

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 966**

51 Int. Cl.:

C12M 1/26	(2006.01)	G01N 15/04	(2006.01)
B01L 3/14	(2006.01)	G01N 21/07	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)	G01N 21/03	(2006.01)
G01N 33/49	(2006.01)	G01N 35/10	(2006.01)
A61M 39/04	(2006.01)	G01N 35/00	(2006.01)
A61M 39/26	(2006.01)	G01N 15/14	(2006.01)
B01D 21/26	(2006.01)		
B01L 1/00	(2006.01)		
C12M 1/00	(2006.01)		
G01N 1/40	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009 PCT/US2009/064297**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065261**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009 E 09764357 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2361301**

54 Título: **Aparato y procedimientos para procesar material biológico**

30 Prioridad:

01.12.2008 US 326061

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

29.05.2017

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MIN, KYUNGYOON;
DUDAR, THOMAS, E. y
LAIRD, JAMES, C.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 613 966 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

Aparato y procedimientos para procesar material biológico

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Estados Unidos con n.º de Serie 12/326.061 presentada el 1 de diciembre de 2008.

5 Descripción**Campo técnico**

La materia objeto actual se refiere por lo general a un aparato y procedimiento para el procesamiento de material biológico para concentrar y lavar un componente biológico en el material.

Antecedentes

10 Los materiales biológicos, tales como células, se utilizan en numerosas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. Por ejemplo, las células madre pueden administrarse a pacientes para obtener un efecto terapéutico deseado, tal como la regeneración de tejido in vivo. En otras situaciones, materiales biológicos, incluyendo células se pueden administrar para injertos, trasplantes, u otros procedimientos.

15 Para proporcionar una preparación eficaz del material biológico, que tiene una concentración suficiente que se puede administrar a un paciente o que puede ser útil para fines de diagnóstico y de investigación, a menudo es necesario realizar numerosas y largas manipulaciones que implican al material. Por ejemplo, las células a menudo se separan y aíslan de un tejido del que se derivan, tales como el músculo, la sangre o el tejido adiposo (grasa). Las células de una composición de este tipo pueden tener que someterse a múltiples rondas de purificación, lavado u otros tratamientos antes de que se puedan introducir, como mediante inyección, en un paciente. Estos
20 procedimientos pueden requerir la transferencia secuencial de las células a diferentes recipientes. También pueden requerir manipulaciones adicionales, como promover la sedimentación. Cada procedimiento se realiza preferentemente de forma aséptica o en un sistema estéril cerrado para limitar o evitar la posible introducción de material contaminante o de organismos en la composición. Como alternativa, incluso si las células no van a ser administradas a un paciente, sino, en cambio cultivadas in vitro, por ejemplo, pueden requerir todavía un extenso
25 lavado y concentración preferentemente en condiciones asépticas.

También, para ser adecuadas para su administración a un paciente, puede ser preferible para una preparación de material biológico que estén altamente concentradas. Esto puede permitir la administración de un volumen relativamente pequeño. Por ejemplo, preparaciones de células madre de aproximadamente 1×10^8 células o más generalmente se pueden concentrar en un volumen de menos de cinco (5) ml para su inyección en un paciente.

30 El documento US 5.824.272 desvela un tubo de centrifuga de compuesto que tiene una porción de mayor volumen y una porción de menor volumen formada a continuación y que se puede separar de la porción de mayor volumen. La porción de menor volumen se desprende de la porción de mayor volumen después de la centrifugación.

35 El documento US 2007/0208321 desvela un dispositivo que comprende dos cámaras y que es adecuado para centrifugarse como una sola unidad para el lavado y recogida de células u otros materiales biológicos. Un acoplamiento cerrable automáticamente entre las dos cámaras no está previsto en este documento.

Si bien se ha hecho mucho trabajo en el campo de procesamiento de tejidos, sigue existiendo la necesidad de avances en el campo del procesamiento de material biológico en particular en las áreas de lavado y concentración del material para sus aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, investigación u otras posteriores.

Sumario

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un conjunto de sedimentación para concentrar las células en una suspensión de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para concentrar las células en una suspensión de acuerdo con la reivindicación 10.

45 En una realización, la segunda cámara se separa de la primera cámara y la suspensión de células concentrada se hace fluir a un destino o fuente de fluido adicional. El destino o fuente de fluido adicional se puede colocar junto con la segunda cámara en un campo de fuerza de sedimentación.

El aparato de la invención tiene una primera cámara con al menos un puerto. El aparato incluye también una segunda cámara que tiene al menos un puerto y que se adapta para poder colocarse repetidamente y de forma amovible en comunicación de fluido con un destino o fuente de fluido, incluyendo la primera cámara.

50 El procedimiento de la invención incluye la colocación de una preparación de células dentro de una primera cámara y el flujo de la preparación de células de la primera cámara a una segunda cámara que se adapta para conectarse a

y colocarse repetidamente de forma amovible en comunicación de fluido con la primera cámara. Una de la primera y segunda cámaras tiene un puerto que tiene una válvula cerrable automáticamente y la otra de la primera y segunda cámaras tiene un puerto que tiene un miembro adaptado para abrir automáticamente la válvula cuando las cámaras están conectadas. La segunda cámara se desconecta después de la primera cámara y la válvula se cierra automáticamente.

Breve descripción de los dibujos

la Figura 1 es una vista en sección transversal parcial de un ejemplo de un conjunto de sedimentación de acuerdo con la invención donde se muestran la primera y segunda cámaras en una posición separada y fuera de la comunicación de fluido;

la Figura 1a es una vista en sección transversal ampliada de un ejemplo de un acoplamiento entre la primera y la segunda cámaras de la Figura 1, con las cámaras mostrándose en una posición separada;

la Figura 2 es una vista en sección transversal parcial del conjunto de sedimentación de la Figura 1 con la primera y la segunda cámaras mostrándose en una posición conectada en comunicación de fluido.

la Figura 2a es una vista en sección transversal ampliada del ejemplo de un acoplamiento entre la primera y la segunda cámaras de la Figura 2, con las cámaras mostrándose en una posición conectada;

las Figuras 3a-3f muestran un ejemplo de un procedimiento de utilización del conjunto de sedimentación de la Figura 1 de acuerdo con la invención;

la Figura 4 es una vista en perspectiva de un ejemplo de un soporte, que retiene un conjunto de sedimentación modificado para su uso en un campo de fuerza de sedimentación, generado específicamente por una centrífuga;

la Figura 5 muestra un ejemplo adicional de un conjunto de sedimentación con un soporte, tal como el soporte de la Figura 4;

la Figura 6 es una vista en sección transversal del ejemplo del soporte con el conjunto de sedimentación de la Figura 4 situado en el soporte,

las Figuras 7a-7g muestran un ejemplo de un procedimiento de utilizar el conjunto de sedimentación de la Figura 1 de acuerdo con la invención;

las Figuras 8a-8c muestran un ejemplo de un procedimiento de utilizar otro conjunto de sedimentación de acuerdo con la invención, donde una cámara incluye un émbolo;

la Figura 9 es una vista en sección transversal de un ejemplo adicional de un conjunto de sedimentación de acuerdo con la divulgación.

Las Figuras 10a-d son vistas en sección transversal de otros ejemplos de válvulas y conectores que se pueden utilizar con un aparato desvelado en la presente memoria.

Descripción detallada

Aunque se desvelan ejemplos detallados en la presente memoria, se debe entender que estos ejemplos desvelados son meramente ejemplares, y diversos aspectos y características descritos en la presente memoria pueden tener utilidad solo o en combinación con otras características o aspectos de manera diferente a lo que se muestra explícitamente pero que será evidente para una persona de experiencia ordinaria en la materia.

La materia objeto de la presente solicitud se refiere en general a un aparato y procedimiento para el procesamiento de material biológico. El aparato es un conjunto de sedimentación que se puede utilizar para concentrar material biológico. En otros ejemplos preferidos, el conjunto de sedimentación se puede utilizar para reconstruir, lavar y/o tratar, de otro modo, el material con reactivos y soluciones deseadas. Por ejemplo, el aparato se puede utilizar para lavar o tratar preparaciones de células con tampones seleccionados. En otros ejemplos, el aparato se puede utilizar para tratar una preparación de células con reactivos tales como suero, anticuerpos o factores de crecimiento. En ejemplos adicionales, el aparato se puede utilizar para preparar células para su congelación y almacenamiento y se puede utilizar para reconstituir una preparación de células que se había congelado y que se puede requerir su transferencia a medios de cultivo.

En otros ejemplos preferidos, el aparato se puede utilizar para reconstituir, lavar o tratar, de otro modo, una preparación de células sin sedimentar necesariamente las células. Por ejemplo, el aparato se puede utilizar para transferir una preparación de células descongelada al medio de cultivo tisular de modo que las células se pueden cultivar.

Volviendo a los dibujos adjuntos, la Figura 1 ilustra un conjunto de sedimentación generalmente con el número de referencia 10 que se puede utilizar en la concentración de material biológico, tal como células, a partir de tejido. El conjunto de sedimentación incluye una primera cámara 12 que puede recibir el material biológico, tal como una suspensión de células. El conjunto 10 de sedimentación incluye también una segunda cámara 26 que se puede colocar en comunicación de fluido con la primera cámara 12, por ejemplo, como se observa en la Figura 2. Es decir, la primera cámara 12 y la segunda cámara 26 se pueden acoplar o conectarse fácilmente entre sí para formar un conjunto 10 de sedimentación como una unidad estable, integrada. Las cámaras 12, 26 pueden, a continuación, separarse y volver a conectarse, si es necesario, de modo que la comunicación de fluido entre las cámaras se puede establecer, eliminar y volver a establecer en repetidas ocasiones. Por ejemplo, la Figura 1 muestra el conjunto 10 de sedimentación con la primera y segunda cámaras 12, 26 separadas - y por tanto la comunicación de fluido aún no se ha establecido o se ha eliminado. La Figura 2 muestra el conjunto 10 con las dos cámaras conectadas o habiéndose

reconectado y colocadas en comunicación de fluido. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, un acoplamiento 32 se puede utilizar para facilitar la conexión, separación y reconexión de las dos cámaras.

En un ejemplo, la primera cámara 12 es sustancialmente rígida y la segunda cámara 26 puede tener el mismo o diferente grado de rigidez. Las cámaras pueden, por ejemplo, ser generalmente más rígidas que las bolsas se utilizan comúnmente en los procedimientos de procesamiento de sangre, pero pueden mantener cierto grado de flexibilidad. Por lo tanto, en algunos ejemplos, las cámaras pueden ser suficientemente flexibles de manera que pueden manipularse mediante la aplicación de no más de una fuerza manual media. Las cámaras 12, 26 se pueden formar, al menos en parte, de plástico transparente sustancialmente rígido de tal manera que los contenidos pueden observarse durante el procesamiento. Por supuesto, la primera y segunda cámaras no tienen que fabricarse necesariamente de los mismos materiales o tener el mismo grado de rigidez. En un ejemplo preferido, al menos parte de la segunda cámara 26 puede ser menos rígida que la primera cámara 12, permitiendo así que el volumen de la segunda cámara sea manipulado o expulsado por la aplicación de fuerza en la pared de la segunda cámara o por un cambio en la presión de la cámara.

