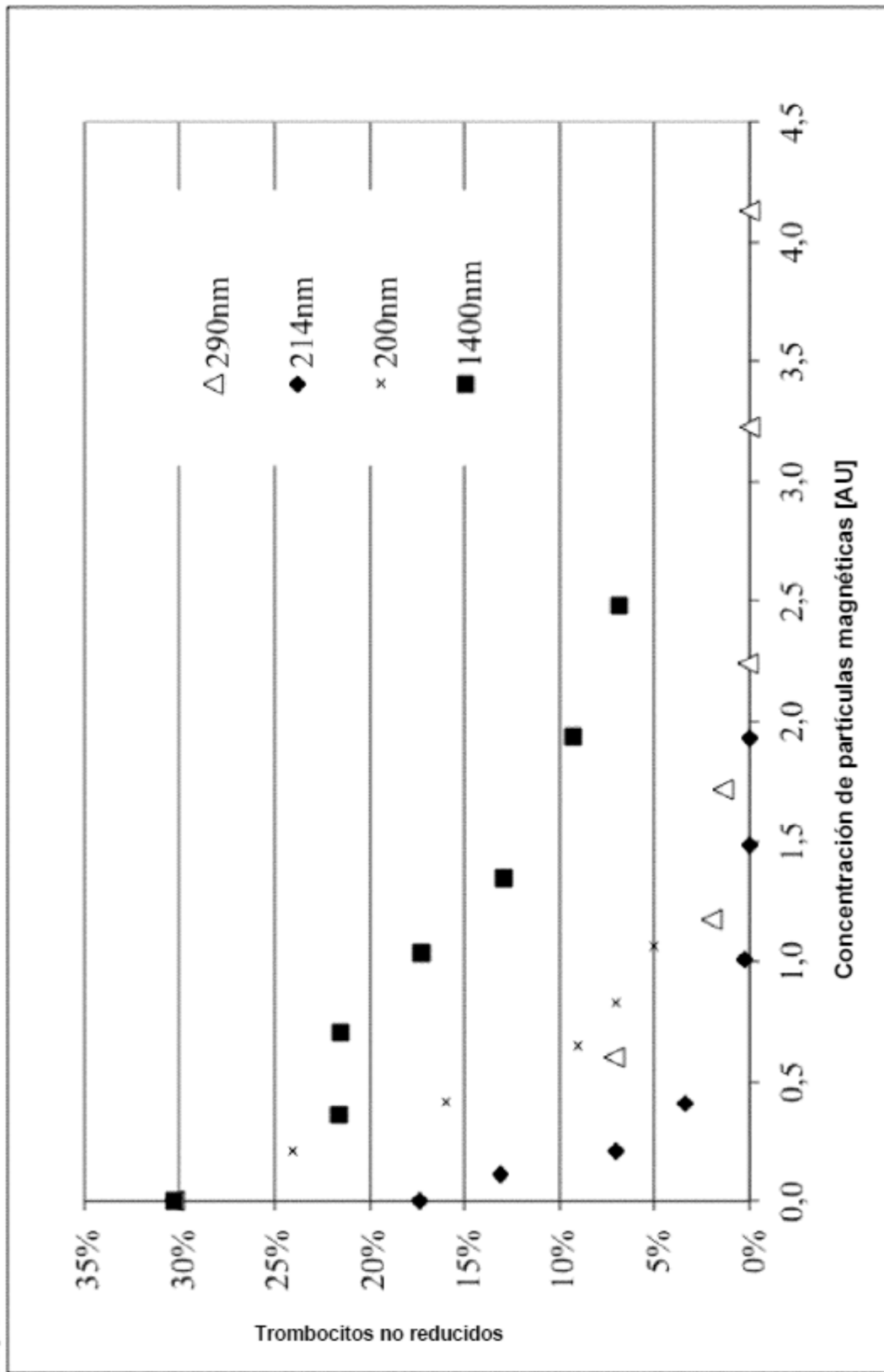


FIG 2

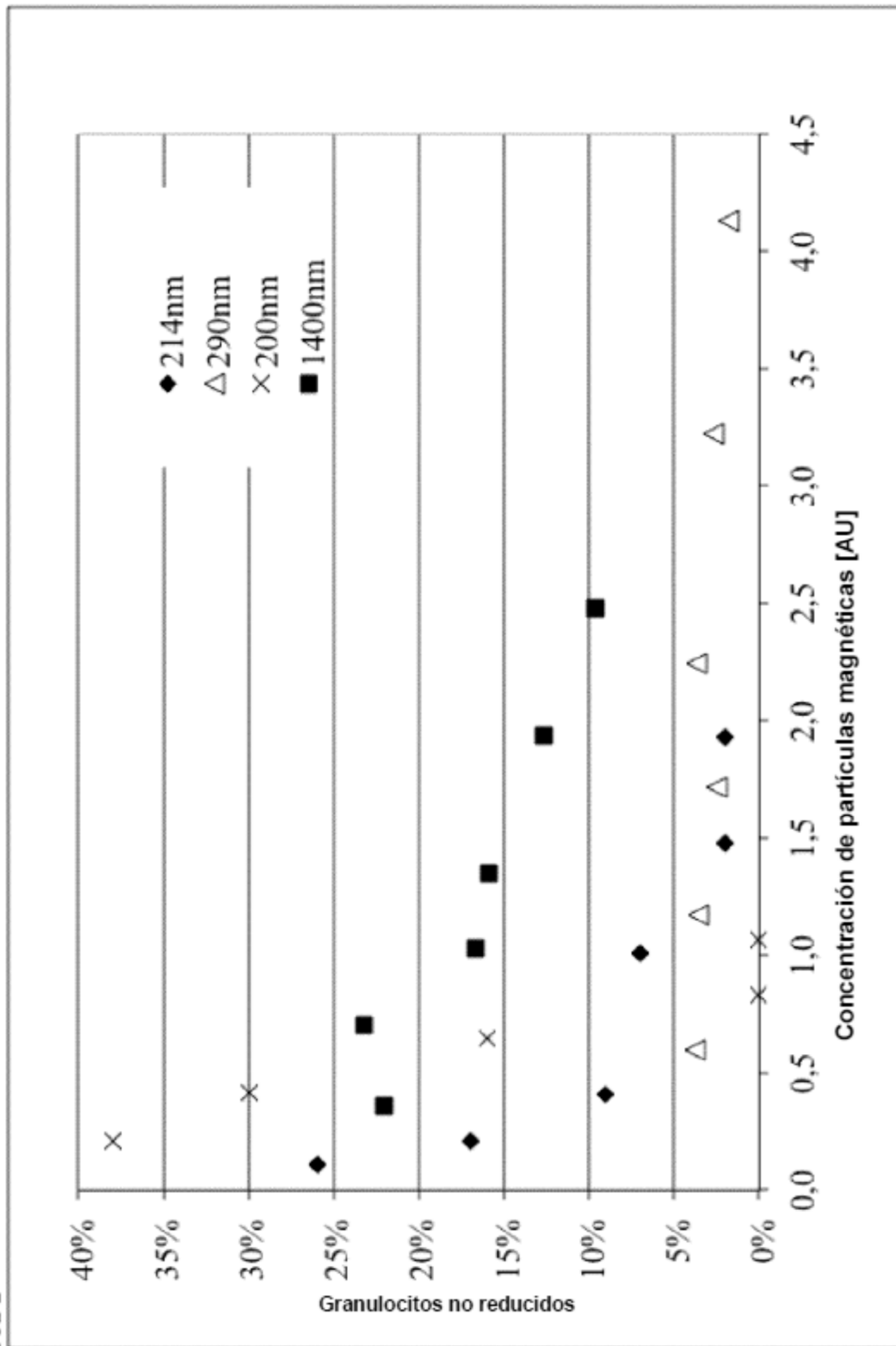


