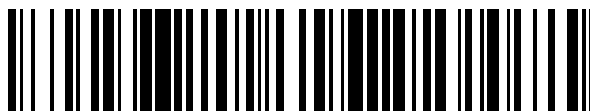


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 225**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2014 PCT/EP2014/070850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2014 E 14787113 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 3052614**

54 Título: **Método de enriquecimiento o aislamiento de una población de células diana**

30 Prioridad:

30.09.2013 EP 13186733

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER (100.0%)
Schlossplatz 2
48149 Münster, DE**

72 Inventor/es:

**ROMMEL, CHRISTINA;
SCHNEKENBURGER, JUERGEN y
DIERKER, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 663 225 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 enriquecimiento o aislamiento de una población de células diana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana. En general, la población de células diana se enriquece/aisla de una pluralidad de células, por ejemplo en un fluido corporal, tal como la sangre.

10

Antecedentes de la invención

La siguiente descripción se proporciona para ayudar a la comprensión del lector. No se admite que ninguna de la información proporcionada o las referencias citadas sea una técnica anterior de la presente invención.

15

La sangre humana es una mezcla celular compleja que tiene un alto potencial diagnóstico en la clínica, principalmente debido a que el aislamiento de la sangre se asocia con un bajo esfuerzo, dolor y riesgo para el paciente, lo que permite diagnosticar y controlar el progreso de las enfermedades sin mayores dificultades. Además del análisis de las células sanguíneas características y de la determinación y el control de los biomarcadores moleculares, el aislamiento de las subpoblaciones celulares de la sangre es de gran importancia. Esto se debe a que la detección directa de células dentro de la sangre no es posible a pesar de los métodos analíticos sensibles, debido al muy bajo número de células en la sangre. Por lo tanto, se debe realizar un aislamiento y/o enriquecimiento de las células contenidas en la sangre, antes del análisis de las células. El aislamiento de las subpoblaciones celulares de la sangre incluye, por ejemplo, el aislamiento de las células fetales de la sangre materna. Un ejemplo adicional es el aislamiento de células tumorales circulantes de pacientes que padecen una enfermedad tumoral.

20

25

En vista del creciente número de enfermedades tumorales, el diagnóstico temprano y el control de tumores y terapias de los mismos, son de particular importancia para un paciente con tumor. Además, la detección y el control de tumores recurrentes y metástasis es igualmente importante y puede ayudar a salvar o prolongar la vida de un paciente. Los métodos para aislar células tumorales que circulan en la sangre descritos en la técnica se basan esencialmente en uno de dos conceptos diferentes. Estos conceptos usan las propiedades físicas de las células tumorales, tales como su densidad o tamaño, o utilizan inmunorreacciones contra antígenos específicos en la superficie de las células tumorales con el fin de "marcar" las células para etapas posteriores de separación o purificación. Ejemplos de sistemas de detección comercializados incluyen, por ejemplo, OncoQuick® que usa la centrifugación en gradiente de densidad, ScreenCell® que usa la exclusión de tamaño o CellSearch® o AdnaTest® que usan partículas inmunomagnéticas contra EpCAM o citoqueratinas en la superficie de las células tumorales. Otros ensayos conocidos en la técnica utilizan chips de microfluidos, en combinación con recubrimiento de anticuerpos o citometría de flujo.

30

35

Los métodos que utilizan la técnica de inmunomarcaje requieren un análisis exhaustivo de las células tumorales, los cuales, sin embargo, pueden verse obstaculizados o incluso impedidos debido a la presencia de un anticuerpo utilizado para marcar las células tumorales. Además, tales métodos a menudo exigen un alto esfuerzo técnico, y el éxito puede depender en gran medida de la persona que realice el análisis. Lo mismo se aplica mutatis mutandis a los métodos que utilizan la centrifugación en gradiente de densidad. Además, el uso de partículas inmunomagnéticas, chips de microfluidos y citometría de flujo depende de la disponibilidad de los anticuerpos adecuados. Además, las células que no expresan el antígeno respectivo no pueden aislarse mediante dichos métodos. Además, la re-identificación de las células tumorales introducidas artificialmente en la sangre podría mostrarse solo para aproximadamente el 72 % de las células, en enfoques que utilizan la centrifugación en gradiente de densidad. En otras palabras, casi un tercio de las células se pierden en estos enfoques. Los métodos que usan la cromatografía de exclusión por tamaño para aislar o enriquecer las células tumorales de la sangre luchan contra la contaminación de la muestra con células sanguíneas que tienen un tamaño similar al de las células tumorales. Los enfoques que usan chips tienen el riesgo de una sobrecarga del chip por las células sanguíneas. Los expertos en la técnica también saben que los métodos basados en la citometría de flujo tienen una sensibilidad limitada, y se necesitan grandes volúmenes de muestra en tales técnicas.

40

45

50

55

Otros posibles enfoques tales como la adhesión selectiva de las células tumorales a superficies recubiertas y/o estructuradas, o el uso de las diferentes propiedades dieléctricas de las células tumorales, hasta ahora han suscitado poco interés, debido a la falta de un número significativo de informes exitosos. Lo mismo se aplica a la citometría de flujo fotoacústica que se ha utilizado, por ejemplo, para el aislamiento de células de melanoma.

60

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al aislamiento, enriquecimiento y/o purificación de una célula de una pluralidad de células. Generalmente, la célula es de un tipo de célula seleccionada, mientras que la pluralidad de células puede incluir una variedad de tipos de células. Si bien los métodos convencionales para detectar ciertos tipos de células en una muestra tal como fluido corporal se basan en la medición de ciertas proteínas marcadoras o en la presencia de

65

ciertos fragmentos de ADN, un método como el divulgado en la presente memoria permite aislar, enriquecer y/o purificar las células diana deseadas. Las células respectivas pueden analizarse posteriormente con más detalle o estar sujetas a un uso posterior.

5 En un primer aspecto, se proporciona un método para enriquecer, purificar y/o aislar una célula diana de una pluralidad de células. El método incluye introducir una pluralidad de células en un compartimento de separación. El compartimento de separación tiene una entrada y una salida, cada una de las cuales está acoplada de forma fluida al ambiente. La pluralidad de células se puede introducir en el compartimento de separación a través de cualquier abertura, que puede ser, por ejemplo, la entrada o la salida. El compartimento de separación está definido por una pared circunferencial, una base y una parte superior. La base y la parte superior están dispuestas en dos extremos del compartimento de separación, los cuales están en relación opuesta. La base del compartimento de separación incluye la salida. La salida incluye un medio poroso. Estos poros son de un tamaño que es más pequeño que el tamaño de la célula diana para ser enriquecida, purificada y/o aislada. El método también incluye introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación. El método incluye además permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimento de separación a través de la salida. Como resultado, la pluralidad de células se expone a un flujo permanente de líquido mientras que el filtro evita que la célula diana salga del compartimento de separación. El método también incluye generalmente introducir un fluido en el compartimento de separación a través de la entrada del compartimento de separación. Este fluido es al menos esencialmente inmisible con el líquido en el compartimento de separación que abarca la célula diana. Este fluido tiene además una densidad que es menor que la densidad del líquido respectivo en el compartimento de separación. El método también incluye generalmente permitir que el líquido que abarca la célula diana en el compartimento de separación, es decir, generalmente el líquido adecuado que se dejó entrar en el compartimento de separación, salga por la salida. Como resultado, se permite que disminuya el volumen del líquido en el compartimento de separación. De ese modo, la célula diana se enriquece, purifica y/o aísla.

La célula diana se incluye en algunas realizaciones en una población de células diana. En dichas realizaciones, el método puede considerarse como un método para enriquecer, purificar y/o aislar una población de células diana de una pluralidad de células. En un método particular, los poros del medio poroso incluidos en la salida son de un tamaño que es mayor que el tamaño de célula promedio de las células de la población de células diana para enriquecer, purificar y/o aislar. En algunas realizaciones, el medio poroso incluido en la salida es extraíble. En algunas realizaciones, el método del primer aspecto incluye eliminar el medio poroso.

En algunas realizaciones, el método del primer aspecto, donde el método se lleva a cabo en presencia de una fuerza de gravitación, permite que el flujo de líquido al menos esencialmente constante introducido a través de la entrada del compartimento de separación cree una fuerza en la población de células diana que se opone a la fuerza de gravitación.

En algunas realizaciones, el método del primer aspecto incluye además disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida quede posicionada hacia delante, en un ángulo de + 80° a - 80°, hacia arriba o hacia abajo, después de que la pluralidad de células haya sido introducida en el compartimento de separación. En algunas realizaciones, el método del primer aspecto incluye además disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada hacia el frente, en un ángulo de + 60° a -60°, hacia arriba o hacia abajo. Una orientación hacia arriba es una posición en la que la salida está orientada al camino que está, al menos esencialmente y en una realización completamente, opuesta a la dirección de la fuerza de gravitación. Una orientación hacia abajo es una posición en la que la salida se orienta al camino que está, al menos esencialmente y en una realización completamente, en la dirección de la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el método incluye disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada enfrente al menos esencialmente hacia arriba o hacia abajo. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada enfrente hacia arriba o hacia abajo en un ángulo de aproximadamente + 50° a -50°, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia arriba o hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 75° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 45° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 50° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimento de separación está en algunas realizaciones dispuesto para mirar hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 35° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 35° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

El método del primer aspecto en algunas realizaciones incluye además inclinar el compartimento de separación con respecto a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en un compartimento de separación. El compartimento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, por un ángulo en el intervalo de + 75° a - 75°, en relación con su orientación original. El compartimento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 80° o más, con respecto a su orientación original. En algunas

realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 45° o más, con respecto a su orientación original. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 20° o más, con respecto a su orientación original. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 10° o más, con respecto a su orientación original.

En algunas realizaciones del método del primer aspecto, el compartimiento de separación puede estar inclinado en un ángulo en el intervalo de + 80° a - 80°, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, por un ángulo en el intervalo de + 90° a - 90°, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 70° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 45° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 20° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 10° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

En algunas realizaciones del método del primer aspecto, la base y la parte superior están dispuestas en dos extremos del compartimiento de separación, que están al menos esencialmente opuestos entre sí. En algunas realizaciones, la totalidad o una porción del líquido que abarca la población de células diana, que generalmente es del líquido adecuado que se dejó entrar en el compartimiento de separación, se recoge después de que se haya permitido que el volumen de este líquido disminuya. El líquido que se eluye a través de la salida se recoge junto con la población de células diana. El medio poroso de la salida es generalmente de naturaleza sólida. En algunas realizaciones, la salida del compartimiento de separación incluye un filtro, que tiene poros.

En algunas realizaciones, el fluido introducido en el compartimiento de separación es un gas tal como nitrógeno o aire. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido acuoso. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido de fluorocarbono.

En un segundo aspecto, se proporciona un método para enriquecer, purificar y/o aislar una célula diana de una pluralidad de células. El método incluye introducir una pluralidad de células en un compartimiento de separación. El compartimiento de separación tiene una entrada y una salida, cada una de las cuales está acoplada de forma fluida al ambiente. La pluralidad de células se puede introducir en el compartimiento de separación a través de cualquier abertura, que puede ser, por ejemplo, la entrada o la salida. El compartimiento de separación está definido por una pared circunferencial, una base y una parte superior. La base y la parte superior están dispuestas en dos extremos del compartimiento de separación, que están en relación opuesta. La base del compartimiento de separación incluye la salida. La salida incluye un medio poroso. Estos poros son de un tamaño que es más pequeño que el tamaño de la célula diana para ser enriquecida y/o aislada. La parte superior del compartimiento de separación incluye la entrada. El método también incluye introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación. El método incluye además permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimiento de separación a través de la salida. Como resultado, la pluralidad de células se expone a un flujo permanente de líquido mientras que el filtro evita que la célula diana salga del compartimiento de separación. El método también incluye disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté orientada hacia abajo. Esta orientación es una posición en la cual la salida se orienta al camino que está, al menos esencialmente, en la dirección de la fuerza de gravitación. El método también incluye generalmente introducir un fluido en el compartimiento de separación a través de la entrada del compartimiento de separación. Este fluido es al menos esencialmente inmiscible con el líquido en el compartimiento de separación que abarca la célula diana. Este fluido tiene además una densidad que es menor que la densidad del líquido respectivo en el compartimiento de separación. El método también incluye generalmente permitir que el líquido que abarca la célula diana en el compartimiento de separación, es decir, generalmente el líquido adecuado que se dejó entrar en el compartimiento de separación, salga por la salida. Como resultado, se permite que disminuya el volumen del líquido en el compartimiento de separación. De ese modo, la célula diana se enriquece, purifica y/o aísla.

En algunas realizaciones del método del segundo aspecto, la célula diana se incluye en una población de células diana. En dichas realizaciones, el método puede considerarse como un método para enriquecer, purificar y/o aislar una población de células diana de una pluralidad de células. En un método particular, los poros del medio poroso incluidos en la salida son de un tamaño que es más pequeño que el tamaño de célula promedio de las células de la población de células diana para enriquecer, purificar y/o aislar. En algunas realizaciones, el medio poroso incluido en la salida es extraíble. En algunas realizaciones, el método del primer aspecto incluye eliminar el medio poroso.

El método del segundo aspecto en algunas realizaciones incluye además disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida quede posicionada orientada en un ángulo de + 80° a - 80°, hacia arriba o hacia abajo, después de que se haya introducido la pluralidad de células en el compartimiento de separación. En algunas realizaciones, el método incluye disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada al menos esencialmente hacia arriba o hacia abajo. En algunas realizaciones, el

compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia arriba o hacia abajo en un ángulo de aproximadamente $+ 75^\circ$ a -75° , con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto enfrentado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 75° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 75° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 40° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 40° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 20° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 20° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

El método del segundo aspecto en algunas realizaciones incluye además inclinar el compartimento de separación con respecto a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en un compartimento de separación. El compartimento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, en un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, en relación con su orientación original. El compartimento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 70° o más, con respecto a su orientación original. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 50° o más, con respecto a su orientación original. El compartimento de separación puede estar, en algunas realizaciones, inclinado en un ángulo de aproximadamente 30° o más, con respecto a su orientación original. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 15° o más, con respecto a su orientación original. El compartimento de separación puede estar, en algunas realizaciones, inclinado en un ángulo de aproximadamente 5° o más, con respecto a su orientación original.

En algunas realizaciones del método del segundo aspecto, el compartimento de separación puede estar inclinado en un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 98^\circ$, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, por un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 70° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 50° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 30° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 15° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 5° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

En algunas realizaciones del método del segundo aspecto, disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida esté orientada hacia abajo incluye hacer girar el compartimento de separación, por ejemplo hasta aproximadamente 180° .

En un tercer aspecto, se proporciona un método para enriquecer, purificar y/o aislar una célula diana de una pluralidad de células. El método incluye introducir una pluralidad de células en un compartimento de separación. El compartimento de separación tiene una entrada y una salida, cada una de las cuales está acoplada de forma fluida al ambiente. La pluralidad de células se puede introducir en el compartimento de separación a través de cualquier abertura, que puede ser, por ejemplo, la entrada o la salida. El compartimento de separación está definido por una pared circunferencial, una base y una parte superior. La base y la parte superior están dispuestas en dos extremos del compartimento de separación, los cuales están en relación opuesta. La base del compartimento de separación incluye la salida. La salida incluye un medio poroso. Estos poros son de un tamaño que es más pequeño que el tamaño de la célula diana para ser enriquecida y/o aislada. La entrada está incluida en la pared circunferencial del compartimento de separación. La entrada está dispuesta cerca de la salida. El método también incluye introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación. El método incluye además permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimento de separación a través de la salida. Como resultado, la pluralidad de células se expone a un flujo permanente de líquido mientras que el filtro evita que la célula diana salga del compartimento de separación. El método también incluye generalmente introducir un fluido en el compartimento de separación a través de la entrada del compartimento de separación. Este fluido es al menos esencialmente inmiscible con el líquido en el compartimento de separación que abarca la célula diana. Este fluido tiene además una densidad que es menor que la densidad del líquido respectivo en el compartimento de separación. Generalmente, el método también incluye permitir que el líquido que abarca la célula diana en el compartimento de separación, es decir, generalmente líquido del líquido adecuado que se dejó entrar en el compartimento de separación, salga por la salida. Como resultado, se permite que disminuya el volumen del líquido en el compartimento de separación. De ese modo, la célula diana se enriquece, purifica y/o aísla.

En algunas realizaciones, el método del tercer aspecto incluye disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida quede posicionada orientada en un ángulo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, hacia arriba o hacia abajo,

después de que la pluralidad de células se haya introducido en el compartimiento de separación. En algunas realizaciones, el método incluye disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada al menos esencialmente hacia arriba o hacia abajo. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia arriba en un ángulo de aproximadamente $+ 70^\circ$ a -70° con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia abajo en un ángulo de aproximadamente $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación está en algunas realizaciones dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 70° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 70° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 25° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 25° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación está en algunas realizaciones dispuesto orientado hacia arriba en un ángulo de aproximadamente 15° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto orientado hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 15° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

El método del tercer aspecto en algunas realizaciones incluye además inclinar el compartimiento de separación con respecto a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en un compartimiento de separación. El compartimiento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, en un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, en relación con su orientación original. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 60° o más, con respecto a su orientación original. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 40° o más, con respecto a su orientación original. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 25° o más, con respecto a su orientación original. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 15° o más, con respecto a su orientación original.

En algunas realizaciones del método del tercer aspecto, el compartimiento de separación puede estar inclinado en un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, en un ángulo en el intervalo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 60° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está inclinado en un ángulo de aproximadamente 40° o más, con relación a la fuerza de gravitación. El compartimiento de separación puede, en algunas realizaciones, estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 30° o más, con relación a la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación puede estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 25° o más, con relación a la fuerza de gravitación.

En algunas realizaciones del método del tercer aspecto, el compartimiento de separación tiene dos entradas, que están acopladas de forma fluida al ambiente. La primera entrada está incluida en la pared circunferencial del compartimiento de separación, donde está dispuesta cerca de la salida. El flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado se introduce a través de la primera entrada. En una realización, el fluido, que es al menos esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la célula diana, se introduce a través de la segunda entrada.