El conjunto de sedimentación también es preferentemente desechable, y se puede fabricar de polietileno, polipropileno u otros materiales que son adecuados para su uso con material biológico y que pueden esterilizarse fácilmente antes de su uso, o proporcionarse de otro modo en una forma estéril. Aunque por lo general no se cree que sea necesario, las superficies de la cámara se pueden tratar o revestir con materiales tales como suero, albúmina, policationes, polianiones, u otros materiales, según se desee, mediante procedimientos conocidos en la técnica, para aumentar o disminuir la adherencia o afinidad del material biológico seleccionado a las paredes de la primera y segunda cámaras, o para otros fines.

Los volúmenes de la primera y segunda cámaras 12, 26 se pueden seleccionar dependiendo de los requerimientos particulares. En un ejemplo, tal como se muestra en la Figura 1, la segunda cámara 26 tiene un volumen menor que la primera cámara 12. Este ejemplo se puede utilizar, por ejemplo, cuando la suspensión de células se tiene que concentrar en un volumen más pequeño para su administración a un paciente o para el procesamiento posterior. Las cámaras 12, 26 pueden también asumir numerosas formas, según se desee. Por ejemplo, como se describe adicionalmente en la presente memoria, una o las dos cámaras pueden estar en la forma de una jeringa con un émbolo desplazable en su interior.

En el ejemplo mostrado en la Figura 1, la primera cámara 12 tiene una porción de pared superior 14 que es cilíndrica. La porción de pared superior 14 de la primera cámara 12 está cerrada en un extremo superior por una pared o base 15 y se une en un extremo inferior a una porción cónica o ahusada, formando una zona o área 16 de concentración dentro de la primera cámara 12, próxima su extremo inferior. Como se muestra en la Figura 1, una tubería 20 de entrada se puede unir a la primera cámara 12 a través de una abertura 18 en la base 15. La tubería 20 de entrada se puede utilizar para introducir material biológico que incluye una suspensión de células en la primera cámara 12. La primera cámara 12 también tiene una salida 22 adyacente al extremo inferior de la zona 16 de concentración. La primera cámara 12 incluye además un orificio 24 de ventilación en la base 15 para permitir la ventilación del aire según se pueda requerir cuando se añade o se retira fluido de la primera cámara 12.

En el ejemplo mostrado en las Figuras 1 y 2, la segunda cámara 26 se muestra como teniendo una forma esférica sustancialmente rígida con un puerto 28 para permitir la introducción y/o extracción del líquido. Por supuesto, la segunda cámara 26 se puede construir para ser más o menos flexible y tener una forma diferente, según se desee. En este ejemplo, la segunda cámara 26 incluye también un bolsillo o región 30 inferior frente al puerto 28. El bolsillo 30 proporciona un espacio o zona donde las células se pueden acumular durante la sedimentación, y puede facilitar la extracción posterior de un fluido de la segunda cámara 26 con menos interrupciones en las células recogidas en el bolsillo 30. Por supuesto, las células sedimentadas pueden estar suspendidas dentro de la segunda cámara y utilizarse directamente como una suspensión final para un fin deseado tal como la inyección en un paciente sin procesamiento adicional.

Como se señaló anteriormente, en la Figura 1, la segunda cámara 26 se muestra como físicamente separada de la primera cámara 12. Por lo tanto, la segunda cámara 26 todavía no se ha establecido o se ha retirado de la comunicación de fluido con la primera cámara 12. La Figura 2 muestra la segunda cámara 26 como conectada a la primera cámara 12, de manera que la segunda cámara 26 se pone en comunicación de fluido con la primera cámara 12.

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, un acoplamiento 32 separable se puede utilizar para facilitar la conexión, la separación y reconexión de la primera cámara 12 y de la segunda cámara 26. Las Figuras 1a y 2a muestran vistas ampliadas, en sección transversal de un acoplamiento 32 ejemplar. La Figura 1a muestra una disposición de acoplamiento cuando las cámaras 12, 26 no están conectados y no se encuentran en comunicación de fluido entre sí. La Figura 2a muestra una disposición cuando las cámaras 12, 26 se conectan y una comunicación de fluido se puede haber establecido entre las cámaras.

Como se muestra en las Figuras 1a y 2a, el acoplamiento 32 ilustrado incluye dos elementos de acoplamiento. Un primer conector o elemento 34 de acoplamiento del acoplamiento 32 se muestra roscándose exteriormente en su extremo superior, y acoplado con la primera cámara 12 a través de roscas complementarias en la salida 22. Se

apreciará que el primer elemento 34 de acoplamiento se puede construir de otras maneras para acoplarse a la primera cámara 12 o se puede moldear con o conectarse, de otro modo, a la primera cámara 12. El primer elemento 34 que se muestra en las Figuras 1a y 2a incluye también un collarín 35 exterior que se rosca internamente, una cánula 36 roma, que se encuentra dentro del collar.

5 Un segundo conector o elemento 38 de acoplamiento del acoplamiento 32 se puede roscar, moldear o conectarse, de otro modo, a la segunda cámara 26 en su puerto 28. En el ejemplo ilustrado en la Figura 1a, el segundo elemento 38 de acoplamiento se muestra con roscas internas en su extremo inferior que acoplan las roscas externas complementarias que se extienden desde el puerto 28 en la parte superior de la segunda cámara 26. El segundo elemento 38 de acoplamiento incluye también en su extremo superior una rosca o brida 37 externa para acoplarse con el collarín 35 roscado internamente del primer elemento 34 de acoplamiento.

10 En este ejemplo ilustrado, el segundo elemento 38 de acoplamiento del acoplamiento 32 incluye además una válvula 40 de septo pre-ranurado, re-sellable flexible. Como se observa en la Figura 1a, la válvula 40 de septo está sesgada hacia una posición cerrada. Por lo tanto, la válvula 40 de septo se cierra automáticamente y sella la segunda cámara 26 del entorno cuando la primera y segunda cámaras 12, 26 se separan. Como se observa en la Figura 2a, la válvula 40 de septo se sella también automáticamente contra la cánula 36 cuando las cámaras 12, 26 están conectadas.

El aparato desvelado no se limita a una construcción de conector o válvula particular mostrada. Por ejemplo, los elementos anteriores se pueden construir de otro modo o invertirse en su colocación, si se desea.

20 Para unir las dos cámaras 12, 26 y colocarlas en comunicación de fluido, el primer y segundo elementos 34, 38 de acoplamiento del acoplamiento 32 se conectan entre sí. Esto hace que la cánula 36 pase a través de la válvula 40 de septo resellable, como se indica en la Figura 2a. En esta disposición, el conector proporciona una vía o canal 42 de paso cerrada en el conjunto 10 de sedimentación que se sella contra el entorno. En este sentido, la válvula de septo se estira preferentemente elásticamente sobre el miembro de penetración. En este ejemplo, con la primera y segunda cámaras 12, 26 conectadas como una unidad, el fluido que incluye las células, es decir, una suspensión de células (o líquido solo), puede fluir en cualquier dirección (de la primera cámara 12 a la segunda cámara 26 o de la segunda cámara 26 a la primera cámara 12) dependiendo de la dirección y magnitud de las fuerzas aplicadas al conjunto 10 de sedimentación. Para eliminar la comunicación de fluido entre las cámaras 12, 26, la cánula 36 se retira de la válvula 40 de septo, que se vuelve a sellar automáticamente instantáneamente.

30 Las Figuras 3a-3f ilustran, por lo general, un procedimiento de uso de un conjunto 10 de sedimentación. Como se muestra en las Figuras 3a y 3b, la primera cámara 12, que ha recibido una suspensión de células, se conecta a una segunda cámara 26 y se establece una comunicación de fluido entre las cámaras. Un acoplamiento 32 se puede utilizar para facilitar la conexión de las dos cámaras, creando un conjunto 10 de sedimentación en la forma de una unidad integrada, con las cámaras 12, 26 rígidamente conectadas entre sí por el acoplamiento 32, como se observa en la Figura 3b.

35 El conjunto 10 de sedimentación se coloca en un campo de fuerza de sedimentación, en concreto un campo de fuerza centrífuga. El campo de fuerza de sedimentación como se ha desarrollado por centrifugación en la Figura 3c, debe ser suficiente para hacer que las células deseadas de la suspensión se concentren en la zona 16 de concentración de la primera cámara 12 y, opcionalmente, fluyan desde la primera cámara 12 a la segunda cámara 26.

40 Después de que la segunda cámara 26 recibe una cantidad de la suspensión deseada de células, la segunda cámara 26 se puede separar de la primera cámara 12, como se ilustra en las figuras 3d y 3e. Por lo tanto, el conjunto 10 de sedimentación se puede invertir, como se muestra en la Figura 3d, para reducir el potencial de derrame a medida que la cánula 36 se retira de la válvula 40 de septo. La segunda cámara 26 se puede desconectar, a continuación, en el acoplamiento 32 de la primera cámara 12, como por ejemplo desenganchando las roscas internas del collarín 35 de la brida 37 en la segunda cámara 26, y retirando la cánula 36.

45 Con la segunda cámara 26 desconectada y separada de la primera cámara 12, como se indica en la Figura 3f, la suspensión concentrada de células se puede retirar de la segunda cámara 26, tal como mediante el uso de una jeringa 41. Si se desea, las células se pueden mantener también en la segunda cámara 26, como para el procesamiento posterior. Por ejemplo, la segunda cámara separada 26 con las células deseadas se puede colocar en comunicación de fluido con un destino o fuente de fluido adicional, tal como una cámara adicional, para su posterior tratamiento y concentración, como se describe a continuación en referencia a otro ejemplo.

50 El conjunto 10 de sedimentación ejemplar se puede utilizar para reconstituir, lavar, tratar o concentrar un conjunto diverso de preparaciones celulares. Por ejemplo, el material biológico recibido por la primera cámara 12 puede ser una suspensión relativamente cruda de las células y puede incluir células individuales, agregados multicelulares y/o células asociadas con el material no celular. La suspensión de células puede incluir uno o más tipos de células. La suspensión de células puede incluir también células madre solas o en combinación con otros tipos de células, incluyendo otros tipos de células madre.