FIG 3

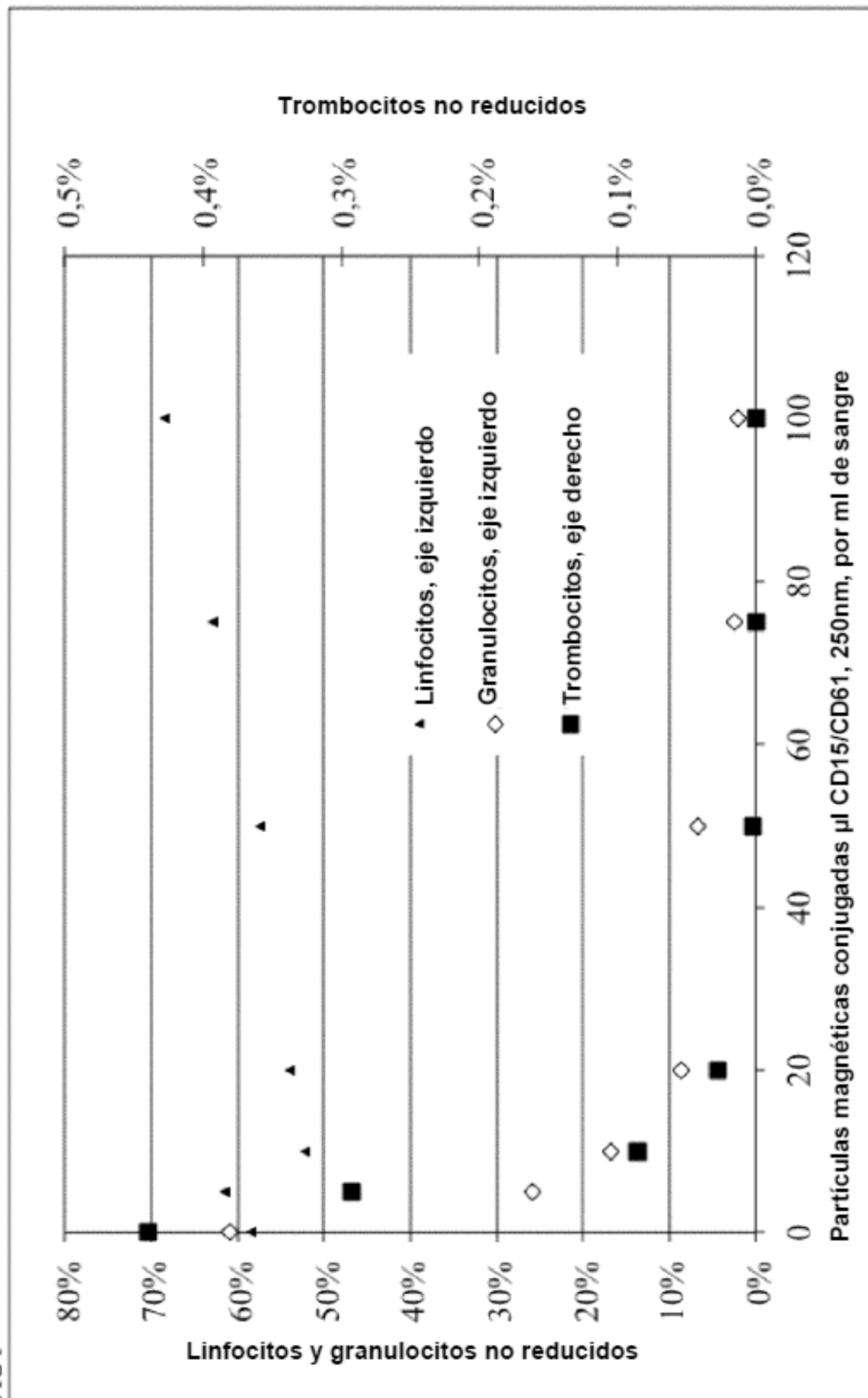


FIG 4

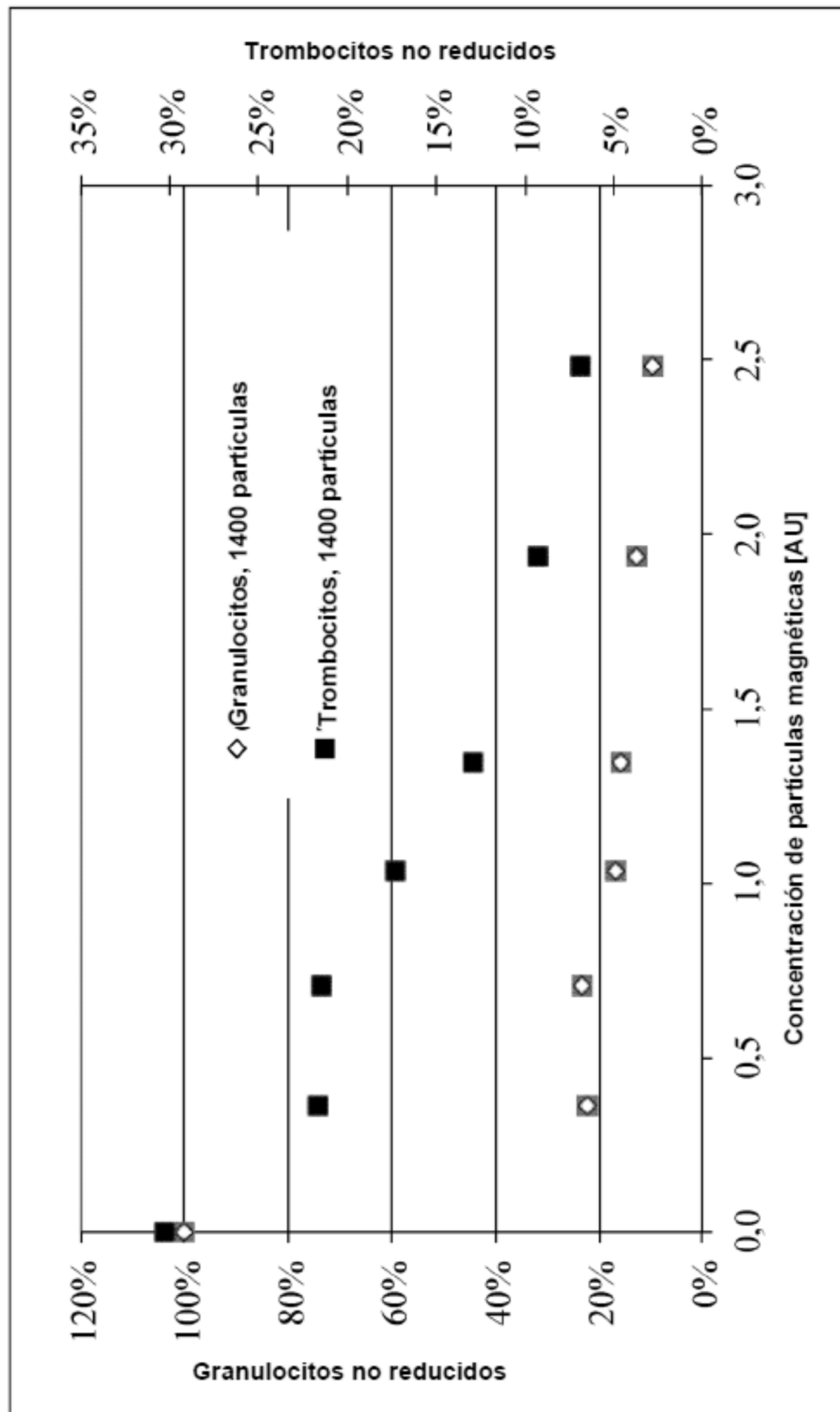
