

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 548**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2012 PCT/EP2012/072431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2012 E 12784010 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2780446**

54 Título: **Método y dispositivo para modificación celular**

30 Prioridad:

**18.11.2011 EP 11189754**

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

**14.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MILTENYI, STEFAN y  
SCHEFFOLD, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 689 548 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 y dispositivo para modificación celular

## 5 Divulgación de la invención

La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para modificar células eucariotas sobre superficies funcionalizadas de un aparato de centrifugación

## 10 Antecedentes de la invención

Las condiciones durante el cultivo celular tienen un impacto sustancial sobre los fenotipos de las células y el cultivo celular deseado o no deseado conduce a la manipulación de las células.

15 El cultivo celular se refiere a los métodos bajo los cuales las células eucariotas, especialmente de origen mamífero, se mantienen en condiciones apropiadas con suministro de medio de cultivo celular en una incubadora o un fermentador de células. Las condiciones de cultivo celular varían ampliamente dependiendo del tipo de célula y la aplicación deseada. La variación de las condiciones de cultivo celular se puede utilizar para la expansión celular, diferenciación celular o fabricación de diferentes fenotipos del tipo de célula. El factor más comúnmente variado en los sistemas de cultivo es el medio de cultivo celular, para el cual se conoce un gran número de recetas (véase, por ejemplo, "Cell Culture Techniques" Humana Press, 1st. Edición, 2011).

20 Normalmente, los sistemas de cultivo utilizan una gran cantidad de medio en comparación con la masa de las células para proporcionar un depósito suficiente de nutrientes. En los sistemas estáticos, el medio que cubre las células está limitando la difusión del gas a las células si la superficie del cultivo celular no permite la difusión del gas. La convección macroscópica lenta del medio resulta en un suministro incontrolado e irregular de nutrientes a las células y puede dar como resultado diferentes células diferenciadas, es decir, manipuladas.

25 Cultivar grandes cantidades de células adheridas a una superficie sin el uso de vehículos o suspensión de células de gran volumen es difícil y requiere un cambio frecuente del medio. Los sistemas estáticos conocidos para el cultivo celular requieren mucha mano de obra y necesitan condiciones de sala limpia durante la manipulación de los cultivos celulares, por ejemplo, intercambio de medios o transferencia de células desde y hacia dispositivos de almacenamiento o incubadoras adecuadas para el crecimiento celular adecuado. En los sistemas dinámicos para el cultivo de células como fermentadores de rodillos, las células pueden dislocarse de la superficie del fermentador y se suspenden en los medios. Las condiciones para el crecimiento y suministro de nutrientes no son uniformes para las células adheridas y suspendidas y darán como resultado diferentes células diferenciadas o modificadas. Se conocen sistemas de centrifugación para la separación o modificación de células.

30 Desde hace mucho tiempo se sabe separar las células de una mezcla de células en fracciones de diferentes tipos de células con la ayuda de fuerzas centrífugas en una centrifuga de acuerdo con su densidad, es decir, su velocidad de sedimentación. La separación celular se lleva a cabo en una centrifuga, rotor y contenedor (matraz) especialmente diseñados para las células. Por ejemplo, la sangre completa se fracciona o separa por centrifugación en plasma sanguíneo (como fase superior), capa leucocitaria (capa delgada de leucocitos mezclados con plaquetas en la fase intermedia) y eritrocitos como fase inferior.

35 El efecto de la gravedad mejorada generada por la centrifugación sobre las células bajo condiciones de cultivo se ha investigado en diversas publicaciones. Huang et al (2009) divulgan en " Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells" en J. Biomed. En este documento, las rBMSCs primero se colocan en placa sobre cubreobjetos de vidrio; después de 24 h las células se habían adherido a los cubreobjetos y los cubreobjetos se transfirieron a una bolsa de cultivo de polietileno biocompatible, se incubaron con medio y luego se cultivaron en una centrifuga de células a 2 g de hipergravedad durante varios días. El medio se cambió cada 3 días durante el cultivo de HG/SMG.

40 Gaubin et al. describió en Microgravity Sci. Technol. 1991 Feb;3(4):246-50 los efectos de la hipergravedad sobre las células humanas adherentes. Galimberti et al divulgaron en "Hypergravity speeds up the development of T-lymphocyte motility", Eur Biophys J, May 1, 2006; 35(5): 393-400 un cultivo de células de hipergravedad durante 1 a 11 días. El cultivo celular se realiza en matraces que se colocaron verticalmente al eje de centrifugación en la centrifuga. El uso de matraces dentro de una centrifuga es propuesto además por Versati et al en "Effects of gravity on proliferation and diferenciación of adipose tissue-derived stem cells", J Gravit Physiol, 14(1): P127-128 (2007). En este documento, se utiliza una centrifuga de tamaño medio comercial disponible (MidiCAR) para acomodar matraces de cultivo celular para investigar el crecimiento celular bajo condiciones de hipergravedad. Morbidelli et al. investigaron en Microgravity Sci. technol (2009) 21: 135-140 el efecto de la hipergravedad sobre la función de las células endoteliales y la expresión génica. La manipulación celular o la modificación celular no se divulgaron en esta publicación.

Los métodos divulgados en estas publicaciones son con la excepción de condiciones de hipergravedad casi idénticos al cultivo celular común e implican etapas de manipulación manual como cambio de medio. El cambio de medio, es decir, el suministro de células que se van a cultivar con nutrientes implica detener el proceso de centrifugación, interrumpiendo de esta manera las fuerzas gravitatorias mejoradas. Las etapas de manipulación manual no solo son laboriosas y propensas a la contaminación, sino que también destruyen el microambiente de las células, como el contacto célula/célula o la interacción célula/célula. Un microambiente no afectado de las células es importante para el cultivo celular, por ejemplo, para la activación de linfocitos o procesos de transducción vírica o retrovírica. No existe divulgación en la técnica anterior sobre la naturaleza de la superficie de los matraces o la cámara de centrifugación.

Se sabe adicionalmente que la transducción retrovírica de las células puede acelerarse por hipergravedad, por ejemplo, descrito por Tonks et al en *Biotechnol Prog.* 2005; 21(3): 953-8. Con esta técnica, los vectores de retrovirus se recubren sobre placas y las células se ponen en contacto con el virus. Con el fin de promover el contacto entre las células objetivo y el vector del virus, la placa que comprende el virus y las células adheridas se colocan en una centrífuga. Esto requiere etapas de manipulación manual y las células no reciben medio durante la centrifugación.

El documento WO 2009/072003 divulga un sistema de centrifugación para la proliferación celular. La manipulación celular o la modificación celular no se divulgan en esta publicación.

El documento WO95/30432 divulga un dispositivo para la modificación celular que comprende una cámara de centrifugación que es una placa de microtitulación de 96 pozos en U situada dentro de una centrífuga oscilante. Los pozos están cubiertos con biglicano o laminina.

La invención proporciona un nuevo dispositivo y método para modificar poblaciones de células sobre superficies modificadas de células funcionalizadas bajo condiciones de hipergravedad generadas por la rotación de una cámara de centrifugación. Con el dispositivo y el método de la invención, las células eucariotas se pueden modificar y se pueden generar células eucariotas con características nuevas o modificadas.

#### Resumen de la invención

Es un primer objeto de la invención proporcionar un dispositivo de modificación celular que comprende una cámara de centrifugación con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° al eje rotacional de la cámara de centrifugación, en el que la cámara de centrifugación comprende por lo menos un puerto de entrada/salida y la cámara de centrifugación es adecuada para inmovilizar las células que se van a modificar en las superficies de modificación celular mediante la rotación de la cámara de centrifugación en 2 a 2000 g caracterizado porque el puerto de entrada/salida se integra en el eje rotacional de la cámara de centrifugación y la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación y se funcionaliza con por lo menos una sustancia en la que la sustancia se selecciona del grupo de sustancias que mejoran la proliferación de células, que inducen modificación genética y que inducen modificación celular de células.

El dispositivo de la invención comprende una cámara de centrifugación con por lo menos un puerto de entrada/salida a través del cual las células, líquidos de cultivo celular (medio), gases y otros materiales pueden entrar y salir de la cámara sin la necesidad de detener la rotación de la cámara de centrifugación. El dispositivo comprende preferiblemente un puerto de entrada y un puerto de salida para líquidos y por lo menos uno, especialmente dos para gases.

Otro objeto de la invención es un método para modificar células que comprende las etapas

- introducir células en un dispositivo de modificación celular, que comprende una cámara de centrifugación con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° al eje rotacional de la cámara de centrifugación en el que el puerto de entrada/salida se integra en el eje rotacional de la cámara de centrifugación y la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación,
- inmovilizar las células sobre las superficies de modificación celular mediante la rotación de la cámara de centrifugación en 2 a 2000 g
- mantener la rotación de la rotación de la cámara de centrifugación hasta que las células se modifican en la que las células se modifican al poner en contacto con por lo menos una superficie de modificación celular funcionalizada con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o inducir modificación genética y/o inducir modificación celular de células

La modificación celular de acuerdo con la invención se refiere a todos los métodos en los que las células se mantienen fisiológicamente activas y se modifican. La modificación puede resultar por ejemplo en un cambio del fenotipo, función, número o estado de diferenciación de las células, como

- a) división celular, diferenciación o proliferación celular

- b) activación de una cascada de transducción de señal
- c) cambio del estado de activación celular y/o función celular
- d) modificación genética de células
- e) crecimiento de capas de diferentes o idénticos de tipos celulares que complican contacto célula-célula

5 La modificación de las células resulta por ejemplo en un cambio de expresión de ciertas proteínas, de moléculas de ARN, de ARNmi, en un cambio de modificación postraducciona, en un cambio de metilación de ADN o en modificación de histona.

10 El dispositivo de modificación celular comprende superficies de modificación celular que se funcionalizan para modificación celular.

15 Se proporciona o activa el estímulo mecánico/químico que cambia los fenotipos de las células mediante las superficies de modificación celular funcionalizadas de la cámara de centrifugación de la invención. El término "superficie funcionalizada" como se utiliza es esta solicitud incluye todos los tipos de superficies que pueden proporcionar un estímulo a una célula. Normalmente, la superficie funcionalizada de modificación celular comprende un recubrimiento de compuesto químico o compuesto bioactivo físico inmovilizado, como

- proteínas, péptidos, ácidos nucleicos;
- moléculas separadoras que mejoran la adhesión de células o compuestos bioactivos a las superficies de modificación celular como polímeros hidrófilos (poli lactato funcionalizado, alcoholes polivinílicos, polisacáridos; dextranos funcionalizados);
- partículas orgánicas o inorgánicas como vehículos de compuestos bioactivos, especialmente partículas magnéticas recubiertas con poli lactato funcionalizado, alcoholes polivinílicos o dextranos funcionalizados;
- sustancias que mejoran la adhesión celular, por ejemplo, polipéptidos, lípidos, polisacáridos;
- virus y retrovirus o partículas de los mismos
- células que se pueden utilizar para modificación de una célula objetivo, tal como células que presentan antígenos, "células accesorias" que producen ciertos factores bioactivos o estirpes celulares transfectadas con ciertas moléculas funcionalizadas.
- estímulo proporcionado por mitógenos, citoquinas, anticuerpos estimuladores o ligandos receptores

20 El dispositivo de modificación celular de acuerdo con la invención comprende por lo menos una superficie de modificación celular que se funcionaliza por ejemplo para adherencia, proliferación, modificación genética y/o celular de las células, o para proliferación de células en una o más capas.

25 El dispositivo de modificación celular de acuerdo con la invención comprende por lo menos una superficie de modificación celular que se funcionaliza con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o induce la modificación genética y/o induce modificación celular de células. La superficie de modificación celular se puede funcionalizar con partículas que se funcionalizan con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o induce modificación genética y/o inducir modificación celular de células.

#### Funcionalización de superficie con sistema de unión celular

30 En una primera realización de la invención, las superficies de modificación celular se pueden funcionalizar con cualquier sustancia que es adecuada para el cultivo celular y útil o requerida para introducir condiciones de cultivo celular preferibles para un tipo de célula dada.

35 Las superficies de modificación celular se pueden funcionalizar con el fin de mejorar la adherencia y/o proliferación de células sobre las superficies de modificación celular. Las sustancias adecuadas para funcionalización de las superficies son glicoproteínas, polipéptidos, glicosaminoglicanos, disacáridos, moléculas de unión de biotina o proteína tags. Por ejemplo, la superficie se puede recubrir con proteínas de matriz extracelular.

40 Adicionalmente, las superficies de modificación celular pueden comprender un sistema de unión de afinidad. Uno de los sistemas de unión de afinidad más ampliamente utilizados es el sistema avidina-biotina o estreptavidina-biotina. Por ejemplo, la superficie de modificación celular se puede recubrir con avidina y/o estreptavidina (o derivados de los mismos) para facilitar la unión de una molécula biotinilada como un anticuerpo biotinilado. Es adicionalmente posible recubrir la superficie de modificación celular primero con biotina (o derivados de la misma) para facilitar la unión de otra molécula funcionalizada con estreptavidina y/o avidina. Ambas variantes dan como resultado una unión de alta afinidad de la segunda molécula a las superficies que modifican la célula. La fuerte interacción entre estreptavidina o avidina-biotina se debilita mucho más al utilizar una combinación de estreptavidina modificada o avidina y biotina modificada como la destiobiotina o un derivado de la misma como DSB-X Biotina (Hirsch et al. 2002: "Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation". Analytical Biochemistry 308: 343-357; US2008/0255004A1). Una proteína, tal como un anticuerpo, se puede biotinilar con la biotina modificada. Cuando esta proteína se inmoviliza al unir la biotina modificada a una estreptavidina o molécula de avidina modificada opcionalmente unida a la superficie de modificación celular, se puede liberar en condiciones suaves al agregar la biotina libre.