El conjunto 10 de sedimentación se puede utilizar también con preparaciones de células que se han sometido a procedimientos de purificación. Por ejemplo, el conjunto 10 de sedimentación se puede unir a, conectar a o incorporar, de otro modo, en un sistema para la purificación de células. En una disposición de este tipo, la primera cámara 12 del conjunto 10 de sedimentación puede recibir una suspensión de células del sistema de purificación de células. Por ejemplo, en la suspensión de células recibidas por la primera cámara pueden estar las células madre que se han aislado de acuerdo con la presencia o ausencia de un marcador de células seleccionado mediante técnicas de afinidad. La suspensión de células puede haber sido, por ejemplo, aislada como CD34 positiva.

Como se ha indicado, la centrifugación se puede utilizar para producir un campo de fuerza de sedimentación para hacer fluir una suspensión de células de la primera cámara 12 a la segunda cámara 26. El conjunto 10 de sedimentación se puede colocar en un soporte, para la posterior colocación conveniente del conjunto en una centrífuga. El soporte puede ayudar también a estabilizar el conjunto durante la centrifugación. El tamaño y la forma del soporte se pueden adaptar a un conjunto de sedimentación dado y a un cubo de centrífuga. Un soporte de este tipo se puede utilizar también para retener un conjunto de sedimentación para la sedimentación a una fuerza de gravedad normal.

Las Figuras 4-6 muestran un ejemplo de un soporte 44 que se puede utilizar con un ejemplo adicional de un conjunto 48 de sedimentación. La Figura 4 muestra el ejemplo de un soporte 44 que se puede utilizar para retener un conjunto 48 de sedimentación en un cubo de centrífuga durante la centrifugación. El soporte incluye una abertura 46, que se observa mejor en la Figura 5, para la colocación del conjunto de sedimentación en el soporte 44. En este ejemplo, la forma general del soporte es generalmente cilíndrica, para adaptarse a la forma más común los cubos de centrífuga.

La Figura 5 muestra la colocación del conjunto 48 de sedimentación en el soporte 44 de la Figura 4. Como se muestra, el conjunto de sedimentación incluye una primera cámara 50 con una zona 52 de concentración, una segunda cámara 54, y un acoplamiento 56. En este ejemplo, la primera cámara 50 incluye una entrada 58 para recibir una suspensión de células. La entrada 58 se puede cubrir, por ejemplo, con un tapón 60 de rosca.

En la Figura 6, el conjunto 48 de sedimentación se muestra colocado dentro del soporte 44, que se muestra en sección transversal, para su uso en un procedimiento de sedimentación, como ocurriría durante la centrifugación. Durante el procedimiento de sedimentación, las células deseadas, inicialmente en la primera cámara 50, se concentrarán en la zona 52 de concentración, y tenderán a fluir dentro de la segunda cámara 54, a través del acoplamiento 56.

Las Figuras 7a-7g ejemplifican un uso de un conjunto 61 de sedimentación de acuerdo con la invención para la realización de múltiples etapas de lavado y/o de tratamiento de una población de células. El conjunto 61 de sedimentación incluye una primera cámara 64 y una segunda cámara 26. En la Figura 7a, la segunda cámara 26 contiene una suspensión de células 62 que puede requerir un procesamiento adicional. La suspensión de células en la segunda cámara 26 puede dar como resultado la transformación de acuerdo con los ejemplos anteriormente descritos para la obtención de una población de células concentrada tal como se describe, por ejemplo, con respecto al uso de la primera cámara 12 en las Figuras 3a-3f.

Como se muestra en la Figura 7b, la segunda cámara 26 con la suspensión de células 62 se puede colocar en comunicación de fluido con otro destino o fuente de fluido, tal como una primera cámara 64 adicional que puede contener una solución de lavado o tratamiento. La conexión de las dos cámaras se puede facilitar por la presencia de un acoplamiento, tal como el acoplamiento 32 descrito anteriormente que permite el acoplamiento (en comunicación de fluido) y desacoplamiento (sin comunicación de fluido) repetido de las cámaras. Las células 62 pueden, a continuación, fluir en la primera cámara 64 adicional, con el flujo mejorándose simplemente mediante la aplicación de fuerza manual a una pared de la segunda cámara 26, tal como apretando la segunda cámara 26 mientras que el conjunto 61 de sedimentación está en una posición invertida. Se apreciará que un campo de fuerza de sedimentación, tal como un campo de fuerza centrífuga, se puede aplicar también al conjunto de sedimentación invertida para facilitar el flujo de células de la segunda cámara 26 a la primera cámara 64.

En ejemplos en los que las células se tienen que lavar, la suspensión de células se puede hacer fluir de la segunda cámara 26 a una primera cámara 64 adicional que contiene un gran volumen de una solución de lavado. En otros ejemplos, las células se pueden hacer fluir en una primera cámara adicional que contiene un volumen relativamente pequeño de fluido, como puede ocurrir cuando las células se tienen que tratar con un reactivo costoso. Después de hacer fluir a las células de la segunda cámara 26 a la primera cámara 64 adicional, para limitar la pérdida de células la segunda cámara 26 puede permanecer conectada a la primera cámara 64, o, como alternativa, se puede desconectar de la primera cámara 64.

Tras el lavado o el tratamiento de las células dentro de la primera cámara 64 adicional, las células se pueden hacer fluir de nuevo en la segunda cámara 26, que permanece unida a la primera cámara adicional permitiendo de ese modo la recuperación completa de todas las células o al menos la reducción de la pérdida de células. Esto se puede lograr utilizando un campo de fuerza de sedimentación, tal como se muestra en la Figura 7c. Como alternativa, la primera cámara 64 adicional se puede conectar a y colocarse en comunicación de fluido con una nueva segunda cámara. La segunda cámara 26 se puede después separar de la primera cámara 64 adicional, lo que da como

resultado una suspensión de células en la segunda cámara 26 que se ha lavado y se reconcentrado, como se observa en la Figura 7d.

Si se desea, la suspensión lavada de células en la segunda cámara 26 adicional se puede hacer fluir, a continuación, a otra primera cámara 68 para el procesamiento posterior, tal como mediante lavado o tratamiento adicional. La conexión y flujo de la suspensión de células de la segunda cámara 26 a la primera cámara 68 adicional se representa en la Figura 7e y se realiza de manera similar como con respecto a la descripción anterior de la Figura 7b. Como se muestra en la Figura 7f, las células se pueden hacer fluir después de nuevo a la segunda cámara 26 original o a una nueva segunda cámara, tal como mediante el uso de un campo de fuerza de sedimentación. La primera y segunda cámaras pueden permanecer unidas y el uso de la misma segunda cámara puede reducir la pérdida de células. De este modo, una suspensión de células se puede mover repetidamente entre la "primera" y "segunda" cámaras que se colocan en comunicación de fluido, proporcionando el lavado, tratamiento y/o reconcentración repetida de las células, que se muestran depositadas en la segunda cámara en a Figura 7g.

Las Figuras 8a-8c muestra un ejemplo adicional de un conjunto 70 de sedimentación y de un procedimiento de uso del mismo de acuerdo con la divulgación. El conjunto 70 de sedimentación incluye una primera cámara 72 para recibir una suspensión de células y una segunda cámara 76, que puede tener forma de jeringa. Un acoplamiento 78 se puede utilizar para colocar las cámaras 72, 76 en comunicación de fluido. Como se ha descrito con respecto a los otros ejemplos, la segunda cámara 76 se puede colocar en comunicación de fluido con una primera cámara 72. El conjunto 70 de sedimentación con la primera cámara 72 conectada a la segunda cámara 76 se puede colocar en un campo de fuerza de sedimentación, tales como se muestra en la Figura 8b, para hacer fluir una población 74 de células en la segunda cámara 76.

El flujo de la población 74 de células a la segunda cámara 76, en la forma de una jeringa, se puede facilitar o conseguirse también moviendo un pistón 80 de la jeringa 76, a fin de crear un vacío en la segunda cámara 76, como se muestra por el desplazamiento del pistón 80 en las Figuras 8c y 8d. Este movimiento del pistón 80 hace que el fluido que se introduce en la segunda cámara 76 procedente de la primera cámara 72 alivie el vacío. El volumen de la cámara de la jeringa se puede configurar como fijo o variable, en función del volumen de líquido previsto. En un ejemplo, la retracción del pistón 80 introducirá fluido en la segunda cámara ayudando por tanto a recuperar las células que permanecen en la primera cámara 72 o en el área del acoplamiento 78, incluso después de la aplicación de un campo de fuerza de sedimentación. Además, la retracción del pistón se puede utilizar para aumentar la cantidad de fluido en la segunda cámara, si se desea. El pistón 80 de la jeringa 76 se puede empujar también después de que la población de células ha fluido hacia la jeringa 76, eliminando así el sobrenadante en exceso de la segunda cámara y ajustando el volumen en el que las células se suspenden en la segunda cámara 76.

La segunda cámara 76 puede, a continuación, retirarse de la comunicación de fluido con la primera cámara 72, como se ilustra en la Figura 8e. Puesto que la segunda cámara 76 está en la forma de una jeringa, la segunda cámara 76 se puede utilizar para administrar las células a un paciente o utilizarse para otros fines. Como se indica en la Figura 8f, la jeringa también se puede colocar en comunicación de fluido con un destino o fuente de fluido adicional, tal como una primera cámara 82 adicional, para su posterior lavado o tratamiento. Las células 74 se pueden hacer fluir en la primera cámara 82 adicional por el movimiento del pistón 80 de la segunda jeringa 76 de cámara, como se muestra en las Figuras 8f y 8g, o mediante la aplicación de un campo de fuerza de sedimentación, tal como se ha descrito anteriormente en referencia a la Figura 8b. Las células se pueden hacer fluir también de nuevo en la segunda cámara 76 (o en una "segunda" cámara adicional) para resultar en una población de células concentrada en la segunda cámara 76, como se muestra en la Figura 8h.

Un ejemplo adicional de un conjunto de sedimentación de acuerdo con la invención se muestra en la Figura 9. De acuerdo con este ejemplo, una o ambas cámaras del conjunto de sedimentación se adaptan mediante la provisión de una o más bolsas de aire para permitir, más fácilmente, la captura de aire en la cámara. Esta característica es beneficiosa cuando es necesario comprimir fácilmente el contenido de una cámara, tal como ocurre, por ejemplo, cuando una estructura tal como una aguja o cánula se debe introducir en una cámara llena de líquido.

El conjunto 84 de sedimentación que se muestra en la Figura 9 es sustancialmente similar al ejemplo mostrado en las Figuras 1 y 2. Es decir, el conjunto 84 de sedimentación incluye una primera cámara 86, una segunda cámara 88, y un acoplamiento 90. El acoplamiento 90 que se muestra en la Figura 9 es idéntico al mostrado en la Figura 1a. En la Figura 9, la pared de la segunda cámara 88 se curva hacia arriba en ambos lados del puerto 92 de entrada, formando bolsas o regiones 94 que atrapan el aire dentro de la segunda cámara 88.