En algunas realizaciones del método del tercer aspecto, la célula diana se incluye en una población de células diana. En dichas realizaciones, el método puede considerarse como un método para enriquecer, purificar y/o aislar una población de células diana de una pluralidad de células. En un método particular, los poros del medio poroso incluidos en la salida son de un tamaño que es mayor que el tamaño de célula promedio de las células de la población de células diana para enriquecer, purificar y/o aislar. En algunas realizaciones, el medio poroso incluido en la salida es extraíble. En algunas realizaciones, el método del primer aspecto incluye eliminar el medio poroso.

En un cuarto aspecto, se proporciona un método para enriquecer, purificar y/o aislar una célula diana de una pluralidad de células. El método generalmente se realiza en presencia de una fuerza gravitacional. El método incluye introducir una pluralidad de células en un compartimiento de separación. El compartimiento de separación tiene una entrada y una salida, cada una de las cuales está acoplada de forma fluida al ambiente. La pluralidad de células se puede introducir en el compartimiento de separación a través de cualquier abertura, que puede ser, por ejemplo, la entrada o la salida. El compartimiento de separación está definido por una pared circunferencial, una base y una parte superior. Dentro del compartimiento de separación, la base y la parte superior están dispuestas en una relación al menos esencialmente opuesta entre sí. La base y la parte superior están generalmente dispuestas en dos extremos del compartimiento de separación, los cuales están en relación opuesta. El método también incluye introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación. El método incluye además permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimiento de separación a través de la salida. De ese modo, la pluralidad de células se suspende en un flujo continuo de líquido. Como resultado, el flujo continuo de líquido evita que la célula diana se sedimente, por ejemplo, se deposite por la fuerza de gravitación. El flujo continuo de líquido evita adicionalmente

que la célula diana salga del compartimiento de separación a través de la salida. De ese modo, la célula diana se enriquece, purifica y/o aísla.

5 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la salida contiene un medio poroso que contiene poros de un tamaño menor que el tamaño celular promedio de las células de la población de células diana. En algunas de tales realizaciones, el método del cuarto aspecto también incluye introducir un fluido en el compartimiento de separación a través de la entrada del compartimiento de separación. Este fluido es al menos esencialmente inmiscible con el líquido en el compartimiento de separación que abarca la célula diana. Este fluido tiene además una densidad que es menor que la densidad del líquido respectivo en el compartimiento de separación. En una
10 realización, el método también incluye permitir que el líquido que abarca la célula diana en el compartimiento de separación, es decir, generalmente el líquido adecuado que se permitió entrar en el compartimiento de separación, salga por la salida. Como resultado, se permite que disminuya el volumen del líquido en el compartimiento de separación.

15 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la base del compartimiento de separación incluye la salida. En algunas realizaciones, la parte superior del compartimiento de separación incluye la salida.

Como se indicó anteriormente, generalmente el método del cuarto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional. El método puede en algunas realizaciones, después de introducir la pluralidad de células en el
20 compartimiento de separación, incluir disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada hacia al menos esencialmente de forma opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional. En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la entrada está dispuesta en la parte superior del compartimiento de separación. En tales realizaciones, la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación puede realizarse en algunas
25 realizaciones después de disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida se coloque con un ángulo de $\pm 80^\circ$ opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional. En una realización, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia al menos esencialmente de forma opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional.

30 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la célula diana se incluye en una población de células diana. En dichas realizaciones, el método puede considerarse como un método para enriquecer, purificar y/o aislar una población de células diana de una pluralidad de células.

35 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza de gravitación, antes de que el fluido, que es al menos esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimiento de separación.

40 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la salida del compartimiento de separación incluye un medio poroso. El medio poroso tiene poros de un tamaño más pequeño que el tamaño celular promedio de una célula diana típica o de las células de la población de células diana. Como resultado, el medio poroso evita, además del flujo continuo de líquido, que la célula diana salga del compartimiento de separación cuando se suspende la pluralidad de células en un flujo continuo.

45 Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, el método del cuarto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional. En algunas realizaciones respectivas, el flujo de líquido al menos esencialmente constante introducido a través de la entrada del compartimiento de separación permite crear una fuerza sobre la población de células diana que se opone a la fuerza de gravitación.

50 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el fluido introducido en el compartimiento de separación es un gas tal como nitrógeno o aire. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido acuoso. En algunas realizaciones, en el método del cuarto aspecto, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es diferente de un líquido acuoso. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido de
55 fluorocarbono.

En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el compartimiento de separación se inclina con relación a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación.

60 En algunas realizaciones en las que el método del cuarto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, el método incluye además -después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación- disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté situada orientada en un ángulo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$ en la dirección de la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el método incluye, después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación, disponer el compartimiento de
65 separación en una orientación tal que la salida esté situada orientada en un ángulo de $+ 80^\circ$ a $- 80^\circ$ opuesto a la dirección de la fuerza gravitacional.

- 5 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la pared circunferencial tiene una porción de pared que tiene una superficie al menos esencialmente recta. En algunas realizaciones, la entrada está dispuesta próxima a la salida. En algunas realizaciones, la entrada está incluida en la parte superior del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación tiene un eje longitudinal. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación tiene una anchura máxima al menos esencialmente uniforme a lo largo del eje longitudinal. La pared circunferencial del compartimiento de separación puede tener, por ejemplo, una forma al menos esencialmente cilíndrica. En algunas realizaciones, la pared circunferencial define una porción al menos esencialmente tubular del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, la pared circunferencial del compartimiento de separación contiene una parte que contiene un área transversal que aumenta a lo largo de su eje.
- 10 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el compartimiento de separación está incluido en una carcasa.
- 15 En algunas realizaciones, cuando el método del cuarto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, el método incluye además disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida quede posicionada orientada en un ángulo de $+80^\circ$ a -80° con relación a la fuerza de gravitación, antes de que el fluido, que es al menos esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimiento de separación. En una realización, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia al menos esencialmente la dirección de la fuerza gravitacional, antes de que el fluido, que es al menos esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimiento de separación.
- 20 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el compartimiento de separación tiene un eje longitudinal, y la salida del compartimiento de separación está dispuesta al menos esencialmente en el eje longitudinal. Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada, al menos esencialmente, en la dirección u opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional. En algunas de estas realizaciones, disponer el compartimiento de separación en tal orientación incluye poner el compartimiento de separación en una posición en la que el eje longitudinal está al menos esencialmente paralelo a la fuerza gravitacional.
- 25 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida quede posicionada orientada en un ángulo de $+80^\circ$ a -80° en la dirección de la fuerza gravitacional o en un ángulo de $+80^\circ$ a -80° opuesto a la dirección de la fuerza gravitacional incluye girar el compartimiento de separación, por ejemplo esencialmente en aproximadamente 180° .
- 30 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el compartimiento de separación incluye una sola entrada. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye una pluralidad de entradas. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye dos entradas. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye dos o más entradas, una de las cuales está dispuesta próxima a la salida. En tales realizaciones, la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación se puede llevar a cabo después de disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada hacia al menos esencialmente la dirección de la fuerza gravitacional.
- 35 En algunas realizaciones, el método del cuarto aspecto incluye agitar el compartimiento de separación. El compartimiento de separación puede, por ejemplo, agitarse en el compartimiento de separación después de que el compartimiento de separación se haya dispuesto en una orientación en la que la salida se coloca orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional.
- 40 En algunas realizaciones, el método del cuarto aspecto incluye además recoger el líquido que abarca la célula diana y/o la población de células diana, junto con la población de células diana del compartimiento de separación.
- 45 En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, la célula diana se incluye en una muestra de fluido corporal, una muestra ambiental, una muestra de cultivo celular, una muestra de médula ósea, una muestra de aguas residuales, una muestra de comida, una muestra de leche, una muestra forense, una muestra de producción de molécula biológica, una muestra de preparación de proteína, una muestra de preparación de lípido, una muestra de preparación de carbohidrato o cualquier combinación de las mismas. La muestra de fluido corporal puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de líquido amniótico, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de lavado nasofaríngeo, una muestra de esputo, una muestra de frotis bucal, una muestra de frotis faríngeo, una muestra de frotis nasal, una muestra de lavado broncoalveolar, una muestra de secreción bronquial, una muestra de orina o cualquier combinación de los anteriores. La célula diana puede ser, por ejemplo, una célula somática, una célula madre y/o una célula progenitora. En algunas realizaciones, la célula diana puede ser una célula tumoral, una célula fetal y/o una célula embrionaria.
- 50
- 55
- 60
- 65

En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es al menos 50 veces mayor. En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es al menos 75 veces. En algunas realizaciones del método del cuarto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es de al menos 100 veces. En algunas realizaciones, el enriquecimiento es al menos 150 veces. En algunas realizaciones, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es al menos de 200 veces.

En un quinto aspecto, se proporciona un método para enriquecer, purificar y/o aislar una célula diana de una pluralidad de células. El método incluye introducir una pluralidad de células en un compartimento de separación. El compartimento de separación tiene una entrada y una salida, cada una de las cuales está acoplada de forma fluida al ambiente. La pluralidad de células se puede introducir en el compartimento de separación a través de cualquier abertura, que puede ser, por ejemplo, la entrada o la salida. El compartimento de separación está definido por una pared circunferencial, una base y una parte superior. Dentro del compartimento de separación, la base y la parte superior están dispuestas en una relación al menos esencialmente opuesta entre sí. La base y la parte superior pueden estar dispuestas, por ejemplo, en dos extremos del compartimento de separación, los cuales están en relación opuesta. La base del compartimento de separación incluye la salida. La salida incluye un medio poroso. Los poros del medio poroso son de un tamaño que es más pequeño que el tamaño de la célula diana que se va a enriquecer, purificar y/o aislar. El método también incluye introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación. El método incluye además permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimento de separación a través de la salida. De ese modo, la pluralidad de células se suspende en un flujo continuo de líquido. Como resultado, el flujo continuo de líquido evita que la célula diana se sedimente, por ejemplo, se deposite por la fuerza de gravitación. El medio poroso que se incluye en la salida evita que la célula diana salga del compartimento de separación a través de la salida. De ese modo, la célula diana se enriquece, purifica y/o aísla.

Como se indicó anteriormente, el medio poroso incluido en la salida del compartimento de separación evita, además del flujo continuo de líquido, que la célula diana salga del compartimento de separación. En algunas realizaciones, el método del quinto aspecto también incluye introducir un fluido en el compartimento de separación a través de la entrada del compartimento de separación. Este fluido es al menos esencialmente inmisible con el líquido en el compartimento de separación que abarca la célula diana. Este fluido tiene además una densidad que es menor que la densidad del líquido respectivo en el compartimento de separación. Un método de acuerdo con tales realizaciones también puede incluir permitir que el líquido que abarca la célula diana en el compartimento de separación, es decir, generalmente el líquido adecuado que se permitió entrar en el compartimento de separación, salga por la salida. Como resultado, se permite que disminuya el volumen del líquido en el compartimento de separación.

En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza de gravitación, antes de que el fluido, que al menos es esencialmente inmisible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimento de separación.

En realizaciones típicas, el método del quinto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional. En algunas de estas realizaciones, el método incluye además disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional, después de introducir la pluralidad de células en el compartimento de separación. En algunas realizaciones en las que el método del quinto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, el compartimento de separación se dispone en una orientación tal que la salida está dispuesta orientada en un ángulo de + 80° a - 80° en la dirección de la fuerza de gravitación, al tiempo que introduce el flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación. En algunas realizaciones, el compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional, mientras introduce el flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación.

En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, la célula diana se incluye en una población de células diana. En dichas realizaciones, el método puede considerarse como un método para enriquecer, purificar y/o aislar una población de células diana de una pluralidad de células.

En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza de gravitación, antes de que el fluido, que al menos es esencialmente inmisible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimento de separación.

Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, el método del quinto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional. En algunas realizaciones respectivas, el flujo de líquido al menos esencialmente constante introducido a través de la entrada del compartimento de separación permite crear una fuerza sobre la población de células diana que se opone a la fuerza de gravitación.

5 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el fluido introducido en el compartimiento de separación es un gas tal como nitrógeno o aire. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido acuoso. En algunas realizaciones, en el método del quinto aspecto, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es diferente de un líquido acuoso. En algunas realizaciones, el líquido introducido a través de la entrada del compartimiento de separación es un líquido de fluorocarbono.

10 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimiento de separación está inclinado con respecto a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación.

15 En algunas realizaciones donde el método del quinto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, el método incluye además -después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación- disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada en un ángulo de + 80° a - 80° en la dirección de la fuerza gravitacional. En algunas realizaciones, el método incluye, después de introducir la pluralidad de células en el compartimiento de separación, disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada en un ángulo de + 80° a - 80° opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional.

20 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, la pared circunferencial tiene una porción de pared que tiene una superficie al menos esencialmente recta. En algunas realizaciones, la entrada está dispuesta próxima a la salida. En algunas realizaciones, la entrada está incluida en la parte superior del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación tiene un eje longitudinal. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación tiene una anchura máxima al menos esencialmente uniforme a lo largo del eje longitudinal. La pared circunferencial del compartimiento de separación puede tener, por ejemplo, una forma al menos esencialmente cilíndrica. En algunas realizaciones, la pared circunferencial define una porción al menos esencialmente tubular del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, la pared circunferencial del compartimiento de separación contiene una parte que contiene un área transversal que aumenta a lo largo de su eje.

30 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimiento de separación está incluido en una carcasa.

35 En algunas realizaciones, cuando el método del quinto aspecto se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, el método incluye además disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida la salida esté posicionada orientada en un ángulo de + 80° a - 80° de la fuerza gravitacional, antes de que el fluido, que al menos es esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimiento de separación. En una realización, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional, antes de que el fluido, que al menos esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimiento de separación.

40 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimiento de separación tiene un eje longitudinal, y la salida del compartimiento de separación está dispuesta al menos esencialmente en el eje longitudinal. Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, el compartimiento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada hacia, al menos esencialmente, en la dirección u opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional. En algunas de estas realizaciones, disponer el compartimiento de separación en tal orientación incluye poner el compartimiento de separación en una posición en la que el eje longitudinal es al menos esencialmente paralelo a la fuerza gravitacional.

50 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida la salida esté posicionada orientada en un ángulo de + 80° a - 80° en la dirección de la fuerza gravitacional o en un ángulo de + 80° a - 80° opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional incluye girar el compartimiento de separación, por ejemplo esencialmente en aproximadamente 180°.

55 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el compartimiento de separación incluye una sola entrada. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye una pluralidad de entradas. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye dos entradas. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación incluye dos o más entradas, una de las cuales está dispuesta próxima a la salida. En tales realizaciones, la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación se puede llevar a cabo después de disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida esté posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional.

65 En algunas realizaciones, el método del quinto aspecto incluye agitar el compartimiento de separación. El compartimiento de separación puede, por ejemplo, agitarse en el compartimiento de separación después de que el compartimiento de separación se haya dispuesto en una orientación en la que la salida está posicionada orientada esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional.

En algunas realizaciones, el método del quinto aspecto incluye además recoger el líquido que abarca la célula diana, y/o la población de células diana, junto con la población de células diana del compartimento de separación.

5 En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, la célula diana se incluye en una muestra de fluido corporal, una muestra ambiental, una muestra de cultivo celular, una muestra de médula ósea, una muestra de aguas
 10 residuales, una muestra de comida, una muestra de leche, una muestra forense, una muestra de producción de molécula biológica, una muestra de preparación de proteína, una muestra de preparación de lípido, una muestra de preparación de carbohidrato o cualquier combinación de las mismas. La muestra de fluido corporal puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de líquido amniótico, una muestra de semen,
 15 una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de lavado nasofaríngeo, una muestra de esputo, una muestra de frotis bucal, una muestra de frotis faríngeo, una muestra de frotis nasal, una muestra de lavado broncoalveolar, una muestra de secreción bronquial, una muestra de orina o cualquier combinación de los anteriores. La célula diana puede ser, por ejemplo, una célula somática, una célula madre y/o una célula progenitora. En algunas realizaciones, la célula diana puede ser una célula tumoral, una célula fetal y/o una célula embrionaria.

En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana y/o la población de células diana, es al menos 50 veces. En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es al menos 75 veces. En algunas realizaciones del método del quinto aspecto, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es de al menos 100 veces. En algunas realizaciones, el enriquecimiento es al menos 150 veces. En algunas realizaciones, el enriquecimiento de la célula diana, y/o la población de células diana, es al menos de 200 veces.

El sumario de la invención descrito anteriormente no es limitante y otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra dos realizaciones para llevar a cabo un método de la invención. La **Figura 1A** representa una realización de un método para enriquecer una población de células diana usando microfiltración en combinación con al menos flujo esencialmente lineal. Inicialmente, la membrana del filtro se coloca por encima de la columna con una entrada para una corriente de alimentación en el lado opuesto de la columna. La columna se gira a continuación hacia abajo y se utiliza aire como medio inmiscible para reducir el volumen de líquido en la columna. La **Figura 1B** representa una realización de un método para enriquecer una población de células diana usando microfiltración en combinación con flujo turbulento. La columna se mantiene continuamente en una orientación donde la membrana del filtro se coloca debajo de ella. Además, la entrada para una corriente de alimentación se posiciona en el mismo extremo de la columna que la membrana del filtro. La columna permanece en posición vertical sin estar inclinada.

La **Figura 2** es una visión general de los experimentos llevados a cabo de acuerdo con los Ejemplos. En estos experimentos, a una columna se aplicaron 5 ml de sangre, en la que se habían introducido 25.000 células tumorales. Después del enriquecimiento celular de acuerdo con un método como el indicado en la Fig. 1A o la Fig. 1B, se preparó ADN total.

