(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 699 589**

(51) Int. Cl.:

G01N 1/40	(2006.01)
C12N 13/00	(2006.01)
B03C 1/28	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
B03C 1/01	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2015** **E 15199104 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 3037171**

(54) Título: **Método de separación celular por MultiSort**

(30) Prioridad:

27.12.2014 EP 14200362

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KAULING, M. BURGUND;
HUPPERT, VOLKER;
DOSE, CHRISTIAN y
STEINBRÜCK, PHILIPP

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 699 589 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de separación celular por MultiSort

Campo de la invención

La presente invención se dirige a un proceso para la separación de las células objetivo de una muestra mediante la depleción de las células no objetivo por agregación y una primera separación celular magnética, seguido por el enriquecimiento de las células objetivo mediante una segunda etapa de separación celular magnética.

Antecedentes de la invención

Los métodos de separación celular están ampliamente extendidos en los laboratorios científicos y clínicos para la investigación, diagnóstico o aplicaciones clínicas. La mayoría de estos métodos se limitan solamente a cantidades pequeñas de células. Para la separación de células a partir de un número amplio de células no objetivo, la separación celular magnética o la centrifugación por gradiente de densidad son tecnologías establecidas.

Un procedimiento de separación particularmente desafiante es la separación de células a partir de sangre total, por ejemplo, células T a partir de sangre total. Para este fin, los eritrocitos tienen que descargarse antes de aislar o purificar las células objetivo. La eliminación de los eritrocitos puede realizarse, por ejemplo, mediante centrifugación por gradiente de densidad, preparación de muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), lisis de eritrocitos o la agregación mediante, por ejemplo, anticuerpos multifuncionales, polisacáridos, polivinilpirrolidona o polioxietileno y subsecuente centrifugación.

Después de la eliminación de los eritrocitos o de otras células no deseadas, deben emplearse las etapas subsiguientes del proceso para el aislamiento de las células objetivo. Dichos métodos se conocen bien en la técnica y usan, por ejemplo, anticuerpos monoclonales con afinidad a antígenos de superficie celular, por ejemplo, como se describe en los documentos núms. US5840502, US5648223, US5646004, US5474687, o US7316932.

El uso de anticuerpos o polímeros multifuncionales como agentes de agregación se describe, por ejemplo, en los documentos núms. WO00/73794 o US7160723. La técnica descrita comprende poner en contacto una muestra que contiene células nucleadas y glóbulos rojos con un agente de agregación, la eliminación de los glóbulos rojos agregados mediante centrifugación y la purificación posterior de las células nucleadas mediante el uso de anticuerpos que reconocen las células deseadas, por ejemplo, mediante la separación celular magnética. Estos métodos tienen la desventaja de varias etapas del proceso, lo que incluye una etapa de centrifugación laboriosa y que requiere mucho tiempo.

El documento WO 2013/076070 enseña a depletar una pluralidad de células no objetivo mediante agregación y separación celular magnética para obtener una suspensión de células, las cuales no se afectan por el cóctel de depleción. Mientras que las células obtenidas con el proceso están "intactas", la pureza es bastante baja, porque solo se realiza un proceso de selección negativa. No es posible obtener una subpoblación pura y específica de células objetivo con el proceso del documento núm. WO 2013/076070.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención fue proporcionar un método rápido y simple para eliminar las células no deseadas y separar las células objetivo específicas a partir de muestras biológicas como la sangre total.

Sorprendentemente, se encontró que es posible enriquecer las células objetivo mediante la incubación de una muestra en una etapa y las etapas de separación magnética subsecuentes sin tratamiento intermedio mediante el uso de partículas magnéticas que tienen diámetros diferentes.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es un método para enriquecer las células objetivo a partir de una muestra de células, caracterizado por al menos las etapas:
a) poner en contacto la muestra con un agente de agregación celular y unas primeras partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro de 0,1 pg a 5 000 pg, acopladas a un primer resto de reconocimiento de antígeno; y unas segundas partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro de 0,05 fg a 100 fg y acopladas a un segundo resto de reconocimiento de antígeno para obtener la mezcla a)
b) aplicar un primer gradiente de campo magnético a la mezcla a) lo que elimina de esta manera las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las primeras partículas magnéticas, para obtener una mezcla b) y obtener un aglomerado que comprende las células de la mezcla a) unidas al agente de agregación celular
c) aplicar un segundo gradiente de campo magnético a la mezcla b) lo que inmoviliza de esta manera las células unidas al segundo resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las segundas partículas magnéticas
d) recuperar las células inmovilizadas a partir del segundo gradiente de campo magnético como células objetivo.

En una variante de la invención, se separan de la mezcla b) el aglomerado que comprende las células de la mezcla a) unidas al agente de agregación celular y, debido al primer gradiente de campo magnético, las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las primeras partículas magnéticas.

En otras palabras, la mezcla b) consiste en una suspensión de células no unidas al agente de agregación celular y/o al primer resto de reconocimiento de antígeno/primeras partículas magnéticas.

La mezcla b) puede separarse del aglomerado que comprende las células de la mezcla a) unidas al agente de agregación celular, por ejemplo, mediante filtración, sedimentación y/o centrifugación.
La sedimentación significa sedimentación por gravedad a 1 x g, lo cual se produce si el contenedor que contiene la muestra a procesar está en un estado de reposo, es decir, sin balanceo o centrifugación, lo que permite a las células agregadas sedimentar en la parte inferior del contenedor. La centrifugación se realiza, por ejemplo, de 1 a 20 x g. En otra modalidad, la mezcla a) se pasa sobre un sistema de filtro que tiene un tamaño de malla apropiado. Preferentemente, el aglomerado se deja reposar como sedimento en el primer gradiente de campo magnético simultáneamente con la eliminación de las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno/las primeras partículas magnéticas y el sobrenadante se obtiene como mezcla b).