5 La funcionalización de la superficie de modificación celular como recubrimiento con biotina o (estrept)avidina se puede realizar antes o durante el proceso de la divulgación, tanto dentro como fuera de la cámara de centrifugación o el dispositivo de la divulgación. La renovación del recubrimiento o la funcionalización de la superficie de modificación celular se pueden realizar entre dos etapas del proceso y sin interrupción de la rotación de la cámara de centrifugación. Por ejemplo, la renovación de la superficie de modificación celular funcionalizada es posible al agregar moléculas o moléculas biotiniladas con (estrept)avidina a una superficie de modificación celular que se recubre con estreptavidina o biotina, respectivamente.

10 Sistemas de unión de afinidad adecuados para las superficies que modifican células comprenden anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos contra biotina o proteína tags, por ejemplo, IIsopeptago, BCCP o Myc-tag.

15 Las superficies que modifican las células se pueden recubrir adicionalmente con colecciones de sustancias sintetizadas con métodos de química combinatoria con el fin de identificar sustancias que funcionan mejor como sistema de unión para un tipo de célula dado.

20 Se pueden utilizar ciertos polímeros bioactivos como moléculas espaciadoras que potencian la adhesión de células o la unión de otras sustancias sobre las superficies de modificación celular como ácido poliláctico funcionalizado, alcoholes polivinílicos, polisacáridos o dextranos o derivados de los mismos. Este sistema de unión es especialmente útil como recubrimiento básico de una superficie de modificación celular producida a partir de un material plástico hidrófobo como policarbonato, poliestireno o polietileno. Las superficies de modificación celular se pueden recubrir con polímeros altamente reactivos como, por ejemplo, los divulgados en el documento No. 6,977,138B2.

25 Las superficies que modifican las células pueden comprender una o más sustancias que mejoran la adhesión y/o proliferación de las células. Especialmente útiles son una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en fibronectina, gelatina, laminina, elastina, ácido hialurónico, sulfato de queratano, sulfato de condroitina, proteoglicanos de sulfato de heparano, polid-lisina, avidina, estreptavidina, biotina, anticuerpos, anticuerpos contra biotina o proteína tags, proteína tags como IIsopeptago, BCCP, Myc-tag, Calmodulina-tag, FLAG-tag, HA-tag, His-tag, proteína de unión a maltosa-tag, Nus-tag, Glutathiona-S-transferasa-tag, proteína verde fluorescente-tag, Tioredoxina-tag, S-tag, Softag 1, Softag 3, estrep-tag, SBP-tag, Ty tag, certia, poli lactato, alcoholes polivinílicos, polisacáridos y dextrano.

35 Funcionalización de la superficie para la modificación celular

40 En una segunda realización del método de la invención, la modificación celular comprende modificación celular como activación, proliferación, desdiferenciación y/o diferenciación de las células. De acuerdo con lo anterior, las superficies que modifican las células se pueden funcionalizar con cualquier sustancia que sea adecuada para la modificación celular de células como la activación, proliferación, desdiferenciación y diferenciación celular de las células. La superficie de modificación celular se puede funcionalizar adicionalmente con partículas que se funcionalizan con por lo menos una sustancia adecuada para la modificación celular de células como activación, proliferación, desdiferenciación y diferenciación celular de células.

45 Particularmente, la modificación celular mediante el método y el dispositivo de la invención comprenden la alteración de la expresión génica, expresión de proteínas, modificaciones postraduccionales o postranscripcionales de genes, mRNA o proteínas, fosforilación de proteína, modificación de histona o modificación de cascadas de señalización intracelular (por ejemplo, Influjos de Ca<sup>2+</sup>).

50 Adicionalmente, la modificación celular puede comprender la activación celular por ejemplo mediante anticuerpos agonísticos o antagonísticos, citoquinas, factores de crecimiento, ligandos de (de-)activación, sustancias farmacológicamente activas, mitógenos, sustancias que modifican ADN o ARN.

Las superficies de modificación celular se pueden funcionalizar por una o más etapas de modificación celular.

55 Funcionalización de superficie para la modificación genética

60 En una tercera realización de la invención, las superficies de modificación celular se pueden funcionalizar con cualquier sustancia que sea adecuada para la modificación genética de células, es decir, modificación de células que utilizan material genético o cualquier otra sustancia que interactúe, se una o integre en polinucleótidos celulares o el genoma y/o que altere su función. De nuevo, la superficie de modificación celular se puede funcionalizar adicionalmente con partículas funcionalizadas con por lo menos una sustancia adecuada para modificación genética de células, es decir, modificación de células que utilizan material genético o cualquier otra sustancia que interactúa, se une o se integra en polinucleótidos celulares o el genoma y/o alterando su función.

65 La modificación genética de una célula de acuerdo con esta invención incluye, por ejemplo, transducción por virus, tales como vectores adenovíricos o retrovíricos o lentivíricos o transfección con ácidos nucleicos, es decir, ARNs

codificantes, ARN pequeños o grandes no codificantes (es decir ARNsi, ARNmi, ARNsh), plásmidos de expresión de ADN, ARNm o ARNsh u otras sustancias que interactúan o se unen o se integran en polinucleótidos celulares o el genoma y/o alteran su función.

5 La modificación genética adicionalmente comprende poner en contacto las células, por ejemplo, con un virus, partícula vírica, ARN, ADN, proteína, ligando, receptor, citocina, anticuerpo estimulante o desactivante, agente farmacológico, otras células (por ejemplo, células alimentadoras) o capas de varias células o tipos de células. El agente de contacto puede ser soluble en el líquido de cultivo celular o unido a las superficies de modificación celular, o puede expresarse o anclarse a la superficie de otra célula utilizada para el cocultivo.

10

Las superficies de modificación celular se pueden funcionalizar para una o más etapas de modificación genética.

Funcionalización de la superficie para capas de células

15 Cultivar células en superficies que modifican células planas a menudo da como resultado hojas bidimensionales, que es un entorno artificial para cualquier célula. Las células eucariotas experimentan in vivo un entorno tridimensional y están rodeadas por otras células, membranas, capas fibrosas y proteínas de adhesión. Se conocen cultivos celulares tridimensionales y se utilizan como matrices extracelulares de soporte, andamios y proteínas para proporcionar una morfología in vivo y un entorno fisiológicamente relevante. Los sistemas de cultivo celular 3D comercialmente disponibles son, por ejemplo, Matriz extracelular humana (ECM) MaxGel™, péptido sintético HydroMatrix™ y ECM de ratón, de Sigma® para soportar células madre y otros cultivos celulares.

20

25 Con el dispositivo y método de la invención se puede proporcionar una composición celular estratificada, en la que las células crecen en un sistema estratificado como tejido u órganos. Para este propósito, el dispositivo y el método de la invención se utilizan para inmovilizar células en posiciones definidas, por ejemplo, en capas sucesivas de tipos de células iguales o diferentes, y para mantener las células en una posición fija por las fuerzas centrífugas, lo que permite la construcción de capas complejas. Adicionalmente a crecer en un sistema estratificado, las células se pueden modificar adicionalmente como se describió anteriormente.

30

Las superficies que modifican las células del dispositivo de la invención pueden comprender una o una pluralidad de superficies de modificación celular funcionalizadas idénticas o diferentes. Por ejemplo, las superficies que modifican las células pueden estar equipadas con un sistema de unión por afinidad además de la funcionalización de la superficie para la modificación genética de las células.

35

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de modificación celular utilizado en las realizaciones de la invención.

40

La Figura 2 muestra una realización de la invención con una cámara en forma cónica que tiene superficies de cultivo con un vector normal que comparte un ángulo diferente de 90° (por ejemplo 105°) con el eje rotacional (g).

La Figura 3 muestra otra realización del dispositivo de la invención, en el que la cámara y/o el elemento tienen un botón cónico o placa base (b) y por lo menos una abertura o tubo (h) que llega al fondo de la cámara y/o el elemento.

45

La Figura 4 muestra diversas realizaciones de las cámaras de centrifugación con una pluralidad de estructuras internas o elementos concéntricos en la vista superior.

La Figura 5 muestra una realización con dos superficies de modificación celular; la primera superficie de modificación celular (b) tiene un vector normal de aproximadamente 90° al eje rotacional de la cámara de centrifugación y la segunda superficie de modificación celular (e) tiene un vector normal de aproximadamente 0° al eje rotacional de la cámara de centrifugación.

50

La Figura 6 y 7 muestran una variante con superficies en forma concéntrica o espiral de modificación celular (e) con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° (mostrado 90°) al eje rotacional de la cámara de centrifugación y una segunda superficie de modificación celular (f) con un vector normal que tiene un ángulo de (-45) - 45° (mostrado con un ángulo de 0°) al eje rotacional de la cámara de centrifugación.

55

La Figura 8 muestra una realización en la que las superficies de modificación celular (e) no están o no se conectan a lo largo de la segunda superficie de modificación celular f) y la cubierta superior de la cámara, permitiendo de esta manera un flujo de líquido de cultivo celular y gases a través de una tubería o canales c' y d'. Opcionalmente la tubería o canal d' comprende aberturas para distribución del líquido de cultivo celular y gases sobre las superficies de modificación celular (e).

60

La Figura 9 muestra una realización en la que se combinan las superficies en forma concéntrica o espiral de modificación celular (f) con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° (mostrado 90°) al eje rotacional de la cámara de centrifugación y segunda superficie de modificación celular (h) con un vector normal que tiene un ángulo de (-45) - 45° (mostrado 0°) al eje rotacional de la cámara de centrifugación.

Descripción detallada

65

En general, la modificación celular de la divulgación implica condiciones de cultivo celular en las que las células se mantienen fisiológicamente activas durante un período de tiempo. Esto se logra generalmente a temperaturas de 25-45°C y con un suministro de nutrientes como glucosa y gases como O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Durante el proceso de cultivo, las condiciones se pueden mantener estables o están sujetas a cambios tales como condiciones de hiper/hipoxia, presión en aumento/disminuida, diferentes fuerzas gravitacionales en aumento/disminuidas, suministro en aumento/disminuido de nutrientes o factores de crecimiento, temperatura en aumento/disminuida, alta o baja densidad celular, osmolaridad en medio en aumento/disminuida, o gradientes de nutrientes, quimiocinas/citoquinas/factores de crecimiento o anticuerpos estimulantes/desactivantes.

10 Medios celulares

En el método de la divulgación, se pueden utilizar diversos líquidos (medios) de cultivo celular conocidos en la técnica de cultivo celular como estímulo para células, que incluyen uno o más de los siguientes medios DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, medio de Iscove, X-VIVO™, cada uno opcionalmente complementado, por ejemplo, con suero de ternera fetal, suero humano o sustitutos de suero u otros nutrientes o estímulos celulares como citoquinas. Los medios pueden ser medios celulares estándar como los medios mencionados anteriormente o medios especiales para, por ejemplo, cultivo de células humanas primarias (por ejemplo, para células endoteliales, hepatocitos o queratinocitos) o células madre (por ejemplo, maduración de células dendríticas, expansión hematopoyética, queratonocitos, células madre mesenquimales o expansión de células T). Los medios pueden tener suplementos o reactivos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, albúminas y proteínas de transporte, aminoácidos y vitaminas, antibióticos, factores de fijación, factores de crecimiento y citoquinas, hormonas o agentes solubilizantes. Diversos medios están disponibles comercialmente por ejemplo de LifeTechnologies o Sigma-Aldrich.

25 Condiciones de centrifugación

Durante la modificación celular en el dispositivo y el método de la invención, las células que se van a modificar se inmovilizan en las superficies de modificación celular por las fuerzas gravitacionales debido a la rotación de la cámara de centrifugación.

La invención preferiblemente se lleva a cabo a una velocidad rotacional de la cámara de centrifugación que genera fuerzas centrífugas entre 20 y 1000 g, más preferiblemente entre 20 y 500 g y especialmente preferible entre 20 y 100 g.

El grado de modificación celular se puede ajustar por la velocidad de rotación de la cámara de centrifugación, debido a que las fuerzas gravitacionales que se representan sobre las células dependen de la velocidad de la cámara de centrifugación, densidad del medio de cultivo, densidad de las células y la distancia de una célula individual al eje rotacional de la cámara de centrifugación.

La magnitud de las fuerzas centrífugas F que actúan sobre una célula dada depende de la masa m de la célula, su velocidad, es decir, su velocidad ω angular, y el radio r de curvatura, es decir, la distancia entre la célula y el eje de rotación de la cámara. de acuerdo con la siguiente fórmula

$$F = m r \omega^2$$

La masa m de la célula se calcula a partir del volumen celular (V<sub>célula</sub>) y la densidad celular (δ<sub>célula</sub>). La densidad celular δ<sub>célula</sub> de células eucariotas está entre 1.04 y 1.09 g/cm<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta la fuerza de flotación relativa a la densidad del medio (δ<sub>medio</sub>), la fuerza centrífuga F se puede calcular de la siguiente manera

$$F = (\delta_{célula} - \delta_{medio}) V_{célula} r \omega^2$$

La velocidad angular se puede expresar como rotaciones de la cámara por tiempo (2 π/T). Si una célula individual está ubicada en la pared interna de la cámara, r es igual al radio interno de la cámara.