De acuerdo con el ejemplo de la Figura 9, el aire queda atrapado en las regiones 94 que atrapan el aire cuando la cámara se coloca en posición vertical y se llena de líquido. Cuando se inserta una aguja de jeringa o un dispositivo similar en la segunda cámara 88 a través de, por ejemplo, el septo 96, el líquido es forzado en las regiones que atrapan el aire debido a que el aire atrapado es compresible, lo que permite que una estructura tal como la aguja o cánula penetre con mayor facilidad en la cámara.

Además, otros tipos de válvulas y acoplamientos se pueden utilizar con el conjunto de sedimentación de la divulgación. Se prefieren las válvulas resellables (y, particularmente, preferentemente resellables automáticamente) para regular el flujo de fluido entre las cámaras, ya sea solas o en combinación con otras válvulas. Por ejemplo, las

válvulas de llave de paso, así como abrazaderas son ejemplos de elementos resellables manualmente que se pueden utilizar. En un ejemplo, una aguja de tipo jeringa se puede utilizar con un tapón de caucho que forma una válvula.

5 Otras válvulas y los acoplamientos que se pueden utilizar se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4,683,916, 5,188,620, 5,957,898, 6,039,302 6,261,282 y 6,605,076. Estas válvulas y otras pueden emplear una variedad de septos y mecanismos de abertura de septos, y se pueden emplear con varios tipos y formas de miembros de acoplamiento tales como agujas, miembros Luer, cánulas, boquillas y estructuras híbridas.

10 Las Figuras 10a-d muestran ejemplos de tales válvulas y conectores. En la Figura 10a, la válvula 100 tiene un septo 102 pre-ranurado, resellable montado en el primer extremo 104 de un alojamiento 106. El septo se monta entre miembros 108 de extremo anulares, en forma de U, estampados y un reborde 110 interno que soporta el septo. Como se describe más completamente en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.188.620 y 6.605.076, este septo coopera con una cánula roma que puede insertarse a través de la ranura 102 del septo para introducir fluido en y a través de la válvula.

15 Un ejemplo adicional de un conector 200 de válvula se muestra en la Figura 10b. En este ejemplo, una boquilla 202 en la forma de un accesorio Luer macho se muestra parcialmente insertado en la válvula 200 para establecer una vía de flujo de fluido. En pocas palabras, la inserción de la boquilla 202 deprime una glándula o miembro 204 elastomérico y desplaza axialmente una barra 206 interna hueca para abrir una vía de flujo de fluido a través de la glándula y la barra hueca a la salida 208 de la válvula.

20 La Figura 10c muestra un ejemplo adicional de un conector de válvula que se puede utilizar con un aparato de acuerdo con la divulgación. El conector 300 de válvula incluye un miembro 302 de válvula resellable con una porción 304 superior, una porción 306 intermedia y un faldón anular (no mostrado). Una ranura 308 de la válvula, se extiende hacia abajo a través de la porción 304 superior y la porción 306 intermedia en una cámara 310. El acoplamiento de una cánula contra la cara de la válvula 302 hace que la ranura 314 se abra y proporciona una trayectoria de flujo de fluido a través de la ranura y la cámara 310 hasta la salida de la válvula.

25 La Figura 10d muestra una válvula adicional que se puede utilizar con el presente aparato. En concreto, el cuerpo de la válvula 400 de la Figura 10d incluye una porción 402 Luer macho y una porción 404 Luer hembra. Un disco 406 de válvula se sitúa dentro del cuerpo de la válvula y se soporta en una proyección 408 triangular. La elasticidad inherente del disco de válvula la desvía normalmente en una posición cerrada como se muestra en líneas discontinuas. Un accionador 410 de válvula se sitúa en el taladro Luer hembra, de modo que la inserción de un Luer macho de conexión obliga al accionador 410 a acoplar y plegar axialmente los bordes del disco 406 de válvula hacia abajo a una posición abierta. El disco se vuelve a sellar tras la retirada del Luer macho de conexión.

Los aspectos de la presente materia que se han descrito anteriormente pueden ser beneficiosos solos o en combinación, con uno o más de otros aspectos.

35 Las siguientes funciones se pueden prever para el conjunto de sedimentación de la reivindicación 1 solas o en combinación con otras.

La primera cámara se puede adaptar para recibir células de un sistema para el aislamiento de células.

La primera cámara puede comprender un orificio de ventilación.

La zona de concentración de células puede incluir una porción ahusada de la primera cámara.

El conjunto de sedimentación se puede adaptar para su colocación en un soporte durante la sedimentación.

40 El conjunto de sedimentación puede comprender además un acoplamiento entre la primera y la segunda cámaras.

El acoplamiento puede ser separable y comprende una primera porción unida a dicha primera cámara y una segunda porción unida a dicha segunda cámara en el que la primera y segunda porciones tienen elementos coincidentes.

El acoplamiento puede incluir un miembro de acoplamiento.

45 El miembro de acoplamiento se puede seleccionar del grupo que consiste en una aguja de jeringa, una conexión Luer, boquilla, una cánula y combinaciones e híbridos de los mismos.

El miembro de acoplamiento puede ser una cánula.

El acoplamiento puede comprender una válvula cerrable.

50 La válvula cerrable se puede seleccionar del grupo que consiste en una llave de paso, abrazadera, un tapón de goma, una válvula de tipo glándula y una válvula de septo pre-ranurado.

- La válvula cerrable puede incluir al menos una válvula de septo pre-ranurado.
- La primera y segunda cámaras pueden tener cada una una válvula cerrable.
- Las cámaras se pueden adaptar para recibir una población de células que incluye células madre.
- 5 Las cámaras se pueden adaptar para recibir una población de células que se ha aislado de acuerdo con la presencia o ausencia de un marcador de células.
- La primera cámara puede tener un volumen mayor que la segunda cámara.
- La primera y segunda cámaras pueden ser sustancialmente rígidas.
- Las siguientes características se pueden prever para el procedimiento de la reivindicación 10 solas o en combinación con otras.
- 10 La primera cámara se puede desconectar de la segunda cámara y la segunda cámara conectarse a la tercera cámara para el procesamiento posterior de la suspensión de células concentrada.
- La primera cámara se puede desconectar de la segunda cámara y el contenido restante en la primera cámara eliminarse. Se añade una solución a la primera cámara, la suspensión de células concentrada de la segunda cámara se añade a la primera cámara y la primera y segunda cámaras se vuelven a conectar para el procesamiento posterior.
- 15 La primera cámara puede recibir la suspensión de un sistema para el aislamiento de células
- La suspensión puede incluir células madre que han sido aisladas de acuerdo con la presencia o ausencia de uno o más marcadores de células seleccionados.
- El destino o fuente adicional puede contener una solución para el lavado de las células dentro de la suspensión.
- 20 El destino o fuente adicional puede contener una solución para el tratamiento de las células dentro de la suspensión.
- Las siguientes características se pueden prever para el conjunto de sedimentación de la reivindicación 1 solas o en combinación con otras.
- La válvula resellable se puede empujar hacia una posición cerrada.
- La válvula resellable puede ser una válvula de septo pre-ranurado, resellable.
- 25 El miembro para abrir la válvula resellable puede abrir automáticamente la válvula.
- El miembro para abrir automáticamente de la válvula resellable puede ser una cánula.
- Las siguientes características se pueden prever para el procedimiento de la reivindicación 10 solas o en combinación con otras.
- La segunda cámara puede contener una solución para el tratamiento de la preparación de células.
- 30 Al menos una de las cámaras puede contener un tampón para el tratamiento de la preparación de células.
- El procedimiento puede comprender además la preparación de células que fluye a un destino o fuente de fluido adicional.
- El procedimiento puede comprender además la etapa de conectar la segunda cámara a una tercera cámara para el posterior procesamiento de la preparación de células.
- 35 El procedimiento puede comprender además la etapa de volver a conectar la primera y la segunda cámaras para el posterior procesamiento de la preparación de células
- La válvula resellable se pueden empujar hacia una posición cerrada y se puede cerrar automáticamente cuando la primera y la segunda cámaras están desconectadas.
- 40 El miembro adaptado para abrir automáticamente la válvula puede ser una cánula que establece comunicación de fluido a través de la válvula cuando la primera y segunda cámaras están conectadas.
- Se entenderá que los ejemplos proporcionados en la presente divulgación son ilustrativos de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto (10) de sedimentación para la concentración de células en una suspensión, que comprende:
 - una primera cámara (12) para recibir una suspensión que incluye una población de células, incluyendo la primera cámara una zona (16) de concentración de células para recibir una población concentrada de células después de la aplicación de una fuerza de centrifugación en la primera cámara, comprendiendo además dicha primera cámara un primer puerto (22); y
 - una segunda cámara (26) que comprende un segundo puerto (28) configurado para colocarse repetidamente de forma amovible en comunicación de fluido con el primer puerto de la primera cámara, uno del primer y segundo puerto teniendo un cierre (40) resellable y el otro del primer y segundo puerto teniendo un miembro (36) configurado para abrir dicho cierre resellable cuando se conectan las cámaras, estando el cierre resellable configurado para cerrarse automáticamente cuando las cámaras están desconectadas, y la primera y la segunda cámara se pueden colocar en un campo de fuerza de centrifugación como una unidad con la primera y segunda cámara en comunicación de fluido para hacer fluir una porción de la suspensión que incluye una población concentrada de las células en la segunda cámara.
2. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 1, en el que la primera cámara (12) se adapta para recibir células de un sistema para el aislamiento de las células.
3. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 1, en el que la zona (16) de concentración de células incluye una porción ahusada de la primera cámara (12).
4. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 1, en el que el conjunto (10) de sedimentación se adapta para su colocación en un soporte (44) durante la sedimentación.
5. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 4, en el que el conjunto (10) de sedimentación en el soporte (44) se coloca en una centrifugadora durante la sedimentación.
6. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 1, que comprende además un acoplamiento (32) entre la primera (12) y segunda (26) cámara.
7. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 6, en el que el acoplamiento (32) es separable y el acoplamiento comprende una primera porción (34) unida a dicha primera cámara (12) y una segunda porción (38) fijada a dicha segunda cámara (26), en el que la primera y segunda porción tienen elementos coincidentes.
8. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 7, en el que el acoplamiento (32) incluye un miembro de acoplamiento.
9. El conjunto de sedimentación de la reivindicación 1, en el que la primera cámara (12) tiene un volumen mayor que la segunda cámara (26).
10. Un procedimiento para concentrar células en una suspensión, que comprende:
 - a. recoger una suspensión que incluye una población de células dentro de una primera cámara (12) que tiene un primer puerto;
 - b. conectar la primera cámara a una segunda cámara (26) que tiene un segundo puerto de tal manera que un miembro de uno del primer y segundo puerto abre un cierre resellable del otro del primer y segundo puerto cuando se conectan las cámaras;
 - c. centrifugar la población de células para obtener una suspensión concentrada de células dentro de la primera cámara; y
 - d. hacer fluir la suspensión de células concentrada en la segunda cámara (26) en conexión de flujo con la primera cámara bajo un campo de fuerza de centrifugación aplicado a la primera y segunda cámara como una unidad.
11. El procedimiento de la reivindicación 10 que comprende además desconectar la primera cámara (12) de la segunda cámara (26) y conectar la segunda cámara a una tercera cámara para el procesamiento posterior de la suspensión de células concentrada.
12. El procedimiento de la reivindicación 10 que comprende además desconectar la primera cámara (12) de la segunda cámara (26), eliminar cualquier contenido restante en la primera cámara, añadir una solución a la primera cámara, añadir la suspensión de células concentrada de la segunda cámara a la primera cámara y reconectar la primera y la segunda cámara para el procesamiento posterior.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que las etapas a-d se repiten pero la suspensión que incluye una población de células que se recoge en la primera cámara (12) cuando se repite la suspensión de células concentrada que se ha hecho fluir a la segunda cámara (26).