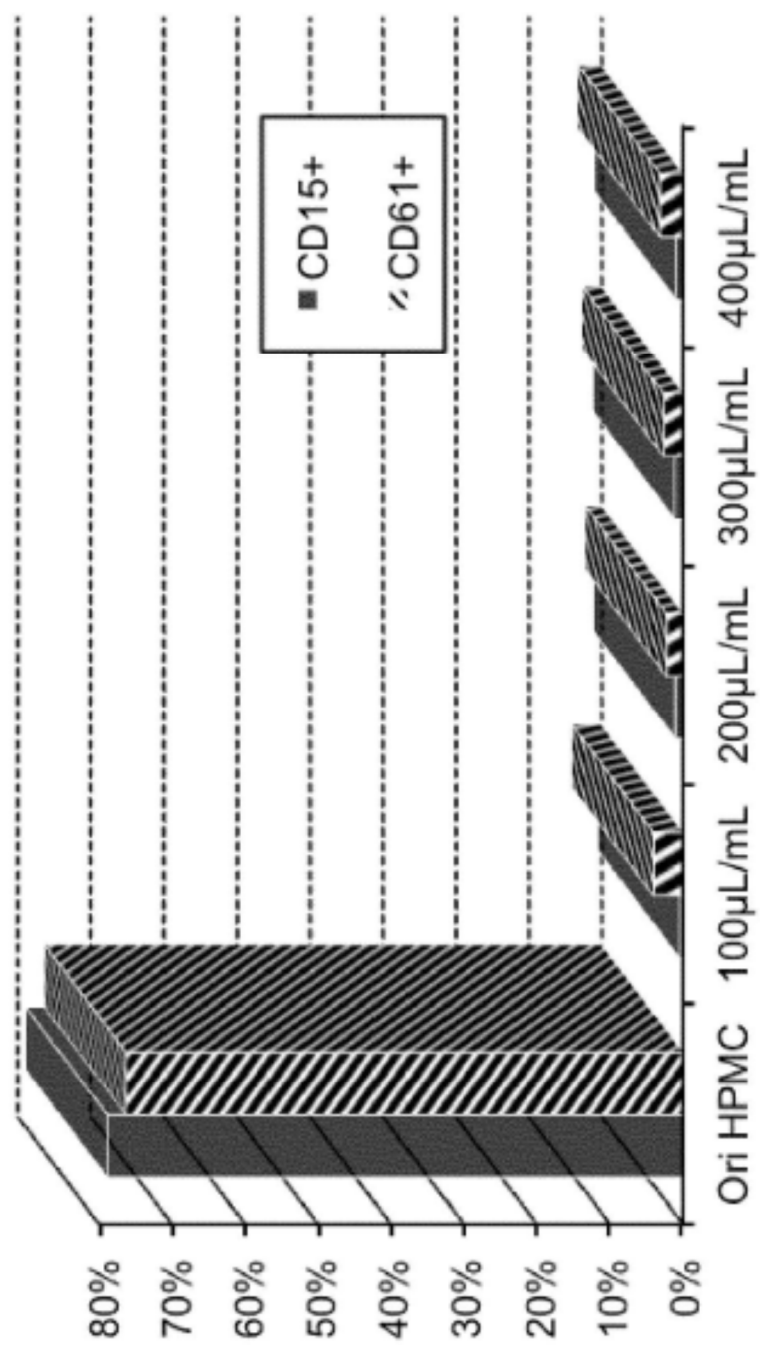
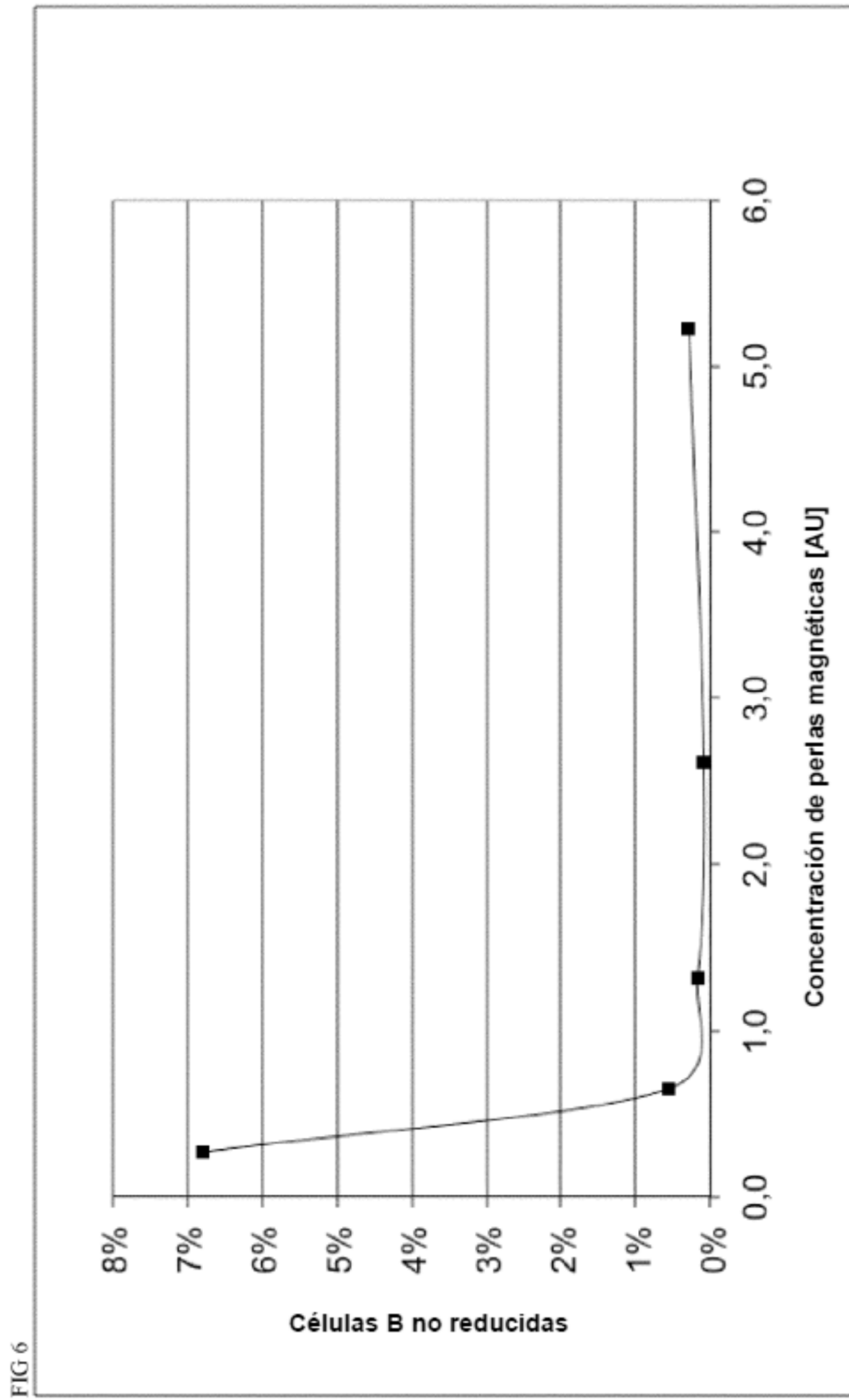