El término "resto de reconocimiento de antígeno" se refiere a cualquier tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, dirigido contra antígenos expresados intracelular o extracelularmente. El término se refiere a anticuerpos intactos completamente o derivados de anticuerpos fragmentados, por ejemplo, Fab, Fab, F(a'b)2, sdAb, scFv, di-scFv que se han sintetizado mediante procedimientos recombinantes, lo que incluye conjugados covalentes y no covalentes que contienen este tipo de moléculas.

La Figura 1 muestra esquemáticamente el método de la invención.

Se muestra (a) la incubación de la muestra heterogénea de células con i) un agente de agregación de glóbulos rojos; ii) un primer tipo de partícula magnética (partículas pequeñas), acoplada a un primer tipo de resto de reconocimiento de antígeno; y iii) un segundo tipo de partícula magnética (partículas grandes), acoplada a un segundo tipo de resto de reconocimiento de antígeno.
(b) La exposición de la mezcla a un primer gradiente de campo magnético que elimina las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno acoplado al primer tipo de partículas magnéticas. Simultáneamente, las células unidas al agente de agregación celular forman un sedimento de células no deseadas. El sobrenadante se colecta para obtener la mezcla b).
(c) La exposición de la mezcla b) mediante la colocación de una columna MACS® en un Separador MACS a un segundo gradiente de campo magnético inmoviliza las células objetivo unidas al segundo tipo de resto de reconocimiento de antígeno acoplado al segundo tipo de partículas magnéticas.
(d) La recuperación de las células objetivo inmovilizadas a partir del segundo gradiente de campo magnético

La presente invención usa un gradiente de campo magnético generado por una fuente magnética, por ejemplo, por un imán permanente o un electroimán. Puede usarse cualquier tipo y forma de imán dentro de la presente invención, como el Separador MACSxpress, el Separador MACSiMAG o el Separador QuadroMACS™ disponible comercialmente por Miltenyi Biotec GmbH, Alemania.

El término "partículas magnéticas" se refiere a fases sólidas ferromagnéticas, superparamagnéticas o paramagnéticas, tales como partículas coloidales, microesferas, nanopartículas o perlas. Las partículas pueden usarse en suspensión o en estado liofilizado.

La magnetización de una partícula magnética está en dependencia del contenido de óxidos de hierro magnéticos (magnetita, maghemita) dentro de dichas partículas. Una diferencia en el contenido de hierro por un factor de 1 000 o mayor permite la separación de las primeras partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro alto mediante gradientes de campo magnético bajos a partir de las segundas partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro bajo, las cuales solo se afectan por gradientes de campo magnético altos.

Las primeras partículas magnéticas contienen preferentemente 0,5 pg a 500 pg, con mayor preferencia 1 pg a 50 pg de hierro por partícula. Como primeras partículas magnéticas, pueden usarse las partículas MACSiBead, las cuales pueden retenerse, por ejemplo, mediante imanes estándar, como el Separador MACSiMAG (Miltenyi Biotec). Como ejemplo, las partículas MACSiBeads, las cuales tienen un diámetro de 3,5 µm, contienen entre 3 % y 10 % p/p de hierro en peso seco.

Las segundas partículas magnéticas contienen preferentemente 0,1 fg a 50 fg, con mayor preferencia 0,1 fg a 10 fg de hierro por partícula. Como segundas partículas magnéticas, pueden usarse partículas MicroBead, las cuales pueden retenerse, por ejemplo, mediante imanes estándar en combinación con columnas de separaciones magnéticas, como el Separador QuadroMACS™ en combinación con columnas LS que pueden obtenerse de Miltenyi Biotec. Las partículas MicroBead para el uso pueden tener un diámetro de partícula de 50 a 100 nm que contiene entre 30 a 60 % p/p de hierro en peso seco.

Las primeras y segundas partículas magnéticas usadas en la presente invención pueden además, o como alternativa al contenido de hierro, caracterizarse por su diámetro. Las primeras partículas magnéticas muestran un diámetro medio de 1 - 5 µm, preferentemente de 2,5 a 3,5 µm. En una modalidad preferida de la invención, el tamaño de las primeras partículas magnéticas debería ser lo más monodisperso posible, por ejemplo, con un coeficiente de variación ("cv") del diámetro de menos del 15 %, preferentemente de menos del 10 %. Las segundas partículas magnéticas pueden tener un diámetro medio de 10 - 250 nm, preferentemente de 30 - 150 nm con un cv del diámetro, por ejemplo, de menos del 60 %, preferentemente de menos del 30 %.

El término "muestra de células" se refiere a suspensiones o mezclas de células que tienen fenotipos o subpoblaciones diferentes en cantidades diferentes, por ejemplo, células, las cuales son comunes en la sangre total, sangre periférica, leucaféresis, capa leucoplaquetaria, sangre del cordón umbilical y la médula ósea. Dichas muestras de células incluyen, por ejemplo, eritrocitos, plaquetas y leucocitos, por ejemplo células T, células T reguladoras, células B, células NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y/o células madre hematopoyéticas.

El término "agente de agregación celular" se refiere a cualquier compuesto conocido en la técnica, el cual desencadena la agregación celular, por ejemplo, de eritrocitos dentro de la muestra de células. Por ejemplo, los eritrocitos pueden agregarse a partir de la sangre total y mediante determinados reactivos para formar un sedimento para poder eliminar el sobrenadante. Por ejemplo, el contacto de la sangre total con el agente de agregación celular desencadena la formación de agregados de eritrocitos y de algunas plaquetas, es decir, trombocitos, lo cual resulta en la sedimentación de estas poblaciones de células no deseadas. El proceso de sedimentación se potencia además mediante las primeras partículas magnéticas.

Los agentes de agregación celular usados en la presente invención son preferentemente proteínas como fibrinógeno e inmunoglobulinas o polímeros que contienen grupos hidroxilo como dextrano, hidroxietil almidón, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

En el método de acuerdo con la invención, el segundo gradiente de campo magnético puede ser más alto que el primer gradiente de campo magnético o la fuerza magnética debe incrementarse. Esto puede lograrse ya sea mediante la aplicación de un segundo campo magnético más alto o el uso de las segundas partículas magnéticas que tienen un contenido mayor de material magnético que las primeras partículas magnéticas.