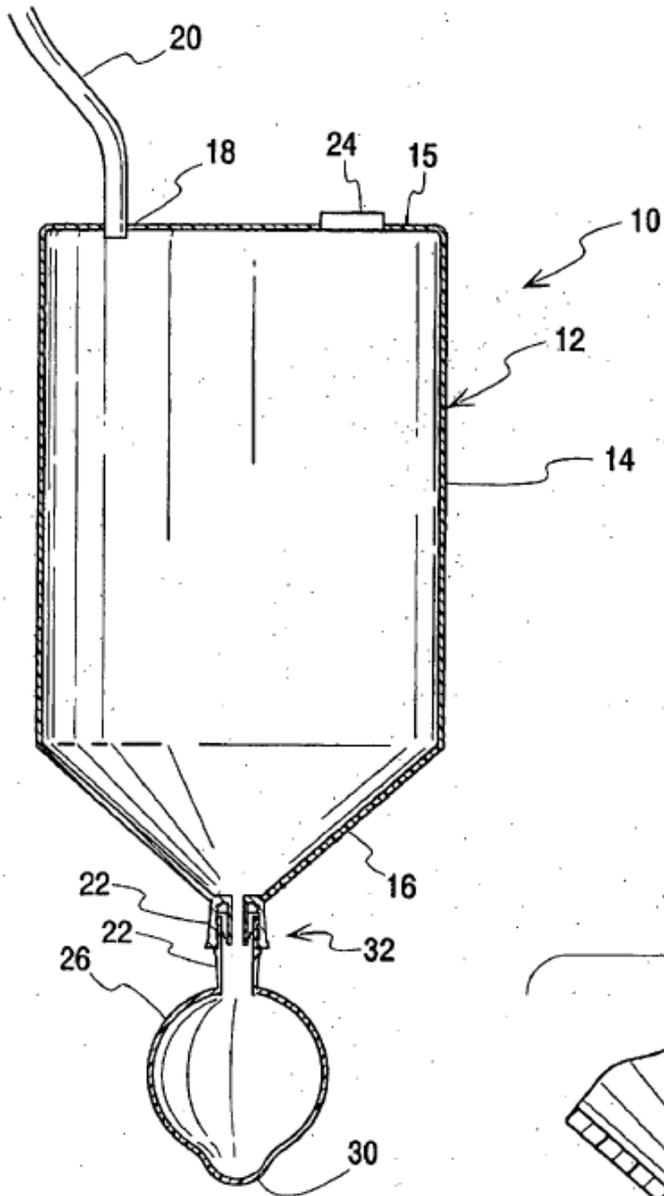


Fig. 2

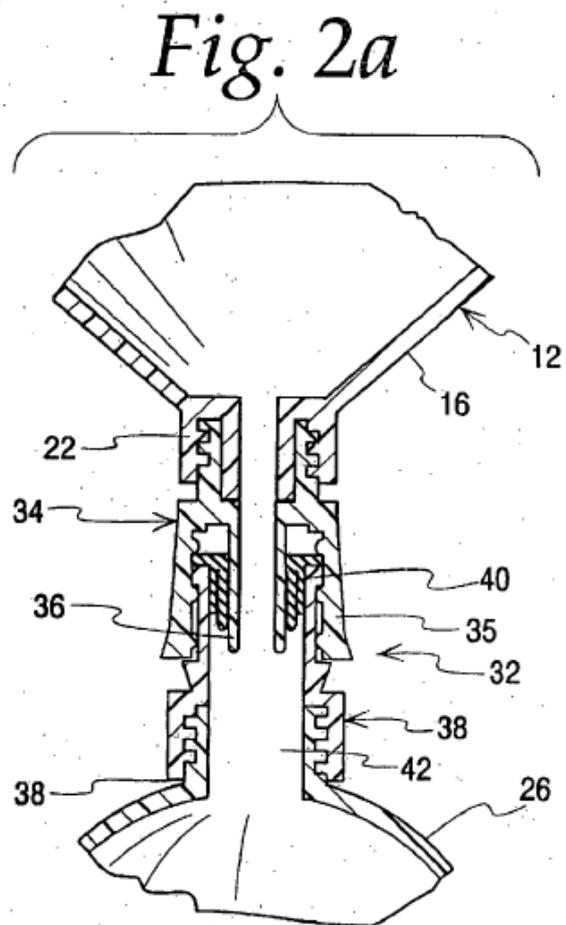
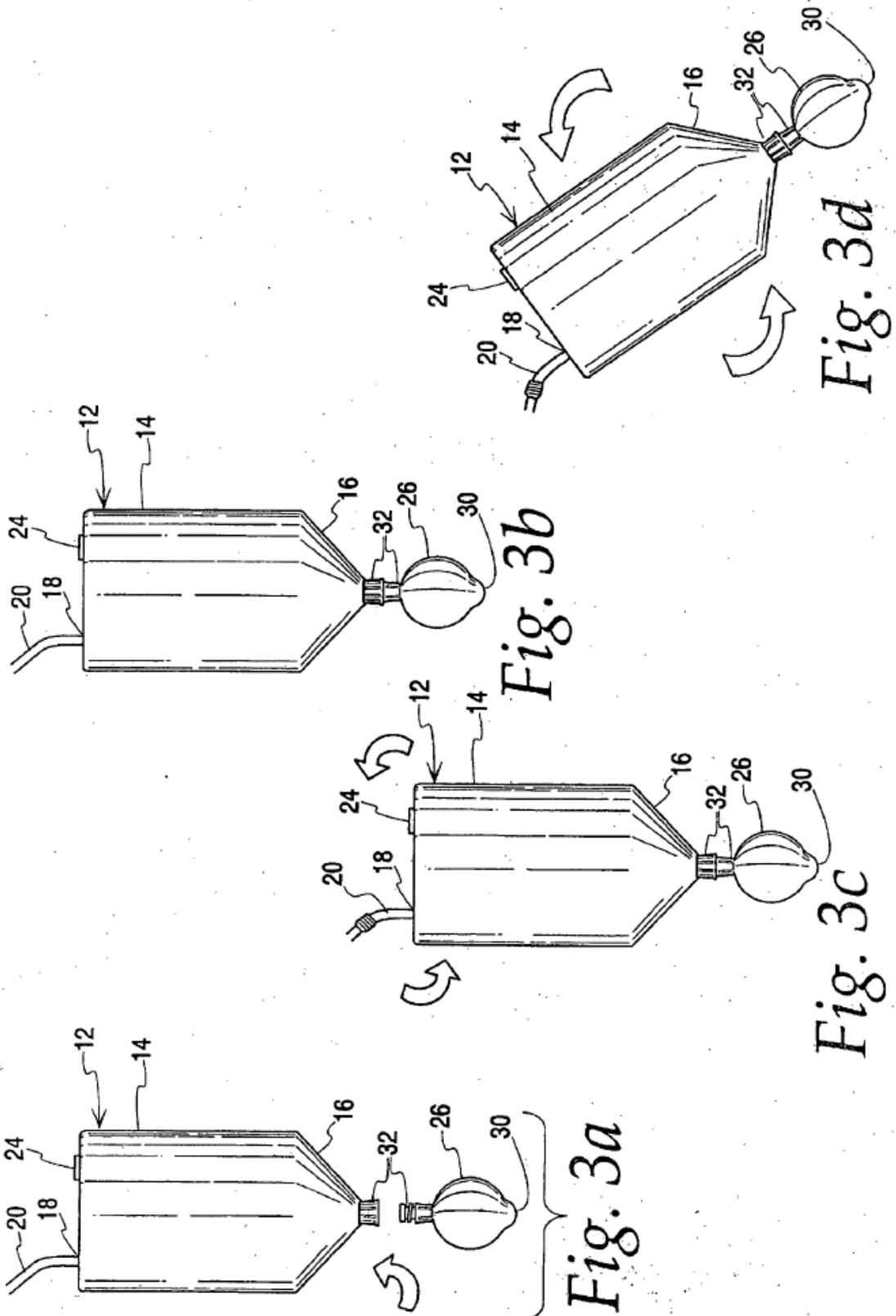