FIG 5





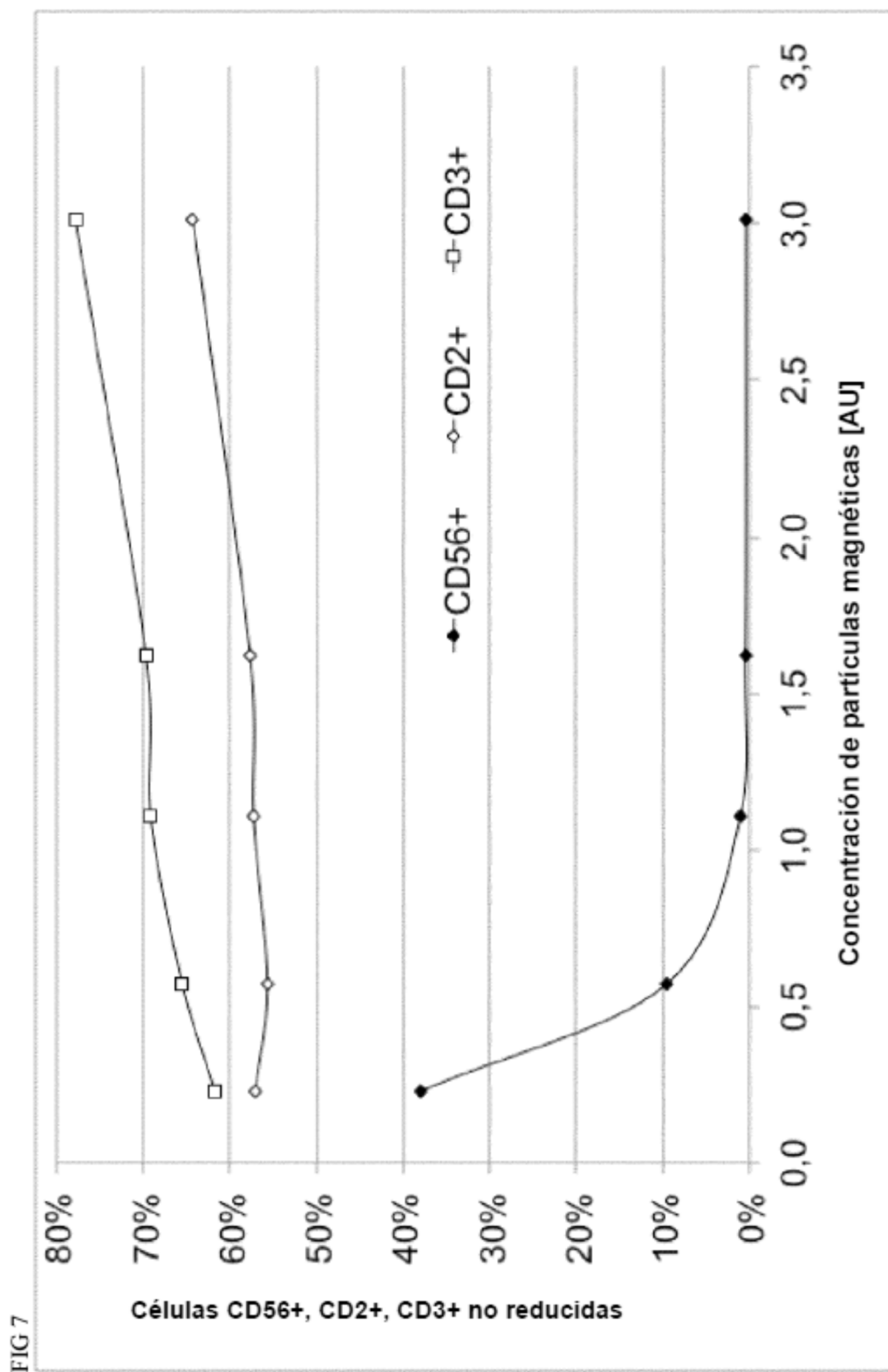


FIG 8

	Especificidad	Frecuencia inicial	Frecuencia final	Eficiencia de eliminación
2 anticuerpos, CD61,CD15, perlas 200nm				
	CD61	n.d.	n.d.	n.d.
	CD15	33%	0.01%	99.9%
3 anticuerpos, CD3,CD19, CD61, perlas 50nm				
	CD3	28%	1.4%	99%
	CD19	8%	2%	92%
	CD61	n.d.	n.d.	n.d.
3 anticuerpos, CD3,CD19, CD61, perlas 290nm				
	CD3	28%	0.05%	99.9%
	CD19	8.2%	0.01%	99.9%
	CD61	n.d.	n.d.	n.d.
4 anticuerpos, CD14, CD15, CD19, CD61, perlas 50nm				
	CD14	10.6%	0.3%	98%
	CD15	48.8%	4.7%	53%
	CD19	8.1%	0.1%	99%
	CD61	n.d.	n.d.	n.d.
6 anticuerpos, CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD61, perlas 50nm				
	CD3	70.3%	5.5%	99%
	CD4dim	16%	13.2%	94%
	CD4bright	44.8%	0.01%	99.9%
	CD14	10.6%	2.6%	98%
	CD15	48.8%	49.3%	92%
	CD19	8.1%	0.3%	99.9%
	CD61	n.d.	n.d.	n.d.