El grado de interacción entre la superficie y la célula se puede modificar cambiando la densidad del medio. Normalmente, la densidad del medio (δ<sub>medio</sub>) es de alrededor de 1.0 g/cm<sup>3</sup>, pero puede cambiarse por los aditivos apropiados. De acuerdo con lo anterior, las células pueden liberarse durante el proceso de la invención desde las superficies de modificación celular utilizando un medio celular con una densidad más alta o mejorando la densidad del medio celular al agregar aditivos apropiados.

La modificación celular de acuerdo con la invención implica condiciones de centrifugación aplicadas a las células tanto tiempo como sea necesario para inducir la modificación deseada de las células. La duración de las fuerzas centrífugas depende de la modificación deseada de las células y no está limitada. Las fuerzas centrífugas se pueden aplicar a las células durante el proceso de la invención por tan solo 10 segundos o hasta 10 días. Normalmente, las fuerzas centrífugas de más de 2 g, especialmente más de 5 g o más de 10 g se aplican durante por lo menos 40, 120 o 360 minutos hasta 720 minutos.

También es posible mantener la centrifugación a la misma velocidad durante todo el proceso o utilizar una secuencia de varios (2-50) períodos de fuerzas centrífugas con la misma o diferente velocidad de rotación. La duración de las fuerzas centrífugas puede variar, dependiendo de la modificación deseada de las células. Por ejemplo, la velocidad de rotación puede ser mayor si está implicada una etapa de proceso para modificaciones genéticas y/o celulares de células en comparación con la velocidad de rotación durante las etapas para cultivar y/o expandir las células. El flujo continuo de líquido a través de la cámara de centrifugación y/o sobre las superficies de modificación celular se puede lograr mediante la variación de las fuerzas centrífugas, es decir, mediante una variación de las velocidades de rotación de la cámara.

#### Uso de partículas

La modificación de las células con el dispositivo y el método de la invención puede comprender adicionalmente el uso de partículas, especialmente partículas que tienen superficies funcionalizadas (es decir, biológicamente activas). Las partículas se pueden producir a partir de material orgánico como polímeros (poli dextranos, polisacáridos, poliestireno, poliláctidos o alcohol polivinílico, cada uno modificado químicamente o no modificado) o material inorgánico como sílice, alúmina o metales ferromagnéticos u óxidos metálicos. Las partículas hechas de material inorgánico pueden estar recubiertas con los polímeros mencionados. El tamaño de las partículas depende de su función prevista y puede variar entre 20 nm y 500  $\mu\text{m}$ .

Preferiblemente, las partículas están recubiertas o por lo menos dopadas con sustancias biológicamente activas. Las sustancias biológicamente activas se pueden mezclar con el material a granel de la partícula y se pueden liberar durante el proceso de la invención. En otra variante, las sustancias biológicamente activas solo están presentes en la superficie externa de las partículas.

Las partículas pueden contener o recubrirse con todas las sustancias biológicamente activas ya divulgadas en la presente solicitud para la funcionalización de la superficie para capas celulares, la funcionalización de la superficie con sistemas de unión celular, la funcionalización de la superficie para la modificación celular o la funcionalización de la superficie para la modificación genética.

Las partículas se pueden recubrir o inmovilizarse mediante las fuerzas centrífugas sobre las superficies de modificación celular antes de introducir las células que se van a modificar en la cámara de centrifugación. En este caso, las células están inmovilizadas por las fuerzas centrífugas sobre las partículas. En otra variante o método de la divulgación, primero las células que se van a modificar se inmovilizan mediante las fuerzas centrífugas sobre las superficies de modificación celular. Luego, las partículas se introducen en la cámara de centrifugación, por ejemplo, como suspensión en el medio celular. En esta variante de la divulgación, las partículas se inmovilizan mediante las fuerzas centrífugas sobre las células.

Las partículas y/o sustancias biológicamente activas se ponen en estrecho contacto con las células que se van a modificar con la ayuda de las fuerzas centrífugas ejercidas sobre la membrana celular de las células. Dependiendo de las fuerzas centrífugas ejercidas sobre la membrana celular de las células, incluso es posible que las partículas y/o sustancias biológicamente activas se introduzcan en las células. Se pueden agregar sustancias que permeabilizan transitoriamente a la membrana celular para ayudar en este proceso.

Las partículas se pueden utilizar en cualquier etapa del proceso de la divulgación, sola o además de otras sustancias o recubrimientos biológicamente activos divulgados.

#### Etapas de secuencia de procesamiento

En otra realización del método de la invención, las células se someten a una secuencia de por lo menos dos fuerzas gravitacionales diferentes, es decir, velocidades de rotación de la cámara de centrifugación. En esta realización, se pueden realizar por lo menos dos etapas de proceso diferentes, cada una con una velocidad de rotación adaptada para la etapa de proceso respectiva.

Una secuencia de fuerzas centrífugas iguales o diferentes aplicadas sobre las células (es decir, la velocidad de rotación de la cámara de centrifugación) permite el control del tipo o el grado de modificación celular. Por ejemplo, las células se pueden modificar genéticamente al transducir con partículas de virus en una primera etapa de procesamiento a una velocidad de rotación que genera fuerzas centrífugas de 100 g a 1000 g y a continuación cultivarse/expandirse en una segunda etapa de procesamiento a una velocidad de rotación que genera fuerzas centrífugas de 2 g a 100 g.

El método de la invención puede comprender una secuencia de etapas de procesamiento que consiste en por lo menos dos etapas de centrifugación con las mismas o diferentes fuerzas centrífugas aplicadas que están opcionalmente interrumpidas mediante, por ejemplo, el cambio o renovación de las superficies de modificación celular o medios de cultivo, o la adición de sustancias o células estimulantes. El intercambio o la renovación de cualquier material se pueden realizar durante el proceso de la invención sin abrir la cámara de centrifugación.

Por ejemplo, el método de la invención puede comprender una secuencia de etapas de procesamiento, en el que las células se introducen primero en la cámara y se inmovilizan en las superficies de cultivo funcionalizadas mediante la rotación de la cámara de centrifugación. Después de una primera modificación, como una etapa de proliferación, las células se enjuagan a baja velocidad de rotación de la cámara desde las superficies de modificación celular a un contenedor de almacenamiento intermedio a través del puerto de entrada/salida. Entonces, la cámara de centrifugación se puede detener y se puede aplicar un recubrimiento nuevo (igual o diferente) a las superficies de modificación celular. En una variante alternativa de la invención, la rotación de la cámara no se detiene, y las superficies de modificación celular se recubren con el mismo recubrimiento (fresco) o funcionalizado diferente bajo rotación continua de la cámara. Un sistema de unión por afinidad como se describe anteriormente se puede utilizar para una etapa de recubrimiento.

Después de que las superficies de modificación celular se reemplazan o vuelven a recubrir, las células se vuelven a introducir desde el contenedor de tampón a la cámara de centrifugación y se puede realizar la siguiente etapa de modificación bajo condiciones de centrifugación.

En un ejemplo adicional para una secuencia de etapas de procesamiento durante el proceso de la invención, la superficie de modificación celular se puede recubrir primero, por ejemplo, con BD Primaria™ para mejorar la proliferación de las células y luego con partículas de virus para una o más etapas de transducción. La superficie de modificación celular se puede recubrir con partículas de virus nuevas (iguales o diferentes) entre dos procesos de transducción. Para funcionalizar la superficie de modificación celular con partículas de virus, las células se enjuagan de las superficies y se almacenan en un contenedor de tampón. Después del proceso de recubrimiento, las células se reintroducen en la cámara de centrifugación y se puede iniciar la segunda etapa de cultivo.

#### Tanda y modificación continua

La cámara de centrifugación y el método de la invención permiten tanto la modificación por tandas como la modificación continua de las células. En una modificación por tandas, las células permanecen durante todo el proceso dentro de la cámara o se eliminan completamente y después de una etapa intermedia reintroducida en la cámara. El procesamiento por tandas generalmente involucra un almacenamiento intermedio de células en un contenedor de tampón.

La modificación continua significa que las células se introducen y extraen continuamente de la cámara durante el proceso de modificación. La modificación continua implica, por ejemplo, una cámara de centrifugación con forma cónica o células que modifican las superficies y/o un flujo de medios a través de la cámara que transporta las células según se requiera. Para la modificación continua, la cámara de centrifugación comprende por lo menos dos puertos de entrada/salida para líquidos y gases y opcionalmente un almacenamiento intermedio de células en un contenedor de tampón.

La introducción de las células en la cámara, el enjuague de las células en un contenedor de tampón, el lavado y el recubrimiento de las superficies de modificación celular y la reintroducción de las células en la cámara se puede realizar con la ayuda de bombas y tubos y se pueden controlar, por ejemplo, mediante el software apropiado.

#### Suministro de nutrientes y condiciones generales

La temperatura y la composición del gas de la cámara de centrifugación pueden controlarse y ajustarse si es apropiado para los tipos de células o las etapas de modificación a realizar. Para este fin, se pueden unir medios de calentamiento y/o enfriamiento al dispositivo de la invención.

En el método de la invención, se prefiere cubrir las células que se van a modificar con una capa de líquido (medio) tan delgada como sea posible para suministrar a las células gases tales como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por difusión. Cuanto más delgada sea la película, más fácil será la difusión de los gases y se puede suministrar mejores células. Por lo tanto, en otra variante de la invención, el líquido de cultivo celular se mueve sobre o en relación con las células, por ejemplo, por cambios en la velocidad de rotación o al agregar medios adicionales a través de los puertos. Preferiblemente, los medios líquidos se mueven sobre las células durante la rotación de la cámara en forma de una película líquida con un espesor de menos de 50 µm, menos de 100 µm, menos de 200 µm, menos de 500 µm, menos de 1000 µm o menos de 2000 µm. Las películas de líquidos de cultivo celular que tienen dicho espesor son suficientes para cubrir y suministrar a las células los nutrientes y gases necesarios. Las células se pueden suministrar con líquidos de cultivo celular mediante el movimiento constante del líquido con relación a las células.

En otra variante de la invención, los líquidos de cultivo celular se intercambian o renuevan durante el proceso de modificación en un flujo constante. Para esta variante, el dispositivo de la invención tiene por lo menos dos puertos para la entrada/salida del líquido de cultivo celular. El intercambio de líquidos se puede realizar sin detener la rotación de la cámara de centrifugación.

El líquido (medio) de cultivo celular suministrado a las células puede tener la misma composición durante todo el proceso de modificación. Adicionalmente, es posible cambiar la composición del medio durante el proceso de modificación, por ejemplo, al retirar un primer medio y suministrar un segundo medio desde/hacia la cámara o mediante un flujo constante de medio con un cambio constante de composición.

5 Células que se van a modificar

Las células eucariotas modificadas en el dispositivo y/o el método de acuerdo con la invención pueden proceder de cualquier fuente de mamífero o humano, tales como tumor, sangre, tejido, médula ósea o estirpes celulares, por ejemplo, uno o más tipos de células seleccionadas del grupo. que consiste en células humanas, fibroblastos, células madre embrionarias, queratinocitos, melanocitos, células madre mesenquimales, células epiteliales, células T, células T reguladoras, células B, células NK, células neuronales, células dendríticas, células madre (adulto, embrionario, hemapoyético), células que se originan del epitelio, ectodermo, endodermo, endotelio, mesodermo, tejido epitelial, lámina basal, vasculatura, tejido conectivo, tejidos fibrosos, tejido muscular, músculo visceral o liso, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido nervioso, cerebro, médula espinal, nervios craneales, nervios espinales o neuronas motoras.

20 El método y el dispositivo de la invención son especialmente adecuados para la modificación de células eucariotas, preferiblemente para la modificación de uno o más tipos de células seleccionadas del grupo de sangre humana y células del sistema inmune que consisten en megacariocitos (precursor de plaquetas), monocitos, macrófagos de tejido conectivo (varios tipos), célula de Langerhans epidérmica, osteoclastos (en el hueso), célula dendrítica; tejidos linfoides), células microgliales (en el sistema nervioso central), granulocitos neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, células T colaboradoras, células T supresoras, células T citotóxicas, linfocitos T naturales, células B, linfocitos naturales, reticulocitos, Células madre y progenitores comprometidos para la sangre y el sistema inmunitario (varios tipos), y células madre de tejido o tumor.

25 De acuerdo con el método de la invención, se pueden modificar por lo menos dos tipos de células o células diferentes de por lo menos dos fenotipos diferentes.

30 Las células exhiben un fenotipo diferente después de la modificación. Es un objeto adicional de la divulgación proporcionar una composición celular modificada por el método de la invención. Otro objeto más de la divulgación es proporcionar una composición celular con por lo menos dos capas, comprendiendo las capas células modificadas de diferentes tipos de células o células de un fenotipo diferente.

35 Técnicas de modificación

Es una ventaja del dispositivo y método de cultivo celular de acuerdo con la invención que las células se presionan contra las superficies de modificación celular mediante las fuerzas centrífugas, ampliando de esta manera la superficie de la célula adyacente a las superficies modificadoras de las células funcionalizadas. La ampliación de la superficie de la célula aumenta las posibilidades de contacto entre, por ejemplo, una célula objetivo que se va a modificar y una célula alimentadora o un retrovirus.