Fig. 2a



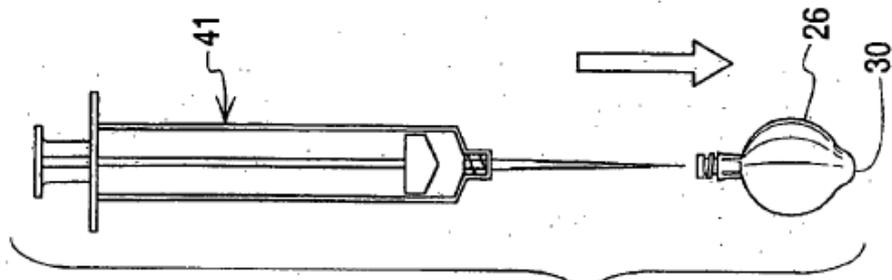


Fig. 3f

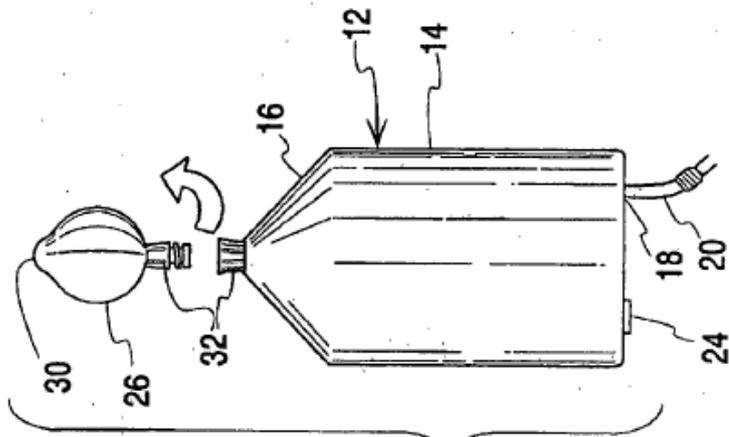


Fig. 3e

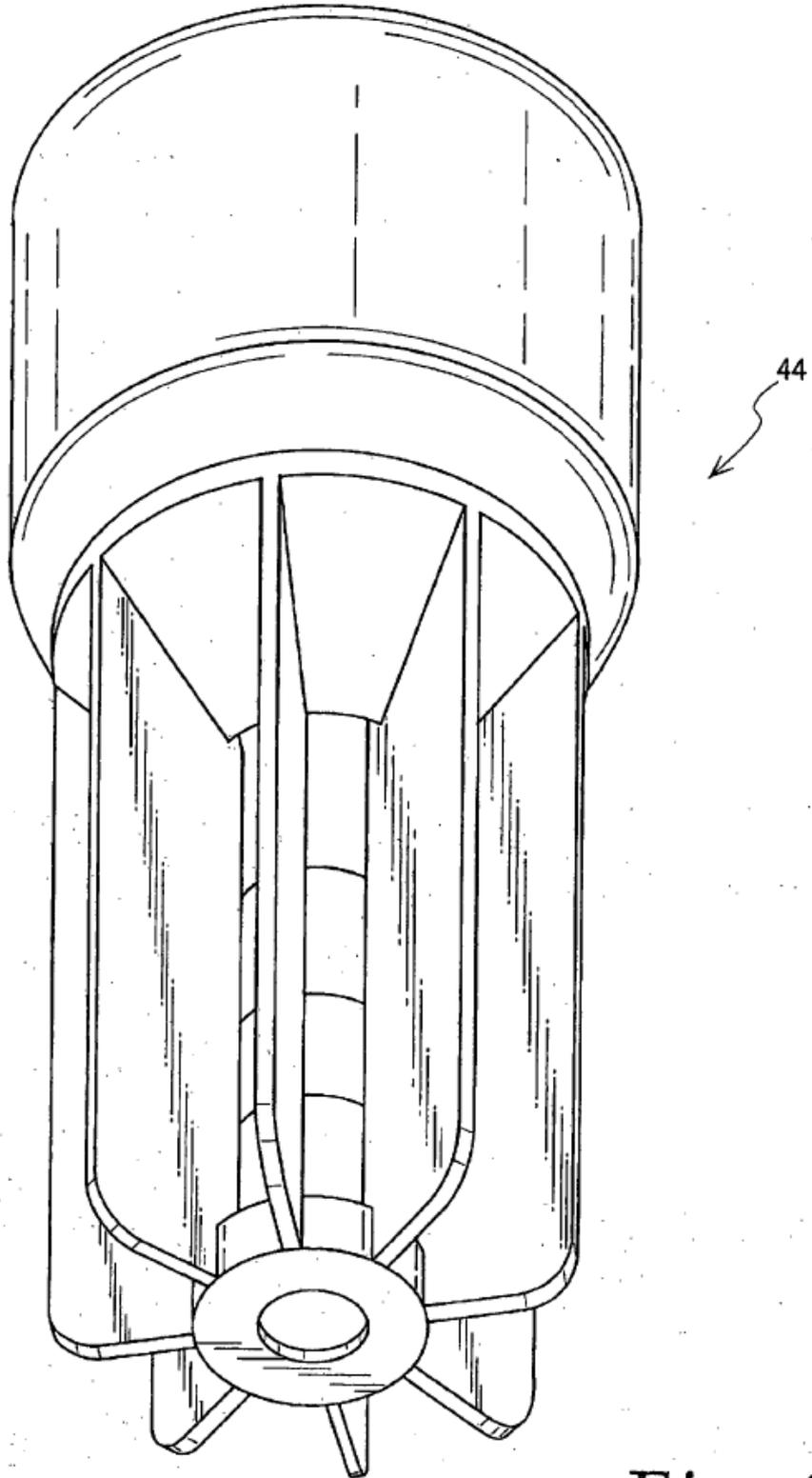


Fig. 4

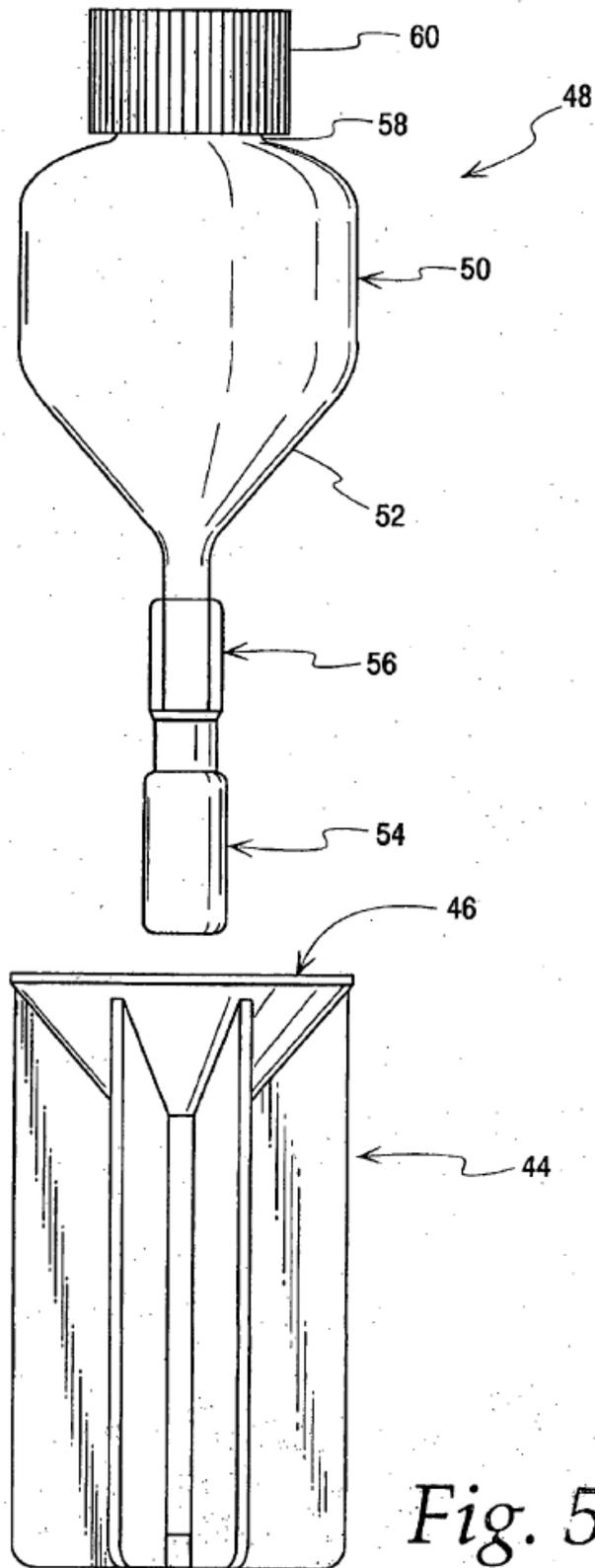
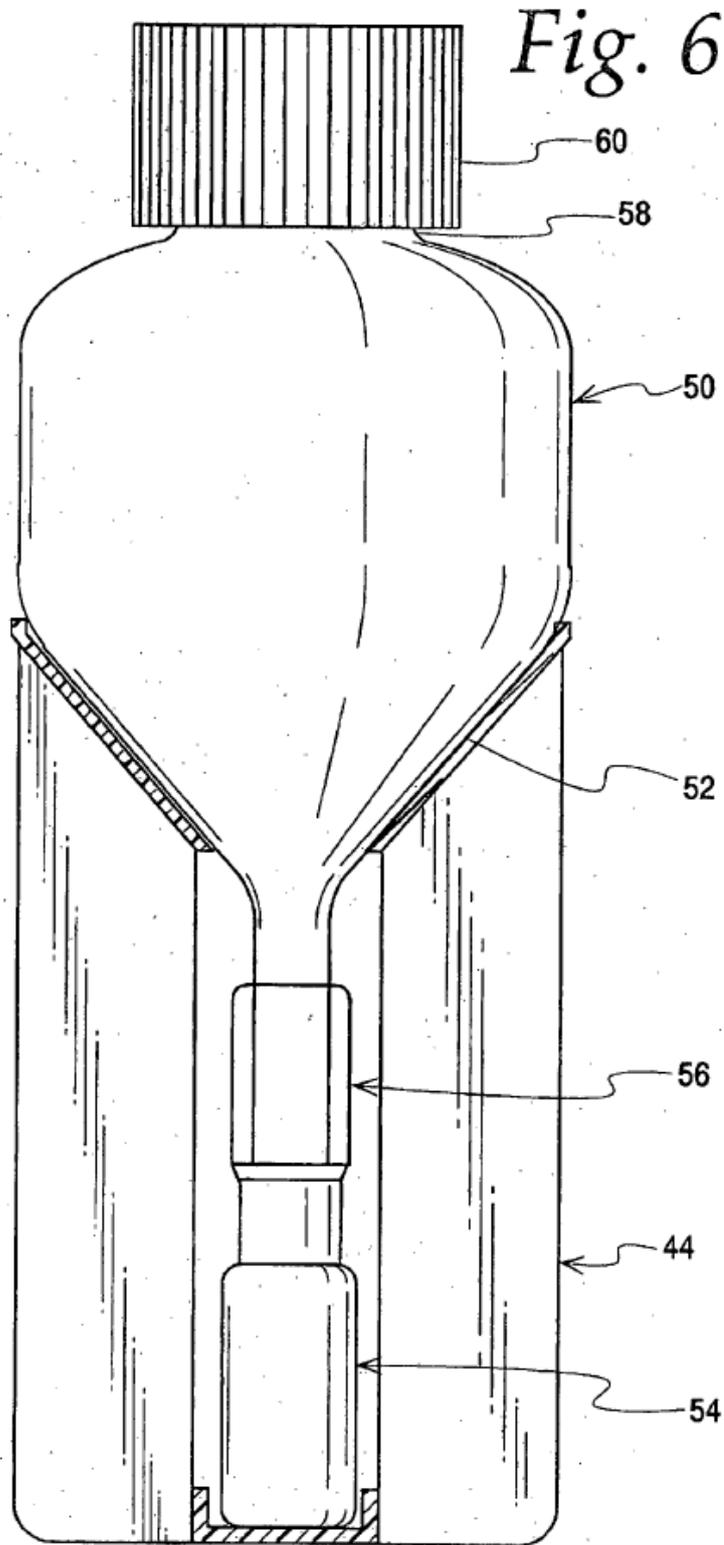