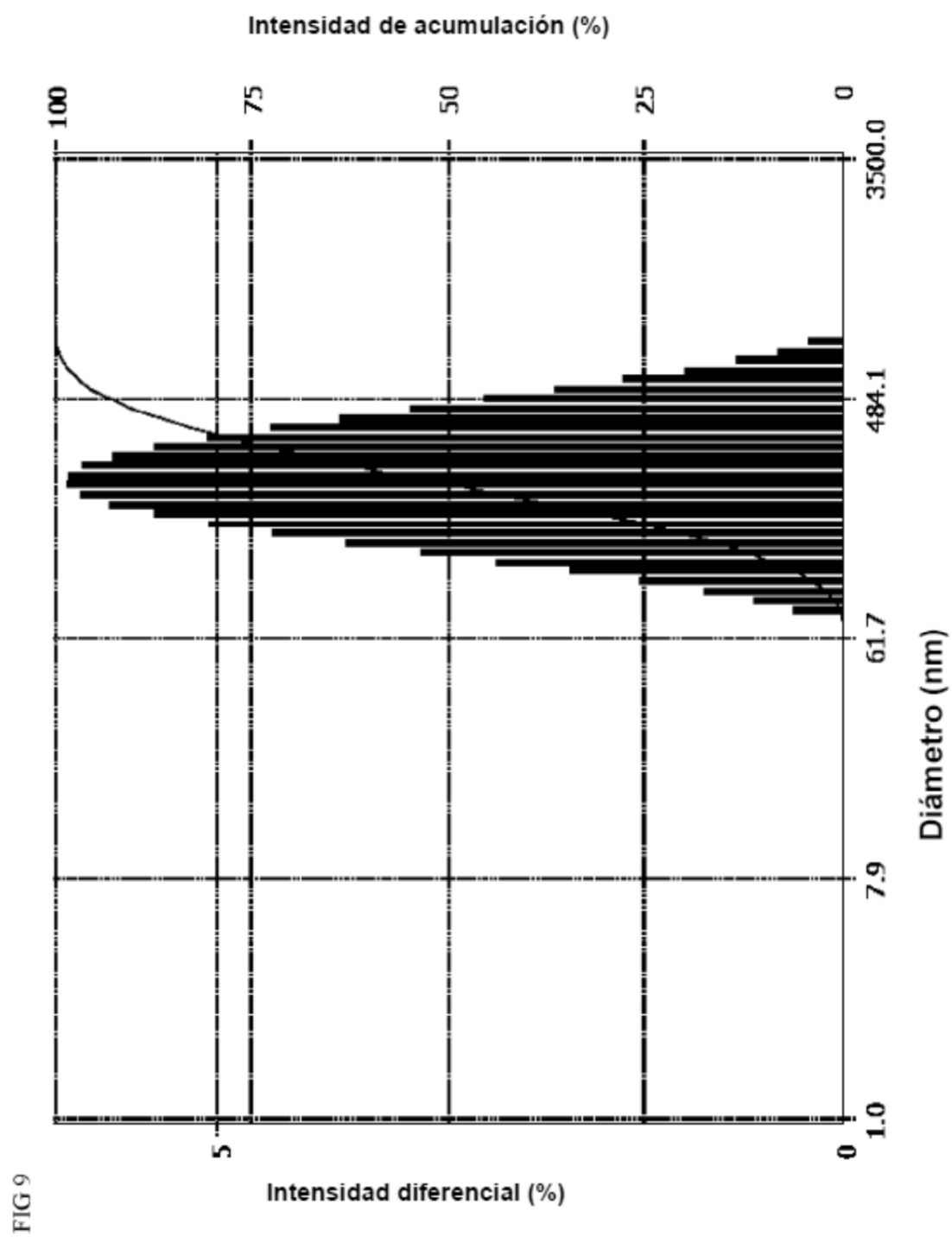


FIG 10