40 Adicionalmente, las fuerzas centrífugas ponen las superficies de cultivo funcionalizadas en estrecho contacto con la membrana de las células que se van a modificar. El contacto cercano hace que la célula actúe, por ejemplo, mediante la transducción de señales o la absorción del material extracelular en la célula. Las técnicas de modificación durante el método de la invención pueden comprender la modificación genética o celular de las células o la preparación de capas celulares.

50 Modificación genética

El término "modificación genética de células" se refiere a todos los procesos que manipulan el programa genético de una célula en el nivel de ADN, ARN o traducción de ARN en proteínas mediante la introducción de oligo- y/o polinucleótidos en el material genético de la célula. El material transfectado solo se puede expresar transitoriamente, por ejemplo, en forma de plásmidos dentro de la célula, o el material transfectado se puede expresar de forma estable mediante la integración del material genético en el genoma de la célula. La modificación genética durante el método de la invención comprende todas las técnicas de clonación y transformación molecular para alterar la estructura y las características de los genes de una célula que se va a modificar. Esto puede incluir el uso de técnicas de ácido nucleico recombinante (ADN o ARN) para formar nuevas combinaciones de material genético hereditario seguido por la incorporación de dicho material en la célula.

60 El proceso de la invención puede comprender diversos métodos de introducción de ácidos nucleicos extraños en una célula eucariota, que son conocidos por los expertos en la técnica.

65 Dichos métodos incluyen la aplicación de tratamiento físico, como, por ejemplo, la aplicación de nanopartículas o magnetofección, el uso de materiales químicos como ciclodextrina o polímeros catiónicos tales como DEAE-dextrano o polietilenimina o el uso de partículas biológicas (virus) que se utilizan como vehículos.

La modificación genética de las células dentro del método de la invención comprende adicionalmente el uso de agentes de modificación genética que dan como resultado una modificación genética de la célula. Dichos agentes de modificación genética son ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN. El ácido nucleico puede estar desnudo o en complejos con moléculas vehículo tales como polímeros, liposomas o micropartículas. El ADN puede estar en forma lineal (oligonucleótidos, polinucleótidos) o en forma circularizada (por ejemplo, ADN-plásmidos). El ARN puede ser cualquier tipo de ARN que se sabe que existe en la célula (por ejemplo, ARNm, ARNm<sub>i</sub>, ARN<sub>si</sub>, ARN<sub>sh</sub>). El ácido nucleico (ADN o ARN) puede ser derivado de los ácidos nucleicos de origen natural o se puede modificar químicamente. Por ejemplo, los nucleótidos modificados pueden incluir: ácido nucleico unido (LNA), nucleótidos 2-O-Me, 2'-O-metoxietilo y T fluoro. Las modificaciones del esqueleto incluyen, por ejemplo, fosforotioato y fosfato.

Otro agente de modificación genético es el sistema de suministro génico basado en virus que implica virus recombinantes modificados genéticamente, como, por ejemplo, adenovirus, virus Adeno-Asociado, Retrovirus, virus Vaccinia y Lentivirus, que llevan el gen de interés en su cápside.

El agente de modificación genético también comprende mutágenos químicos tales como análogos de base (por ejemplo, 5-bromouracilo (5-BU)) que se incorporan en el ADN, agentes que modifican purinas y piridinas o agentes que labilizan bases (por ejemplo, óxido nitroso, hidroxilamina y agentes alquilantes) y agentes que producen distorsiones en el ADN (por ejemplo ej., colorantes fluorescentes de acridina tales como proflavina y naranja de acridina).

La modificación genética de las células dentro del método de la invención comprende, por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, en la célula al utilizar las partículas ya divulgadas. El ácido nucleico que se va a introducir en la célula se puede unir de forma covalente o no covalente a la superficie de las partículas, dando como resultados complejos de partículas de ácido nucleico. El complejo de partículas de ácido nucleico se puede inmovilizar en la superficie de modificación celular de la cámara de centrifugación o los complejos de partículas de ácido nucleico se pueden administrar en el líquido/medio dentro de la cámara de centrifugación. Entonces la aplicación de las fuerzas gravitatorias mediante la rotación de la cámara de centrifugación de la presente invención dirige los complejos de partículas de ácido nucleico hacia y dentro de las células objetivo, donde se libera la carga.

La modificación genética de las células dentro del método de la invención comprende, por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, en la célula utilizando agentes de transfección basados en productos químicos tales como por ejemplo ciclodextrina, polímeros, liposomas. Los complejos de ácido nucleico, por ejemplo, ADN (lineal o en forma circular, por ejemplo, plásmido) o ARN, y los agentes de transfección química, por ejemplo, Lipofectamin® se puede inmovilizar en la superficie de modificación celular de la cámara de centrifugación. Entonces la aplicación de fuerzas gravitacionales por rotación de la cámara de centrifugación de la presente invención conduce a los complejos de ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, y los agentes de transfección química hacia y dentro de las células objetivo. Alternativamente, los complejos de ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, y los agentes de transfección química, por ejemplo, Lipofectamin® se pueden administrar en el líquido/medio dentro de la cámara de centrifugación, lo que da como resultado la transfección de la célula durante la centrifugación de la cámara de centrifugación.

La modificación genética de las células dentro del método de la invención comprende, por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, en la célula utilizando sistemas de suministro de genes basados en virus (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus y lentivirus). Las partículas de virus o virus que van a introducirse en la célula pueden unirse de forma covalente o no covalente a la superficie de la cámara modificadora de células de la cámara de centrifugación o las partículas de virus o virus se pueden administrar al líquido/medio de la cámara de centrifugación. Luego la aplicación de fuerzas gravitacionales por rotación de la cámara de centrifugación de la presente invención dirige las partículas de virus o virus hacia y dentro de las células objetivo.

En algunas realizaciones de la invención, las superficies de modificación celular están recubiertas opcionalmente con sistemas de unión por afinidad, es decir, péptidos que mejoran la transducción retroviral como, por ejemplo, RetroNectin® (Takara, Japón). La naturaleza multivalente de dichos sistemas de unión de afinidad permite la unión simultánea de células y virus, acercándolos a los dos físicamente. La colocalización de virus y células facilita la infección, lo que resulta en mayores frecuencias de transferencia de genes estables. Los sistemas de unión de afinidad se pueden recubrir adicionalmente con partículas, lo que da como resultado una colocalización de virus y células en las partículas. Las propias partículas se pueden recubrir sobre la superficie de modificación celular o se pueden utilizar en suspensión e inmovilizarse sobre las células mediante centrifugación.

En otras realizaciones de la invención, las superficies de modificación celular se funcionalizan con modificaciones, por ejemplo, pseudotipado, virus como vectores tales como los divulgados en el documento WO2008/037458. Los vectores derivados de los retrovirus gamma, por ejemplo, el virus de la leucemia murina (MLV), se han convertido en una herramienta estándar para la tecnología de transferencia génica y se han utilizado frecuentemente en ensayos clínicos de terapia génica (Ross et al., Hum. Gen Ther. 7:1781-1790, 1996). La pseudotipación de vectores retrovirales, que incluyen vectores de VIH o vectores de MLV, se refiere a la incorporación de proteínas de envoltura

de virus heterólogos en la membrana de la envoltura retroviral. Dichos vectores retrovirales pseudotipados exhiben entonces un fenotipo de receptor similar al virus del que se derivó la proteína de la envoltura. Dependiendo del rango de anfitrión de dicho virus, los vectores retrovirales pseudotipados tendrán entonces un rango de anfitrión ampliado o estrechado en comparación con las partículas de vector que tienen las proteínas de envoltura retroviral homólogas incorporadas. Vectores pseudotipados útiles incluyen vectores de MLV pseudotipados con la proteína Env de VIH, la glicoproteína de virus Ebola, o la glicoproteína de baculovirus.

El virus del sarampión (MeV), un prototipo de morbilivirus del género Paramyxoviridae, utiliza dos glicoproteínas de la envoltura (la proteína de fusión (F) y la proteína de hemaglutinina (H)) para obtener la entrada en la célula objetivo. El documento WO2008/037458 describe el pseudotipado de vectores retrovirales con proteínas de envoltura heterólogas derivadas de la familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus. La incorporación de las proteínas morbilivirus F y H que tienen colas citoplásmicas truncadas en partículas de vectores lentivirales permite una transducción efectiva de las células. Adicionalmente, estas partículas de vector pseudotipado permiten la transferencia génica dirigida a un tipo de célula dado de interés modificando una proteína H mutada y truncada con un anticuerpo o ligando de cadena sencilla dirigido contra un marcador de superficie celular de la célula objetivo, por ejemplo, el marcador de células madre CD133.

#### Modificación celular

El término "modificación de células" se refiere a todos los procesos que dan como resultado una modificación morfológica, funcional o molecular de las células (por ejemplo, activación, proliferación, reprogramación, desdiferenciación, diferenciación o maduración). Esta realización de la invención comprende técnicas como la activación o estimulación celular, por ejemplo, por anticuerpos o citoquinas agonistas o antagonistas o la modulación in vitro de células como la expansión in vitro y/o la modificación genética de linfocitos. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden cultivar con anticuerpos contra moléculas de superficie celular como CD3 ya sea unidas a una matriz macroscópica como las superficies de modificación celular de la invención o en forma soluble en presencia de células presentadoras de antígenos, por ejemplo, utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o fracciones de las mismas como células alimentadoras y estímulos policlonales. En lugar de anticuerpos CD3, se pueden utilizar antígenos específicos para la estimulación y expansión de células T específicas de antígeno. En estos tipos de cultivos, las transducciones víricas de las células T o cualquier otro tipo de modificación genética como se describió anteriormente también se pueden realizar como ya se ha descrito, para lograr modificaciones celulares.

La modificación celular de las células dentro del método de la invención comprende, por ejemplo, el uso de células alimentadoras o la modificación de células que secretan ciertos metabolitos, factores de crecimiento o diferenciación en el medio o que entregan señales directamente a las células que se van a modificar.

Los cultivos alimentadores, que secretan factores de crecimiento, se pueden preparar a partir de esplenocitos, macrófagos, timocitos o fibroblastos. Por ejemplo, los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) a menudo se utilizan como células alimentadoras en la investigación con células madre de embriones humanos. Las células modificadas genéticamente, tales como células K562, transfectadas de forma estable con moléculas estimuladoras, por ejemplo, MHC clase I o MHC clase II, ligandos para moléculas coestimuladoras CD28, ICOS, Notch, CD137, CD40 o citoquinas, por ejemplo IL-2 o IL-15 o moléculas facilitadoras, por ejemplo También se puede utilizar el receptor Fc-gamma (para marcar con moléculas estimuladoras que portan Fc, por ejemplo, anticuerpos o proteínas de fusión Fc).

La modificación celular con el método de la invención puede comprender adicionalmente el suministro de factores de transcripción (TF) en células que promueven la diferenciación, transdiferenciación o desdiferenciación/reprogramación de las células objetivo. En esta realización de la invención, el método comprende alterar el estado de una célula, por ejemplo, una célula somática adulta, una célula madre embrionaria o adulta, o una célula madre mesenquimal (MSC) mediante la introducción de uno o más factores de transcripción o sustancias, que alteran la expresión o actividad de dichos factores de transcripción, en las células. Las células luego alteran el nivel de expresión de por lo menos un polipéptido (por ejemplo, Oct3/4 para una célula madre pluripotente inducida) y/o se cambia la programación epigenética de la célula.

La introducción del factor de transcripción en las células objetivo se puede lograr al poner en contacto una célula con un factor de transcripción, un polipéptido o fragmento del mismo fusionado a un dominio de transducción de proteínas que permite la entrada de la proteína en la célula o por cualquier otro medio para transportar sustancias activas como se definió anteriormente en las células y por lo tanto al alterar el perfil de expresión y/o el estado epigenético, por ejemplo lo que lleva a la reprogramación de las células. Por ejemplo, Xie et al (2004, Cell: 117: 663-676) divulgan un método para la expresión forzada de un único TF para activar una célula B especializada para transdiferenciarse en un macrófago.

La modificación celular de las células durante los métodos de la invención se puede lograr adicionalmente con un cóctel de moléculas de señalización extrínseca para potenciar la diferenciación y ampliar el espectro de plasticidad

de MSC. Brazilay et al (2009), Stem Cells, 27: 2509-2515 divulgan un método adecuado para suministrar TF en MSCs.

El método de la invención es especialmente adecuado para la modificación y expansión de células T, ya sea policlonal o específico de antígeno. La interacción de las células T con un agente estimulador como un anticuerpo estimulador o un complejo MHC/péptido específico en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) puede aumentarse mediante el aumento de la fuerza gravitatoria durante la centrifugación. Para este propósito, las superficies de cultivo se pueden recubrir con moléculas estimuladoras de células T, como anticuerpos estimuladores contra CD3, CD28 o CD137. Es ventajoso activar las células T que se van a modificar con anticuerpos estimuladores en una forma soluble o con partículas recubiertas con anticuerpos estimuladores durante el proceso de la invención. Adicionalmente, las células T se pueden cultivar conjuntamente con APC, como PBMC empobrecidas en células T o APC artificiales (por ejemplo, Células K562, transfectadas con moléculas del receptor Fc-gamma y/o MHC y/o moléculas coestimuladoras, como el ligando CD137, o ligandos CD28), en diversas relaciones (por ejemplo, 10:1 a 1:1000 células T/APC).