Fig. 5



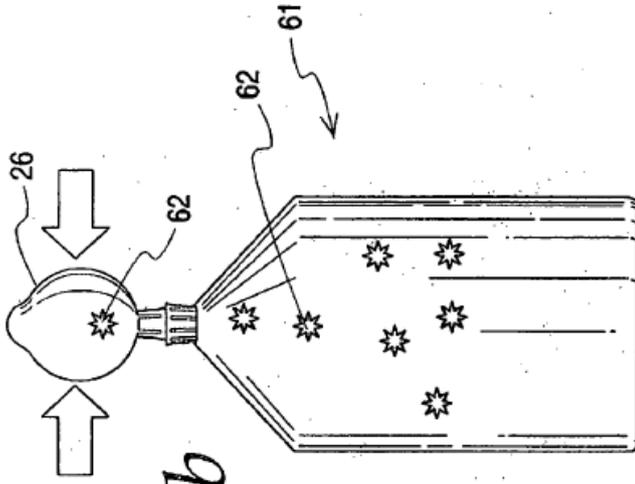


Fig. 7b

Fig. 7d

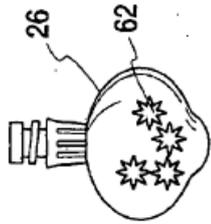
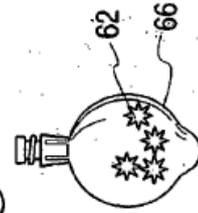


Fig. 7a

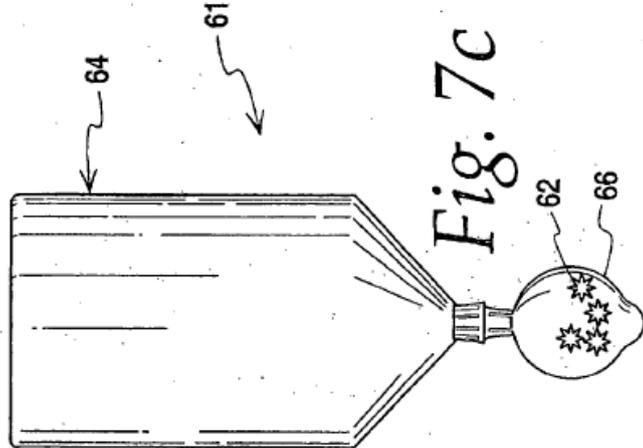
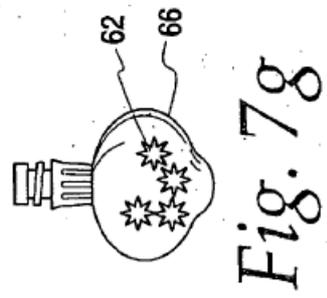
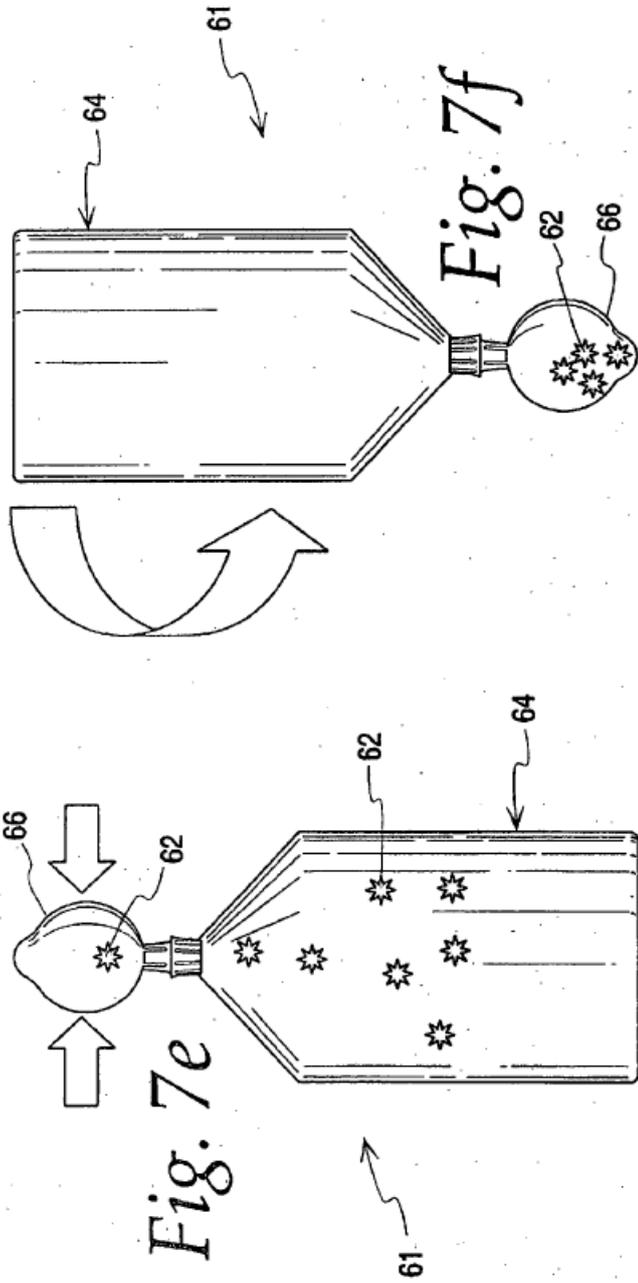


Fig. 7c



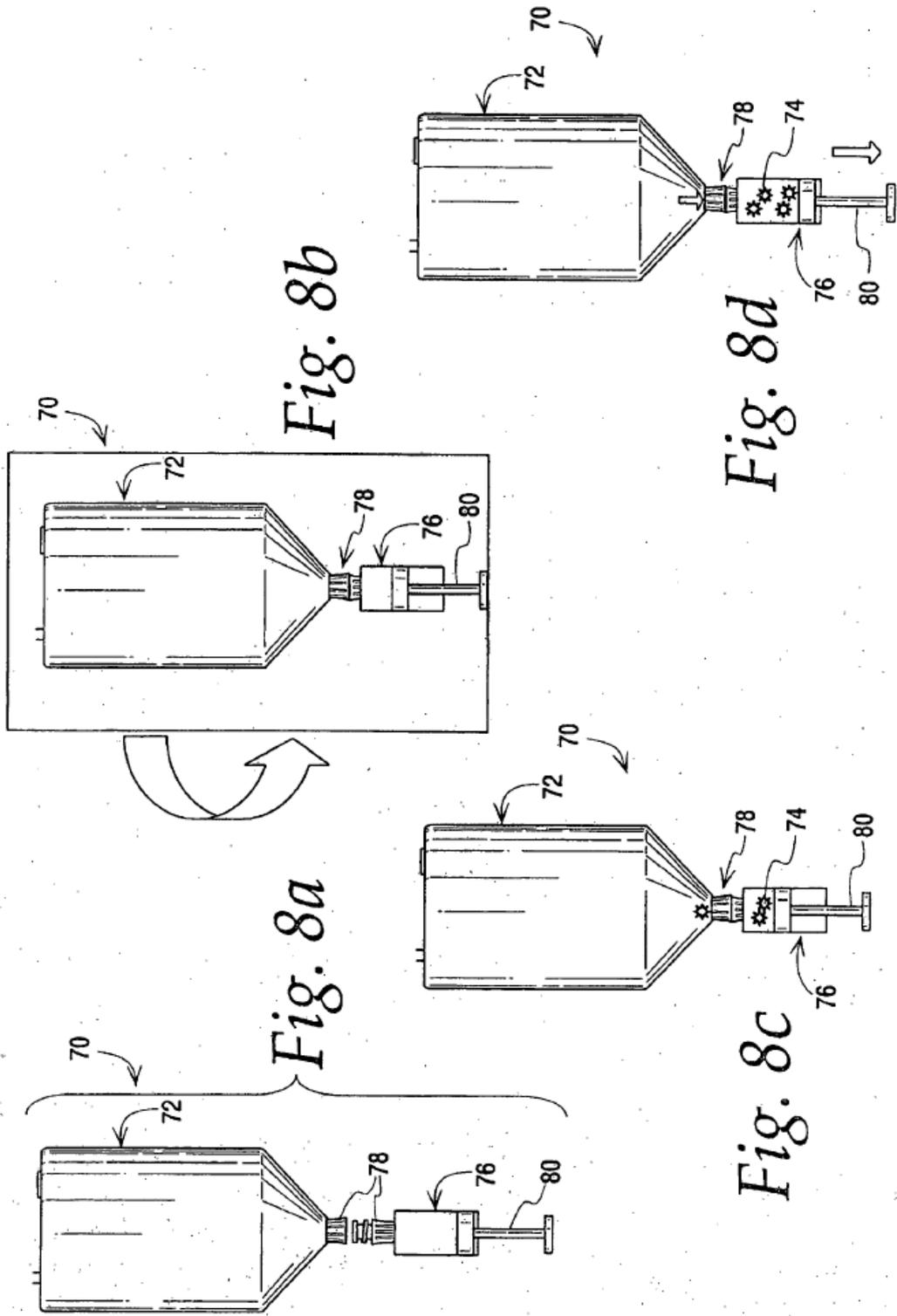


Fig. 8h

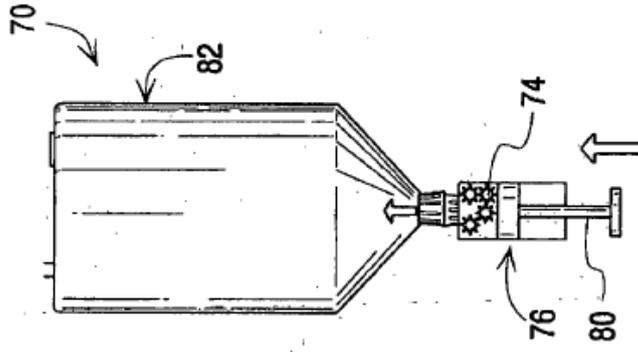
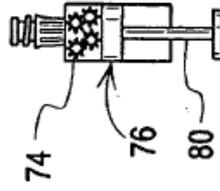