La **Figura 3** representa imágenes de células tumorales aisladas de acuerdo con un método de flujo "lineal" como se ilustra en la Fig. 1A (**Fig. 3A**) y de acuerdo con un método de flujo "turbulento" como se ilustra en la Fig. 1B (**Fig. 3B**). Las células se tiñeron usando CellTracker® antes de la introducción. Después del enriquecimiento, se eliminó la membrana y se obtuvieron imágenes de las células de la membrana mediante microscopía de fluorescencia.

La **Figura 4** ilustra el enriquecimiento de células PaTu, detectado mediante análisis de mutaciones. Se enriquecieron 5 ml de sangre, a la que se habían añadido 25.000 células tumorales PaTu 8988T y PaTu 8988S, en los experimentos indicados en la Fig. 2. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de KRAS para una mutación en el codón 12/13 por duplicado. LOD es el límite de detección según lo indicado por el proveedor (Qiagen AG, Alemania) del kit de pirosecuenciación.

La **Figura 5** muestra una ilustración de una columna de filtración montada en una orientación hacia abajo (**Fig. 5A**) y hacia arriba (**Fig. 5B**) de la salida del compartimento de separación. Fig. 5A: 1 = Jeringa Original Perfusor OPS de 20 ml Conexión Luer Lock Duo 2,0 x 30 mm; 2 = Portafiltro de jeringa Swinnex de 13 mm con un filtro de membrana de policarbonato hidrófilo de 5 µm de tamaño de poro, 13 mm; 3 = Aguja hueca Original Perfusor 2,0 x 30 mm (parte de 1); 4 = Venofix Luer Lock 0,8 x 20 mm; 5a = llave de paso Discofix C; 5b = llave de paso de 360°, 4 vías, azul; 6 = tubos flexibles y piezas de conexión. Fig. 5B: 1 = OPS 20 ml Conexión Luer Lock Duo (supra); 2 = Portafiltro de jeringa Swinnex de 13 mm con un filtro de membrana de policarbonato hidrófilo de 5 µm de tamaño de poro, 13 mm (supra); 3 = Aguja hueca Original Perfusor 2,0 x 30 mm (supra); 4 = tubos flexibles y piezas de conexión (supra).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al enriquecimiento y/o aislamiento de células diana que están incluidas en una pluralidad de células. La expresión "célula diana" o "célula deseada" o "célula de interés" como se usa se refiere a cualquier célula que se puede encontrar o poner en suspensión. Una célula diana puede ser una célula epitelial, una célula mesenquimal, una célula endotelial, una célula tumoral o una célula cancerosa, una célula infectada, una célula mutada, una célula dañada, una célula madre o cualquier otra célula de interés en una muestra de fluido como se define a continuación. En algunas realizaciones, la célula diana es de un tipo celular específico cuya presencia, número, proporción o propiedades son útiles para una evaluación diagnóstica o pronóstica del sujeto del que se recogió la muestra. El sujeto puede ser un animal, como un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es uno de entre una rata, un ratón, una cabra, un cerdo, un mono tití, un conejo y un mono. En una realización, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula rara, en relación con el entorno natural del que se recoge. Una "célula rara" o "célula diana rara" puede ser de un tipo de célula que es menor que aproximadamente 10 % o menos de aproximadamente 5 % de la población total de células nucleadas en una muestra de fluido como se define a continuación. Una célula rara puede ser, en algunas realizaciones, de un tipo de célula que es menor que aproximadamente 4 % o menos de la población total de células nucleadas. En algunas realizaciones, una célula rara es de un tipo de célula que es menor que aproximadamente 3 %, 2 % o incluso menos de 1 % de la población total de células nucleadas en una muestra de fluido como se define a continuación. Una célula rara también puede ser de un tipo de célula que está presente en menos de aproximadamente un millón de células por mililitro (ml) de muestra de fluido. En algunas realizaciones, una célula rara puede ser de un tipo de célula que está presente en menos de aproximadamente 500.000 células por mililitro de muestra de fluido. Una célula rara puede ser en algunas realizaciones de un tipo de célula que está presente en menos de aproximadamente 100.000 células, menos de 75.000 células, menos de 50.000 células, menos de 25.000 células, menos de 10.000 células, menos de 5.000 células o incluso menos que 1.000 o 500 células por mililitro (ml) de muestra de fluido. Una célula diana puede ser, por ejemplo, un tipo específico de célula rara de interés que puede identificarse y/o separarse y/o enriquecerse de otros tipos de células mediante métodos que implican un marcador o propiedad que puede estar presente o ausente en la célula diana. En algunas realizaciones, la célula diana en un método divulgado en la presente memoria es una célula tumoral, tal como una célula tumoral o cancerosa circulante. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula fetal o una célula embrionaria. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula madre.

Las células que se eliminan deseablemente, con el fin de facilitar la identificación, aislamiento, purificación y/o caracterización de una célula diana, se denominan en lo sucesivo también "células no deseadas" o "células no diana". Por ejemplo, las células sanguíneas en una muestra de sangre pueden ser células no deseadas. Una muestra de fluido como se usa en la presente memoria puede contener una pluralidad de tipos de células no diana. Las células no diana se pueden eliminar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante microfiltración, centrifugación, lisis, unión selectiva a un soporte sólido o un anticuerpo. La eliminación de células no diana de la muestra significa que al menos la mayoría de la población de células no diana se elimina de la muestra mediante la etapa de eliminación, tal como al menos aproximadamente el 70 % u 80 % de las células que no se desean, es decir células no diana. La eliminación de células no diana de la muestra puede implicar en algunas realizaciones eliminar de la muestra al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o incluso 100 % de las células no diana. Las células no diana se eliminan cuando se retiran de la muestra mediante los métodos mencionados anteriormente en esta memoria descriptiva. Por ejemplo, puede ser deseable eliminar los glóbulos rojos y glóbulos blancos de una muestra de sangre de un paciente humano que padece una enfermedad tumoral con el fin de aislar, purificar y/o enriquecer las células tumorales circulantes.

La expresión "muestra de fluido" como se usa en la presente memoria se refiere generalmente a cualquier fluido a partir del cual los componentes celulares se van a separar o analizar. Tal muestra puede ser de cualquier fuente, tal como una muestra ambiental, tal como de una masa de agua o del suelo, un organismo, un grupo de organismos de la misma especie o de diferentes especies, de una fuente de alimento o una fuente industrial. Generalmente, la muestra de fluido es una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de un fluido corporal, una muestra de células separadas o una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluyen, entre otras, muestras de sangre, plasma, suero u orina. Se pueden obtener muestras de tejido u órgano de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. En una realización, la muestra de fluido es una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre humana. Una muestra de sangre puede referirse a una muestra de sangre procesada o no procesada, es decir, puede haber sido centrifugada, filtrada, extraída o tratada de otro modo, incluida una muestra de sangre a la cual se han añadido uno o más reactivos tales como, pero sin limitarse a, anticoagulantes o estabilizantes. Un ejemplo de muestra de sangre es una capa leucocitaria que se obtiene al procesar sangre humana para obtener glóbulos blancos. Otro ejemplo de una muestra de sangre es una muestra de sangre que se ha "lavado" para eliminar los componentes del suero centrifugando la muestra para sedimentar las células, eliminando el sobrenadante del suero y volviendo a suspender las células en una solución o tampón. Otras muestras de sangre incluyen muestras de sangre del cordón umbilical, aspirados de médula ósea, sangre interna o sangre periférica. Una muestra de sangre puede ser de cualquier volumen y puede ser de cualquier sujeto, como un animal, incluido un ser humano. En algunas realizaciones, la muestra de fluido es una muestra de sangre completa. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano, tal como un paciente humano que padece un tumor. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre periférica.

La pluralidad de células puede originarse a partir de cualquier muestra deseada. La muestra puede ser de cualquier origen. Por ejemplo, puede estar obtenerse, sin limitarse a, seres humanos, animales, plantas, bacterias, virus, esporas, hongos o protozoos, o de materiales orgánicos o inorgánicos de origen sintético o biológico. Por consiguiente, cualquiera de las siguientes muestras seleccionadas de, pero sin limitarse a, el grupo que consiste en una muestra de suelo, una muestra de aire, una muestra ambiental, una muestra de cultivo celular, una muestra de médula ósea, una muestra de lluvia, una muestra de precipitación, una muestra de aguas residuales, una muestra de agua subterránea, una muestra de abrasión, una muestra arqueológica, una muestra de alimentos, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina, una muestra de heces, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de lavado nasofaríngeo, una muestra de esputo, una muestra de frotis bucal, una muestra frotis faríngeo, una muestra de frotis nasal, una muestra de lavado broncoalveolar, una muestra de secreción bronquial, una muestra de leche, una muestra de líquido amniótico, una muestra de biopsia, una muestra de cáncer, una muestra de tumor, una muestra de tejido, una muestra de célula, una muestra de cultivo celular, una muestra de lisado celular, una muestra de cultivo de virus, una muestra de uñas, una muestra de cabello, una muestra de piel, una muestra forense, una muestra de infección, una muestra de infección nosocomial, una muestra de producción, una muestra de preparación de un fármaco, una muestra de producción de molécula biológica, una muestra de preparación de proteína, una muestra de preparación de lípido, una muestra de preparación de carbohidrato, una muestra espacial, una muestra extraterrestre o cualquier combinación de los mismos se pueden procesar en el método. Si se desea, una muestra respectiva puede haber sido preprocesada en cualquier grado. Como ejemplo ilustrativo, una muestra de tejido puede haber sido digerida, homogeneizada o centrifugada antes de ser utilizada con el dispositivo de la presente invención. La muestra puede además haberse preparado en forma de un fluido, tal como una solución. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una solución o una suspensión de un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un aminoácido, una proteína, un polímero sintético, una composición bioquímica, una composición química orgánica, una composición química inorgánica, un metal, un lípido, un carbohidrato, un producto químico combinatorio, una molécula candidato a fármaco, una molécula de fármaco, un metabolito de fármaco o cualquiera de sus combinaciones. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una suspensión de un metal, una suspensión de aleación de metal y una solución de un ion metálico o cualquier combinación de los mismos, así como una suspensión de una célula, un virus, un microorganismo, un patógeno, un compuesto radioactivo o cualquiera de sus combinaciones. Se entiende que una muestra puede incluir además cualquier combinación de los ejemplos mencionados anteriormente.

Un "glóbulo blanco" como se usa en la presente memoria significa un leucocito, o una célula del linaje hematopoyético que no es un reticulocito o plaqueta y que se puede encontrar en la sangre de un animal o se humano. Un leucocito puede ser, por ejemplo, un linfocito citolítico natural (célula NK) y un linfocito tal como un linfocito B (célula B) o un linfocito T (célula T). Un leucocito también puede incluir una célula fagocítica, tal como un monocito, un macrófago y un granulocito, incluyendo un basófilo, un eosinófilo y un neutrófilo. Un leucocito también puede ser un mastocito.

Un "glóbulo rojo" como se usa en la presente memoria es un eritrocito. A menos que se mencione un glóbulo rojo nucleado o glóbulo rojo nucleado fetal como se usa en la presente memoria, se usa glóbulo rojo para referirse a un glóbulo rojo no nucleado.

"Células neoplásicas" o "células tumorales" o "células cancerosas" como se usan en la presente memoria significan células que eran parte de un tumor o la progenie de tales células. Estas células tienden a mostrar una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal y pueden ser benignas o malignas. Las células cancerosas a diferencia de las células tumorales benignas exhiben las propiedades de invasión y metástasis y son altamente anaplásicas. Las células cancerosas incluyen las dos categorías generales de carcinoma y sarcoma.

Un "tumor" o "neoplasia" es un crecimiento anormal de tejido como consecuencia de una multiplicación de células incontrolada y progresiva y que no cumple ninguna función fisiológica.

Un "cáncer" es cualquiera de varios neoplasmas malignos caracterizados por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y metastatizar en nuevos sitios del cuerpo.

Una "célula maligna" como se usa en la presente memoria es una célula que tiene la propiedad de crecimiento localmente invasivo y destructivo y metástasis distal. Los ejemplos de células malignas incluyen, pero no se limitan a, células de leucemia, células de linfoma, células cancerosas de tumores sólidos, células tumorales sólidas metastásicas, por ejemplo, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, en diversos fluidos corporales, incluida la sangre, la médula ósea, el líquido ascítico, las heces, la orina, los lavados bronquiales, etc.

Una "célula cancerosa" como se usa en la presente memoria significa una célula que exhibe crecimiento desregulado y, en la mayoría de los casos, ha perdido al menos una de sus propiedades diferenciadas, tales como, pero sin limitarse a, morfología característica, comportamiento no migratorio, interacción célula-célula y comportamiento de señalización celular, expresión de proteínas y patrón de secreción, etc. En la mayoría de los

casos, las células cancerosas son de origen epitelial o mesenquimal y se pueden distinguir de las células epiteliales normales.

5 “Cáncer” se refiere a una enfermedad neoplásica cuya evolución natural es mortal. Las células cancerosas, a diferencia de las células tumorales benignas, exhiben las propiedades de invasión y metástasis y son altamente anaplásicas. Las células cancerosas incluyen las dos categorías generales de carcinoma y sarcoma.

10 Una “célula madre” como se usa en la presente memoria es una célula indiferenciada que puede dar lugar, a través de uno o más ciclos de división celular, a al menos un tipo de célula diferenciada.

15 Una “célula progenitora” es una célula comprometida pero indiferenciada que puede dar lugar, a través de uno o más ciclos de división celular a al menos un tipo de célula diferenciada. Generalmente, una célula madre da lugar a una célula progenitora a través de una o más divisiones celulares en respuesta a un estímulo particular o un conjunto de estímulos, y un progenitor da lugar a uno o más tipos de células diferenciadas en respuesta a un estímulo o conjunto de estímulos en particular.

20 La expresión “célula de referencia” tal como se usa en la presente memoria significa que el tamaño y/o la densidad y/o posición espacial específica en la columna de separación y/o la concentración de la célula diana se compara con el tamaño y/o la densidad y/o posición espacial en la columna de separación y/o concentración de una célula de referencia. La “comparación”, como se usa en la presente memoria, abarca la comparación de las células diana mencionadas en la presente memoria que están incluidas en la muestra de fluido a analizar con una muestra de referencia o célula de referencia adecuada. Debe entenderse que la comparación tal como se usa en la presente memoria se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, la densidad y/o tamaño de una célula diana como se menciona en la presente memoria se compara con la densidad y/o tamaño de una célula de referencia; una concentración de una célula diana como se menciona en la presente memoria se compara con una concentración de una célula de referencia; la posición espacial en la columna de separación de la célula diana se compara con la posición espacial en la columna de separación de una célula de referencia; o una relación de la concentración de dos células diana diferentes como se menciona en la presente memoria se compara con una relación de dos células de referencia. La comparación a la que se hace referencia en los métodos de la presente invención puede llevarse a cabo de forma manual o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad o relación determinada se puede comparar con los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación por medio de un sistema experto. Por consiguiente, un diagnóstico diferencial para las enfermedades a las que se hace referencia en la presente memoria puede proporcionarse automáticamente en un formato de salida adecuado.

40 La pluralidad de células puede ser de cualquier origen e incluir cualquier tipo de células deseado. En algunas realizaciones, la pluralidad de células es una muestra de sangre. En una realización, las células diana son células fetales que deben aislarse/enriquecerse a partir de sangre materna. En una realización, las células diana son células tumorales que deben aislarse, purificarse y/o enriquecerse a partir de sangre. La invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente hallazgo de que las células vivas, en particular las células encontradas en la sangre, en un compartimiento sellado pueden estar expuestas a una combinación de filtración y un flujo de fluido, y aun así la mayoría de las células permanecen intactas y viables. Por lo tanto, las células sobreviven sin daños y pueden ser posteriormente utilizadas, incluso analizadas. El uso de sistemas de filtración se ha evitado hasta ahora para enriquecer y/o aislar células diana. Se sabe, por ejemplo, que el uso de células agitadas para reducir el volumen de una solución de proteína implica la obstrucción de la membrana y, por lo tanto, se usan sistemas de membrana complejos relativos para evitar la agregación de proteínas. Por lo tanto, la configuración de células agitadas se ha considerado hasta ahora como no adecuada para aplicaciones que implican células vivas.

50 Mediante el uso del término “enriquecido” en referencia a una célula, un polipéptido o un ácido nucleico se entiende que la célula específica, que incluye la población celular, o la secuencia específica de aminoácidos/nucleótidos, constituye una fracción significativamente mayor (2 - 5 veces) del número total de células o secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos presentes en la muestra de interés que en la fuente natural de la que se obtuvo la muestra. El polipéptido, un ácido nucleico o una célula también pueden constituir una fracción significativamente mayor que en un organismo normal o enfermo o que en células normales o enfermas o en las células de las que se obtuvo la secuencia. Esto podría ser causado por la reducción preferencial en la cantidad de otras secuencias de aminoácidos/nucleótidos o células presentes, o por un aumento preferencial en la cantidad de la secuencia de aminoácidos/nucleótidos específica o célula de interés, o por una combinación de los dos. Sin embargo, debe observarse que enriquecido no implica que no haya otras células, secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos presentes. El término simplemente define que la cantidad relativa de la secuencia de interés ha aumentado significativamente. El término significativo aquí se usa para indicar que el nivel de aumento es útil para la persona que logra tal aumento, y generalmente significa un aumento relativo respecto a otras secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de al menos 2 veces, por ejemplo al menos aproximadamente de 5 a 10 veces o incluso más. El término está destinado a abarcar solo aquellas situaciones en las que el hombre ha intervenido para aumentar la proporción de la secuencia de aminoácidos, secuencia de nucleótidos o célula deseadas.

Los términos “aislar” y “aislando” indican que la célula o células, o el péptido o péptidos o molécula o moléculas de ácido nucleico se están eliminando de su/su entorno fisiológico normal, por ejemplo, una fuente natural, o que se sintetiza un péptido o ácido nucleico.