En lugar de anticuerpos estimuladores, las células T se pueden cultivar conjuntamente con antígenos específicos, por ejemplo, péptidos antigénicos definidos, proteínas definidas purificadas o mezclas de proteínas o lisados de patógenos definidos. Este tipo de cultivo podría ser útil para la activación o expansión de células T específicas de antígeno. Adicionalmente, se puede utilizar cualquier tipo de agente estimulador de células T dentro del método de la invención, por ejemplo, PMA, ionomicina, superantígenos como SEB, lectinas, como ConA o PHA.

El método de la invención permite la regulación de la interacción de las células T con sustancias o células estimulantes a través del tiempo de centrifugación y/o la velocidad de rotación. La interacción entre las células que se van a modificar, las superficies de cultivo y las sustancias o células (como APC) aplicadas a la cámara de centrifugación pueden repetirse según sea necesario para reestimar las células o iniciar su expansión. Adicionalmente, se pueden agregar de forma automatizada otros medios, citoquinas, otras sustancias relevantes para la modificación/cultivo celular, sin la necesidad de interrumpir la interacción entre las células y la superficie recubierta o APC.

Las sustancias, ligandos, factores, agentes, partículas o células mencionados anteriormente se pueden aplicar, recubrir o adherir a las superficies de cultivo o introducirse en la cámara de centrifugación con los líquidos de cultivo.

#### Capas celulares

Una composición celular en capas de acuerdo con la invención comprende por lo menos dos capas de células con el mismo o diferente tipo de célula o fenotipo. Preferiblemente, la composición celular estratificada comprende de 2 a 10, especialmente de 2 a 5 capas de células con diferente tipo de célula o fenotipo. Cada una de estas capas puede comprender una o más (como 10 a 50) capas del mismo tipo de célula. Las composiciones en capas de la invención pueden consistir en tejido celular complejo, como células madre en la parte superior de células alimentadoras, tejido de la piel u órganos y pueden comprender los mismos o diferentes tipos de células, por ejemplo, células madre, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, células epiteliales, células endoteliales, células presentadoras de antígenos (células B, células dendríticas, macrófagos).

Por ejemplo, se cultivan células de un primer tipo en la superficie de modificación de células de la cámara de centrifugación. En esta primera capa, las células de un segundo tipo son colocadas o inmovilizadas por las fuerzas centrífugas, lo que adicionalmente mejora el contacto y la interacción entre las células del primer y segundo tipo. Se pueden colocar capas o tipos de células adicionales en las capas de células existentes, lo que da como resultado una estructura de células de varias capas. Adicionalmente, las matrices se pueden utilizar para cultivar las células en estructuras tridimensionales. Dichas matrices son, por ejemplo, retículas tridimensionales, por ejemplo, proteoglicanos, colágeno o matrices artificiales útiles para cultivar células en tres dimensiones.

Con el método y los dispositivos de la invención, es posible generar una composición celular en capas que se parece a la piel humana. Dichas composiciones de células estratificadas se pueden utilizar, por ejemplo, como piel artificial.

#### Dispositivos de acuerdo con la invención

Una vista esquemática de un dispositivo de modificación celular de acuerdo con la invención se muestra en la Figura 1 con cámara de centrifugación (a), eje de rotación (g) y superficies de cultivo (e). Las superficies de cultivo se pueden colocar paralelas al eje de rotación (g), es decir, el vector normal de las superficies de cultivo comparte un ángulo de 90° con el eje de rotación (g). Al girar la cámara por el eje (g), las células (f) se inmovilizan en las superficies de cultivo (e) y se pueden suministrar con medio de cultivo celular a través de por lo menos un puerto de entrada/salida, como el puerto de entrada (c) y de salida (d) mostrado.

Los dispositivos de la invención se equipan con un puerto que se utiliza tanto para la introducción como para la extracción de células, medios o gases dentro o fuera de la cámara. En otra variante, se utilizan por lo menos dos

puertos, por ejemplo, un puerto de entrada y otro de salida para líquidos y uno o más puertos para intercambio de gases. Los puertos se integran preferiblemente en el eje de rotación de la cámara de centrifugación y, en el caso de una entrada y una abertura de salida, se pueden unir desde el mismo o desde diferentes lados de la cámara de centrifugación.

5 Una cámara con forma cónica que tiene superficies de cultivo con un vector normal que comparte un ángulo diferente de 90° (por ejemplo, 105°) con el eje de rotación (g) se muestra en la Figura 2. En esta realización, las células y los medios se pueden mover sobre la superficie de modificación de célula dependiendo de la velocidad de rotación hacia el lado de la cámara que tiene el diámetro más ancho (en la Figura 2: hacia arriba). Esto se puede utilizar ventajosamente para la modificación genética de las células, por ejemplo, con una superficie de modificación celular recubierta con partículas de virus para la transducción retroviral. Mediante el movimiento de las células sobre la superficie, se mejora el área de contacto de las células con la superficie, mejorando de esta manera la posibilidad de modificación celular, como la transducción retroviral. Adicionalmente, las células son suministradas por el movimiento de los medios sobre las células en forma de una película delgada.

15 Si el método de la invención comprende en una etapa de procesamiento en la que las células se mueven (o fuerzan) sobre la superficie de modificación celular durante la rotación de la cámara, es preferible emplear por lo menos dos velocidades de rotación diferentes de la cámara de centrifugación. Por ejemplo, en una primera etapa de procesamiento, una velocidad de rotación más alta que da como resultado fuerzas centrífugas de 100 g a 1000 g mueve las células hacia el lado de la cámara que tiene el diámetro más ancho y en una segunda etapa de procesamiento a velocidad de rotación inferior o incluso cámara detenida. Las células se deslizan hacia abajo por las superficies de modificación celular hacia la placa base b). Las etapas de procesamiento de por lo menos dos velocidades de rotación diferentes se pueden repetir con la frecuencia necesaria para alcanzar el nivel deseado de modificación de la célula.

25 La Figura 3 muestra otra realización del dispositivo de la invención, en el que la cámara y/o el elemento tienen un fondo cónico o placa de base (b) y por lo menos una abertura o tubo (h) que llega al fondo de la cámara y/o elemento. Durante la rotación, las células (f) se inmovilizan en las superficies de cultivo (e). Si la rotación de la cámara es demasiado lenta o incluso detenida, las células se acumularán en el punto más bajo (i) de la base cónica o placa base (b) y se pueden eliminar mediante el tubo interno (h) y el puerto de salida (d)

30 La cámara de centrifugación comprende por lo menos una superficie de modificación celular en la que las células están inmovilizadas por la rotación de la cámara de centrifugación. La superficie de modificación celular está ubicada en la cámara de centrifugación o sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación y puede tener cualquier forma tridimensional como una pared o barrera tan delgada como sea posible mecánicamente con una altura de acuerdo con el tamaño de muestra o la población de células a ser modificado.

35 La superficie de modificación celular puede estar situada sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación, un elemento en forma de espiral o en por lo menos un elemento cilíndrico.

40 La superficie de modificación celular puede estar ubicada en por lo menos un elemento o estructura cilíndrica como una pared o una capa. La cantidad de elementos cilíndricos depende del volumen de la cámara de centrifugación y/o del número de células que se van a modificar/cultivar. Alternativamente, la superficie de modificación celular puede tener forma de espiral con o sin una abertura hacia el exterior de la espiral para evitar la pérdida de medio debido a las fuerzas centrífugas.

45 En otro aspecto de la divulgación, las superficies de modificación celular están ubicadas en o son parte de un elemento insertable en la cámara de centrifugación. Preferiblemente, las superficies de modificación celular y/o el elemento cilíndrico y las estructuras en ellas pueden comprender aberturas o segmentos para facilitar el flujo de medio a cualquier parte de las superficies de modificación celular para suministrar todas las células inmovilizadas sobre la superficie de modificación celular de manera suficiente. Las superficies de modificación celular, el elemento cilíndrico o las estructuras internas pueden comprender adicionalmente un número apropiado de elementos espaciadores para asegurar la estabilidad mecánica de las superficies de modificación celular durante la centrifugación y para garantizar el flujo libre del líquido y gases de cultivo celular a través de la cámara.

50 Las superficies de modificación celular en forma de espiral se pueden obtener al enrollar una película o lámina para formar una bobina. Las superficies de modificación celular ubicadas en una película enrollada se pueden utilizar sin aberturas o segmentos, ya que el líquido es forzado a través de la cámara por las fuerzas centrífugas. En otra variante, la película comprende elementos espaciadores para facilitar el flujo de líquidos entre las capas de película. La bobina de la película se puede insertar en la cámara o en un elemento concéntrico apropiado para formar una espiral. Al utilizar una película como sustrato para las superficies de modificación celular, se pueden proporcionar áreas de alta superficie para altas densidades de células o números de células.

55 La Figura 4 muestra diversas realizaciones de cámaras de centrifugación con una pluralidad de estructuras internas o elementos concéntricos en vista desde arriba. La etiqueta (193) se denomina eje de rotación y (194) la pared exterior de la cámara. Las superficies de modificación celular están etiquetadas con (191) y (192) y pueden ser

elementos concéntricos o en forma de espiral. Las superficies de modificación celular pueden comprender elementos (195) espaciadores que generan espacio suficiente entre las superficies de modificación celular para el flujo libre de líquido y gases de cultivo celular.

5 Adicionalmente, es posible que la cámara de centrifugación comprenda por lo menos dos superficies de modificación celular que están funcionalizadas con la misma o diferente por lo menos una sustancia que potencia la proliferación de células y/o induce la modificación genética y/o induce la modificación celular de las células. Las superficies de modificación celular pueden tener diferentes funcionalidades o diferentes superficies recubiertas. En esta realización, el dispositivo puede comprender por lo menos una primera superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación y por lo menos una  
10 segunda superficie de modificación celular con un vector normal con un ángulo de (-45) -45° al eje de rotación de la cámara de centrifugación.

15 Por ejemplo, las superficies de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación se pueden funcionalizar para la modificación genética de las células, mientras que las superficies de modificación celular con un vector normal tienen un ángulo de (-45) -45° al eje de rotación de la cámara de centrifugación se puede funcionalizar para la proliferación de las células. La Figura 5 muestra esta realización, teniendo la primera superficie de modificación celular (b) que tiene un vector normal de aproximadamente 90° con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación y la segunda  
20 superficie de modificación celular (e) que tiene un vector normal de aproximadamente 0° con respecto al rotacional eje de la cámara de centrifugación. Esta realización de la invención permite por lo menos dos etapas de modificación diferentes en dos superficies de modificación celular durante el proceso.

25 Las Figuras 6 y 7 muestran otra variante de esta realización a modo de ejemplo con superficies de modificación celular (e) concéntricas o en forma de espiral con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° (mostrado 90°) al eje de rotación de la cámara de centrifugación y una segunda superficie de modificación celular (f) con un vector normal que tiene un ángulo de (-45) -45° (mostrado con un ángulo de 0°) con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación. La cámara de centrifugación mostrada en la Figura 6 está en el estado de centrifugación,  
30 en el que todas las células están inmovilizadas en las superficies de modificación celular (e) por las fuerzas centrífugas. La Figura 7 muestra el dispositivo después de detener la rotación de la cámara alrededor del eje b, las células se enjuagan desde las superficies de modificación celular (e) y pueden cultivarse adicionalmente sobre la superficie de modificación celular (f) como se muestra en la Figura 7.

35 El líquido de cultivo celular se puede suministrar en un flujo constante o se mueve mediante variaciones de la velocidad de rotación sobre las células. Por ejemplo, en la Figura 8, las superficies de modificación celular (e) no están o no conectadas a la segunda superficie de modificación celular f) y a la cubierta superior de la cámara, permitiendo de esta manera un flujo de líquido y gases de cultivo celular a través de tubos o canales c' y d'. Opcionalmente, el tubo o canal d' comprende aberturas para la distribución del líquido y los gases de cultivo celular  
40 sobre las superficies de modificación celular (e).

La cámara puede comprender por lo menos una abertura que permite un flujo de líquido y/o gases de cultivo celular dentro y fuera de la cámara. La abertura se ubica preferiblemente en el eje (g) de la cámara centrífuga o elemento concéntrico como se muestra en la Figura 8. El líquido y/o los gases de cultivo celular se suministran a través del  
45 puerto de entrada y salida c/d ubicado en el eje de rotación (g) y luego son forzados por el movimiento centrífugo sobre las superficies de cultivo. Los líquidos de cultivo de células pueden retirarse del sistema a través de un tubo o canal d' o dirigirse de nuevo hacia el elemento moldeado o la cámara centrífuga a través del desvío (c').

50 La Figura 9 muestra otra realización de la invención, en la que superficies de modificación celular concéntricas o en forma de espiral (f) con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° (mostrado 90°) con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación y la segunda célula modificadora se combinan la superficie (h) con un vector normal que tiene un ángulo de (-45) -45° (mostrado 0°) con respecto al eje de rotación de la cámara de centrifugación. En esta realización, las segundas superficies de modificación celular están unidas a la primera superficie de cultivo (f) de manera que las células se pueden transferir fácilmente desde la primera hasta la segunda  
55 superficie de cultivo y viceversa mediante el cambio de la velocidad de rotación de la cámara. En esta realización, las primera y segunda superficies de cultivo tienen un recubrimiento funcionalizado diferente que proporciona de ese modo diferentes modificaciones a las células.