Fig. 8g

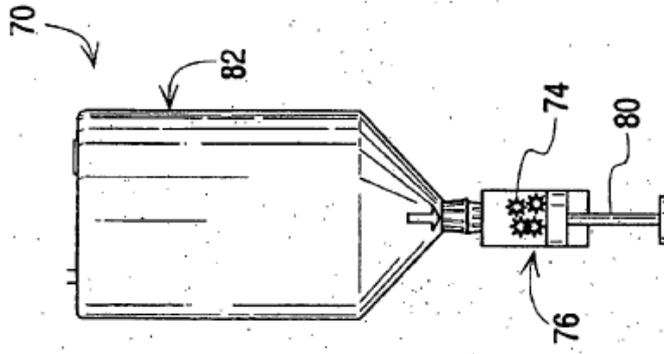


Fig. 8f

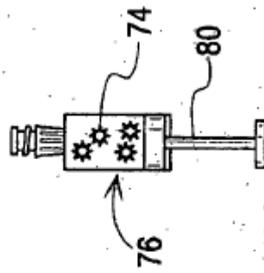
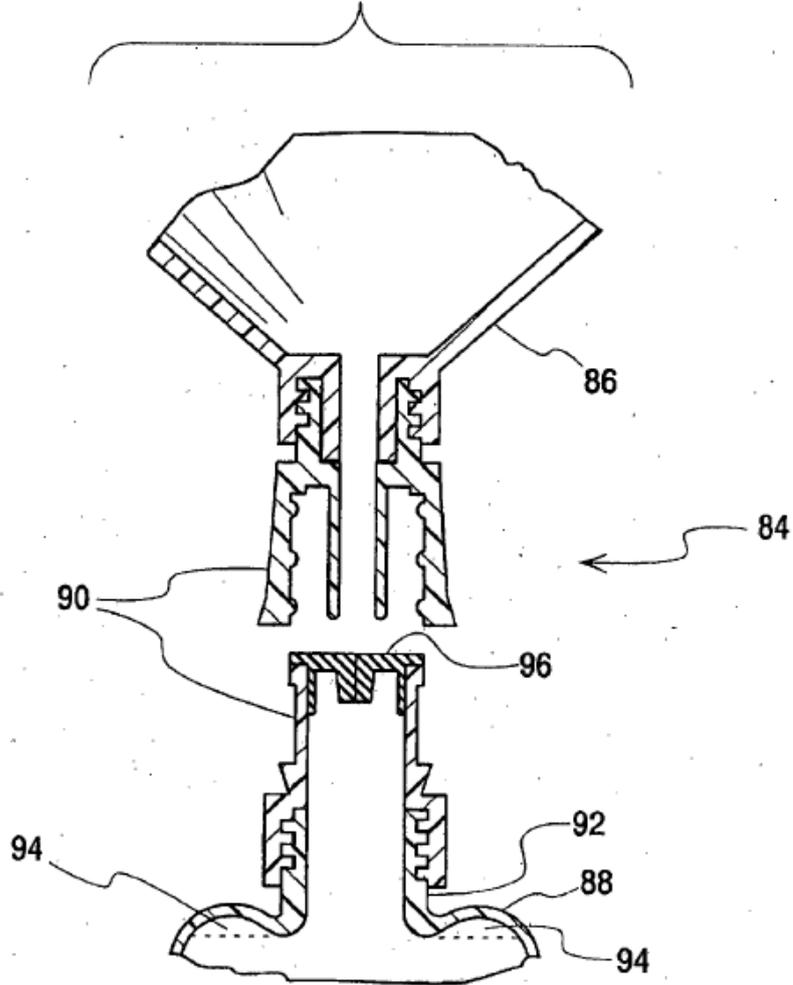
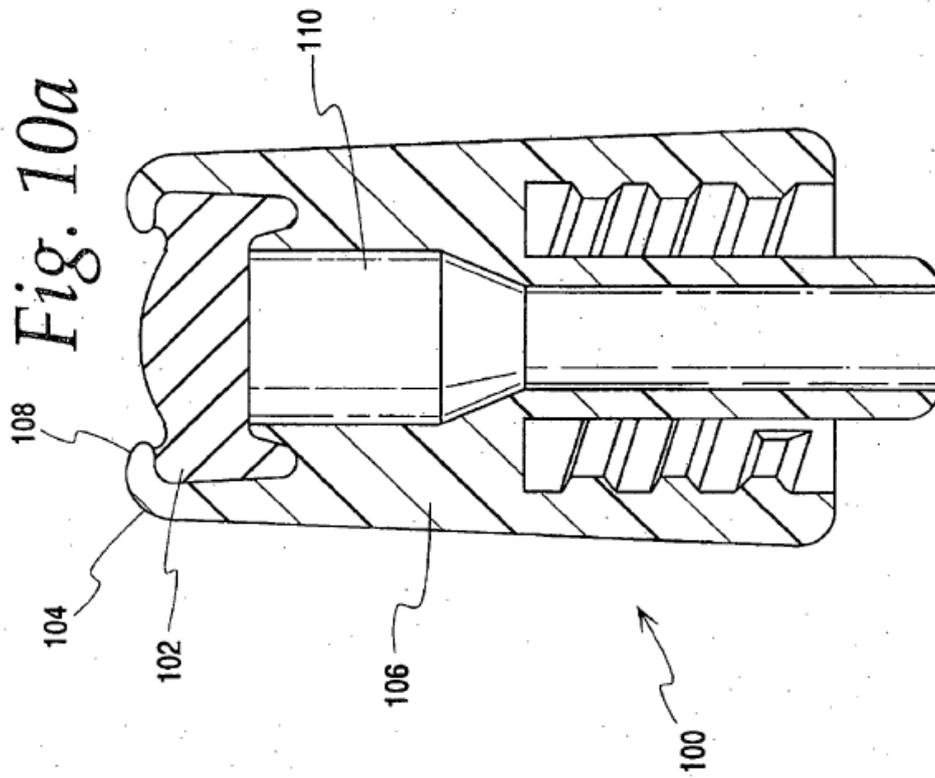
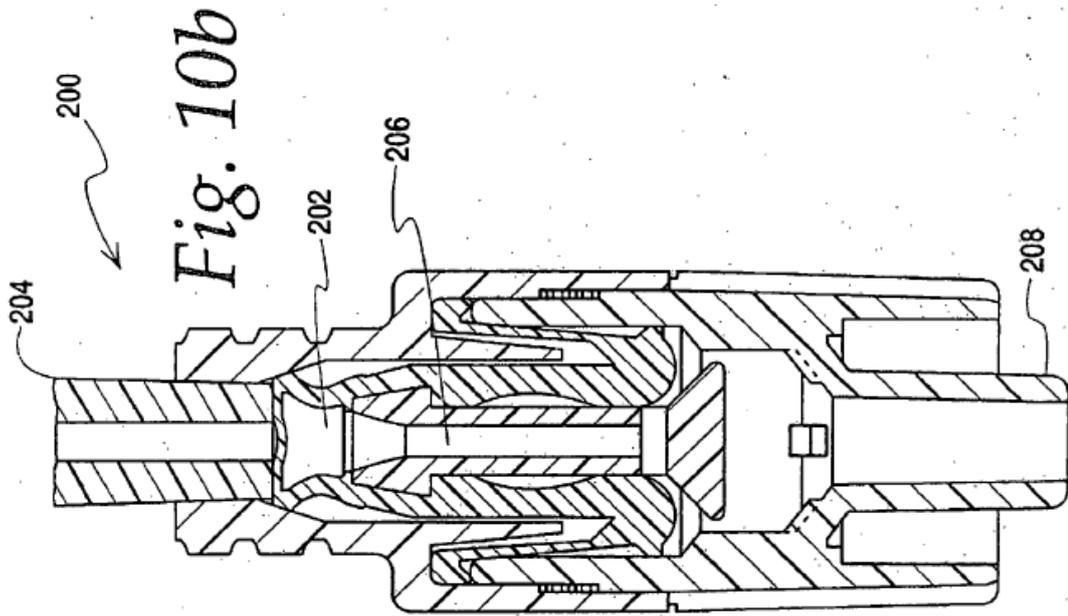


Fig. 8e

Fig. 9





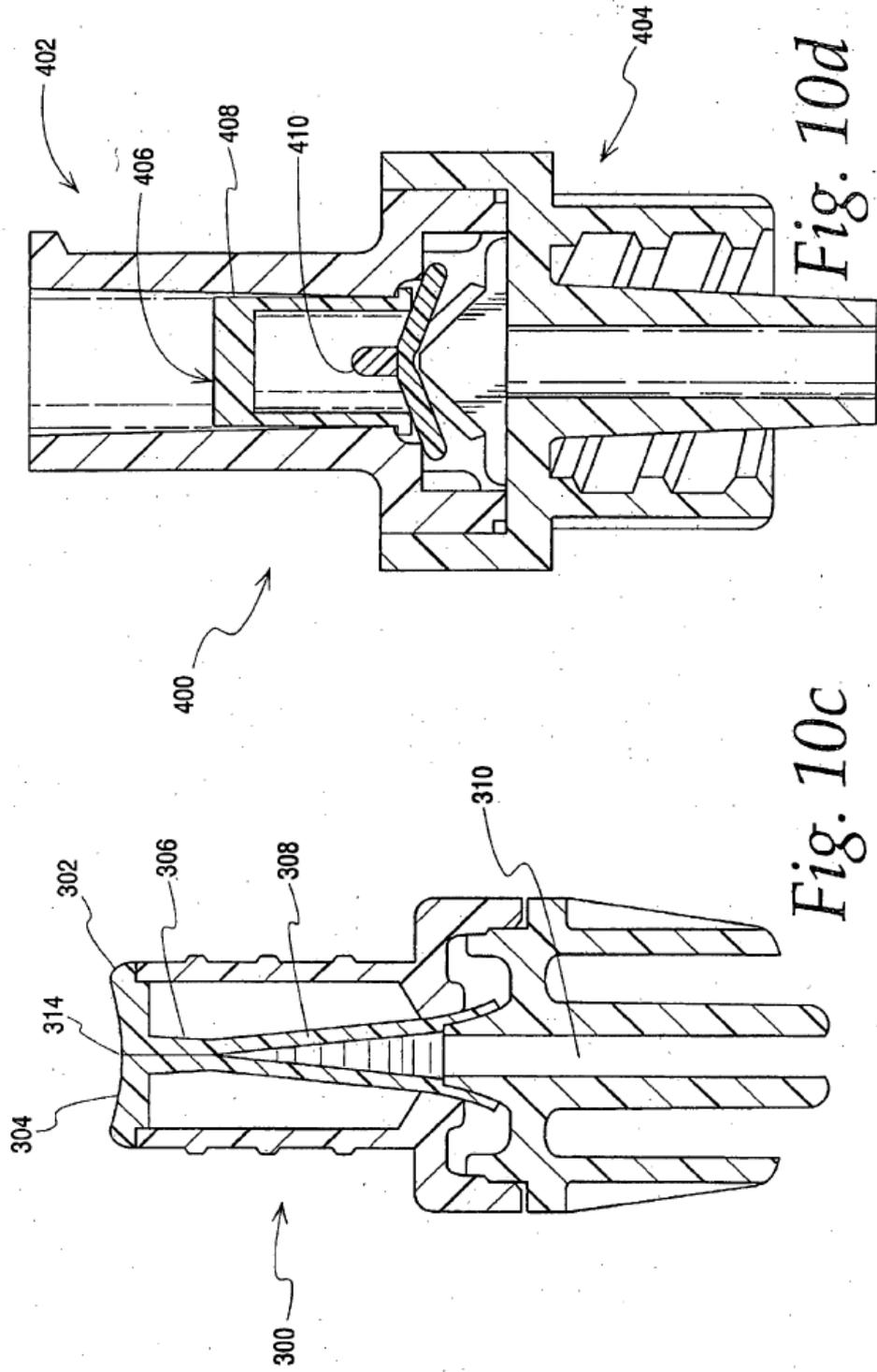


Fig. 10d

Fig. 10c