Mediante la aplicación del primer gradiente magnético, esencialmente todas las células (es decir, 85 - 99 %) unidas a las primeras partículas magnéticas se retienen en el imán, mientras que esencialmente todas las células (es decir, 85 - 99 %) unidas a las segundas partículas magnéticas mucho más pequeñas permanecen en la mezcla b).

El primer y segundo gradiente de campo magnético se aplica preferentemente al someter la mezcla b) y la mezcla c) en medios de separación ferromagnéticos en el primer y segundo campo magnético. Dichos medios de separación ferromagnética se conocen en la técnica de la separación celular magnética y son, por ejemplo, tubos rellenados con materiales magnéticos, como partículas, malla y fibras no tejidas. Es posible ajustar el segundo gradiente de campo magnético tan alto como el primer gradiente de campo magnético mediante el uso de medios de separación ferromagnética diferentes en el mismo campo magnético.

Las primeras y segundas partículas magnéticas se acoplan a al menos un resto de reconocimiento de antígeno, el cual se une a al menos un antígeno en las células no objetivo y las células objetivo, respectivamente. Los restos de reconocimiento de antígeno pueden ser mono- y/o multiespecíficos. Preferentemente, las primeras y/o las segundas partículas magnéticas se acoplan a una pluralidad de primeros restos de reconocimiento de antígeno diferentes. Es posible acoplar las partículas magnéticas usadas en la presente invención a una o más, como 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 restos de reconocimiento de antígeno diferentes.

En una modalidad de la presente invención, el agente de agregación celular es HPMC-15 y la especificidad de las partículas se define por los restos de reconocimiento de antígeno respectivos. El primer y/o el segundo resto de reconocimiento de antígeno pueden seleccionarse a partir de anticuerpos dirigidos contra determinados marcadores de la superficie celular, lo que incluye, por ejemplo, CD1c, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD23, CD25, CD27, CD34, CD36, CD38, CD43, CD45, CD45RO, CD45RA, CD56, CD61, CD123, CD127, CD133, CD193, CD235a, CD335, CD304, anti Fc_epsilon, anti receptor de células T alfa/beta, anti receptor de células T gamma/delta, anti biotina, anti IgE, anti HLA-DR, y sus combinaciones.

Como segunda partícula magnética para el enriquecimiento de las células objetivo, se usan partículas conjugadas con anticuerpos, por ejemplo, con anticuerpos anti-CD8, anti-CD25 o anti-CD34. En consecuencia, en la etapa d), las células presentadoras de antígenos para estos anticuerpos pueden recuperarse como células objetivo.

Después de eliminar las células unidas al agente de agregación celular y las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las primeras partículas magnéticas, se obtiene una mezcla o suspensión celular b), la cual está libre sustancialmente de las primeras partículas y depletada de la mayoría de las células que son no deseadas.

En la etapa c), se aplica un segundo gradiente magnético a la mezcla b) obtenida de esta manera. Por el contrario al primer gradiente magnético, el segundo gradiente magnético retiene las células unidas a las segundas partículas magnéticas mucho más pequeñas y, de esta manera, separa las células objetivo de las células no deseadas.

La etapa d) del proceso de la invención se lleva a cabo preferentemente mediante la eliminación de las células inmovilizadas, por ejemplo, mediante la eliminación de los medios de separación ferromagnéticos a partir del gradiente magnético y la elución de las células a partir de los medios de separación ferromagnéticos con solución tampón.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar composiciones para aislar, enriquecer y/o recuperar células terapéuticamente, diagnósticamente o científicamente valiosas a partir de una muestra de células, como sangre periférica, sangre del cordón umbilical y/o médula ósea.

La composición de acuerdo con la invención comprende un agente de agregación celular; primeras partículas magnéticas que tienen un diámetro medio de 1 - 5 µm, acopladas a un primer resto de reconocimiento de antígeno; y segundas partículas magnéticas que tienen un diámetro medio de 10 - 250 nm y acopladas a un segundo resto de reconocimiento de antígeno.

Los componentes de separación celular mencionados son adecuados para suministrarse como un kit. Cada kit contiene los componentes necesarios para realizar la separación de las células deseadas a partir de una muestra que contiene células con el método descrito en la presente descripción.

Los componentes esenciales del kit son los reactivos de agregación celular y las primeras y segundas partículas magnéticas como se menciona en la presente descripción. Las partículas pueden estar disponibles en el kit en, por ejemplo, líquidos, tampones o en forma liofilizada y pueden usarse para el aislamiento de células T reguladoras, células NK positivas para CD8 y/o células madre hematopoyéticas.

Medición del contenido de hierro

La determinación del contenido de hierro del material seco puede realizarse mediante la degradación del óxido de hierro con ácido, por ejemplo, ácido fosfórico, y la cuantificación de los iones de hierro disueltos mediante medios analíticos, tales como la determinación fotométrica de complejos coloreados, por ejemplo, con el Merck Spectroquant Test Kit para pruebas de hierro. Los recuentos de partículas de las suspensiones de perlas pueden determinarse mediante contadores de partículas o microscópicamente con una cámara de Neubauer. La concentración de masa en la misma suspensión de perlas puede determinarse mediante la transferencia del material de perlas de un volumen definido de suspensión de perlas a agua mediante lavado, la eliminación de dicha agua mediante secado y el pesaje del residuo sólido. El contenido de hierro de una partícula puede calcularse al conocer el recuento de partículas de una suspensión de perlas con una concentración de masa conocida de material de perlas secas y el contenido de hierro conocido de dicho material de perlas secas. Por ejemplo, las MACSiBead con 44,5 mg por ml de peso seco de perlas, 1,36 x 10^9partículas por mg y un contenido de hierro de 4,61 % p/p en el material de perla seca contienen 1,51 pg de hierro por partícula.