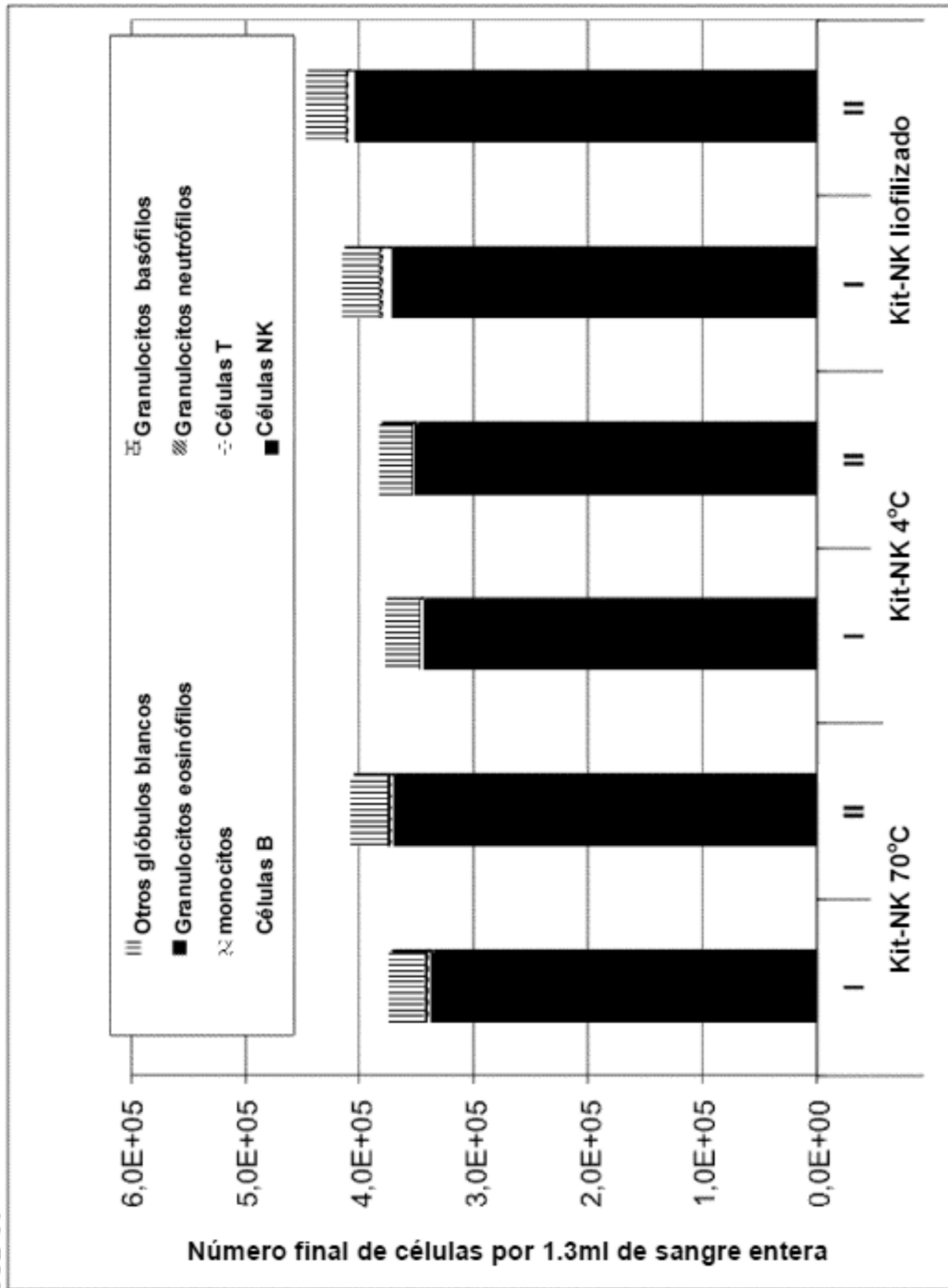
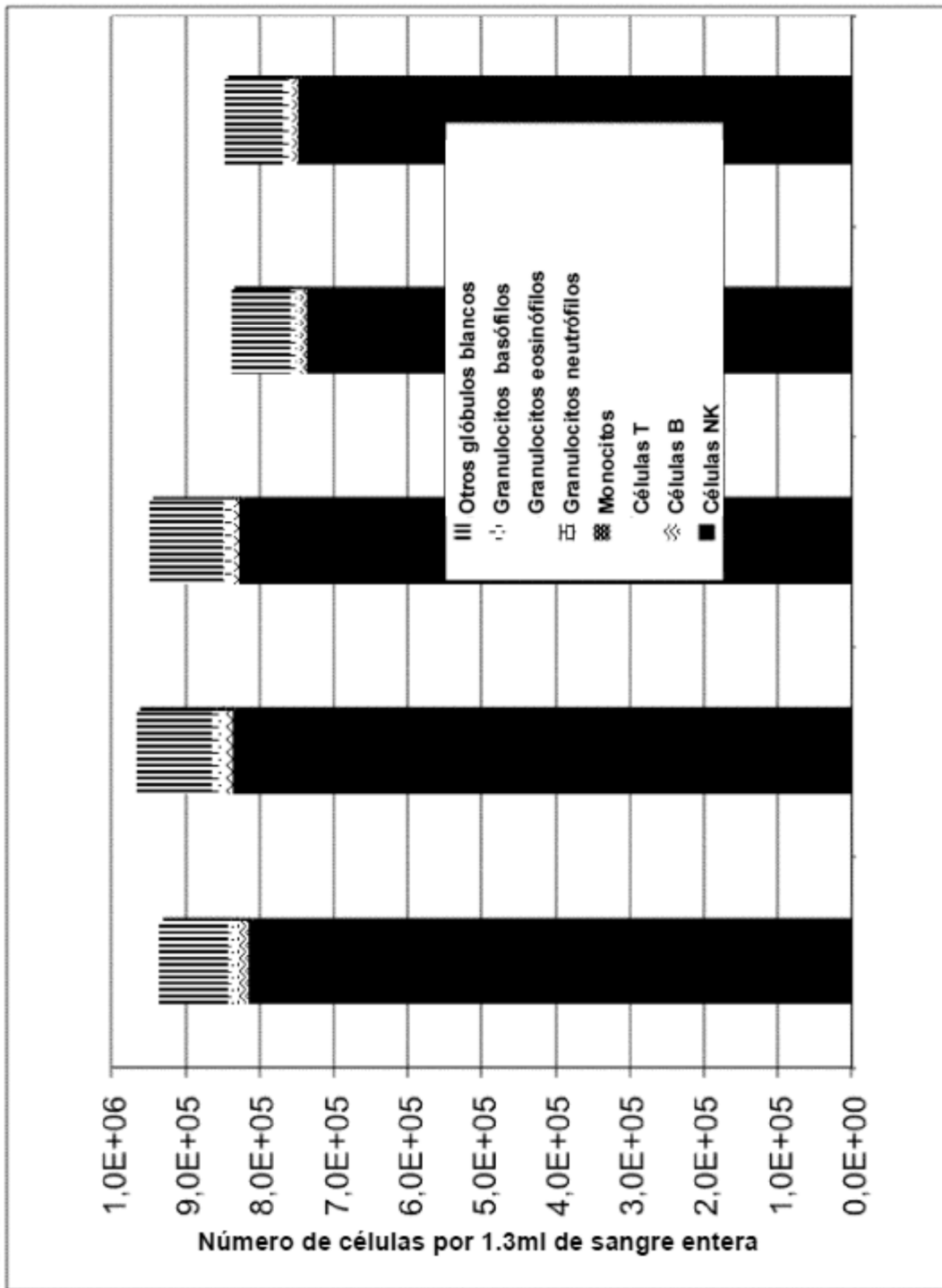