60 Los elementos concéntricos como estructuras de soporte para las superficies de cultivo, las superficies de cultivo en sí mismas y/o la cámara de centrifugación pueden estar hechas de diversos materiales, preferiblemente de plásticos como, por ejemplo, poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), policarbonato, vidrio, poli acrilato, poli acrilamida, polimetilmetacrilato (PMMA), tereftalato de polietileno (PET), poli tetrafluoretileno (PTFE), poliuretano termoplástico (TPU), silicona, polietileno (PE) polipropileno (PP), alcohol polivinílico (PVA) o composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente. En una realización preferida, las superficies de modificación celular se pueden recubrir con un material biodegradable, por ejemplo, colágeno, quitina, alginato y/o derivados de  
65 ácido hialurónico, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros.

El tamaño de la cámara de centrifugación depende del número de células que se van a modificar y puede tener un tamaño de 2 cm a 50 cm de diámetro y una altura de 5 mm a 50 cm.

5 La cámara de centrifugación del dispositivo de la invención puede ser un único componente con las superficies de cultivo y/o estructuras de soporte como elementos concéntricos para las superficies de cultivo. En otra realización de la invención, la cámara de centrifugación consiste en una cámara exterior (por ejemplo, hecha de acero inoxidable) en la que se pueden insertar uno o más elementos concéntricos hechos de los materiales mencionados anteriormente. Las superficies de modificación celular se ubican en o son parte de los elementos concéntricos.

10 Los elementos concéntricos pueden ser desechables (es decir, de un solo uso) o pueden diseñarse y fabricarse para su reutilización después del lavado y la esterilización.

15 Adicionalmente, las superficies de modificación celular pueden tener una textura rugosa, estar ranuradas y/o pueden comprender bolsas o cavidades para mejorar la adherencia de las células que se van a cultivar.

El proceso de la invención puede automatizarse, por ejemplo, en un sistema de procesamiento de muestras como se conoce por los documentos EP 0869838B1 y WO 2009/072003. Los métodos descritos en este documento permiten la automatización en un dispositivo de modificación de célula cerrada que elimina el riesgo de contaminación del cultivo celular en comparación con un proceso de transducción no cerrado estándar, especialmente cuando el proceso de transducción se repite varias veces. Adicionalmente, la seguridad del operador aumenta debido a la reducción del contacto directo con material biológico peligroso como retrovirus.

25 Sistemas de acuerdo la invención

Aún otro objeto de la invención son sistemas para modificación celular, que comprende:

- 30 a) una cámara de centrifugación con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° al eje rotacional de la cámara de centrifugación y por lo menos un puerto de entrada/salida integrado en el eje rotacional de la cámara de centrifugación, y  
 b) un dispositivo para girar la cámara de centrifugación con el fin de aplicar una fuerza centrífuga a las células en la que la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación y se funcionaliza con por lo menos una sustancia en la que la sustancia se selecciona del grupo de sustancias que mejoran la proliferación de células, que inducen modificación genética y que inducen modificación celular de células

35 Los sistemas pueden comprender adicionalmente

- 40 c) por lo menos un contenedor que contiene las células que se van a modificar  
 d) por lo menos un contenedor para las células que se van a modificar  
 e) por lo menos un contenedor que contiene medios celulares  
 f) un conjunto de tubos que conecta la cámara de centrifugación y el contenedor  
 g) por lo menos una bomba y  
 h) una pluralidad de válvulas

45 Los sistemas para la modificación celular se pueden operar al controlar el dispositivo para rotar la cámara de centrifugación, la bomba y las válvulas para introducir las células que se van a modificar y los medios celulares a la cámara de centrifugación, girar la cámara de centrifugación y eliminar las células modificadas de la cámara de centrifugación.

50 El sistema de la presente invención puede incluir diversos componentes mecánicos, electromecánicos y magnéticos. Un sistema de acuerdo con la invención se muestra en la Figura 10, en el que la cámara 128 de centrifugación que tiene un puerto 130 de entrada/salida se puede conectar a la bomba 108 y a una pluralidad de válvulas 110. El contenedor para las células que se van a modificar, las células objetivo modificadas y los medios celulares no se muestran, pero se pueden colocar en los ganchos 114.

55 El sistema puede incluir opcionalmente una unidad 106 de separación magnética con alojamiento para posicionar una columna de separación como una columna de separación magnética.

60 El sistema 100 incluye adicionalmente una bomba 108 y una pluralidad de medios o válvulas de control de flujo de fluido, como se ilustra por una o más válvulas 110. Los componentes del sistema 100 (por ejemplo, cámara de centrifugación, válvulas, bomba, unidad de separación, etc.) se pueden acoplar o conectar mediante una o más rutas de flujo con el fin de formar una serie de rutas de fluido o circuitos de fluido. El sistema incluye adicionalmente un sistema de monitorización por ordenador o unidad 112 que proporciona monitorización y/o control de uno o más aspectos del sistema 100. El sistema 112 de ordenador, como se describió anteriormente, puede incluir uno o más dispositivos de entrada y/o salida, pantallas gráficas, interfaces de usuario y puede permitir el control manual y/o automático del funcionamiento y las funciones del sistema 100. El sistema 112 de control de ordenador puede incluir

un módulo o sistema para procesar información (por ejemplo, información de flujo, etc.) dentro del sistema 100 y puede incluir una amplia variedad de ordenadores, componentes o componentes electrónicos patentados y/o comercialmente disponibles que tienen una o más estructuras de procesamiento y similares, con tales sistemas que a menudo comprenden hardware y/o software de procesamiento de datos configurados para implementar cualquiera o una combinación de etapas del método como se describe aquí. El software normalmente comprenderá un código de instrucciones de programación legible por máquina incorporado en un medio tangible tal como una memoria, medios de grabación digital u óptica, señales de telemetría óptica, eléctrica o inalámbrica, o similares, y una o más de estas estructuras también se pueden utilizar para emitir o transmitir datos, señales o información entre los componentes del sistema en cualquiera de una amplia variedad de arquitecturas de procesamiento de señal.

El sistema puede incluir además diversos soportes, sensores, carcasas, etc. para diversos componentes que se pueden acoplar con el presente sistema para realizar los métodos como se describe en el presente documento.

El sistema 100 incluye adicionalmente una o más estructuras 114 de soporte configuradas para sostener y/o soportar diversos fluidos, reactivos, muestras de depósitos de fluido, filtros y similares que se pueden utilizar con el sistema 100 de acuerdo con la presente invención. El carro de estructuras de soporte incluye diversas configuraciones de gancho o suspensión, o de soporte (por ejemplo, portafiltras o carcasa) y no están limitadas a ningún diseño en particular. Los fluidos, tampones, reactivos, etc. posicionados sobre un soporte 114 se pueden acoplar a una ruta o tubería de fluido, que a su vez puede estar conectado a más o más componentes del sistema 100. El sistema 100 puede incluir sensores para monitorizar y/o controlar adicionalmente el flujo de fluido a través del sistema. Los sensores pueden incluir, por ejemplo, sensores de líquido, que pueden incluir detectores de burbujas (detector ultrasónico), sensores de presión y similares. Se muestran el detector 116 de burbujas y los sensores 118 de presión. Se muestra un soporte 120, que se puede configurar para contener un filtro o unidad de reducción de volumen. El área 122 de recolección puede soportar contenedores de recolección, reactivos, etc.

La unidad 104 de procesamiento puede incluir una carcasa o cubierta 124, que puede ser móvil (por ejemplo, amovible) alrededor de una o más bisagras. La cubierta 124 define por lo menos parcialmente un área 126 de procesamiento que puede ser controlada por temperatura y acoplada a componentes de monitorización y control de la temperatura que pueden estar alojados dentro de la carcasa 105 del sistema 100. La unidad 104 de procesamiento incluye una cámara 128 de centrifugación configurada para contener y procesar (por ejemplo, centrifugación, cultivo, separación de componentes de muestra, etc.) de una muestra. La cámara 128 de centrifugación mostrada es una cámara giratoria mantenida en posición alrededor de un eje 130 que puede incluir un bloqueo antirrotación. La unidad 104 de procesamiento puede incluir uno o más sistemas de detección, tales como un detector 132 óptico posicionado dentro de la cubierta 124 y configurado para detectar o supervisar el procesamiento de una muestra en la cámara 128. Una o más líneas de entrada/salida de fluido se pueden acoplar a la cámara 128 y se pueden mantener en posición mediante un soporte 134.

#### EJEMPLOS

Los ejemplos que se describen a continuación son ejemplos de los aparatos, métodos y sistemas de la invención y no pretenden limitar la divulgación de la invención como se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 Transducción vírica de células T con genes de receptores de células T específicos a enfermedad

Un uso de la invención es la introducción de genes que codifican un receptor de células T específico a enfermedad en una población policlonal de células T, que luego se puede utilizar para la inyección terapéutica en pacientes. Las células T se dirigen hacia el antígeno objetivo, por ejemplo, célula tumoral o células infectadas.

Una cámara de centrifugación que proporciona superficies de modificación celular recubiertas con RetroNectin® se suministra con un sobrenadante que contiene virus recombinante, en el que el virus codifica el antígeno objetivo, y se rota en las superficies por las fuerzas gravitacionales generadas por la rotación. Después de esta etapa de recubrimiento, la cámara se hace girar a baja velocidad de rotación y las células T que se van a modificar se introducen en la alta velocidad de rotación (por ejemplo, 2000 xg) durante 2 horas. Para la transducción vírica mejorada, las células T se activan previamente, por ejemplo, por cultivo en presencia de anticuerpos contra CD3 y CD28, ya sea en la misma cámara de centrifugación o en un dispositivo separado. Mediante centrifugación (por ejemplo, 1000 xg durante 15 minutos), las células T en la cámara entran en contacto íntimo con la superficie recubierta con virus, permitiendo la transducción vírica. La velocidad de centrifugación se ajusta para optimizar la transducción. La disminución transitoria de la velocidad de centrifugación permite el desprendimiento de las células y la posterior centrifugación a alta velocidad vuelve a unir las células en otro punto de la superficie recubierta. Este proceso se puede repetir varias veces, por ejemplo para lograr interacciones múltiples de las células con superficies recubiertas de virus. Después de este proceso de transducción, la velocidad de rotación se detiene o se reduce a un mínimo, es decir, suficiente para mantener las células en la superficie de cultivo. Durante el proceso, los medios de cultivo celular óptimos, que contienen cantidades apropiadas de nutrientes y factores de crecimiento, se agregan continuamente a la cámara a través del puerto de entrada del sistema de cámara rotatoria. La centrifugación fija las células en una determinada ubicación, y por lo tanto los medios se pueden agregar y eliminar sin cambiar la ubicación de la célula, es decir, sin interferir con el proceso de modificación. El intercambio constante del medio sin

afectar la posición de la célula, es decir, el proceso de modificación, también permite utilizar un volumen medio mínimo en un momento dado, es decir, la distancia de la célula unida a la superficie del cultivo al depósito de gas/superficie del medio puede ser <5 mm. De esta forma, se garantiza el suministro óptimo de gas sin la necesidad de un volumen mediano de estado en equilibrio, generalmente utilizado como depósito de nutrientes.

5 Durante el proceso de transducción de alta velocidad y/o menor velocidad, se mantiene un flujo constante de medios de estimulación sobre las células o cultivo celular a través del puerto de entrada y salida de la cámara. Esto elimina los inhibidores de la transducción y mejora la viabilidad de la célula objetivo.

10 Cada proceso de transducción se ajusta a la interacción óptima de las células con las partículas de virus (dependiendo del tipo de célula y virus) recubiertas en la superficie de la cámara de centrifugación o elemento moldeado mediante la adaptación de la velocidad de centrifugación (aumentando o reduciendo el número g) lo que lleva a manejo eficiente, rápido, fácil y seguro del proceso de transducción.

15 Ejemplo 2 Activación y expansión de células T específicas de antígeno

Las células T se pueden activar y expandir por antígenos cargados en o sobre células presentadoras de antígeno (APC). La activación de células T requiere un contacto íntimo entre las células T y APC.

20 Para mejorar la activación de las células T, se utiliza un sistema descrito en este documento para dividir células T y APC en una relación apropiada, por ejemplo 1:100 a 100:1. Ya sea mezclas de células fisiológicas tales como PBMC, que contienen células T y APC o preparaciones de células definidas, por ejemplo células T purificadas y APC, por ejemplo se utilizan células dendríticas, células B, macrófagos, estirpes celulares transfectadas con moléculas de MHC distintas, etc., mezcladas en una relación apropiada. Adicionalmente, se pueden agregar  
25 antígenos, proteínas, péptidos, lisados celulares y factores de crecimiento y/o anticuerpos coestimuladores, por ejemplo, anti CD28, antiCD137. El contacto entre las células se induce rápidamente y se mantiene en un nivel apropiado mediante centrifugación.