5 El término “aislar” significa extraer el componente de la muestra deseado, por ejemplo, una célula diana, a partir de una muestra de fluido. En los métodos de la invención, se enriquece una muestra en cuanto a las células diana de interés mediante una combinación ventajosa de varios métodos de separación que eliminan de la muestra con alta especificidad otros componentes celulares no deseados, tales como células sanguíneas en una muestra de sangre. Los métodos de la presente invención usan por un lado un enfoque negativo o de agotamiento para aislar células
10 diana de una muestra de fluido. Las células tales como las células sanguíneas con un tamaño más bajo y una mayor densidad pueden lavarse a través de la membrana porosa, en algunas realizaciones al menos esencialmente de manera completa, y de este modo se eliminan de forma eficaz de la muestra de fluido. Por el contrario, el flujo de salida de las células diana de la columna de separación se evita mediante un medio poroso con un tamaño de poro específico. Un flujo lineal de flujo turbulento puede servir como una fuerza ascendente para las células que se
15 mantienen en una posición espacial específica dentro de la columna, en dependencia de su densidad. “Aislar” como se menciona en la presente memoria también significa que más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % o incluso más del 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de las células diana en una muestra, se aíslan mediante un método descrito en la presente memoria. Esto se puede determinar añadiendo una muestra con un número conocido de células diana para determinar cuántas células se recuperan para la detección; como norma,
20 la eficacia de la recuperación puede determinarse añadiendo a una muestra, por ejemplo, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 células diana y determinar cuántas de esas células se detectan mediante un proceso de aislamiento/enriquecimiento divulgado en la presente memoria.

El uso del término “aislado” indica además que una secuencia o célula natural se ha eliminado de su entorno normal. Por lo tanto, una secuencia puede estar en una solución libre de células o situada en un entorno celular diferente. Una célula aislada o células aisladas pueden incluirse, por ejemplo, en un medio diferente tal como una solución acuosa que el proporcionado originalmente, o colocarse en un entorno fisiológico diferente. Generalmente, las células, péptidos o molécula(s) de ácido nucleico aislados constituyen una fracción superior de las células totales, péptidos o molécula(s) de ácido nucleico presentes en su entorno, por ejemplo, solución/suspensión según
30 corresponda, que en el entorno del que se obtuvieron. Por “aislado” en referencia a un polipéptido o molécula de ácido nucleico se entiende un polímero de aminoácidos (2 o más aminoácidos) o nucleótidos acoplados entre sí, incluido un polipéptido o molécula de ácido nucleico que se aísla de una fuente natural o que es sintetizado. El término “aislado” no implica que la secuencia sea la única cadena de aminoácidos o cadena de nucleótidos presente, sino que está esencialmente exenta, por ejemplo, aproximadamente 90 - 95 % puro o más, de por ejemplo
35 un material no aminoácido y/o material no ácido nucleico, respectivamente, asociados de forma natural con este.

El aislamiento de una población de células deseada puede incluir en algunas realizaciones técnicas adicionales de enriquecimiento celular tales como centrifugación, filtración o cromatografía celular. En algunas realizaciones, el aislamiento de una población de células deseada también puede incluir el uso de un kit de aislamiento de células
40 comercializado.

En algunas realizaciones se purifican células diana que están incluidas en una pluralidad de células. El término “purificado” se entiende que es una indicación relativa en comparación con el entorno original de la célula, representando por lo tanto una indicación de que la célula es relativamente más pura que en el entorno natural. Por
45 lo tanto, incluye, pero no solo se refiere a, un valor absoluto en el sentido de pureza absoluta de otras células (como una población celular homogénea). Comparado con el nivel natural, el nivel después de purificar la célula generalmente será al menos 2-5 veces mayor (por ejemplo, en términos de células/ml). Se contempla expresamente la purificación de al menos un orden de magnitud, tal como aproximadamente dos o tres órdenes, que incluye, por ejemplo, aproximadamente cuatro o cinco órdenes de magnitud. Puede desearse obtener la célula al menos
50 esencialmente libre de contaminación, en particular libre de otras células, en un nivel funcionalmente significativo, por ejemplo, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o 99 % puro. Con respecto a un ácido nucleico, un péptido o una proteína, lo anterior se aplica mutatis mutandis. En este caso, la purificación del ácido nucleico, péptido o proteína será, por ejemplo, generalmente al menos 2-5 veces mayor (por ejemplo, en términos de mg/ml).

55 “Separación”, como se usa en la presente memoria, significa un proceso en el que uno o más componentes celulares, tales como una célula diana y una célula no deseada están espacialmente separados entre sí o de uno o más componentes de una muestra. Se puede llevar a cabo una separación de manera que uno o más componentes de interés se trasloquen o se retengan en una o más áreas de un aparato de separación tal como un compartimiento de separación, por ejemplo, una columna de separación, y al menos algunos de los componentes restantes se
60 trasloquen fuera del área o áreas donde uno o más componentes de la muestra de interés se traslocan y/o permanecen en, o en el que uno o más componentes de la muestra se retienen en una o más áreas y al menos algunos de los componentes restantes se eliminan del área o áreas. En otra alternativa, uno o más componentes de una muestra pueden ser traslocados y/o retenidos en una o más áreas y uno o más componentes de la muestra pueden ser eliminados del área o áreas. También es posible provocar la traslocación de uno o más componentes de la muestra a una o más áreas y uno o más componentes de la muestra de interés o uno o más componentes de una muestra a una o más áreas diferentes. La separación se puede lograr mediante, por ejemplo, filtración,
65

preferiblemente microfiltración, o el uso de fuerzas físicas, químicas, eléctricas o magnéticas. Los ejemplos no limitantes de fuerzas que se pueden usar en las separaciones son la gravedad, el flujo másico, las fuerzas dieléctricas, las fuerzas dieléctricas de la onda móvil y las fuerzas electromagnéticas.

5 El término “sujeto” como se usa en la presente memoria, también denominado como un individuo, se refiere a un ser humano o animal no humano, generalmente un mamífero. Un sujeto puede ser de una especie de mamífero, como un conejo, un ratón, una rata, un conejillo de Indias, un hámster, un perro, un gato, un cerdo, una vaca, una cabra, una oveja, un caballo, un mono, un simio o un humano. Por lo tanto, los métodos y usos descritos en la presente memoria son, entre otros, aplicables para aislar células encontradas tanto en enfermedades humanas como
10 veterinarias. Una muestra que incluye una pluralidad de células puede haberse obtenido de un sujeto. Por lo tanto, se entiende que las conclusiones extraídas de la presencia o el número de células en la muestra y las decisiones basadas en ellas se refieren al sujeto del que se ha obtenido la muestra. Además, aunque un sujeto es generalmente un organismo vivo, un método o uso descrito en este documento también se puede utilizar en el análisis post-mortem. Cuando el sujeto es un ser humano que está recibiendo atención médica por una enfermedad o afección, también se le denomina un “paciente”.
15

Una “columna” o “cámara” como se usa en la presente memoria significa una estructura que es capaz de contener una muestra de fluido en la que se puede realizar al menos una etapa de procesamiento tal como una etapa de separación. La columna o cámara puede tener varias dimensiones y su volumen puede variar entre unos pocos microlitros y aproximadamente 0,5 litros o más.
20

Un “filtro” es una estructura que incluye uno o más poros o ranuras de dimensiones particulares que pueden estar dentro de un rango particular que permite el paso de algunos componentes de la muestra, por ejemplo, células, pero no otras de un lado del filtro al otro, según el tamaño, forma y/o deformabilidad de las partículas o células. Un filtro puede estar hecho de cualquier material adecuado que evite el paso de partículas insolubles, tales como metal, cerámica, vidrio, silicio, plásticos, polímeros, fibras, etc. Tales filtros están comercializados.
25

El término “microfiltración” como se usa en la presente memoria significa un proceso de filtración técnica de membrana que elimina contaminantes o células de un fluido al pasar a través de una membrana microporosa. Un intervalo de tamaño de poro de membrana de microfiltración típico es de 0,1 a 10 micrómetros (μm). En consecuencia, la microfiltración utiliza el mismo principio de separación basado en el tamaño. La microfiltración puede usar, por ejemplo, un sistema presurizado. La microfiltración como se usa en la presente memoria es el proceso de filtración con un filtro de tamaño micrométrico. Los filtros pueden estar en una configuración sumergida o en una configuración de recipiente a presión. Pueden ser fibras huecas, láminas planas, tubulares, enrolladas en espiral, fibras finas huecas u obtenidas por bombardeo iónico. Estos filtros son porosos y permiten pasar a su través agua, especies monovalentes (Na^+ , Cl^-), materia orgánica disuelta, pequeños coloides, restos de células y células pequeñas, pero no permiten el paso de células más grandes.
30
35

Una “unidad de filtración” como se menciona en la presente memoria es una realización de un compartimento de separación. El término se refiere a una cámara de filtración y a las entradas, válvulas y conductos asociados que permiten que la muestra y las soluciones se introduzcan en la cámara de filtración y los componentes de la muestra salgan de la cámara de filtración. Una unidad de filtración también incluye opcionalmente un depósito de carga.
40

Un “conducto” como se usa en la presente memoria es un medio para transferir fluido entre diferentes ubicaciones. El fluido puede, por ejemplo, ser transportado a través de un conducto desde un contenedor o bomba a un compartimento de separación, tal como una cámara, columna o unidad de microfiltración. Preferiblemente, un conducto se acopla directa o indirectamente a un orificio en la carcasa de una cámara. Un conducto puede comprender cualquier material que permita el paso de un fluido a través de él. Los conductos pueden comprender tubos tales como, por ejemplo, de caucho, teflón o tubos Tygon. Los conductos también se pueden moldear a partir de un polímero o plástico, o taladrar, grabar o maquinar en un sustrato de metal, vidrio o cerámica. Los conductos pueden, por lo tanto, formar parte integral de las estructuras tales como, por ejemplo, un cartucho. Un conducto puede ser de cualquier dimensión, pero preferiblemente varía de 10 micrómetros a 5 milímetros de diámetro interno. Un conducto está preferiblemente encerrado, aparte de los puntos de entrada y salida de fluido, o puede estar abierto en su superficie superior, como un conducto de tipo canal.
45
50
55

La expresión “unidad de microfiltración”, como se usa en la presente memoria, se refiere en general a una realización del compartimento de separación. La expresión significa en un método divulgado en la presente memoria usar al menos flujo esencialmente lineal, una unidad de microfiltración que incluye al menos (i) una entrada en el extremo superior, (ii) un flujo de salida en el extremo inferior, y (iii) un medio poroso tal como un filtro de membrana en el extremo inferior. En el método de la invención que usa flujo turbulento, la unidad de microfiltración incluye (i) un medio poroso tal como un filtro de membrana, (ii) una entrada, y (iii) un orificio que permite la ventilación. Detalles adicionales de una unidad de microfiltración y medios adicionales que se pueden usar en un método de la invención se indican en otra parte de la presente memoria.
60

Un “cartucho” es una estructura que incluye una o más cámaras que forman parte de un sistema manual o automático y uno o más conductos para el transporte de fluido hacia o desde al menos una cámara. Un cartucho
65

puede incluir o no uno o más chips.

5 Un “sistema automatizado para separar células diana de una muestra fluida” o un “sistema automatizado” como se usa en la presente memoria es un dispositivo que incluye una o más cámaras de filtración, medios automatizados para proporcionar flujo de fluido a través de la cámara de filtración y al menos una fuente de energía para proporcionar flujo de fluido y, opcionalmente, medios para proporcionar una fuente de señal para la generación de fuerzas en chips activos. Un sistema automatizado de la presente invención también puede incluir opcionalmente uno o más chips activos, cámaras de separación o columnas de separación.

10 Un “orificio” es una abertura en la carcasa de una cámara o columna a través del cual una muestra de fluido tal como un líquido o un gas que incluye aire puede entrar o salir de la cámara o columna. Por ejemplo, un orificio puede permitir la ventilación de una unidad de microfiltración como se usa en un método divulgado en la presente memoria. También una entrada o una salida como se usa en la presente memoria es en algunas realizaciones un orificio. Un orificio puede ser de cualquier dimensión. Generalmente, un orificio tiene una forma y un tamaño que
15 permite dispensar una muestra en una cámara bombeando un fluido a través de un conducto, o por medio de una pipeta, jeringa u otro medio para dispensar o transportar una muestra.

20 El término “entrada”, como se usa en la presente memoria, indica un punto de comunicación con el ambiente que permite que un material, tal como una muestra, una solución, un tampón o un reactivo entren en el compartimiento de separación, tal como una columna o cámara de fluido. Una entrada puede ser un orificio de una cámara o columna, o puede ser una abertura en un conducto que conduce, directa o indirectamente, a una cámara o columna de un sistema automatizado. En algunas realizaciones, el flujo de entrada puede cerrarse.

25 El término “salida” tal como se usa en la presente memoria significa un punto de comunicación con el ambiente que permite que un material, tal como una muestra, los componentes de la muestra o los reactivos salgan de una cámara o columna fluida. Los componentes de la muestra y los reactivos que salen de una cámara o columna pueden ser residuos, es decir, componentes de la muestra que no se van a utilizar más, o pueden ser componentes de la muestra o reactivos que se recuperarán, como, por ejemplo, reactivos reutilizables o eluatos o fracciones que incluyen células diana para ser analizarlas o manipuladas. Una salida puede ser un orificio de una cámara, pero
30 preferiblemente es una abertura en un conducto que, directa o indirectamente, procede de una cámara de un sistema automatizado. En algunas realizaciones, el flujo de salida puede cerrarse.

35 Una “bomba” como se usa en la presente memoria puede ser una bomba de presión o una bomba de vacío. Preferiblemente, se usa una bomba de presión automatizada en los métodos de la invención. Sin embargo, también se puede usar una jeringa como una “bomba de presión”.

40 El término “agitador” como se usa en la presente memoria significa cualquier agitador que se puede usar para agitar la columna de microfiltración tal como se utiliza en los métodos de la invención. Por ejemplo, los agitadores de laboratorio que están comercializados pueden usarse para este fin.

45 En un método de la invención, generalmente se proporciona un compartimiento de separación. El compartimiento de separación puede incluirse en cualquier dispositivo deseado. En algunas realizaciones, el dispositivo se selecciona para permitir la rotación o la inversión del compartimiento de separación. El compartimiento de separación puede ser, por ejemplo, una columna de filtración o una cámara de filtración. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está incluido dentro de un alojamiento. Tal alojamiento también puede adaptarse para adoptar una pluralidad de compartimientos de separación. Adicionalmente, durante la disposición de una pluralidad de dichos dispositivos, la carcasa puede permitir que la pluralidad se asegure adicionalmente entre sí.

50 El compartimiento de separación generalmente tiene una pared circunferencial, una base y una parte superior. La base y la parte superior están dispuestas en una relación opuesta. La expresión “relación opuesta” se refiere a la dirección de la materia que podría fluir a través del compartimiento de separación si la parte superior y la base incluyesen una entrada y una salida, respectivamente. La parte superior y la base pueden estar dispuestas, por ejemplo, en relación opuesta en un eje del compartimiento de separación. En consecuencia, la parte superior y la base pueden estar dispuestas en cualquier ángulo con respecto a la otra, siempre que no estén orientadas en la
55 misma dirección. La base y la parte superior están dispuestas generalmente en al menos extremos esencialmente opuestos del compartimiento de separación. La base y la parte superior están en algunas realizaciones dispuestas en extremos opuestos a lo largo de un eje longitudinal del compartimiento de separación.

60 La pared circunferencial es generalmente una pared recta. La pared circunferencial tiene una superficie interna. Del mismo modo, la base y la parte superior tienen una superficie interna. La superficie interna de la base es generalmente una superficie recta. Del mismo modo, la superficie interna de la parte superior suele ser una superficie recta. Estas superficies internas se pueden considerar que definen el interior del compartimiento de separación, ya que entran en contacto directo con el fluido que se introduce en el compartimiento de separación. Las superficies internas también entran en contacto con las células que deben enriquecerse, aislarse o purificarse, así
65 como con la pluralidad de células, tales como una suspensión celular, a partir de la cual se deben enriquecer, aislar o purificar las células. El interior de la cámara de procesamiento de muestra significa cualquier espacio o materia

que está en contacto directo con el fluido que se introduce en la cámara de procesamiento de la muestra cuando cualquier entrada o salida está cerrada. También se refiere a cualquier espacio o materia que pueda incluirse en el espacio o la materia que entra en contacto con dicho fluido. Por consiguiente, la expresión “pared interna”, cuando se usa en relación con el compartimento de separación, se refiere a las áreas superficiales que están orientadas hacia el interior de la cámara de procesamiento de muestras ya que pueden entrar en contacto con el fluido que se introduce cuando está cerrada cualquier entrada o salida. Cualquier entrada o salida puede actuar para permitir la comunicación fluida entre el interior del compartimento de separación y el ambiente, es decir, el entorno circundante. El término “ambiente” se refiere al exterior (frente al interior) del compartimento de separación y, por lo tanto, significa cualquier materia que no se encuentre dentro o que esté en contacto con el interior del compartimento de separación. Por lo tanto, se refiere a cualquier espacio o materia que no esté en contacto directo con el fluido que se introduce en el compartimento de separación cuando está cerrada cualquier entrada o salida.

El compartimento de separación puede incluir cualquier material deseado. Generalmente, las paredes del compartimento de separación son sólidas y pueden permanecer intactas durante todo el proceso a realizar en ellas. Si se desea, se selecciona un material incluido en el compartimento de separación para soportar un fluido tal como un medio acuoso o un líquido de perfluorocarbono que se pretende usar. Los ejemplos de materiales que son generalmente adecuados para el uso de fluidos acuosos incluyen, pero no se limitan a, materiales inorgánicos y polímeros naturales o sintéticos. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, polipropileno, poliisopreno, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), poliisobutileno, tereftalato de polietileno (PET), poliácridatos (por ejemplo, polimetilmetacrilato (PMMA)), copolímeros de etileno-acetato de vinilo (EVA), fenol, resinas de formaldehído, resinas epoxi, poli(N-propargilamidas), poli(O-propargilésteres) y polisiloxanos. Dos ejemplos ilustrativos de materiales inorgánicos que se pueden usar en la mayoría de las condiciones son vidrio y una lámina de metal. Una lámina de metal respectiva puede ser, por ejemplo, una lámina de aluminio. Una lámina de metal puede recubrirse opcionalmente con una capa de polímero tal como polietileno o polipropileno, por ejemplo, si se desea evitar la oxidación.