FIG 11



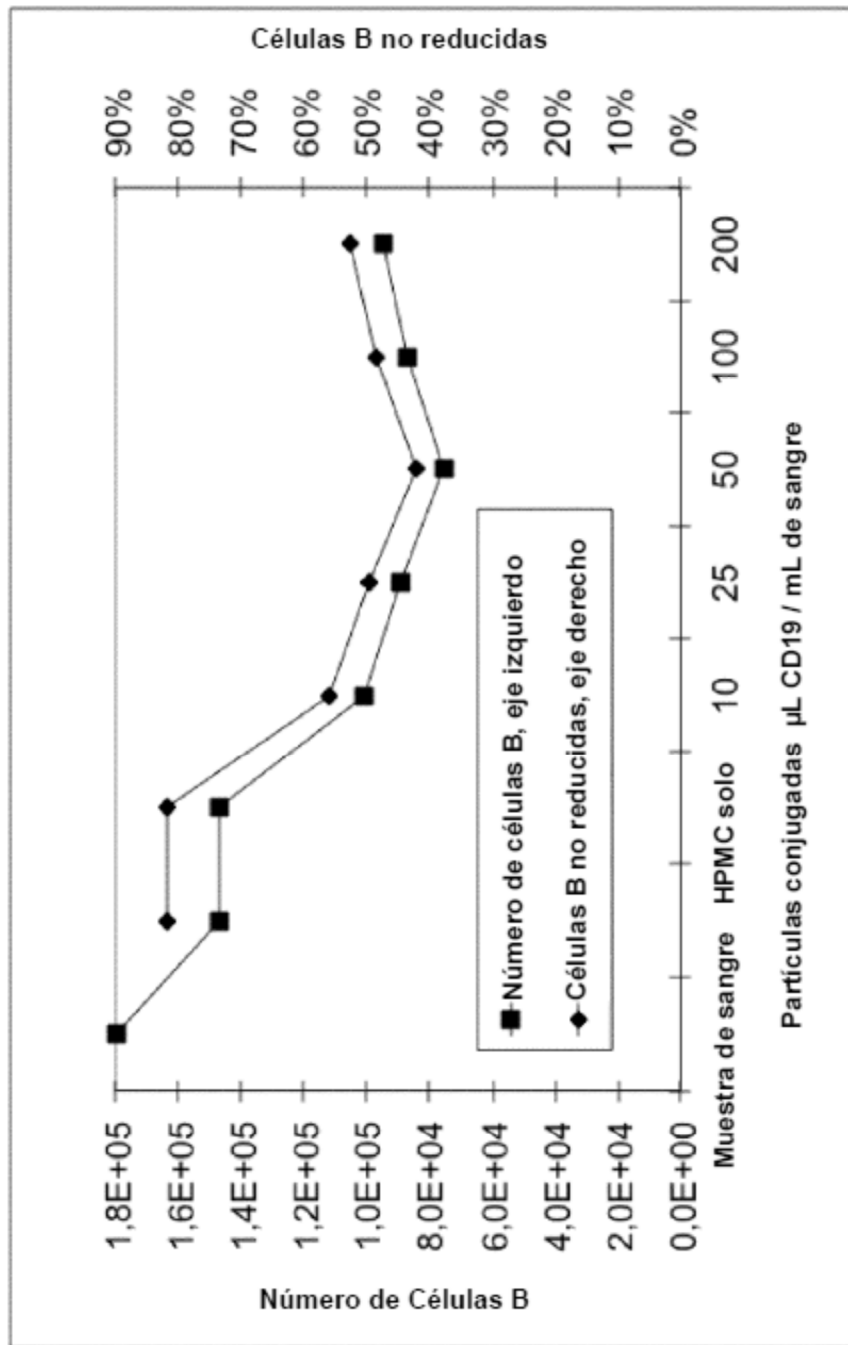


FIG 12

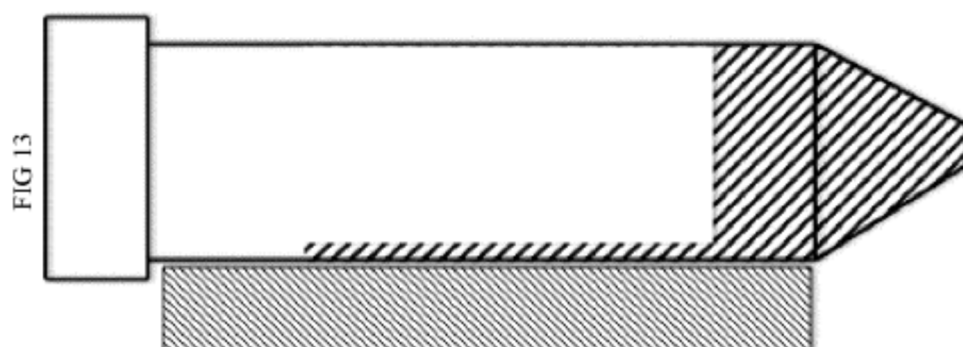
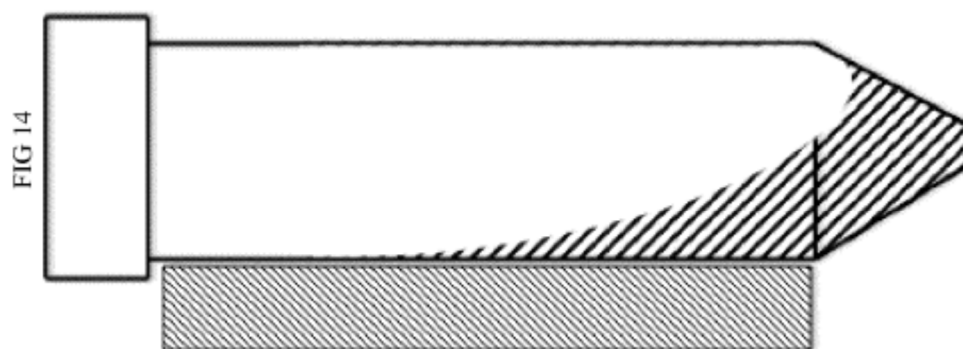
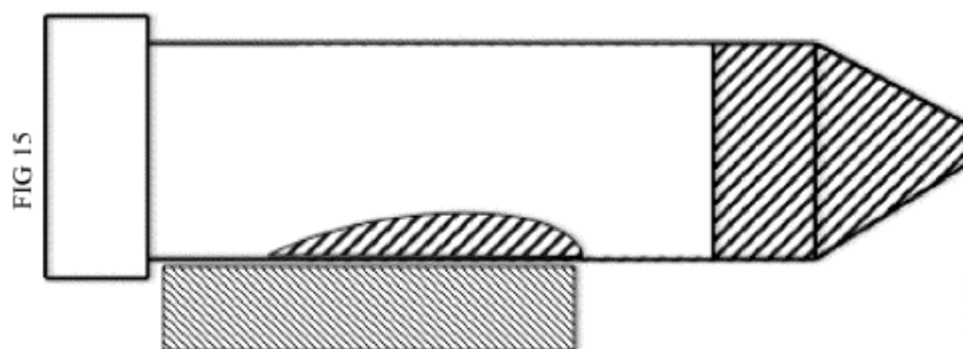