30 Las células APC y T pueden depositarse en distintas capas, por ejemplo, Una célula T en la parte superior de una capa de APC, lo que permite un contacto óptimo de las células T con APC. En los dispositivos de cultivo convencionales, las células se sedimentan lentamente de una manera descontrolada, proporcionando un contacto asíncrono y solo subóptimo entre las células T y APC. Durante el cultivo, la centrifugación fija las células en una posición distinta y, por lo tanto, los medios, los factores de crecimiento, las moléculas coestimuladoras o los  
35 antígenos se pueden agregar de forma controlada sin alterar la interacción celular. Al cambiar la velocidad centrífuga, la interacción entre las células se modula en diferentes fases del proceso de cultivo, por ejemplo, inducir contacto firme en una fase temprana y contacto reducido en fases posteriores. Esto da como resultado una activación acelerada y sincrónica y más pronunciada de las células T y, adicionalmente, permite un control óptimo del microambiente celular en términos de composición celular, suministro de nutrientes, factores de crecimiento, etc. Bajo estas condiciones, se logra la activación rápida y controlada de las células T específicas de antígeno.

40 Las células T activadas se purifican adicionalmente, por ejemplo, con base en la expresión de marcadores de activación, tales como citoquinas, CD154 o CD137 por separación de células magnéticas. Dichas células se pueden generar contra diversos antígenos, por ejemplo, patógenos, tumores o, en el caso de células T reguladoras contra autoantígenos. Estas células se pueden utilizar para terapias celulares.

45 Una ventaja particular de la invención es el hecho de que se puede realizar todo el proceso de cultivo celular que incluye todas las manipulaciones descritas requeridas para lograr resultados óptimos en un sistema cerrado, es decir, con un riesgo mínimo de contaminación.

50 Ejemplo 3 Activación policlonal y expansión de células T

Los sistemas de la invención proporcionan una plataforma optimizada para la activación y expansión policlonal de células T, que comprende células T convencionales o células T reguladoras.

55 Este ejemplo es similar al Ejemplo 2, excepto que, en lugar de antígeno definido, se utilizan estímulos policlonales que comprenden anticuerpos contra CD3 y moléculas coestimuladoras, tales como CD28 y/o CD137. Estos anticuerpos se agregan en forma soluble, requiriendo la adición de células accesorias que portan receptores Fc, por ejemplo, células presentadoras de antígeno convencionales o estirpes celulares transfectadas con receptores Fc. Alternativamente, los anticuerpos agregados se inmovilizan en una superficie macroscópica, por ejemplo, una  
60 partícula o perla que varía desde aproximadamente 30 nm hasta 100 µm. Estos anticuerpos inmovilizados se cultivan directamente con células T purificadas, por ejemplo, en relaciones 1:4 a 4:1. Como se describió anteriormente, el sistema utilizado permite el contacto regulado de las células T y el agente estimulante y la adición controlada de factores ambientales adicionales, por ejemplo nutrientes, citoquinas, etc.

Las poblaciones policlonales de células T generadas se pueden utilizar en terapias celulares, por ejemplo, células T reguladoras policlonales para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria o de injerto contra anfitrión o la prevención del trasplante de órganos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de modificación celular que comprende una cámara de centrifugación con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° al eje rotacional de la cámara de centrifugación, en el que la cámara de centrifugación comprende por lo menos un puerto de entrada/salida y la cámara de centrifugación es adecuada para inmovilizar las células que se van a modificar en las superficies de modificación celular mediante la rotación de la cámara de centrifugación en 2 a 2000 g caracterizado porque el puerto de entrada/salida se integra en el eje rotacional de la cámara de centrifugación y la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación y se funcionaliza con por lo menos una sustancia en la que la sustancia se selecciona del grupo de sustancias que mejoran la proliferación de células, que inducen modificación genética y que inducen modificación celular de células.
2. Un dispositivo de modificación celular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la superficie de modificación celular se funcionaliza con partículas que se funcionalizan con por lo menos una sustancia seleccionada de las sustancias que mejoran la proliferación de células, inducen modificación genética, e inducen modificación celular de células.
3. Un dispositivo de modificación celular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia que mejora la proliferación de células se selecciona del grupo que consiste de fibronectina, gelatina, laminina, elastina, ácido hialurónico, sulfato de queratano, sulfato de condroitina, proteoglicanos sulfato de heparina, poli-d-lisina, avidina, estreptavidina, biotina, anticuerpos, anticuerpos contra biotina o proteína tags, proteína tags como IIsopeptag, BCCP, Myc-tag, Calmodulin-tag, FLAG-tag, HA-tag, His-tag, proteína de unión a Maltosa-tag, Nus-tag, Glutathione-S-transferasa-tag, proteína verde fluorescente-tag, Tioredoxina-tag, S-tag, Softag 1, Softag 3, estrep-tag, SBPtag, Ty tag, certia, poli lactato, alcoholes polivinílicos, polisacáridos y dextrano.
4. Un dispositivo de modificación celular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia que induce modificación celular de células se selecciona del grupo que consiste de anticuerpos agonísticos o antagonísticos, citoquinas, factores de crecimiento, ligandos de (de-)activación, sustancias farmacológicamente activas, mitógenos, sustancias que modifican ADN o ARN.
5. Un dispositivo de modificación celular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia que induce modificación genética de células se selecciona del grupo que consiste de un virus, partícula vírica, adenovirus, retrovirus, lentivirus, ARN, ADN, ARN grandes o pequeños no codificantes (es decir ARNsi, ARNmi, ARNsh), ADN, plásmidos de expresión de ARNm o ARNsh, ADN, proteína, ligando, receptor, citoquina, anticuerpo de estimulación o desactivación, agente farmacológico, células alimentadoras.
6. Un dispositivo de modificación celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la cámara de centrifugación comprende por lo menos dos superficies de modificación celular que se funcionalizan con la misma o diferente por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o inducir modificación genética y/o inducir modificación celular de células.
7. Un método para modificar células que comprende las etapas de
- introducir células en un dispositivo de modificación celular, que comprende una cámara de centrifugación con por lo menos un puerto de entrada/salida y con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de 135-45° al eje rotacional de la cámara de centrifugación; en el que el puerto de entrada/salida se integra en el eje rotacional de la cámara de centrifugación y la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación,
  - inmovilizar las células sobre las superficies de modificación celular mediante la rotación de la cámara de centrifugación en 2 a 2000 g
  - mantener la rotación de la rotación de la cámara de centrifugación hasta que modifiquen las células caracterizada porque las células se modifican al poner en contacto con por lo menos una superficie de modificación celular funcionalizada con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o inducir modificación genética y/o inducir modificación celular de células.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que las células se modifican al poner en contacto con por lo menos una superficie de modificación celular funcionalizada con partículas que se funcionalizan con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o inducir modificación genética y/o inducir modificación celular de células.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las células se modifican al inmovilizar células sobre por lo menos una superficie de modificación celular y poner en contacto con partículas que se funcionalizan con por lo menos una sustancia que mejora la proliferación de células, y/o inducir modificación genética y/o inducir modificación celular de células.

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que las células se someten a por lo menos dos diferentes fuerzas gravitacionales.

11. Un sistema para modificación celular, que comprende:

- 5
- una cámara de centrifugación con por lo menos una superficie de modificación celular con un vector normal que tiene un ángulo de  $135-45^\circ$  al eje rotacional de la cámara de centrifugación y por lo menos un puerto de entrada/salida integrado en el eje rotacional de la cámara de centrifugación, y
  - un dispositivo para girar la cámara de centrifugación con el fin de aplicar una fuerza centrífuga a células
- 10
- caracterizado porque la superficie de modificación celular se ubica sobre la superficie interna de la cámara de centrifugación y se funcionaliza con por lo menos una sustancia en la que la sustancia se selecciona del grupo de sustancias que mejoran la proliferación de células, que inducen modificación genética y que inducen modificación celular de células.

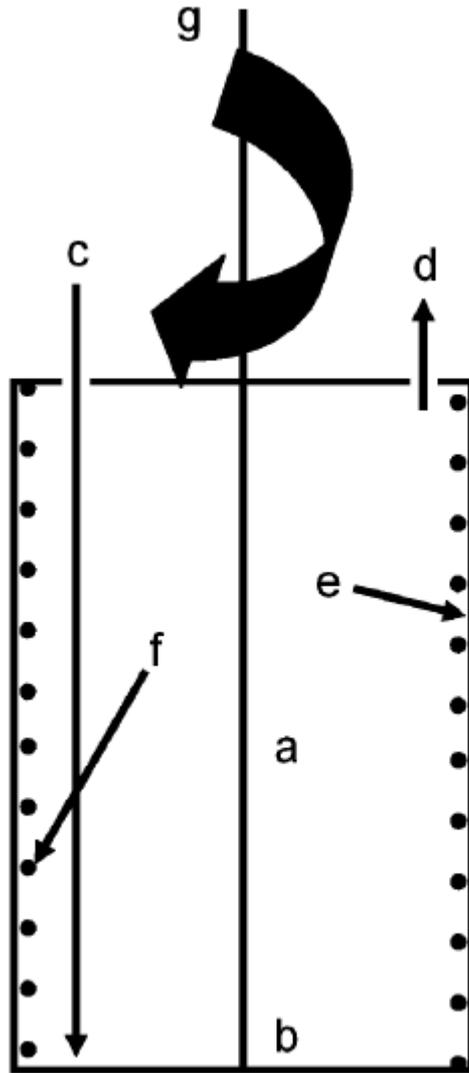


Fig. 1

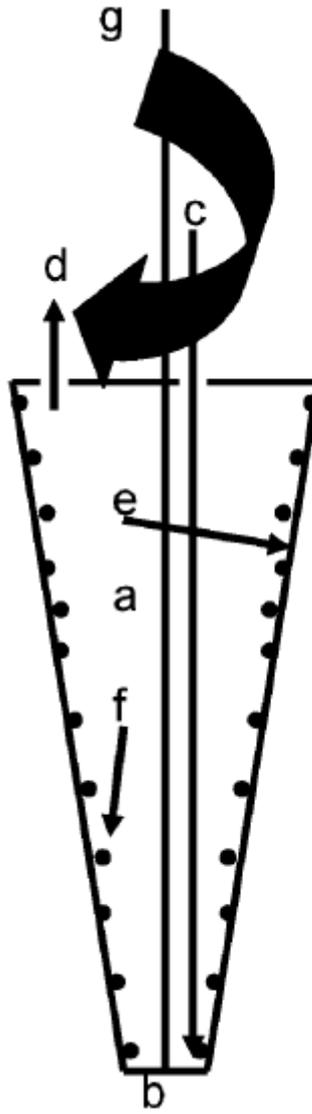
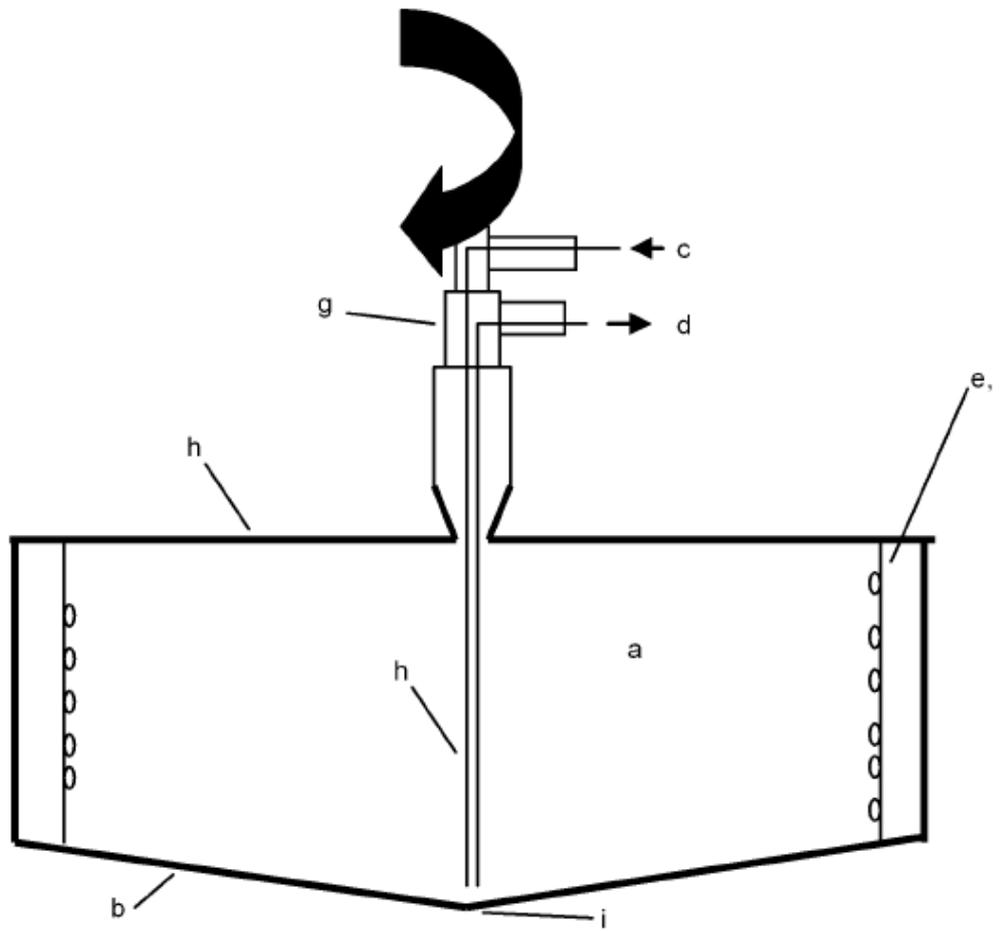