El recuento de partículas no se obtiene directamente, pero se estima mediante el cálculo del peso de una sola partícula al asumir una forma esférica y mediante el uso del diámetro hidrodinámico obtenido mediante mediciones de DLS y la densidad de partículas de 2,5 mg/ml, de acuerdo con Aaron B. Kantor, Ian Gibbons, Stefan Miltenyi y Jürgen Schmitz en "Cell Separation Methods and Applications", Ed. Diether Recktenwald, Andreas Radbruch, Marcel Dekker, Nueva York, 1998, p. 153 - 171.). Por ejemplo, las MicroBead que tienen un tamaño de 100 nm, un peso seco de 10 mg por ml y un contenido de hierro del 40 % p/p en el material de perla seca contienen 0,53 fg de hierro por partícula.

Ejemplos

Las perlas magnéticas se fabricaron con parámetros de proceso diferentes que dieron como resultado un tamaño diferente de las partículas. El tamaño de partícula se caracterizó mediante los instrumentos Beckman Coulter Delsa Nano y Coulter Counter Z2. En los ejemplos, las primeras partículas magnéticas se denominan como "partículas magnéticas grandes" y las segundas partículas magnéticas se denominan como "partículas magnéticas pequeñas". Las partículas magnéticas grandes están disponibles comercialmente de Miltenyi Biotec GmbH como, por ejemplo, "MACSiBead anti biotina". Las partículas magnéticas pequeñas están disponibles comercialmente en Miltenyi Biotec GmbH como, por ejemplo, "MicroBead CD25".

Ejemplo 1: aislamiento de células T reguladoras

Las partículas magnéticas grandes se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD8, CD14, CD15, CD19, CD123 y CD127. Las partículas magnéticas pequeñas se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD25. Los conjugados de anticuerpos a perlas se titularon en sangre total humana y se determinó la concentración óptima.

Los conjugados de anticuerpos a perlas magnéticas se combinaron, lo que incluye 15 ml de HPMC al 0,75 % de solución madre de HPMC15 a un cóctel en las cantidades determinadas previamente. El cóctel se proporcionó a 30 ml de sangre total humana, se mezcló, se incubó durante 10 minutos en un rotador de tubos MACSmixTM (Miltenyi Biotec GmbH) y se

colocó en un separador MACSxpress® (Miltenyi Biotec GmbH) durante 15 minutos. El sobrenadante se procesó después directamente con la tecnología MACS mediante el uso de una columna LS y un separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH). Las células no deseadas pasan a través de la columna. Las células marcadas magnéticamente se expulsarían mediante una presión firme del émbolo dentro de la columna. Las células T reguladoras aisladas se analizarían en un citómetro de flujo MACSquant Analyzer (Miltenyi Biotec) mediante el uso de una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

La Figura 2 muestra que, de acuerdo con el ejemplo 1, las células T reguladoras pueden enriquecerse muy rápido, en un lapso de 45 minutos, con una pureza de aproximadamente el 91 % mediante el uso de la estrategia de marcaje combinada de la invención.

Ejemplo 2: aislamiento de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés)

Las partículas magnéticas grandes se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD61 y las partículas magnéticas pequeñas se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD34. Los conjugados de anticuerpos a perlas se titularon en sangre total humana y se determinó la concentración óptima. Los conjugados de anticuerpos a perlas magnéticas se combinaron, lo que incluye 4 ml de HPMC al 0,75 % de solución madre de HPMC15 en un cóctel en las cantidades determinadas previamente. El cóctel se proporcionó a 8 ml de sangre total humana, se mezcló, se incubó durante 10 minutos en un rotador de tubos MACSmixTM (Miltenyi Biotec GmbH) y se colocó en un separador MACSxpress® (Miltenyi Biotec GmbH) durante 15 minutos. El sobrenadante se procesó después directamente con la tecnología MACS mediante el uso de una columna LS y un separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH) seguido de una segunda columna MS. Las células no deseadas pasan a través de la columna. Las células marcadas magnéticamente se expulsarían mediante una presión firme del émbolo dentro de la columna. Las HSC aisladas se analizarían en un citómetro de flujo MACSquant Analyzer (Miltenyi Biotec) mediante el uso de una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

La Figura 3 muestra que, de acuerdo con el ejemplo 2, las HSC podrían enriquecerse muy rápidamente a partir de la sangre total, en un lapso de 50 minutos, con una pureza de aproximadamente el 67 % mediante el uso de una estrategia de marcaje combinada de la invención.

Ejemplo Comparativo 1: Aislamiento de células T reguladoras sin reactivo de agregación de eritrocitos

Las partículas magnéticas grandes se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD8, CD14, CD15, CD19 y las partículas magnéticas pequeñas se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD25.
Los conjugados de anticuerpos a perlas se titularon en sangre total humana y se determinó la concentración óptima.

Los conjugados de anticuerpos a perlas magnéticas se combinaron con y sin 4 ml de HPMC al 0,75 % de solución madre de HPMC15 a un cóctel a las cantidades determinadas previamente con un volumen final de 4,5 ml. El cóctel se proporcionó a 8 ml de sangre total humana, se mezcló, se incubó durante 10 minutos en un rotador de tubos MACSmixTM (Miltenyi Biotec GmbH) y se colocó en un separador MACSxpress® (Miltenyi Biotec GmbH) durante 15 minutos. El sobrenadante se procesó después directamente con la tecnología MACS mediante el uso de una columna LS y un separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH). Las células no deseadas pasan a través de la columna. Las células marcadas magnéticamente se expulsarían mediante una presión firme del émbolo dentro de la columna. Las células T reguladoras aisladas se analizarían en un citómetro de flujo MACSquant Analyzer (Miltenyi Biotec) mediante el uso de una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

La Figura 4 muestra que de acuerdo con el ejemplo comparativo 1 (sin HPMC15); las células T reguladoras se obtienen con una pureza y un rendimiento del 42 % y 6,9E+04 respectivamente. El aislado. FIG 3

Mediante la repetición del ejemplo comparativo 1 con HPMC15, las células T reguladoras podrían lograrse con una pureza del 90 % y un rendimiento de 2.1E+05.