Si se desea, cualquier parte del compartimento de separación, que incluye la pared circunferencial, la parte superior y/o inferior, puede incluir o ser de material translúcido tal como vidrio, cuarzo o un material plástico. Los materiales plásticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polimetilmetacrilatos (por ejemplo, polimetilmetacrilato (PMMA) o metacrilatos a base de carbazol y dimetacrilatos), poliestireno, policarbonato y olefinas policíclicas. Otro ejemplo ilustrativo de un material que es adicionalmente adecuado para la generación de un sustrato que permite que la luz pase solo hasta cierto grado es el fluoro-etileno-propileno (FEP).

Se entiende que el interior del compartimento de separación está definido por la pared circunferencial, que puede ser de cualquier grosor. El compartimento de separación puede tener cualquier forma deseada, incluyendo recto, doblado o serpenteante (o de otro modo sinuoso) y puede incluir uno o más pliegues o dobleces. En realizaciones típicas, el compartimento de separación tiene un eje longitudinal. El compartimento de separación puede poseer una sección transversal de cualquier perfil deseado, tal como ser un cuboide (por ejemplo, con un perfil de forma rectangular o cuadrada) o, en otra alternativa, una semiesfera o cualquier otro perfil irregular adecuado. El perfil del compartimento de separación también puede cambiar su forma a lo largo de una longitud del compartimento de separación, por ejemplo gradualmente o escalonadamente. La pared circunferencial, la base y la parte superior pueden ser de cualquier geometría y dimensión. Por ejemplo, pueden ser curvas, redondas, rectas o planas. El compartimento de separación tiene en algunas realizaciones un eje, por ejemplo un eje longitudinal.

El compartimento de separación puede ser de cualquier volumen deseado. Por ejemplo, puede acomodar un volumen de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 1000 ml, incluyendo un volumen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml. En algunas realizaciones, el compartimento de separación puede tener un volumen de aproximadamente 10 μ l a 100 μ l. Cuando se introduce fluido en el compartimento, solo parte del volumen de la cámara de reacción de muestra puede llenarse con el fluido respectivo. El resto del volumen de la cámara puede estar ocupado, por ejemplo, por otro fluido, tal como aire o un gas inerte.

Como se indicó anteriormente, el compartimento de separación tiene una o más entradas y una o más salidas. A través de la entrada, una muestra de células puede ser dispuesta en, o entrar, en el compartimento de separación. En algunas realizaciones, una muestra respectiva de células, o una porción de selección de la muestra de células, también se puede eliminar de, o dejar, el compartimento de muestra a través de una entrada. Normalmente, se permite que materia como el fluido salga del compartimento de separación a través de una salida. La entrada y la salida pueden estar ubicadas en cualquier posición deseada con respecto a un punto o región seleccionada del compartimento de muestra. La entrada puede estar ubicada, por ejemplo, en la parte superior del compartimento de muestras. La salida puede estar, por ejemplo, ubicada en la parte inferior del compartimento de muestras. Los términos “encima de”, “en la parte superior”, “debajo”, “en la parte inferior”, “debajo” y “arriba” como se usan en la presente memoria se refieren a una posición donde el compartimento de separación está dispuesto de una posición donde una salida del compartimento de separación apunta en la dirección de la gravedad. En algunas realizaciones, la salida está dispuesta en la dirección longitudinal del compartimento de separación, es decir, en la dirección que corresponde a la longitud del compartimento de separación. En una realización, la salida está dispuesta en el eje longitudinal del compartimento de separación. En algunas realizaciones, una entrada o una salida del compartimento de muestras está adaptada para ser utilizada como un orificio que permite la ventilación del

compartimiento de separación. El orificio en la microfiltración permite tanto la entrada de aire como la salida de aire, es decir, la admisión de aire y la desaireación.

La entrada y la salida pueden ser de cualquier forma y dimensión. Los ejemplos de una entrada y una salida incluyen, pero no se limitan a, una válvula, una cámara, un cuello o un canal. En algunas realizaciones, la entrada es una abertura. Una abertura respectiva puede ser de cualquier forma, perfil y diámetro. El compartimiento de separación puede incluir además un sello para la entrada y/o un sello para la salida. En una de las realizaciones donde la entrada es una abertura, el compartimiento de separación incluye un sello para la abertura respectiva. Del mismo modo, si la salida es una abertura, el compartimiento de separación puede incluir un sello para la abertura respectiva. Un sello particular, que puede ser extraíble del compartimiento de separación, puede, por ejemplo, evitar que la materia entre o salga del compartimiento de muestras. Un sello particular puede incluir cualquier material deseado. Tres ejemplos puramente ilustrativos de materiales que se pueden usar son vidrio, polipropileno (PP) y politetrafluoroetileno (PTFE, Teflón). La entrada del compartimiento de separación puede ser completamente sellable.

En algunas realizaciones, la entrada está dispuesta en la parte inferior y la salida está dispuesta en la parte superior del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, la disposición de entrada y salida permite la admisión de fluido, incluyendo por ejemplo aire, a través de la entrada del compartimiento de separación en el extremo opuesto del sustrato poroso y la salida, que permite la salida de fluido. Por ejemplo, el compartimiento de separación puede incluir (i) una entrada en el extremo superior, (ii) una salida en el extremo inferior, y (iii) un filtro de membrana en el extremo inferior. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación puede incluir (i) una entrada en el extremo inferior, (ii) una salida en el extremo superior, y (iii) un filtro de membrana en el extremo superior. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación puede incluir (i) una entrada en el extremo superior, (ii) una salida en el extremo inferior, y (iii) un filtro de membrana en el extremo inferior. Como se indicó anteriormente, un aparato, en el que se incluye el compartimiento de separación, puede incluir otros componentes. Un aparato particular puede incluir, por ejemplo, una bomba, que está conectada de manera fluida a la entrada, por ejemplo a través de un conducto. Tal disposición permite que el fluido, que incluye un gas, sea admitido en el compartimiento de separación a través de la entrada. Además, el compartimiento de separación puede agitarse en algunas realizaciones en el transcurso del método de enriquecimiento/aislamiento de una población de células diana mediante un agitador que está incluido en un aparato particular. Como un ejemplo adicional, el aparato puede incluir uno o más dispositivos para la recogida de eluatos o fracciones. Además, se pueden incluir en un aparato particular dispositivos para llevar a cabo cualquier parte deseada de un método para usar el compartimiento de separación de una manera automatizada.

La salida, o en realizaciones en las que se incluye una pluralidad de salidas en el compartimiento de separación al menos una salida, en algunas realizaciones, incluye un medio poroso, que generalmente es de naturaleza sólida. El medio poroso tiene poros de un tamaño promedio definido. El tamaño promedio de los poros es más pequeño que el tamaño celular promedio de las células de la población de células diana para enriquecer, aislar y/o purificar. Como ejemplo ilustrativo, cuando las células que se van a aislar tienen un ancho promedio máximo de aproximadamente 7 μm o superior, los poros del medio poroso pueden tener, por ejemplo, un ancho máximo promedio de aproximadamente 5 μm . El medio poroso también puede tener poros de una desviación máxima definida del tamaño promedio. Esto puede ser ventajoso para evitar que las células de la población de células diana escapen del compartimiento de separación a través de poros particularmente grandes.

En algunas realizaciones, el medio poroso es un filtro tal como un filtro de membrana. El medio poroso puede ser, por ejemplo, una película microporosa. Un filtro de membrana particular está comercializado, por ejemplo como un filtro de disco de membrana. El medio poroso retiene partículas, microorganismos o células más grandes que su tamaño de poro por captura de superficie. En algunas realizaciones, el medio poroso es de material inorgánico. Puede, por ejemplo, incluir fibras de vidrio o incluir plata. También puede incluir material cerámico. En algunas realizaciones, el medio poroso es de un material polimérico. El medio poroso puede incluir celulosa, un éster de celulosa, un acetato de celulosa, un nitrato de celulosa, politetrafluoroetileno (PTFE), fluoruro de polivinilideno (PVDF), PVC, polietersulfona (PES), polipropileno, nailon o policarbonato. En algunas realizaciones, el medio poroso como se usa en un método de la invención es una membrana de policarbonato sometida a bombardeo iónico (PCTE). Los filtros de disco de membrana PCTE (comercializados, por ejemplo, por Sterlitech y otros fabricantes) están hechos de un material de película de policarbonato fino y microporoso. Las membranas de PCTE son muy adecuadas para su uso en un análisis de sangre, así como la filtración de alta pureza o filtración general. Una membrana PCTE es generalmente una película delgada, translúcida y microporosa de policarbonato con una superficie lisa y plana.

Un "poro" tal como se usa en la presente memoria es una abertura, en particular un orificio pasante, en una superficie, tal como un filtro de membrana o microfiltro que proporciona comunicación fluida entre un lado de la superficie y el otro. Un poro puede ser de cualquier tamaño y forma. En algunas realizaciones, un poro tiene un tamaño y una forma que restringe el paso de uno o más componentes insolubles de la muestra desde un lado de un sustrato poroso, por ejemplo un filtro, al otro lado del sustrato poroso en función del tamaño, forma y deformabilidad (o falta de la misma) del componente de muestra.

Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones se permite que el volumen del líquido que abarca la población de células diana disminuya, por ejemplo, introduciendo un fluido esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana. En tales realizaciones, la posición de la salida, que incluye el medio poroso, generalmente se selecciona de modo que esté lejos en la dirección de la gravedad, con respecto a todo el compartimiento de separación, que la salida todavía esté cubierta con líquido que abarca la célula diana, si el volumen en el compartimiento de separación se ha reducido a un volumen final deseado, en el que se debe aislar la célula diana (véase también a continuación). En realizaciones en las que la base tiene una pared interna recta, esta salida puede estar localizada generalmente en cualquier parte de esta pared. En realizaciones en las que la base tiene una pared interna curva, que incluye una pared interna cóncava, tanto la posición de esta salida como la orientación exacta del compartimiento de separación pueden ajustarse para permitir que esta salida se cubra completamente con líquido si el volumen final deseado de la población de células diana se ha alcanzado, introduciendo un fluido inmiscible en el compartimiento de separación (ver también más adelante).

En algunas realizaciones, el compartimiento de separación está adaptado para permitir un modo de contraflujo. El término "contraflujo" como se usa en la presente memoria significa la aparición de flujo de fluido en direcciones diferentes, que incluyen direcciones opuestas, dentro de un aparato tal como un compartimiento de separación. Puede imaginarse que el compartimiento de separación tiene diferentes porciones, aunque de hecho define un espacio continuo, en porciones adyacentes de un aparato tal como un compartimiento de separación. Esto puede lograrse, por ejemplo, colocando la entrada utilizada para introducir un flujo de líquido en el compartimiento de separación y la salida utilizada para permitir que el flujo de líquido salga, próximas entre sí. En algunas realizaciones, que incluyen realizaciones de contraflujo, se permite que el flujo de entrada y salida de fluido se produzca en direcciones opuestas: El flujo de entrada de, por ejemplo, tampón de lavado en el compartimiento de separación y el flujo de salida de, por ejemplo, eluatos o fracciones del compartimiento de separación puede tomar direcciones opuestas, independientemente de la disposición de entrada y salida. En algunas realizaciones, la respectiva entrada y la respectiva salida usadas están dispuestas en diferentes posiciones del compartimiento de separación, tales como opuestas entre sí o desplazadas entre sí mediante un cierto ángulo, por ejemplo, desplazado axialmente. Un ejemplo de un compartimiento de separación utilizado en modo de contraflujo se representa, por ejemplo, en la Fig. 1B.

En un método de la invención, la pluralidad de células se introduce en el compartimiento de separación. Las células pueden suspenderse en cualquier medio deseado siempre que las células permanezcan viables en el medio durante el período de tiempo durante el cual se lleva a cabo el método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana. En algunas realizaciones, las células se suspenden en un medio acuoso. En algunas realizaciones, las células se suspenden en un líquido de fluorocarbono.

En un método para enriquecer y/o aislar células diana como se divulga en la presente memoria, el compartimiento de separación puede disponerse en cualquier orientación deseada cuando las células se están introduciendo en el compartimiento de separación. El compartimiento de separación tiene una cierta orientación cuando la pluralidad de células se ha introducido en el compartimiento de separación. En algunas realizaciones, la orientación del compartimiento de separación no se modifica. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación se dispone en una orientación que difiere de la orientación que tenía el compartimiento de separación cuando se estaban introduciendo las células. En esta orientación, la salida puede, en algunas realizaciones, posicionarse para estar orientada, al menos esencialmente, en la dirección de gravitación u opuesta a la dirección de la fuerza de gravitación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación puede estar inclinado en un ángulo de aproximadamente 1° a aproximadamente 90° , con respecto a la dirección de la gravedad. El compartimiento de separación puede estar inclinado, por ejemplo, en un ángulo de aproximadamente 5° a aproximadamente 85° , tal como de aproximadamente 10° a aproximadamente 75° , con respecto a la dirección de la gravedad. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación se dispone en dicha orientación. En algunas realizaciones, el compartimiento de separación ya está dispuesto en dicha orientación. Por ejemplo, puede haberse configurado de forma correspondiente antes o durante la introducción de la pluralidad de células.

En algunas realizaciones, después de la aplicación de la pluralidad de células, por ejemplo incluidas en una muestra de fluido, al compartimiento de separación, el compartimiento de separación puede colocarse verticalmente. Por ejemplo, la unidad de microfiltración puede orientarse verticalmente de manera que la entrada esté dispuesta en el extremo superior y la salida, que incluye el medio poroso, esté dispuesta en el extremo inferior. En algunas realizaciones, la unidad de microfiltración puede colocarse verticalmente de forma que el flujo de entrada se encuentre en el extremo inferior y el filtro de membrana y el flujo de salida estén en el extremo superior. En algunas realizaciones, la gravedad se usa para ayudar al proceso de enriquecimiento, purificación y/o aislamiento de una población de células diana si el compartimiento de separación se coloca verticalmente.

Antes de la aplicación al compartimiento de separación, la pluralidad de células se puede diluir, por ejemplo, en un tampón tal como un tampón de lavado y/o pretratar como se indica en otra parte de la presente memoria. En un método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana, una muestra de fluido que contiene la pluralidad de células, por ejemplo, una muestra de sangre, se carga en el compartimiento de separación. La salida puede estar cerrada para evitar fugas de muestra de fluido a través de la salida. En algunas realizaciones, el medio poroso, también llamado sustrato poroso en la presente memoria, incluido en la salida puede eliminarse

temporalmente para el proceso de carga. Después de la aplicación de la muestra de fluido a la unidad de microfiltración, la unidad de microfiltración puede llenarse con un líquido tal como un tampón de lavado, por ejemplo con un orificio tal como una entrada abierta para la ventilación. El compartimiento de separación puede entonces disponerse una posición recta, es decir, vertical.

5 En un método divulgado en la presente memoria, se permite que un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado entre en el compartimiento de separación y fluya a través del compartimiento de separación. Se permite que el líquido entre en el compartimiento de separación a través de una entrada y salga del compartimiento de separación a través de una salida (supra). Se puede aplicar un flujo turbulento de líquido, tal como un flujo
10 turbulento o al menos esencialmente lineal de tampón de lavado, a través de una entrada del compartimiento de separación. La cantidad total de líquido que se deja pasar a través del compartimiento de separación se selecciona de acuerdo con las condiciones individuales de la realización respectiva, en particular las dimensiones del compartimiento de separación, y la cantidad de células presentes en la pluralidad de células. En algunas realizaciones, se usa un volumen en el intervalo de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 2 litros de líquido.
15 Asimismo, el caudal se selecciona de acuerdo con las condiciones individuales de la realización respectiva, tales como el tamaño de poro del medio poroso, las dimensiones de la salida y del medio poroso, y el volumen del compartimiento de separación. En algunas realizaciones, se usa un caudal en el intervalo de aproximadamente 20 ml/hora a aproximadamente 500 ml/hora de líquido.

20 “Flujo turbulento” como se usa en la presente memoria significa que un fluido tal como un tampón de lavado se bombea o se inyecta en un compartimiento de separación de una manera laminar o turbulenta durante el proceso de separación. Como saben los expertos en la materia, el flujo turbulento es un tipo de flujo de fluido en el que el fluido experimenta fluctuaciones irregulares, o mezcla, en comparación con el flujo laminar o lineal, en el cual el fluido se mueve en trayectorias o capas uniformes. En el flujo turbulento, la velocidad del fluido en un punto está
25 continuamente experimentando cambios tanto en magnitud como en dirección.

“Flujo lineal” como se usa en la presente memoria significa que un fluido tal como un tampón de lavado se bombea o inyecta en un compartimiento de separación tal como una cámara, columna o unidad de microfiltración de manera
30 continua y constante durante el proceso de separación. Esto permite que los componentes de una muestra que no se retengan selectivamente en una cámara o columna sean eliminados de la cámara o columna durante el proceso de separación. Por lo general, el flujo lineal se indica en cm/hora (h). Los caudales volumétricos están indicados en ml/h o ml/minuto (min). La conversión entre el caudal lineal y volumétrico puede llevarse a cabo por los expertos en la materia usando fórmulas conocidas en la materia.