Fig. 2



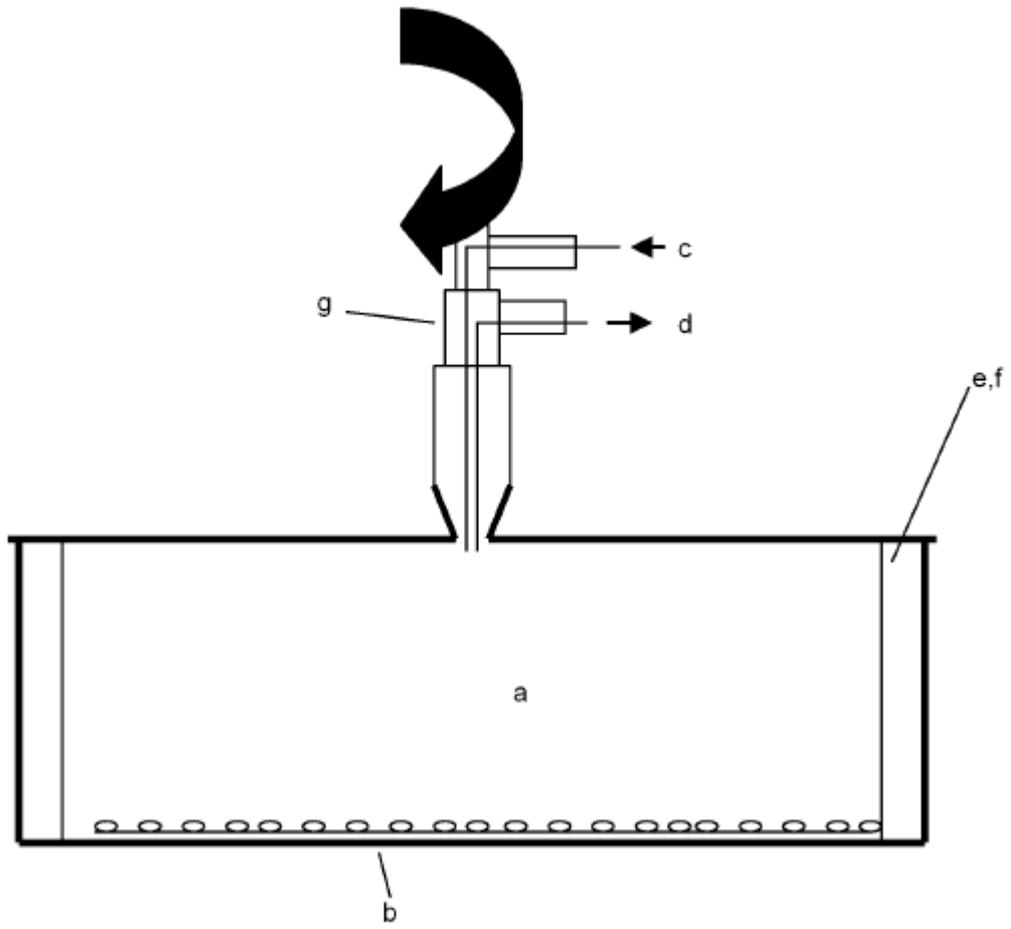


Fig. 4

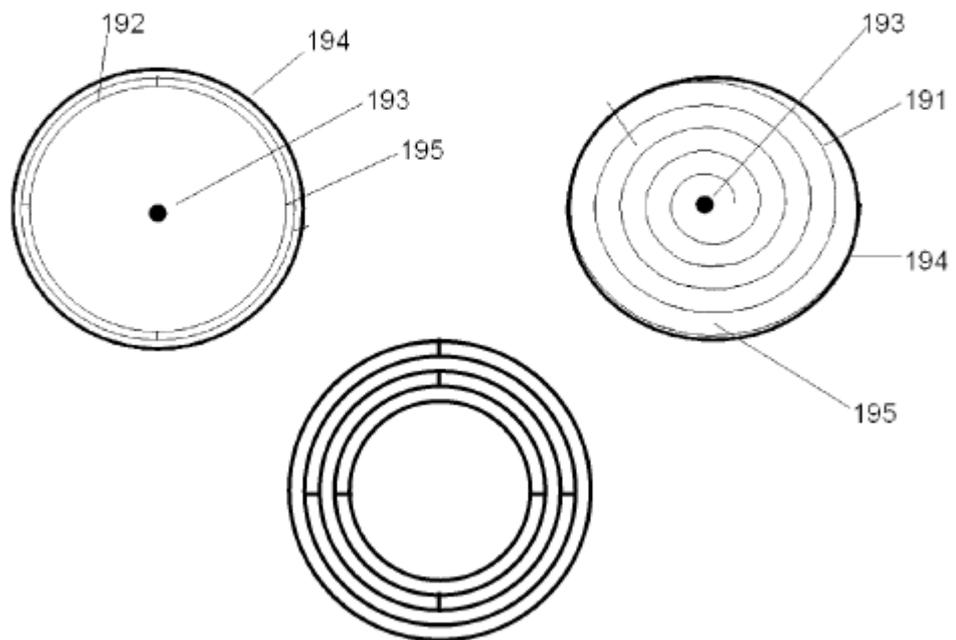


Fig. 5

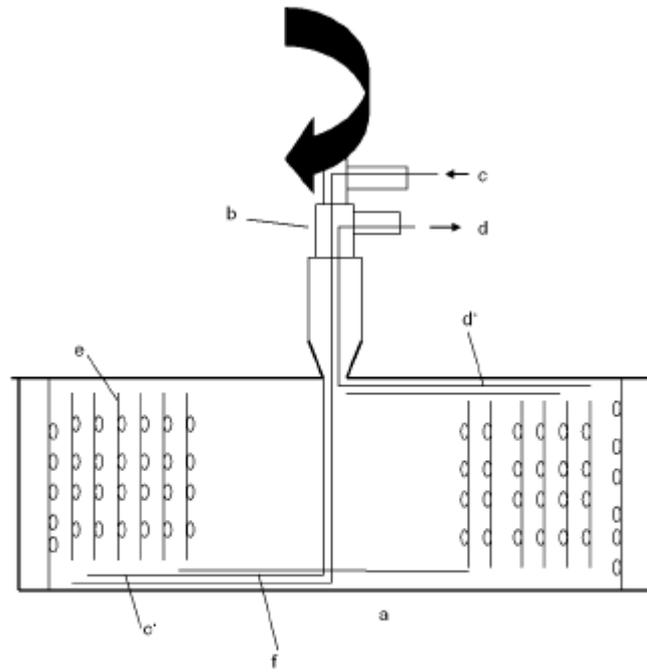


Fig. 6

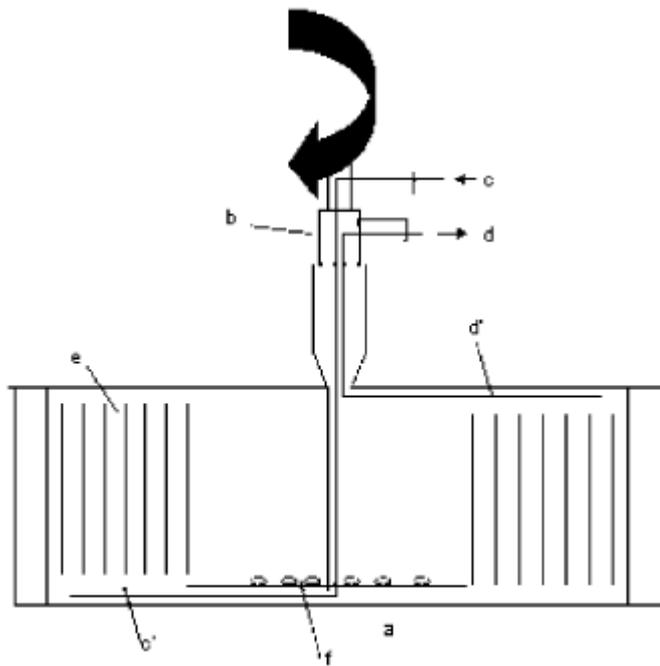


Fig. 7

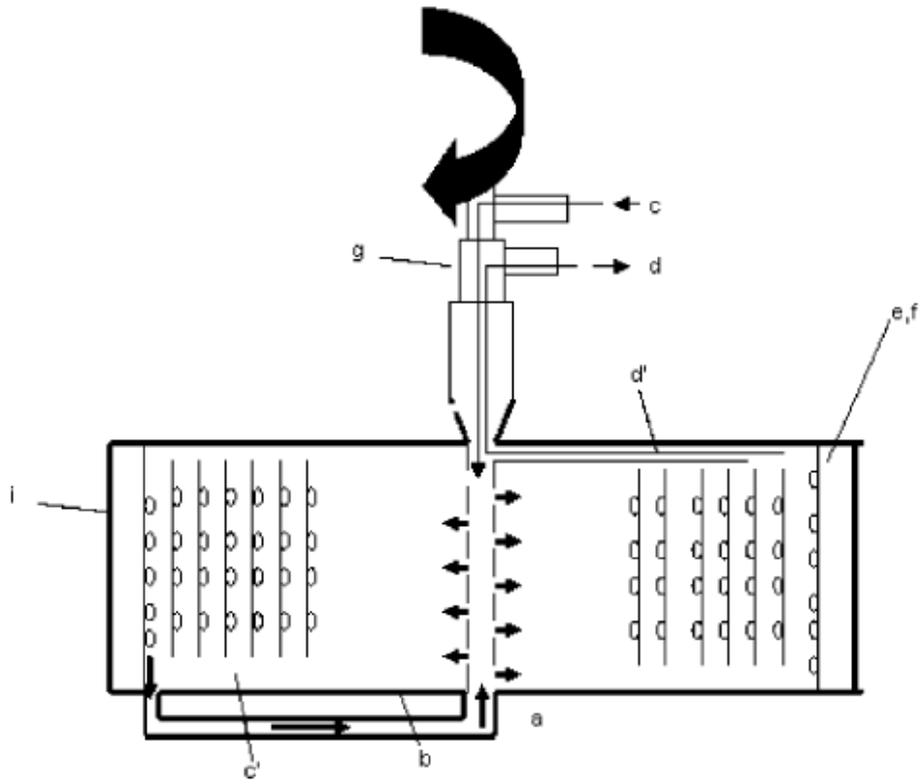


Fig. 8

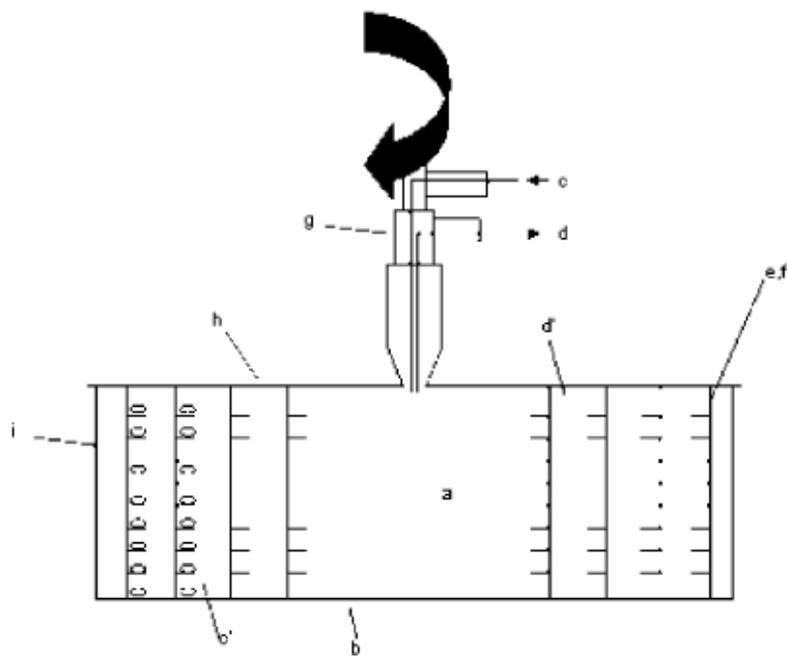


Fig. 9

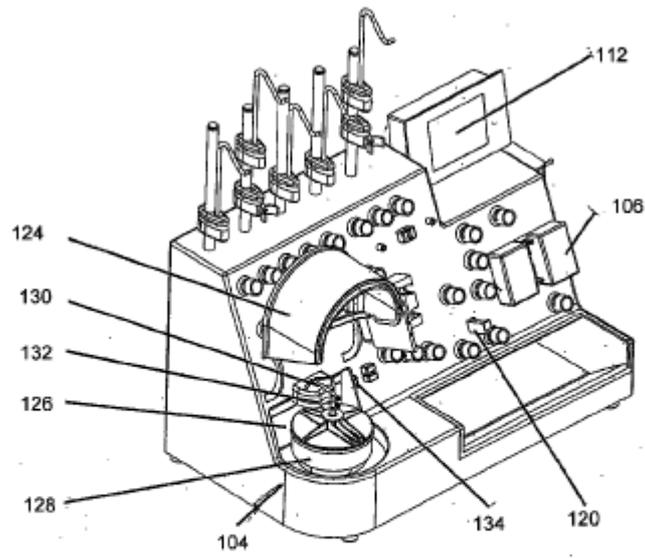


Fig. 10