FIG 16

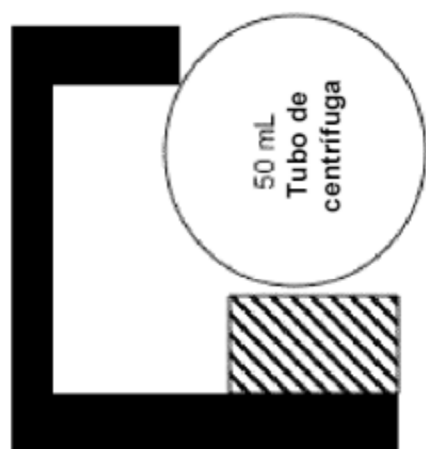
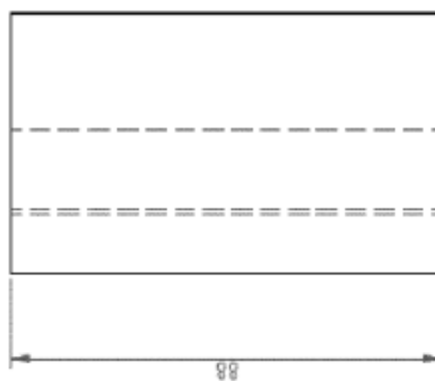
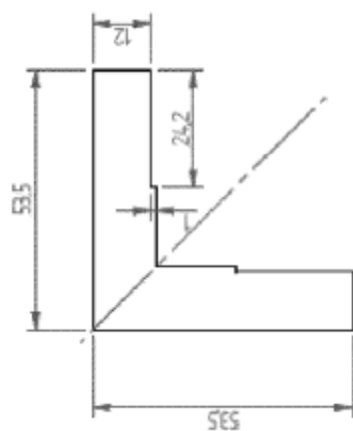


FIG 17

FIG 18

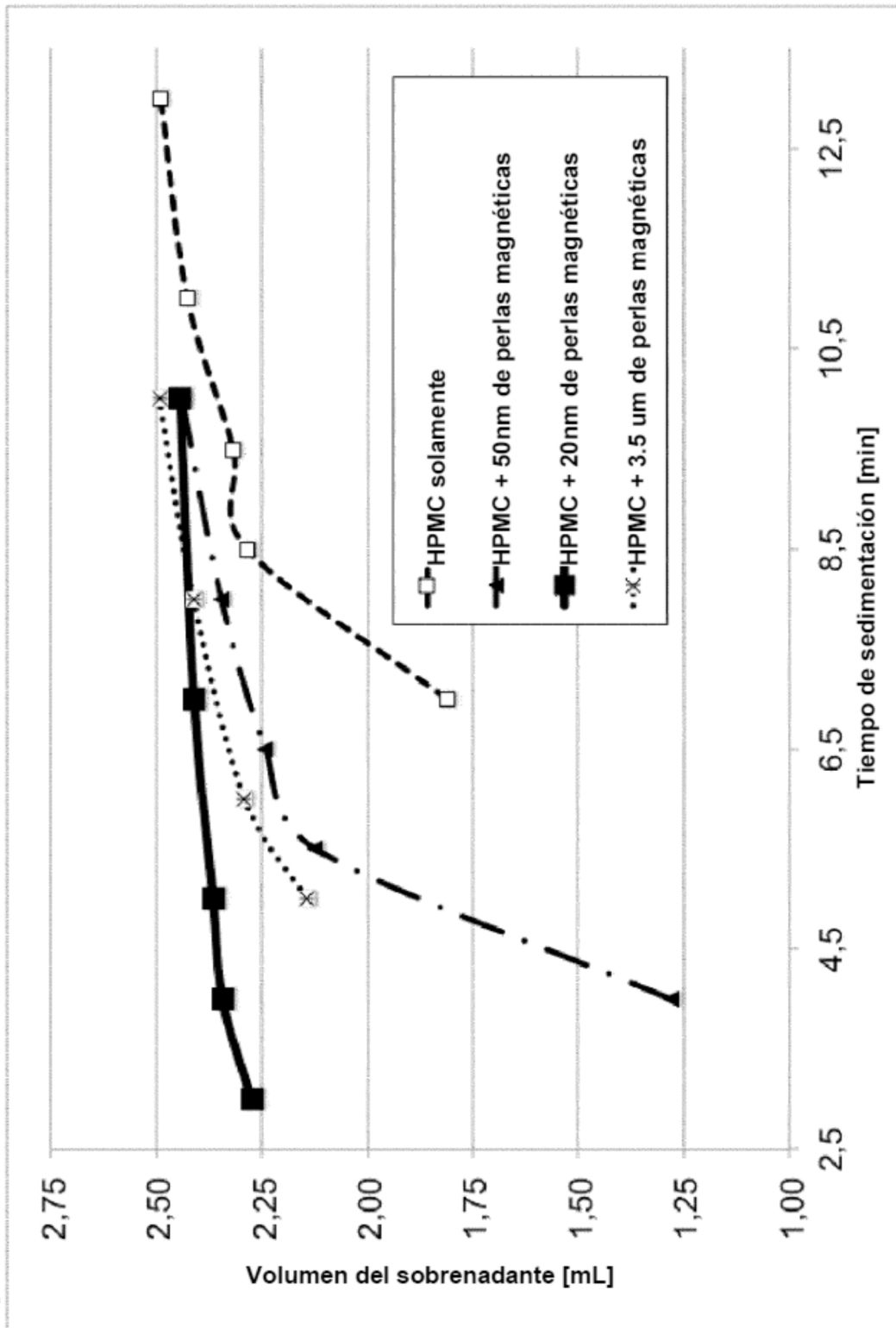


FIG 19