35 El líquido utilizado puede ser cualquier líquido que permita que las células se mantengan viables en el medio durante el período de tiempo durante el cual se lleva a cabo el método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana. En algunas realizaciones, el líquido es un medio acuoso. El líquido puede ser, por ejemplo, el mismo medio en el que se suspenden las células cuando se introducen en el compartimiento de separación. El líquido se seleccionará generalmente de acuerdo con los requisitos específicos de las células a las que se aplica el
40 método, en particular las células a enriquecer, purificar y/o aislar. Como dos ejemplos ilustrativos, el líquido puede ser un líquido oxigenado y/o un líquido que contiene nutrientes. El líquido puede incluir, por ejemplo, una cantidad predeterminada de un gas tal como oxígeno, nitrógeno o dióxido de carbono, de un compuesto, tal como un péptido, una proteína, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un sacárido, una vitamina, un ion o un compuesto orgánico o inorgánico de bajo peso molecular. El líquido puede incluir, por ejemplo, una cantidad
45 predeterminada de un factor seleccionado del grupo que consiste en un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, un metabolito, una hormona, un fármaco, un fármaco candidato, un profármaco, una vitamina y un antibiótico. El fluido también puede ser de una propiedad predeterminada tal como una tensión de oxígeno seleccionada, contenido de dióxido de carbono, una temperatura seleccionada o un flujo de cizalladura seleccionada. El líquido puede incluir un agente quelante tal como EDTA, por ejemplo, 1 mM del mismo. El líquido
50 también puede incluir un compuesto tampón. En la técnica se usan numerosos compuestos tampón y se pueden usar para llevar a cabo las diversas etapas del proceso descritas en la presente memoria. Los ejemplos de tampones incluyen, pero no se limitan a, soluciones de sales de fosfato, carbonato, succinato, citrato, acetato, formiato, barbiturato, oxalato, lactato, ftalato, maleato, cacodilato, borato, N-(2-acetamido)-2-amino-etanosulfonato (también llamado (ACES), ácido N-(2-hidroxietil)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (también llamado HEPES), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-propanosulfónico (también llamado HEPPS), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (también llamado PIPES), ácido (2-[Tris- (hidroximetil)-metilamino]-1-etansulfónico (también llamado TES), ácido 2-ciclohexilamino-etanosulfónico (también llamado CHES) y N-(2-acetamido) -iminodiacetato (también llamado ADA). Se puede usar cualquier contraión en estas sales, el amonio, el sodio y el potasio pueden servir como ejemplos
55 ilustrativos. Otros ejemplos de tampones incluyen, pero no se limitan a, trietanolamina, dietanolamina, etilamina, trietilamina, glicina, glicilglicina, histidina, tris(hidroximetil)aminometano (también llamado TRIS), bis-(2-hidroxietil)-imino-tris(hidroximetil)metano (también llamado BIS-TRIS) y N-[Tris(hidroximetil)-metil]-glicina (también llamado TRICINE), por nombrar algunos. Dos ejemplos ilustrativos de líquidos iónicos son 1,3-dialquilimidazolio-tetrafluoroboratos y 1,3-dialquilimidazolio-hexafluoroboratos. El líquido iónico puede ser un líquido iónico polar tal como, por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de N-butil-4-metilpiridinio, tetrafluoroborato de 1,3-dialquilimidazolio, hexafluoroborato de 1,3-dialquilimidazolio, 1-etil-3-metilimidazolio bis(pentafluoroetil)-fosfinato, 1-butil-3-metilimidazolio tetrakis(3,5-bis(trifluorometilfenil)borato, tetrabutyl-amonio
65

bis(trifluorometil)imida, trifluorometanosulfonato de etil-3-metilimidazolio, 1-butil-metilsulfato de 3-metilimidazolio, 1-n-butil-3-metilimidazolio ([bmim]) octilsulfato y tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio. El líquido iónico puede ser un líquido iónico no polar tal como, por ejemplo, 1-etil-3-metilimidazolio bis[trifluorometil]-sulfonil]amida bis(trifil)amida, 1-etil-3-metilimidazolio bis[(trifluorometil)sulfonil]-amida trifluoroacetato, 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, trihexil(tetradecil)fosfonio bis[oxalato(2-)]borato, 1-hexil-3-metilimidazolio tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, trihexil(tetradecil)-fosfonio, N"-etil-N,N,N',N'-tetrametilguanidinio, 1-butil-1-metilpirrolinino tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, 1-butil-1-metil pirrolidinio bis(trifluorometilsulfonil)imida, 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, 1-etil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida y 1-n-butil-3-metilimidazolio. En algunas realizaciones, el fluido es un medio de cultivo. En algunas realizaciones, el líquido incluye solución salina tamponada con fosfato.

La pluralidad de células está expuesta a un flujo permanente de líquido. Generalmente, las células se mantienen constantemente en suspensión, de modo que las células no pueden sedimentar. El medio poroso que se incluye en la salida evita que la población celular salga del compartimiento de separación.

En algunas realizaciones, se puede lograr un flujo de líquido usando una bomba. En la técnica se usan diversos sistemas de bombeo adecuados, generalmente basado en una bomba de presión. En algunas realizaciones, se puede aplicar una fuerza manual, por ejemplo, usando una jeringa. El caudal se seleccionará de acuerdo con el volumen del compartimiento de separación y el tipo de células que se aislarán. En realizaciones típicas, el caudal se selecciona para que sea lo suficientemente alto para evitar que las células se sedimenten dentro del compartimiento de separación. Además, el caudal generalmente se selecciona para que sea lo suficientemente bajo como para prevenir cualquier lesión/daño a las células.

Un flujo continuo de fluido sirve para suspender células diana. Un flujo continuo puede ajustarse a un caudal en el que la célula o células diana se mantienen en una posición que se puede considerar como una composición flotante. En tal posición, la célula o células diana están expuestas a una fuerza gravitacional, la cual generalmente crea una fuerza en la dirección del suelo. Esta dirección puede corresponder a la dirección de la base del compartimiento de separación. Un flujo continuo de un líquido actúa para crear una fuerza opuesta a la fuerza gravitacional, y la suma de vectores resultante de todas las fuerzas que actúan sobre las células define un estado de equilibrio en el que cada célula se suspende independientemente sin necesidad de soporte. En algunas realizaciones, las fuerzas inmovilizan sustancialmente las células mediante la suma de las fuerzas vectoriales que actúan sobre las células. En algunas realizaciones, las fuerzas causan turbulencia, lo que mantiene la célula o células en flujo. Los factores determinantes con respecto a las fuerzas que actúan sobre la célula o células son, entre otros, la densidad, masa y forma de la célula o células. Como un ejemplo ilustrativo, las fuerzas del flujo generalmente serán más débiles en comparación con la gravedad para las células de mayor masa, de modo que las células con una masa más alta generalmente estarán flotando en menor grado, por ejemplo a un nivel menor, que las células con una masa inferior. Por lo tanto, las células se pueden separar de acuerdo con su tamaño y densidad. La canalización, la turbulencia y la retromezcla se pueden permitir habitualmente en un método como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el flujo continuo de fluido puede considerarse como una perfusión continua de medios. En un flujo continuo de fluido, la célula o células están en un entorno de cizallamiento y presión mínimos, y que proporciona un suministro constante de oxígeno y nutrientes a la célula o células. Generalmente, la célula o células se mantienen viables. Las células aisladas, enriquecidas y/o purificadas de acuerdo con un método como se describe en la presente memoria pueden, por lo tanto, usarse habitualmente para cualquier aplicación deseada. En particular en realizaciones donde la posición de la salida en el compartimiento de separación está dispuesta de tal manera que el flujo continuo de líquido evita que la célula diana o la población de células diana salga del compartimiento de separación a través de la salida, la célula o células diana pueden mantenerse en una posición determinada en el compartimiento de separación debido a un equilibrio entre las fuerzas de gravitación y flujo (supra). En algunas realizaciones el compartimiento de separación está diseñado de tal manera que el medio poroso evita que la población de células salga del compartimiento de separación a través de la salida.

La posición de una célula diana conocida y su separación de las células no deseadas puede verse afectada por el ajuste del líquido que se utiliza en un flujo esencialmente constante. Siempre que la célula diana siga siendo viable, pueden ajustarse, por ejemplo, condiciones tales como la viscosidad, la densidad, el flujo de líquido y la inclinación del compartimiento de separación, como la inclinación de un eje del mismo con respecto a la fuerza de gravedad. Otros factores adecuados están dentro del conocimiento de la persona experta.

Aplicar un flujo de líquido al menos esencialmente lineal, por ejemplo, el tampón de lavado, a través de la entrada del compartimiento de separación puede permitir que la pluralidad de células fluya a través del compartimiento de separación, por ejemplo a través de una columna de filtración o cámara de filtración y el medio poroso. En algunas realizaciones de un método divulgado en la presente memoria, se usa un enfoque negativo o de agotamiento para aislar células diana de una pluralidad de células en una muestra de fluido. Por ejemplo, las células que tienen un ancho máximo que es inferior al tamaño de poro de un medio poroso en la unidad de microfiltración se lavan completamente a través del medio poroso y, por lo tanto, salen del compartimiento de separación a través de la

5 salida. De este modo, se eliminan de manera eficiente de la pluralidad de células. Por el contrario, se evita la eliminación de las células diana que tienen un ancho máximo que es mayor que el tamaño de poro del medio poroso del compartimento de separación, por ejemplo columna de filtración o cámara. En realizaciones en las que se usa un flujo al menos esencialmente lineal, este generalmente sirve como una fuerza hacia arriba (o flotabilidad) para las células que se pueden mantener en una posición espacial específica dentro de la columna o cámara de separación, dependiendo de su densidad celular. Como se indicó anteriormente, el flujo aplicado de tampón de lavado es generalmente un flujo al menos esencialmente lineal.

10 La distancia entre la entrada y la salida se puede seleccionar como se desee. Asimismo, se puede usar cualquier volumen del compartimento de separación, siempre que el volumen sea al menos varios miles de veces el volumen esperado de la célula diana o de la población de células diana, es decir, el volumen total de todas las células de la población de células diana. Normalmente, el volumen del compartimento de separación será de 1 cm³ o más, como 10 cm³ o más. Cuando se usan compartimientos de separación con un eje longitudinal, en particular con una anchura máxima esencialmente uniforme a lo largo del eje longitudinal, los inventores han observado que generalmente la separación aumenta con la longitud del eje longitudinal.

15 Un método como el descrito en la presente memoria puede usarse en algunas realizaciones con una pluralidad predefinida de células, la cual se introduce en el compartimento de separación, después de lo cual ya no se introducen o más células en el mismo. En algunas realizaciones, se puede introducir continuamente un suministro continuo de células en el compartimento de separación, mientras se aplica un flujo continuo de un líquido adecuado. Las células no deseadas pueden lavarse continuamente del compartimento de separación, mientras que las células diana deseadas permanecen en el compartimento de separación. Como ejemplo ilustrativo, las células pueden retirarse de un biorreactor estacionario y transferirse a un compartimento de separación mientras el medio se transmite a, y a través del compartimento de separación. En algunas realizaciones con un suministro continuo de células, puede realizarse un enriquecimiento continuo de células diana.

20 En algunas realizaciones, el compartimento de separación puede agitarse durante cualquier período de tiempo deseado mientras se permite que pase al menos un flujo esencialmente constante de líquido a través del compartimento de separación. Por ejemplo, se puede usar un agitador para agitar el compartimento de separación. Los presentes inventores han descubierto además que, en general, es beneficioso llevar a cabo un proceso de filtración de un método de acuerdo con la invención agitando el compartimento de separación mediante un agitador, por ejemplo, un agitador de laboratorio. En algunas realizaciones, se usa una etapa de rotación rápida (etapa 200 a 250). Esta medida generalmente ayuda a distribuir mejor las células diana en el compartimento de separación. Si se desea, puede recogerse el líquido que sale del compartimento de separación. En una realización, las fracciones de eluato pueden recogerse, por ejemplo, para controlar la elución de las células.

25 En algunas realizaciones de un método para enriquecer, aislar y/o purificar una población de células diana, la entrada se cierra después de que se ha dejado pasar un flujo de líquido al menos esencialmente constante a través del compartimento de separación. Si se desea, el compartimento de separación puede agitarse brevemente, por ejemplo para la resolución de ciertas células tales como eritrocitos sedimentados sobre el medio poroso. En algunas realizaciones en las que el compartimento de separación no está dispuesto en una orientación en la que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la gravedad, el compartimento de separación dispone en dicha orientación. La salida se abre si está en un estado cerrado. Para este propósito, se puede usar una bomba.

30 Después de aplicar un flujo esencialmente constante de un líquido adecuado para pasar a través del compartimento de separación, en algunas realizaciones se permite que el fluido entre en el compartimento de separación a través de una entrada. Este fluido es al menos esencialmente inmiscible con el líquido que actualmente abarca la población de células diana dentro del compartimento de separación. Además, el fluido tiene una densidad que es menor que la densidad del fluido que actualmente abarca la población de células diana. En algunas realizaciones, el fluido es un gas que puede incluir nitrógeno, oxígeno y/o monóxido de carbono. En algunas realizaciones, el respectivo gas es aire. El líquido, que abarca la población de células diana, puede salir por la salida. En algunas realizaciones, se permite que una porción del líquido salga del compartimento de separación. En algunas realizaciones, se permite que el líquido completo salga del compartimento de separación. Generalmente, el nivel de líquido del líquido que abarca actualmente las células diana se reduce de ese modo para reducir el volumen de la suspensión celular que se incluye en el compartimento de separación. En algunas realizaciones, el nivel de líquido se baja a la superficie del filtro de membrana mediante la introducción de aire a la entrada, que puede estar localizado, por ejemplo, en el extremo superior de la unidad de microfiltración. Como resultado, se permite que el volumen del líquido que abarca la población de células diana disminuya.

35 Posteriormente, el medio poroso puede eliminarse de la salida. El medio poroso se puede usar, por ejemplo, para análisis microscópico, para almacenamiento o para aislamiento adicional de ADN. El almacenamiento puede llevarse a cabo en cualquier condición deseada que se sepa que es adecuada para el fin previsto. Como ejemplo ilustrativo, se puede usar almacenamiento a -20 °C en una cantidad suficiente de una solución tampón tal como 200 microlitros de PBS. El filtro de membrana también se puede usar para el almacenamiento o para el aislamiento adicional de ADN, ARN o proteínas de las células diana aisladas.

Cualquier etapa de un método como se describe en esta memoria descriptiva, tal como el uso del compartimiento de separación, que incluye introducir una pluralidad de células o un fluido en la separación, disponiendo el compartimiento de separación en una orientación deseada puede llevarse a cabo de forma manual, automática o en una combinación de los mismos. Un uso automático puede incluir un sistema de control que induzca de manera programada la realización de cualquier acto deseado para que se lleve a cabo un proceso usando el dispositivo de la invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, abrir o cerrar una entrada o una salida, accionar una bomba, inyectar, agitar, la aplicación de energía y el inicio de un dispositivo de detección. El uso puede ser una etapa integrada de un método descrito en la presente memoria. Tal método puede incluir una serie de etapas secuenciales. Una etapa inicial ilustrativa de un método de procesamiento de una pluralidad de células como se describe en la presente memoria puede estar dirigida a una reducción de volumen e incluye, por ejemplo, centrifugación. Una última etapa de un método para enriquecer, aislar y/o purificar una célula de una respectiva pluralidad de células puede incluir la detección de las células deseadas, por ejemplo, por medio de un dispositivo automático de recuento de células.

Como ya se indicó anteriormente, el compartimiento de separación es en algunas realizaciones, por ejemplo, una parte externa, interna o integrada de un aparato más grande. Tal aparato puede incluir, por ejemplo, medios tales como tornillos y soportes para alterar y fijar la posición del compartimiento de separación. Otros elementos ilustrativos de un aparato particular incluyen medios para la regulación de la temperatura tal como un dispositivo de enfriamiento, un dispositivo de calentamiento y un controlador de temperatura. En algunas realizaciones, el aparato incluye otros componentes adaptados para realizar cualquier función que se desee realizar. Un ejemplo ilustrativo de un componente que puede ser parte de una entrada o una salida o estar acoplado de manera fluida a una entrada o una salida es una válvula. Otro ejemplo ilustrativo más de un componente que puede ser parte de un aparato particular es un espectrómetro tal como un espectrómetro de fluorescencia, que puede servir para detectar el flujo de salida o el flujo de entrada del compartimiento de separación, incluidas las fracciones que eluyen del compartimiento de separación.

En la Fig. 1 se ilustran dos realizaciones para llevar a cabo un método de enriquecimiento, purificación y/o aislamiento de una o más células diana como se describe en la presente memoria. Como se muestra en los siguientes ejemplos, las células tumorales podrían aislarse de sangre humana con alta tasa de recuperación, en un sistema modelo. Además, las células tumorales aisladas contenían una alta proporción de células ópticamente intactas, como se verificó mediante microscopía, lo que indica que este método no solo permite altas tasas de reidentificación de células diana de muestras de fluidos, sino también una recuperación fina de células diana viables. En algunas realizaciones, la pluralidad de células puede ser sangre humana y la población de células diana puede ser leucocitos, que incluyen una población de linfocitos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células puede ser sangre humana y la población de células diana puede ser células de cordón umbilical.

En la presente memoria se divulgan métodos para enriquecer, purificar y/o aislar células diana, generalmente a partir de una muestra de fluido tal como una muestra líquida. Se puede considerar un método particular para combinar varios métodos de separación dentro de un único proceso, que incluye una única etapa de trabajo. Un ejemplo de una población de células diana son células tumorales circulantes tales como células tumorales de origen epitelial. Tales células tumorales difieren de la mayoría de los componentes celulares normales de la sangre de una persona sana en su tamaño y densidad. Como se muestra en los siguientes ejemplos, usando un flujo al menos esencialmente lineal o una solución tampón turbulenta/en contracorriente, por ejemplo, un tampón de lavado, se evita la salida de células tumorales desde el compartimiento de separación, por ejemplo, se evita mediante una columna de separación o filtración con una membrana porosa con un tamaño de poro específico, por ejemplo de 5 micrómetros, donde se elige un tamaño más pequeño que el tamaño de las células tumorales. Las células sanguíneas de menor tamaño (y mayor densidad) generalmente se lavan completamente a través del filtro de membrana porosa. Además, el flujo lineal o turbulento de la solución tampón sirve como una fuerza hacia arriba para las células que se mantienen en una posición espacial específica dentro del compartimiento de separación, dependiendo de su densidad celular. La densidad de las células tumorales es menor que la de las células sanguíneas. La distribución de las células diana dentro del líquido utilizado puede ser asistida adicionalmente sacudiendo la unidad de microfiltración durante el proceso de filtración. Por consiguiente, se puede considerar un método como el descrito en la presente memoria para combinar métodos de separación dependientes del tamaño celular y de la densidad celular para el aislamiento, purificación y/o enriquecimiento de células diana en muestras fluidas tales como células tumorales circulantes en sangre. Un flujo de fluido al menos esencialmente lineal o turbulento en un método particular también evita que las células diana entren en contacto con el medio poroso, por ejemplo, una membrana porosa, evitando así un daño mecánico potencial de las células. Como resultado, un método correspondiente permite un aislamiento, purificación y/o enriquecimiento particularmente suave de células diana vivas y viables. Después de la eliminación exitosa de los componentes sanguíneos no deseados, el nivel de líquido en la columna de separación se reduce de modo que aumenta la concentración de células diana. Si se desea, el nivel de líquido puede reducirse hasta tal punto que las células restantes se recojan en el medio poroso desde donde pueden aislarse. De esta forma, se podría lograr un aislamiento y enriquecimiento muy eficaz de las células tumorales circulantes en sangre, como se demuestra en los siguientes ejemplos.