Ejemplo comparativo 2: Aislamiento de células NK positivas para CD8 con tamaño de partícula diferente de partículas magnéticas grandes - marcaje magnético sucesivo

Las partículas magnéticas grandes, con 3 µm y 300 nm se separaron conjugadas a anticuerpos que reconocen CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, IgE y TCRab. Las partículas magnéticas pequeñas se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD8. Los conjugados de anticuerpos a perlas se titularon en sangre total humana y se determinó la concentración óptima.

Los conjugados de anticuerpos a perlas magnéticas grandes se combinaron en un cóctel en las cantidades determinadas previamente. El cóctel se incubó con 8 ml de sangre total humana en combinación con 4 ml de solución madre de HPMC 15 al 0,75 %. La mezcla se mezcló e incubó durante 10 minutos en un rotador de tubos MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y se colocó en un separador MACSxpress® (Miltenyi Biotec GmbH) durante 15 minutos. Después, el sobrenadante se elimina de los agregados mediante pipeteo hacia un nuevo tubo.

Las partículas magnéticas pequeñas se proporcionaron a las células NK aisladas, se mezclaron y se incubaron durante 10 minutos. Las células se procesaron con tecnología MACS mediante el uso de una columna MS y un separador OctoMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH). Las células no deseadas pasan a través de la columna. Las células marcadas magnéticamente se expulsarían mediante una presión firme del émbolo dentro de la columna. Las células NK positivas para CD8 aisladas se analizarían en un citómetro de flujo MACSquant Analyzer (Miltenyi Biotec) mediante el uso de una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo.

Las células NK positivas para CD8 podrían lograrse con una alta pureza de aproximadamente el 93 % mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm. La pureza fue menor (73 %), cuando se usaron partículas de 300 nm.

La figura 5 muestra células NK positivas para CD8 aisladas directamente a partir de sangre total sin ningún enriquecimiento previo no magnético. Mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 300 nm, la fracción positiva muestra un 27 % de células no deseadas debido a las partículas magnéticas grandes marcadas a células diferentes de NK que no pudieron retenerse durante el primer enriquecimiento magnético. Las partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm marcadas a células diferentes de NK podrían permanecer casi completas durante la primera etapa magnética.

Por lo tanto, puede alcanzarse una pureza más alta significativamente de células NK positivas para CD8 después de la segunda etapa de aislamiento mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm.

Ejemplo comparativo 3: Aislamiento de células NK positivas para CD8 con tamaño de partícula diferente de partículas magnéticas grandes - marcaje magnético simultáneo

Las partículas magnéticas grandes, con 3 µm y 300 nm se separaron conjugadas a anticuerpos que reconocen CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, IgE y TCRab. Las partículas magnéticas pequeñas se conjugaron a anticuerpos que reconocen CD8. Los conjugados de anticuerpos a perlas se titularon en sangre total humana y se determinó la concentración óptima.

Los conjugados de anticuerpos a perlas magnéticas grandes y pequeñas se combinaron en un cóctel en las cantidades determinadas previamente. El cóctel se incubó con 4 ml de sangre total humana en combinación con 2 ml de solución madre de HPMC 15 al 0,75 %. La mezcla se mezcló e incubó durante 10 minutos en un rotador de tubos MACSmix™ (Miltenyi Biotec GmbH) y se colocó en un separador MACSxpress® (Miltenyi Biotec GmbH) durante 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se procesó directamente con la tecnología MACS mediante el uso de una columna LS y un separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH). Las células no deseadas pasan a través de la columna. Las células marcadas magnéticamente se expulsarían mediante una presión firme del émbolo dentro de la columna.

Las células NK positivas para CD8 podrían lograrse con una pureza de alrededor del 80 % mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm. La pureza fue menor (6,7 %), cuando se usaron partículas de 300 nm.

La Figura 6 muestra células NK positivas para CD8 aisladas directamente de sangre total sin ningún enriquecimiento previo. Mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 300 nm, la fracción positiva muestra un 93 % de células no deseadas debido a las partículas magnéticas grandes marcadas con células diferentes de NK que no pudieron retenerse durante el primer enriquecimiento magnético. Las partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm marcadas a células diferentes de NK podrían permanecer casi completas durante la primera etapa magnética.

Por lo tanto, puede alcanzarse una pureza obviamente mayor de células NK positivas para CD8 después de la segunda etapa de aislamiento mediante el uso de partículas magnéticas grandes con un diámetro de 3 µm.

Reivindicaciones

1. Un método para enriquecer células objetivo a partir de una muestra de células caracterizado por:

a) poner en contacto la muestra con un agente de agregación celular y primeras partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro de 0,1 pg a 5 000 pg y un diámetro medio de 2,5 a 3,5 µm, acopladas a un primer resto de reconocimiento de antígeno; y segundas partículas magnéticas que tienen un contenido de hierro de 0,05 fg a 100 fg y un diámetro medio de 10 a 250 nm y acopladas a un segundo resto de reconocimiento de antígeno para obtener la mezcla a)
b) aplicar un primer gradiente de campo magnético a la mezcla a) lo que elimina de esta manera las células unidas al primer resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las primeras partículas magnéticas, para obtener una mezcla b) y obtener un aglomerado que comprende las células de la mezcla a) unidas al agente de agregación celular
c) aplicar un segundo gradiente de campo magnético a la mezcla b) lo que inmoviliza de esta manera las células unidas al segundo resto de reconocimiento de antígeno acoplado a las segundas partículas magnéticas
d) recuperar las células inmovilizadas a partir del segundo gradiente de campo magnético como células objetivo.

2. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el aglomerado que comprende las células de la mezcla a) unidas al agente de agregación celular se separa de la mezcla b).

3. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el segundo gradiente de campo magnético es mayor que el primer gradiente de campo magnético.

4. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el primer y segundo gradiente de campo magnético se aplica al someter la mezcla b) y la mezcla c) en medios de separación ferromagnéticos en el primer y segundo campo magnético.

5. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las primeras partículas magnéticas tienen un cv del diámetro de menos del 15 %.

6. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el reactivo de agregación celular se selecciona del grupo que consiste en proteínas como fibrinógeno e inmunoglobulinas, dextrano, hidroxietil almidón, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

7. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque las primeras partículas magnéticas se acoplan a una pluralidad de primeros restos de reconocimiento de antígeno diferentes.

8. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las segundas partículas magnéticas se acoplan a una pluralidad de segundos restos de reconocimiento de antígeno diferentes.

9. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque los restos de reconocimiento de antígenos primero y/o segundo son anticuerpos contra antígenos seleccionados del grupo CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD34, CD36, CD61, CD123, CD193, CD235a, anti-IgE y anti-TCRab

10. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra de células es una muestra de sangre total, capa leucoplaquetaria o sangre periférica.

11. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el agente de agregación celular agrega eritrocitos.

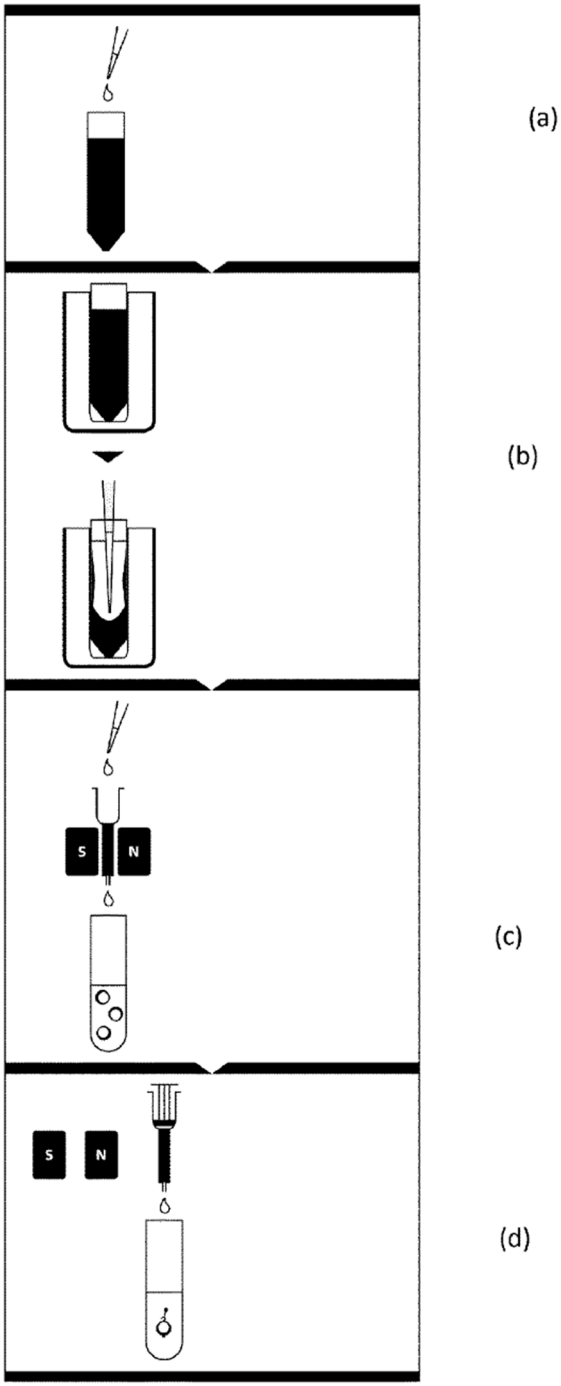


Fig. 1

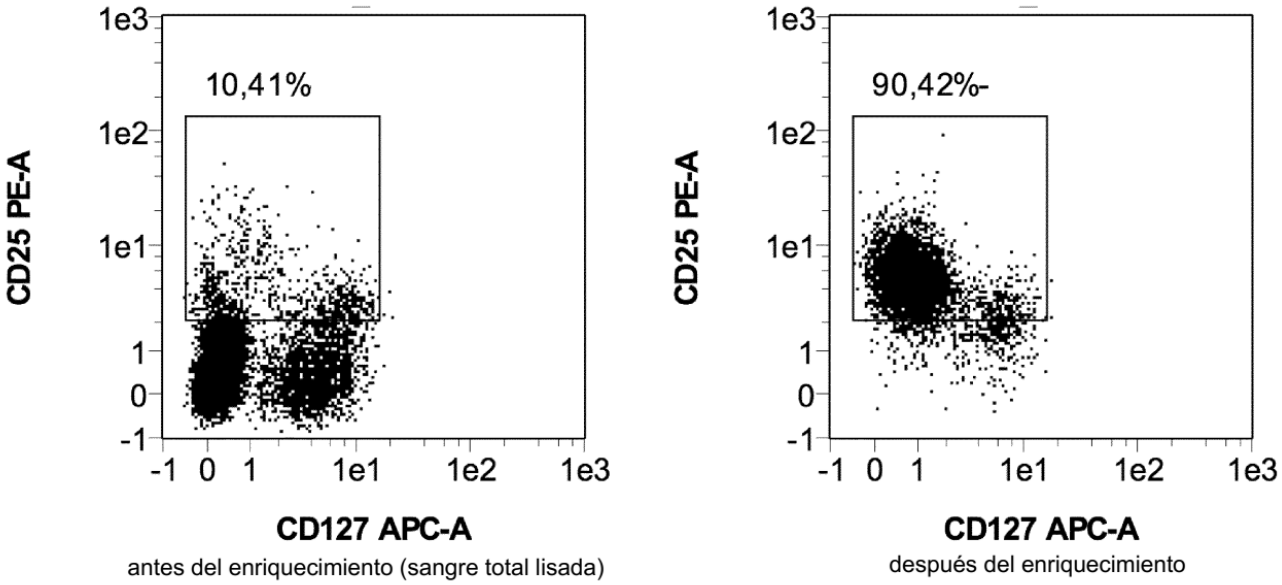
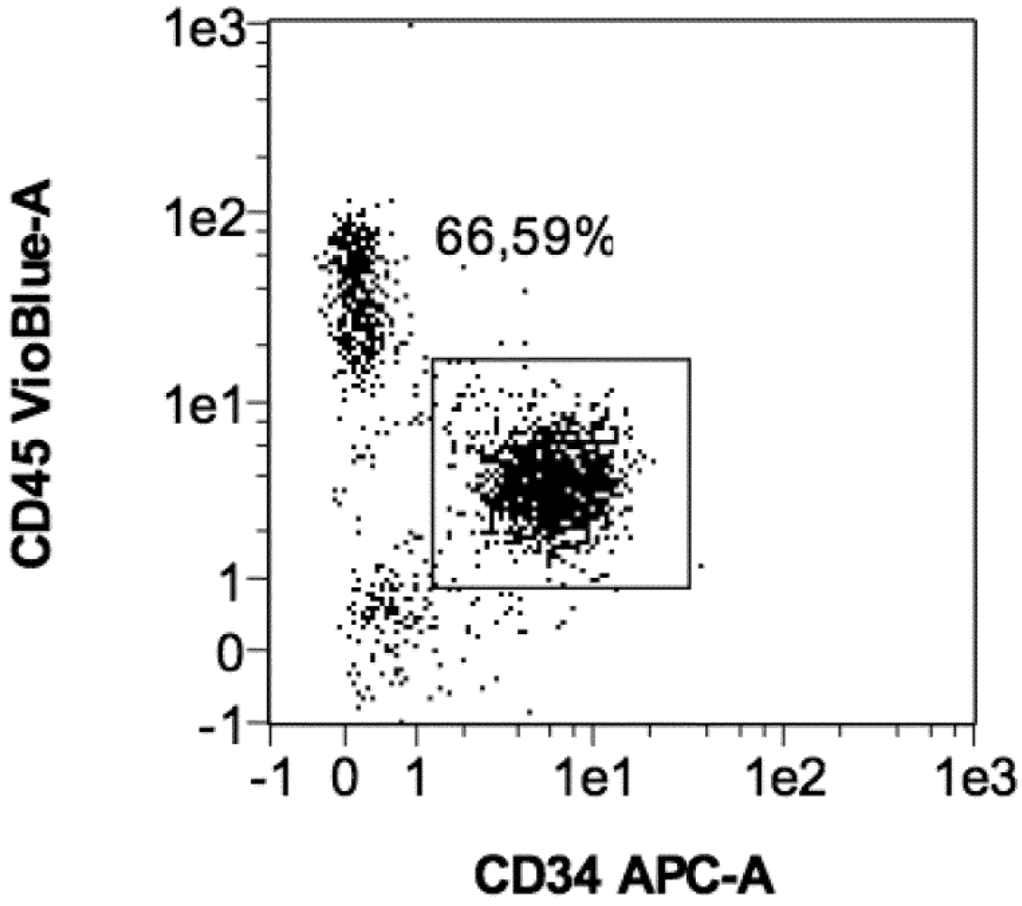

10,41%
CD25 PE-A
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3
CD127 APC-A
antes del enriquecimiento (sangre total lisada)
90,42%-
CD25 PE-A
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3
CD127 APC-A
después del enriquecimiento