Brevemente, en los Ejemplos, se ha añadido un número específico de células tumorales pancreáticas a la sangre de una persona sana, en un sistema modelo. El número de células tumorales introducidas se ha elegido de modo que

5 sea demasiado bajo para una detección directa de las células tumorales mediante técnicas extremadamente sensibles y específicas actualmente utilizadas, tales como la PCR. Con el fin de permitir la cuantificación visual de las células tumorales en la membrana porosa, aisladas mediante los métodos de la invención, se usó tinción vital en las células tumorales. Posteriormente, se aisló el ADN de las células teñidas y se detectó por PCR. Tanto una prueba visual como una PCR demostraron el enriquecimiento satisfactorio de las células tumorales de la muestra de sangre mediante el método descrito en la presente memoria. En comparación con un ensayo para la detección directa de las células tumorales en la muestra de sangre, usando un método como se definió anteriormente se podía lograr una reducción de al menos 200 veces del nivel de detección. Por consiguiente, un método como el divulgado en esta memoria descriptiva se caracteriza generalmente de forma ventajosa por una tasa de recuperación y enriquecimiento mejoradas. Además, generalmente no se requiere un pretratamiento de una muestra de sangre para llevar a cabo un método como se divulga en la presente memoria. Además, generalmente no es necesaria ninguna intervención durante un proceso de separación que se incluye dentro de un método de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de una célula de una respectiva pluralidad de células como se describe en la presente memoria. Las células generalmente se pueden aislar en una etapa vital y se pueden usar no solo para métodos analíticos posteriores, por ejemplo, para la detección de mutaciones u otras modificaciones patológicamente relevantes, sino también para el cultivo de tejidos, por ejemplo, para establecer una línea de células tumorales primarias.

20 A la vista de esto, los métodos de la presente invención permiten el aislamiento, la purificación y/o el enriquecimiento de una o más células de muestras de fluido tales como sangre, que se distinguen de los componentes celulares normales de la sangre en tamaño y/o densidad. Ejemplos de tales células son células fetales en la sangre materna o células que migran a los vasos sanguíneos durante la progresión de una enfermedad o que están siendo modificadas patológicamente en la sangre. A este respecto, las células tumorales migratorias o circulantes a menudo son de particular interés. Tales células también son detectables en baja concentración en sangre de pacientes que padecen tumores sólidos. El aislamiento y/o enriquecimiento de las células tumorales de la sangre se puede usar para el primer diagnóstico de una enfermedad tumoral, pero también para el control de la recurrencia de la enfermedad tumoral y/o la metástasis o las terapias tumorales. Como es evidente para los expertos en la materia, el control es de la mayor importancia económica, particularmente a la luz de la tensa situación financiera actual en el sector de la salud.

30 Las células tumorales circulantes (CTC) probablemente derivan de clones del tumor primario, lo que sugiere que se pueden usar para todas las pruebas biológicas que se aplican a las células primarias. Un método como se describe en esta memoria descriptiva es generalmente una técnica innovadora de bajo coste, que puede considerarse como una combinación de diferentes enfoques de separación, por ejemplo para aislar y clasificar células tumorales por tamaño y/o densidad. Un método particular generalmente puede aislar células tumorales raras, fijas, con una alta tasa de recuperación. Tales células se conservan morfológicamente bien durante un método descrito en la presente memoria, debido al procedimiento de aislamiento suave utilizado. Los métodos de la invención permiten el aislamiento de células vivas capaces de crecer en cultivo. Materiales genéticos de alta calidad pueden, por ejemplo, obtenerse directamente de células tumorales aisladas en un medio poroso. Debido a su versatilidad y capacidad para aislar CTC en un tiempo breve, un método descrito en la presente memoria también es capaz, por ejemplo, de simplificar y mejorar el acceso no invasivo a las células tumorales.

45 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden ir seguidos de un análisis cuantitativo y cualitativo de las células diana así enriquecidas, purificadas y/o aisladas. Los expertos en la materia conocen numerosos ensayos citológicos cuantitativos y cualitativos. Por ejemplo, el análisis morfológico, que incluye, por ejemplo, la relación nucleocitoplásmica, los detalles nucleares y el tamaño de los nucleolos de las células aisladas, puede llevarse a cabo mediante microscopía. Además, las células diana enriquecidas y/o aisladas pueden usarse para el establecimiento de cultivos tisulares primarios. Las células tumorales circulantes (CTC) aisladas vivas se pueden usar para probar su capacidad potencial para iniciar la formación de tumores en modelos animales y son fácilmente accesibles para una amplia gama de análisis biológicos moleculares. Además, se pueden realizar métodos de enumeración e inmunocitoquímicos para identificar el origen tumoral de las células tumorales circulantes. Además, las células obtenidas usando un método descrito en la presente memoria también se pueden usar para el aislamiento y/o análisis del ADN, ARN o proteínas celulares. Por ejemplo, el ADN aislado puede usarse para detectar mutaciones específicas de tumores, por ejemplo, mediante PCR.

55 Por consiguiente, en algunas realizaciones, un método para aislar, purificar y/o enriquecer una célula diana o una población de células diana incluye análisis cuantitativo y/o cualitativo de las células diana enriquecidas, purificadas y/o aisladas, por ejemplo análisis de mutaciones.

60 En alguna realización de un método particular de aislamiento, purificación y/o enriquecimiento de una célula diana o una población de células diana, la velocidad de recuperación de la célula diana es de al menos 10.000 células, al menos 7.500 células, o incluso al menos 5.000 células por ml de muestra de fluido.

65 Para la detección directa de mutaciones específicas en células tumorales que circulan en la sangre mediante PCR, actualmente se requieren aproximadamente 1 millón de células por ml de sangre. Como se muestra en los siguientes ejemplos, el límite de detección para mutaciones específicas podría reducirse a menos de 5.000 células por ml de sangre mediante los métodos de la invención. Esto corresponde a un enriquecimiento de al menos 200

veces, en comparación con los métodos descritos en la técnica, en particular cuando se usa microfiltración en combinación con flujo turbulento. En algunas realizaciones, el enriquecimiento de la célula diana es al menos 50 veces, al menos 75 veces, al menos 100 veces, al menos 150 veces o incluso al menos 200 veces.

5 En algunas realizaciones de un método como se describió anteriormente, se usa un sistema automatizado.

10 En algunas realizaciones, el sistema automatizado es un dispositivo que incluye uno o más compartimentos de separación como se describió anteriormente, por ejemplo una cámara de filtración, medios automatizados para proporcionar flujo de fluido a través de la unidad de microfiltración, y una fuente de alimentación para proporcionar flujo de fluido. En algunas realizaciones, un sistema automatizado particular incluye además medios para proporcionar una fuente de señal para la generación de fuerzas sobre chips activos. Un sistema automatizado utilizado en un método como el descrito anteriormente también puede incluir uno o más chips activos, cámaras de separación o columnas de separación.

15 Los contenidos de los artículos, patentes y solicitudes de patente, y todos los demás documentos e información disponible electrónicamente mencionados o citados en la presente memoria, se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente que es incorporada por referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Los solicitantes se reservan el derecho de incorporar físicamente en esta aplicación todos y cada uno de los materiales e información de dichos artículos, patentes, solicitudes de patentes u otros documentos físicos y electrónicos.

20 La inclusión o discusión de un documento previamente publicado en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

25 Los métodos, usos y combinaciones descritos en la presente memoria ilustrativamente pueden ser practicados y aplicados en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se describa específicamente en la presente memoria. Además, los términos y expresiones empleados en la presente memoria se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones ilustrativas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de las invenciones incorporadas divulgadas en la presente memoria y que tales modificaciones y variaciones son consideradas dentro del alcance de esta invención.

30 La invención se ha descrito amplia y genéricamente en la presente memoria. Cada una de las especies más estrechas y agrupaciones subgenéricas incluidas en la divulgación genérica también forman parte de los métodos, usos y combinaciones. Esto incluye la descripción genérica de los métodos, usos y combinaciones con una salvedad o limitación negativa que elimina cualquier tema del género, independientemente de si el material extirpado se menciona específicamente aquí.

35 Otras realizaciones se exponen dentro de las reivindicaciones adjuntas. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras adjuntas. Como un experto normal en la técnica apreciará fácilmente a partir de la presente divulgación, otras composiciones químicas, medios, usos, métodos o etapas, que existen actualmente o que se desarrollarán posteriormente, que realizan sustancialmente la misma función o logran sustancialmente el mismo resultado que las correspondientes realizaciones ilustrativas descritas en la presente memoria también pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención.

55 **Ejemplos de realizaciones de un método de la invención**

60 La **Figura 1A** muestra la configuración e implementación del método de la invención que muestra microfiltración en combinación con flujo lineal para enriquecer y/o aislar células diana de una muestra de fluido que se muestra. La unidad de microfiltración comprende un flujo de entrada en el extremo superior, un flujo de salida en el extremo inferior y un filtro de membrana en el extremo inferior. En esta realización del método de la invención, la unidad de microfiltración se gira después de la aplicación de la muestra de fluido, de modo que la membrana del filtro y el flujo de salida se sitúan en el extremo superior de la unidad de microfiltración, mientras que el flujo de entrada del tampón de lavado se produce a través del flujo de entrada localizado en el extremo inferior opuesto. La unidad de microfiltración se mantiene en posición vertical o puede inclinarse en un cierto ángulo. El proceso de filtración se puede apoyar agitando la microfiltración usando un agitador. A continuación, la microfiltración se gira de nuevo, de

modo que ahora el filtro de membrana y el flujo de salida se encuentran en el extremo inferior, mientras que el flujo de entrada está en el extremo superior. Se añade más tampón de lavado al flujo de entrada en el extremo superior. Finalmente, el nivel de líquido se reduce mediante la aplicación de aire. La membrana del filtro se retira de la unidad de microfiltración para su almacenamiento o para un posterior análisis cuantitativo o cualitativo de las células diana aisladas y/o enriquecidas.

La **Figura 1B** muestra la configuración e implementación de un método de la invención que usa microfiltración a contracorriente, en combinación con el flujo turbulento que se muestra. Primero, se aplica una muestra de fluido tal como una muestra de sangre a una unidad de microfiltración de contraflujo. Esta unidad de microfiltración comprende un orificio que permite la ventilación de la unidad de microfiltración, un flujo de entrada y salida y un filtro de membrana. El orificio está localizado en un extremo de la unidad de microfiltración y la entrada, salida y filtro de membrana están en el extremo opuesto de la unidad de microfiltración. Además, el filtro de membrana está aguas arriba del flujo de salida y cerca del flujo de entrada para permitir un modo de contra flujo. Luego, se aplica un flujo turbulento de tampón de lavado al flujo de entrada de la unidad de microfiltración, utilizando una bomba. El proceso de filtración se favorece agitando la unidad de microfiltración con un agitador. Se pueden recolectar fracciones de eluato para controlar el proceso. Posteriormente, el flujo de entrada se cierra y el nivel de fluido en la unidad de microfiltración se reduce mediante la admisión de aire en el orificio mediante el uso de una bomba para permitir la extracción del filtro de membrana. La membrana del filtro se puede usar para un análisis cuantitativo o cualitativo adicional de las células diana aisladas y/o enriquecidas o almacenadas.

La **Figura 5** muestra un ejemplo de ensamblaje de una columna de filtración en orientación hacia abajo y hacia arriba. Para una orientación hacia abajo de la salida del compartimento de separación, una Jeringa Original Perfusor OPS de 20 ml Conexión Luer Lock Duo 2,0 x 30 mm **1**) se equipa con un Portafiltro de jeringa Swinnex de 13 mm con un filtro de membrana de policarbonato hidrófilo de 5 µm de tamaño de poro, 13 mm (Sterlitech Cooperation, 22027 70th Avenue S, Kent, WA 98032-1911 USA, **2**) y una aguja hueca Original Perfusor 2,0 x 30 mm (**3**). La aguja es parte de una Jeringa Original Perfusor OPS (supra).

Además, un Venofix Luer Lock 0,8 x 20 mm (B.Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Alemania, **4**), una llave de paso Discofix C (B.Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Alemania, **5a**), una llave de paso de 360°, 4 vías, azul (pvh medizintechnik gmbh & co kg, Hauptstraße 45-47, 85614 Kirchseeon, Alemania, **5b**) y tubos flexibles y piezas de conexión (Bio-Rad Laboratories Headquarters, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 EE.UU., **6**) se montan en la jeringa. Para una orientación hacia arriba de la salida del compartimento de separación una Jeringa Original Perfusor OPS de 20 ml Conexión Luer Lock Duo 2,0 x 30 mm (supra, **1**) se equipa con un Portafiltro de jeringa Swinnex de 13 mm con un filtro de membrana de policarbonato hidrófilo de 5 µm de tamaño de poro, 13 mm (supra, **2**), una aguja hueca Original Perfusor 2,0 x 30 mm (**3**) y se ensamblan tubos flexibles y piezas de conexión (Bio-Rad Laboratories supra, **4**).

Se presentan dos configuraciones experimentales que se han usado para demostrar la eficacia preliminar de los métodos de la presente invención que combinan un método de separación dependiente del tamaño celular, es decir, microfiltración con un método de separación dependiente de la densidad celular, usando flujo lineal o flujo turbulento/contraflujo. La disposición de flujo lineal se muestra en la Fig. 1A, mientras que la configuración de flujo turbulento se representa en la Fig. 1B. El enriquecimiento exitoso de subpoblaciones celulares a partir de sangre humana podía lograrse ya en la configuración de flujo lineal.

Con el fin de enriquecer y/o aislar células tumorales de una muestra de sangre humana mediante un proceso de microfiltración que utiliza un flujo lineal como se muestra en la Figura 1, se han llevado a cabo las siguientes etapas:

Etapa 1: Marcaje de las células para su posterior identificación microscópica. Como material fuente, se usaron células tumorales pancreáticas PaTu 8988S con un diámetro celular promedio de 11,11 más/menos 0,07 micrómetros y PaTu 8988T con un diámetro celular promedio de 7,17 más/menos 0,05 micrómetros, respectivamente. Las células tumorales pancreáticas que crecen como células adherentes se han marcado con CytoTrackerGreen: CMFDA (5-clorometilfluorescindiacetato)-Verde (Invitrogen/Mol. Probes), 5 µM en medio sin suero mediante incubación a 37 °C/5 % de CO₂ durante 30-45 minutos para permitir la reidentificación de las células.

Etapa 2: Separación de las células tumorales pancreáticas adherentes de la placa de cultivo celular mediante incubación con proteasa tripsina, centrifugación y resuspensión en medio completo, determinación del número de células.

Etapa 3: Introducción de un cierto número de células tumorales pancreáticas en una muestra de sangre. 5 ml de sangre diluida con 5 ml de dilución PBS⁻/EDTA (EDTA 1 mM, PBS⁻: solución salina tamponada con fosfato sin cationes divalentes). La sangre utilizada fue sangre completa con EDTA fresca, sin ningún tratamiento adicional. Se han transferido 25.000 células tumorales pancreáticas a 10 ml de la sangre diluida.

Etapa 4: Transferencia de la suspensión de sangre a una columna de filtración (véase arriba).

Etapa 5: La microfiltración se ha llevado a cabo de la siguiente manera:

i): ángulo de inclinación de la columna de filtración: 0°, recta (vertical), con filtro de membrana en el extremo superior, agitador: nivel 200-250 (rápido), caudal: 200 ml/h, volumen de flujo: 200 ml, tampón de lavado usado: PBS⁻/EDTA 1 mM.

5 ii): rotación de 180° de la columna (membrana del filtro en el extremo inferior), la columna se ha sacudido suavemente para resolver los eritrocitos precipitados en la membrana del filtro, filtración, caudal: 200 ml/h, volumen de flujo: 100 ml; tampón de lavado usado: PBS⁻/ EDTA 1 mM; posteriormente, reducción del nivel de líquido a la superficie de la membrana del filtro introduciendo aire.

10 Etapa 6: Separación del filtro de membrana y análisis microscópico o almacenamiento en 200 µl de PBS⁻ a -20 °C, por ejemplo, para el posterior procesamiento o análisis/aislamiento del ADN de las células tumorales.

15 Con el fin de enriquecer y/o aislar las células tumorales de una muestra de sangre humana mediante un proceso de microfiltración que utiliza un flujo turbulento como se muestra en la Figura 2, se han llevado a cabo las siguientes etapas:

Las etapas 1 a 3 corresponden a las etapas 1 a 3, respectivamente, indicadas en la sección 1.1.

20 Etapa 4: Transferencia de la suspensión de sangre a la columna de filtración. Para este propósito, el filtro de membrana se ha eliminado temporalmente; ajuste de la columna de filtración en posición vertical, filtro de membrana en el extremo inferior, orificio debajo de la membrana del filtro cerrada, para evitar la fuga de líquido a través de la membrana (orificio no mostrado en la Figura 2), llenado de la columna con PBS⁻/ EDTA (1 mM) con orificio abierto para ventilación.

25 Etapa 5: Microfiltración: ángulo de inclinación de la columna: 0°, columna vertical, membrana del filtro en el extremo inferior; agitador: Nivel 200-250 (rápido), caudal: 200 ml/h, volumen de flujo: 200 ml, tampón de lavado: PBS⁻/ EDTA (1 mM), agitación breve y suave de la columna para resolver los eritrocitos precipitados en la membrana del filtro, posteriormente reducción del nivel del líquido a la superficie de la membrana del filtro introduciendo aire a través del orificio.