FIG 2

Fig. 3



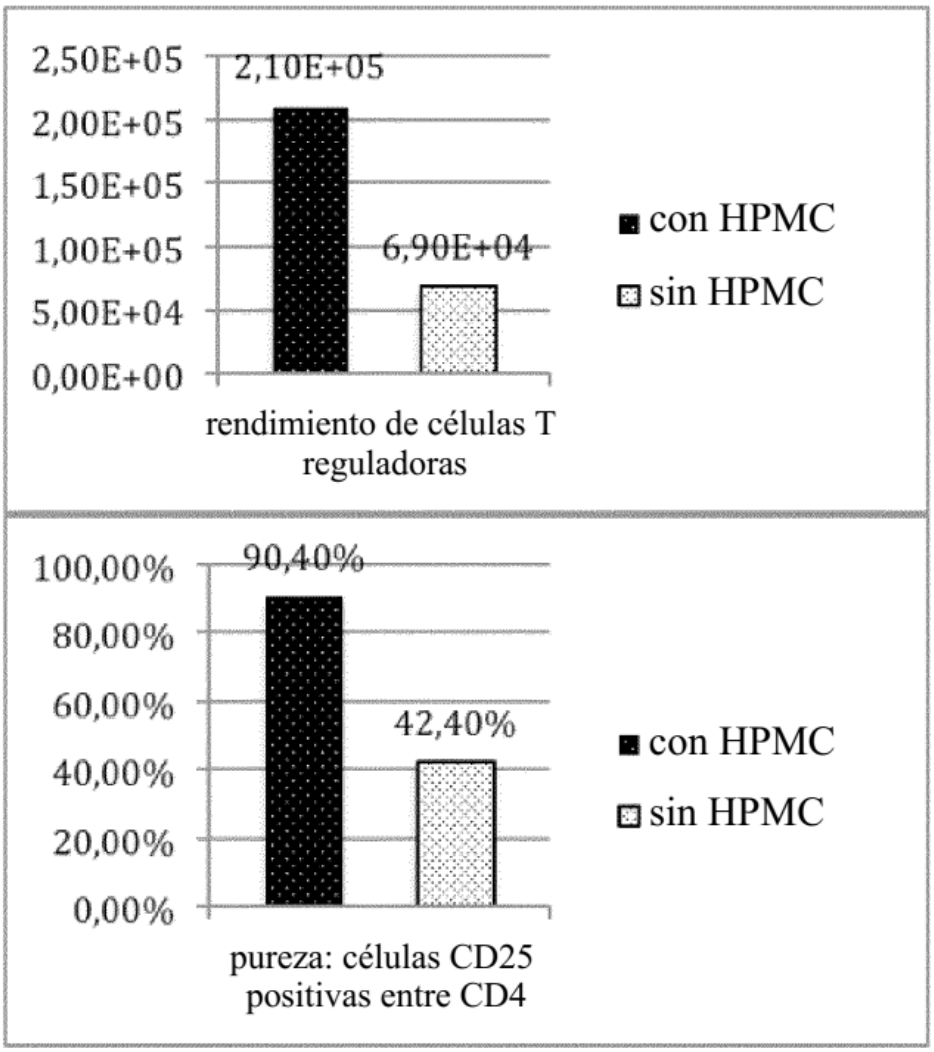
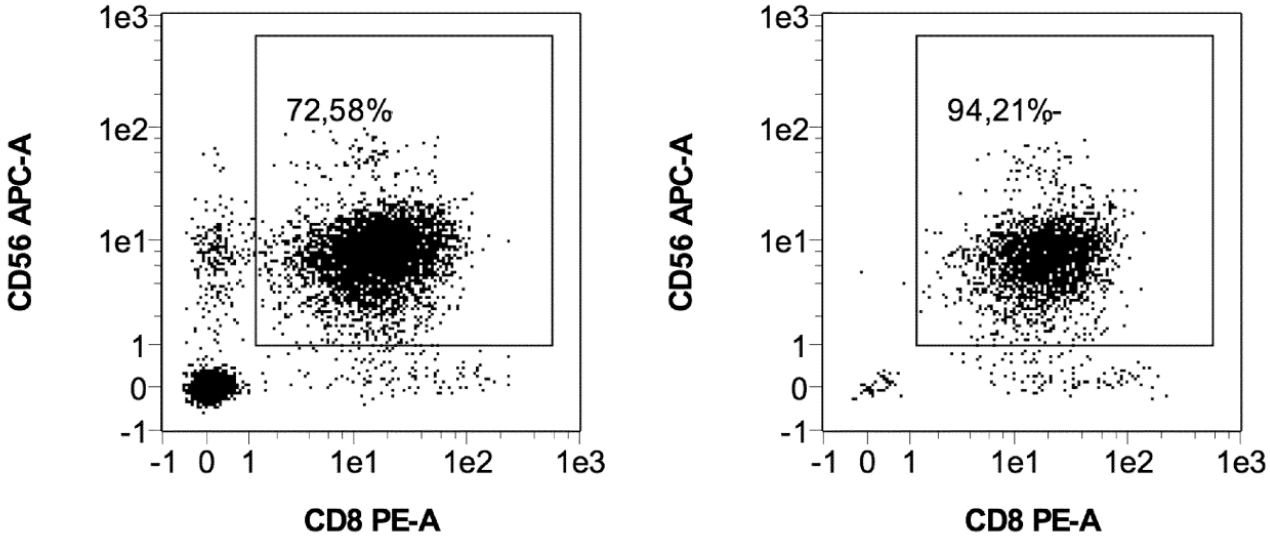

2,50E+05
2,00E+05
1,50E+05
1,00E+05
5,00E+04
0,00E+00
2,10E+05
6,90E+04
con HPMC
sin HPMC
rendimiento de células T reguladoras
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
90,40%
42,40%
con HPMC
sin HPMC
pureza: células CD25 positivas entre CD4

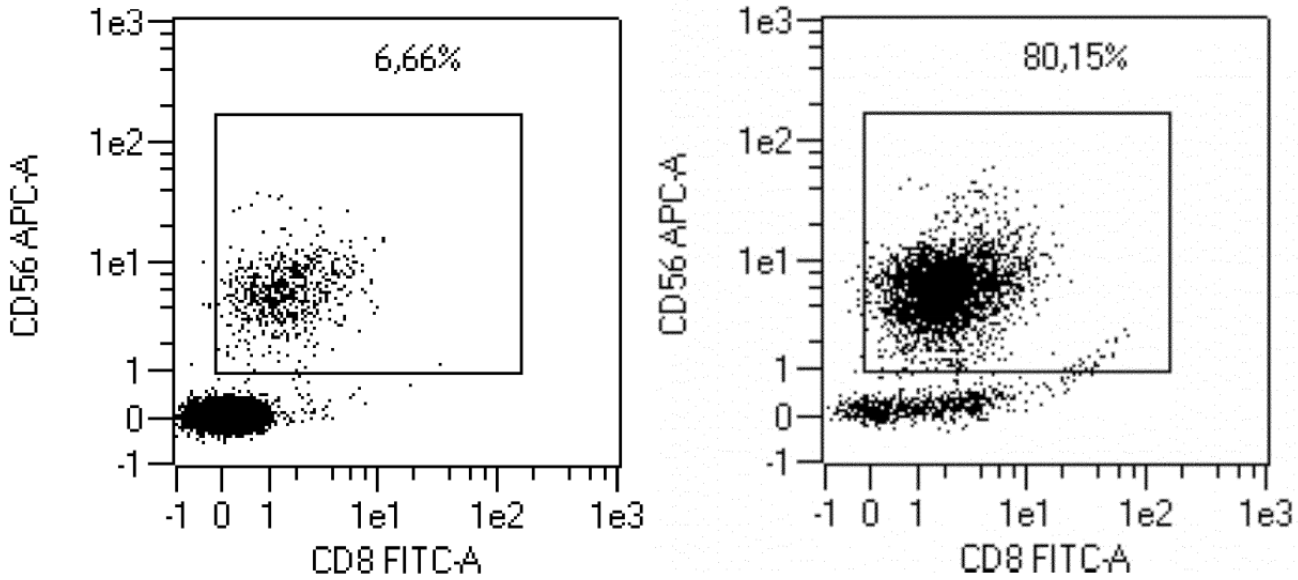
Fig. 4



con partícula de 300 nm

con partícula de 3 µm

Fig. 5



con partícula de 300 nm con partícula de 3 µm Fig. 6