30 Etapa 6: Separación del filtro de membrana y análisis microscópico o almacenamiento en 200 µl de PBS⁻ a -20°C para posterior procesamiento o análisis/aislamiento del ADN de las células tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Un método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana a partir de una pluralidad de células en presencia de una fuerza gravitacional, comprendiendo el método:

- (a) introducir la pluralidad de células en un compartimiento de separación, en el que el compartimiento de separación tiene una entrada y una salida acopladas de forma fluida al ambiente, estando definido el compartimiento de separación por una pared circunferencial, una base y una parte superior, estando la base y la parte superior dispuestas en una relación al menos esencialmente opuesta dentro del compartimiento de separación;
- (b) introducir en una disposición del compartimiento de separación donde la salida está posicionada orientada en un ángulo de $\pm 75^\circ$ opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional, un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación y permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimiento de separación a través de la salida, suspendiendo así la pluralidad de células en un flujo continuo de líquido, de manera que el flujo continuo de líquido impide que la población de células diana sedimente y salga del compartimiento de separación a través de la salida;

enriqueciendo y/o aislando así la población de células diana.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la salida comprende un medio poroso que tiene poros de un tamaño menor que el tamaño celular promedio de las células de la población de células diana, comprendiendo además el método:

- (c) introducir un fluido en el compartimiento de separación a través de su entrada, en el que el fluido es al menos esencialmente inmisible con el líquido que abarca la población de células diana en el compartimiento de separación y de una densidad inferior a la misma, permitiendo que el líquido que abarca la población de células diana salga a través de la salida, de manera que se puede reducir el volumen de la misma.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

- (a) la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación se lleva a cabo después de disponer el compartimiento de separación en una orientación tal que la salida se posiciona orientada, al menos esencialmente, opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional, y/o
- (b) la salida está comprendida en la base o en la parte superior, y/o
- (c) la entrada y la salida están dispuestas en una relación al menos esencialmente opuesta entre sí.

4. Un método de enriquecimiento y/o aislamiento de una población de células diana a partir de una pluralidad de células, comprendiendo el método:

- (a) introducir la pluralidad de células en un compartimiento de separación, en el que el compartimiento de separación tiene una entrada y una salida acopladas de forma fluida al ambiente, estando definido el compartimiento de separación por una pared circunferencial, una base y una parte superior, estando la base y la parte superior dispuestas en una relación al menos esencialmente opuesta dentro del compartimiento de separación y en el que la base comprende la salida, y en el que la salida comprende un medio poroso que tiene poros de un tamaño más pequeño que el tamaño celular promedio de las células de la población de células diana;
- (b) introducir un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimiento de separación y permitir que un flujo de líquido al menos esencialmente constante salga del compartimiento de separación a través de la salida, suspendiendo así la pluralidad de células en un flujo continuo de líquido, de manera que el flujo continuo de líquido impide que la población de células diana sedimente y el medio poroso evita que la población de células diana salga del compartimiento de separación a través de la salida;

enriqueciendo y/o aislando así la población de células diana.

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además:

- (c) introducir un fluido en el compartimiento de separación a través de su entrada, en el que el fluido es al menos esencialmente inmisible con el líquido que abarca la población de células diana en el compartimiento de separación y de una densidad inferior a la misma, permitiendo que el líquido que abarca la población de células diana salga a través de la salida, de manera que se puede reducir el volumen de la misma.

6. El método de la reivindicación 4 o 5, en el que

- (a) el método se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, en el que la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación se lleva a cabo después de disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida está posicionada orientada en un ángulo de $\pm 75^\circ$ en la dirección de la fuerza gravitacional, después de introducir la pluralidad de células en el compartimento de separación, y/o
- (b) el compartimento de separación está dispuesto en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional, mientras se introduce el flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- (a) el método se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, en el que el flujo de líquido al menos esencialmente constante introducido a través de la entrada del compartimento de separación permite crear una fuerza en la población de células diana que se opone a la fuerza gravitacional y/o
- (b) el fluido introducido en el compartimento de separación es un gas, y/o en el que el fluido introducido en el compartimento de separación es aire, y/o
- (c) el método comprende además inclinar el compartimento de separación con respecto a su orientación original, después de introducir la pluralidad de células en el compartimento de separación, y/o
- (d) el enriquecimiento de la población de células diana es al menos 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces o 200 veces más, y/o
- (e) el método comprende además agitar el compartimento de separación después de que el mismo haya sido dispuesto en una orientación en la que la salida está posicionada orientada, al menos esencialmente, en la dirección de la fuerza gravitacional.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- (a) la pared circunferencial tiene una porción de pared que tiene una superficie al menos esencialmente recta, y/o
- (b) la pared circunferencial tiene una forma al menos esencialmente cilíndrica, y/o
- (c) la entrada está (i) dispuesta cerca de la salida o (ii) comprendida en la parte superior, y/o
- (d) el compartimento de separación tiene un eje longitudinal, en el que opcionalmente el compartimento de separación tiene una anchura máxima al menos esencialmente uniforme a lo largo del eje longitudinal, y/o
- (e) la pared circunferencial define una porción al menos esencialmente tubular del compartimento de separación, y/o
- (f) el compartimento de separación está comprendido en una carcasa, y/o
- (g) el líquido introducido a través de la entrada del compartimento de separación es un líquido acuoso.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se lleva a cabo en presencia de una fuerza gravitacional, comprendiendo además el método disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida está posicionada orientada en un ángulo de $+ 75^\circ$ a $- 75^\circ$ con respecto a la fuerza gravitacional, antes de que el fluido, que al menos es esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimento de separación, en el que el compartimento de separación está dispuesto opcionalmente en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional, antes de que el fluido, que al menos es esencialmente inmiscible con el líquido que abarca la población de células diana, se introduzca en el compartimento de separación.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compartimento de separación tiene un eje longitudinal, y en el que la salida está dispuesta al menos esencialmente en el eje longitudinal, en el que opcionalmente la disposición del compartimento de separación en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección u opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional comprende colocar el compartimento de separación en una posición en la que el eje longitudinal es al menos esencialmente paralelo a la fuerza gravitacional.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compartimento de separación comprende una sola entrada, o en el que el compartimento de separación comprende dos entradas.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el compartimento de separación comprende dos entradas y en el que una entrada está dispuesta próxima a la salida y en el que la introducción de un flujo al menos esencialmente constante de un líquido adecuado a través de la entrada del compartimento de separación se lleva a cabo después de disponer el compartimento de separación en una orientación tal que la salida está posicionada orientada al menos esencialmente en la dirección de la fuerza gravitacional.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

- 5 (a) en el que la pluralidad de células está comprendida en al menos una de una muestra de fluido corporal, una muestra ambiental, una muestra de cultivo celular, una muestra de médula ósea, una muestra de aguas residuales, una muestra de comida, una muestra de leche, una muestra forense, una muestra de producción de molécula biológica, una muestra de preparación de proteína, una muestra de preparación de lípido, una muestra de preparación de carbohidrato o cualquier combinación de las mismas,
- 10 en el que opcionalmente la muestra de fluido corporal puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de líquido amniótico, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de lavado nasofaríngeo, una muestra de esputo, una muestra de frotis bucal, una muestra de frotis faríngeo, una muestra de frotis nasal, una muestra de lavado broncoalveolar, una muestra de secreción bronquial y una muestra de orina; y/o
- 15 (b) en el que la población de células diana es una población de células somáticas, una población de células madre o una población de células progenitoras, y/o en el que la población de células diana es una población de una de células tumorales, células fetales y células embrionarias.
- 20 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y 6 a 13, en el que la disposición del compartimiento de separación en una orientación tal que la salida está posicionada orientada en un ángulo de + 75° a - 75° en la dirección de la fuerza gravitacional o en un ángulo de + 75° a - 75° opuesta a la dirección de la fuerza gravitacional, comprende girar el compartimiento de separación.
- 25 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente:
- (d) recoger el líquido que abarca la población de células diana junto con la población de células diana del compartimiento de separación.

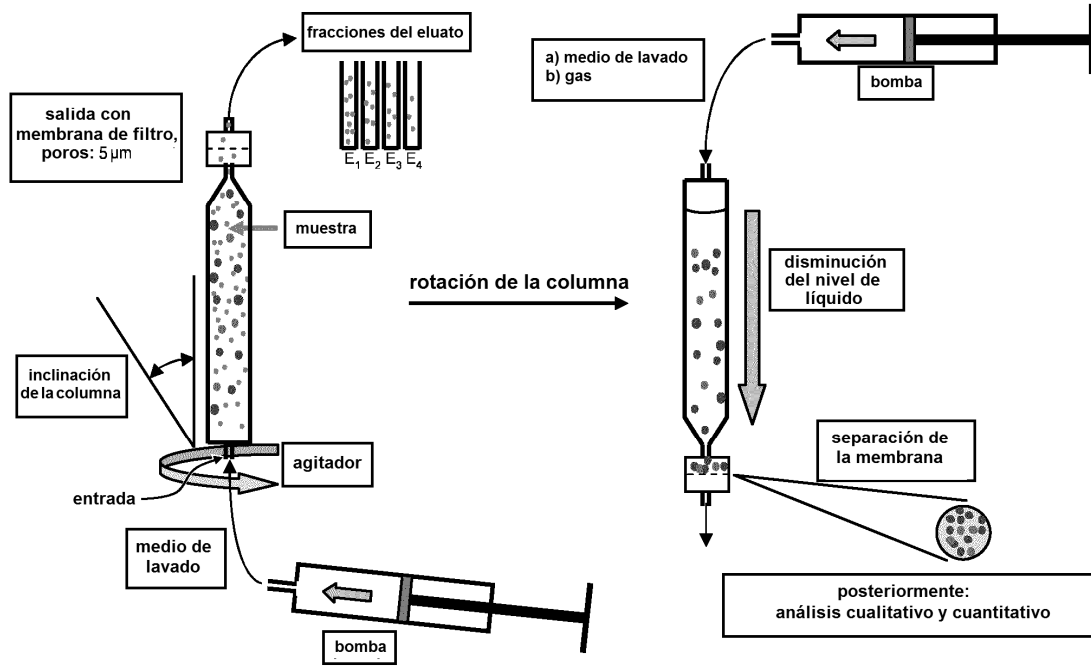


Fig. 1A

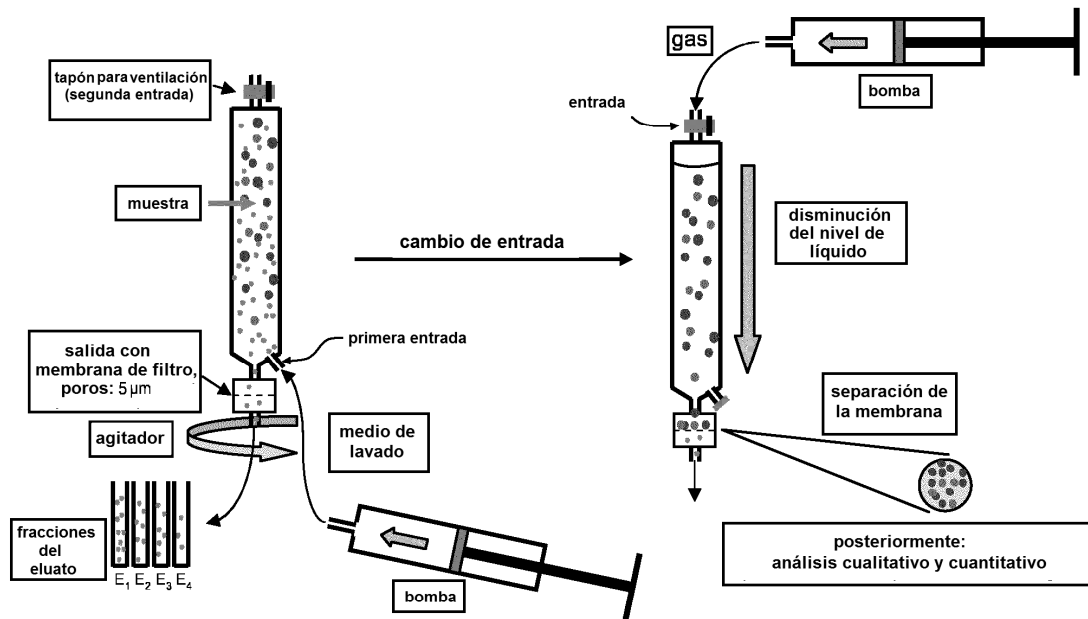


Fig. 1B

Fig. 2

experimento	línea celular	configuración/flujo
E1	PaTu 8988S	"lineal"
E2	PaTu 8988S	"lineal"
E3	PaTu 8988S	"lineal"
E4	PaTu 8988T	"lineal"
E5	PaTu 8988S	"turbulento"

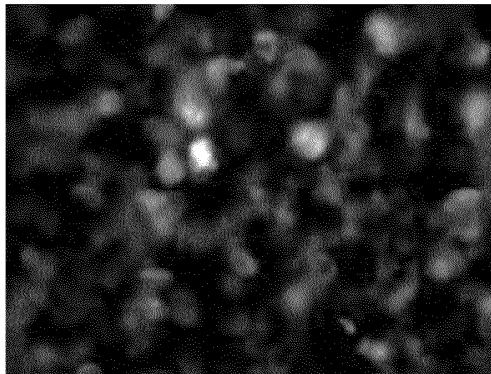


Fig. 3A

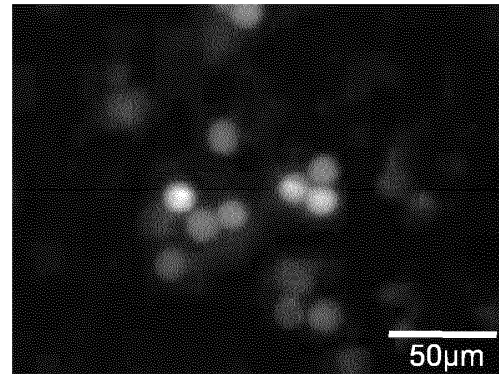
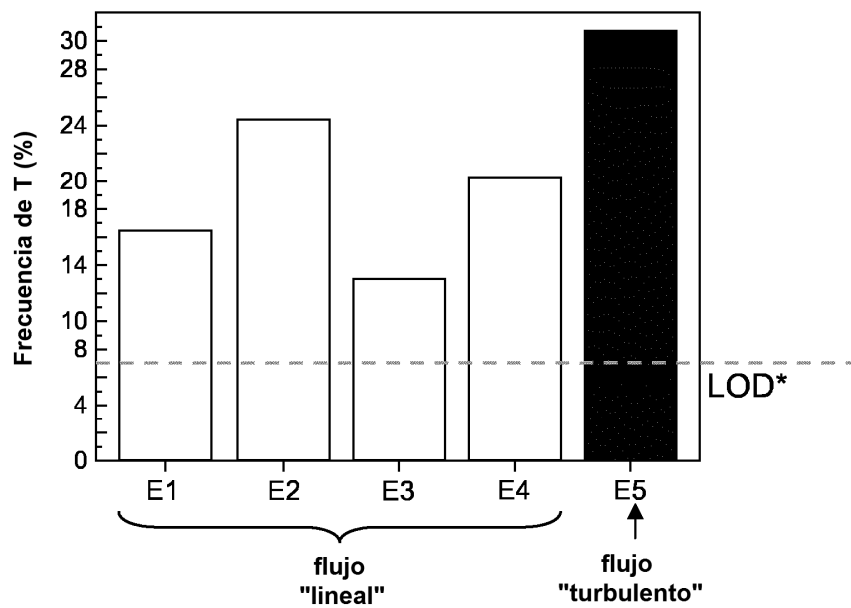


Fig. 3B

Fig. 4



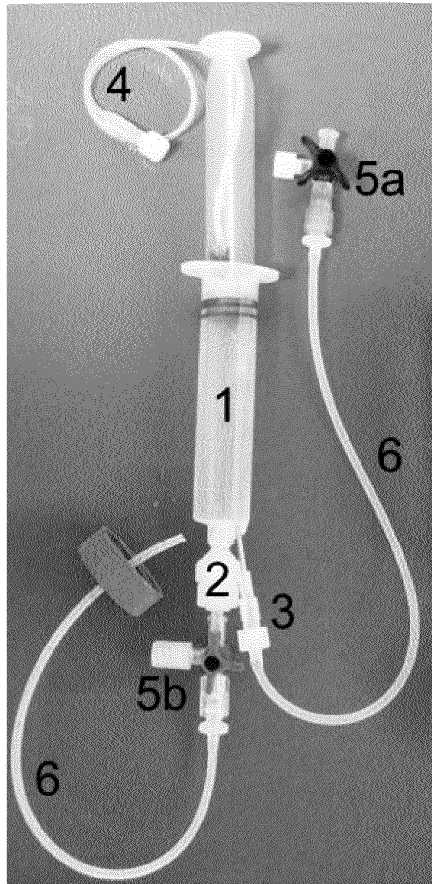


Fig. 5A

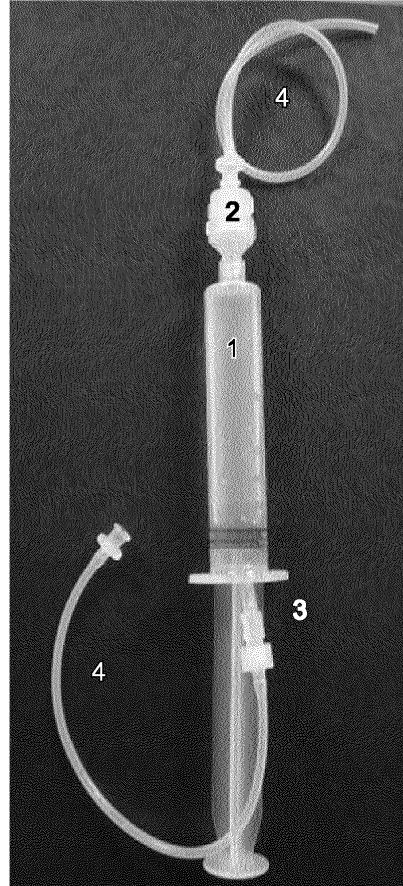


Fig. 5B