

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 564**

51 Int. Cl.:

A61B 10/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/US2012/064130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12847676 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2775928**

54 Título: **Sistemas y métodos de procesamiento celular**

30 Prioridad:

08.11.2011 US 201161557127 P

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

24.09.2019

73 Titular/es:

**AUXOCELL LABORATORIES INC. (100.0%)
71 Grove St.
Chestnut Hill, MA 02467, US**

72 Inventor/es:

**TAGHIZADEH, ROUZBEH, R. y
MEADE, JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 725 564 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

Sistemas y métodos de procesamiento celular

5 Campo técnico

En diversas realizaciones, la presente invención se refiere a sistemas y a métodos de procesamiento tisular para aislar y recoger células diana.

10 Antecedentes de la invención

La purificación de células viables a partir de una muestra de tejido puede ser un proceso laborioso que implica la disección y otras etapas manuales de manipulación y procesamiento, así como, en algunos casos, el cultivo de células. Mantener la esterilidad de las células durante el proceso de purificación también es una preocupación importante. Aunque pueden usarse campanas laminares para mantener la esterilidad, tienen varias desventajas. Por ejemplo, tales campanas son caras, relativamente inmóviles, difíciles de manejar y consumen valioso espacio de laboratorio. La eficacia del proceso de purificación celular es otra preocupación que complica aún más el proceso de purificación. El aislamiento de células raras, como las células madre, de una muestra de tejido requiere un proceso eficaz para recuperar tantas células como sea posible. El documento WO2011117821 divulga una herramienta de trituración tisular que comprende un medio de reducción de tamaño y un émbolo.

Sigue existiendo la necesidad de un mecanismo y un método prácticos, rentables, estériles y eficientes para extraer y recoger células, como células madre, para promover terapias potenciales que dependan de la administración de estas células.

25 Sumario de la invención

La presente invención extrae y recoge células de un tejido de manera eficaz y económica. Los inventores han descubierto que el tejido puede fragmentarse eficazmente y que las células resultantes pueden purificarse usando un sistema o kit con múltiples componentes. Una ventaja de la presente invención es que el procesamiento del tejido tiene lugar en un sistema cerrado, de modo que puede mantenerse la esterilidad durante todo el proceso, incluso si se eliminan ciertos componentes durante el procesamiento, por ejemplo, mediante el uso de válvulas, abrazaderas y sellos térmicos. Además, cualquiera o todas las etapas pueden automatizarse o realizarse manualmente, de acuerdo con las necesidades específicas de la aplicación o del usuario.

Por lo tanto, la invención se refiere a una herramienta de trituración tisular. La herramienta de trituración tisular incluye un compartimento para una muestra de tejido, una superficie de corte giratoria en un extremo del compartimento y un recipiente estéril sellado. La superficie de corte giratoria separa el compartimento del recipiente estéril sellado, de manera que una muestra de tejido que pasa a través de la superficie de corte puede depositarse dentro del recipiente. La superficie de corte giratoria puede dimensionarse para triturar la muestra de tejido en fragmentos que tienen una sección transversal media no mayor a cuatro milímetros cuadrados. Por ejemplo, el número de milímetros cuadrados no puede ser mayor que 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1 o 0,05 en varias realizaciones de la invención. La herramienta de trituración tisular también puede incluir una segunda superficie de corte para reducir aún más la sección transversal media de los fragmentos. La superficie de corte giratoria de la herramienta de trituración tisular puede incluir un sistema de corte automatizado. Una o más rejillas trituradoras pueden colocarse cerca de la superficie de corte. La herramienta de trituración tisular puede incluir además una ventosa para estabilizar la herramienta durante su funcionamiento. La herramienta de trituración tisular puede incluir también o alternativamente un conducto de fluido en comunicación con el recipiente estéril sellado, y una unidad de separación tal como uno o más filtros dentro del conducto de fluido. El recipiente estéril sellado incluye opcionalmente al menos un puerto de acceso sellado que permite la introducción estéril de un fluido en el recipiente.

En la herramienta de trituración tisular, el compartimento para el tejido incorpora un miembro sólido para presionar la muestra de tejido.

En una realización, una porción del compartimento cerca de su extremo tiene una sección transversal sustancialmente constante, de manera que puede introducirse un miembro sólido de forma similar en el compartimento y llenar esa porción, mientras se presiona la muestra de tejido en o a través de la superficie de corte. El compartimento cerca de la superficie de corte puede tener un extremo ahusado o en forma de cono. En una realización, una superficie interior del compartimento está roscada, de manera que un miembro sólido roscado puede guiarse dentro del compartimento. En una realización, el compartimento también incluye una junta, que puede proporcionar un sello mejorado cuando se introduce un miembro sólido en el compartimento. En otra realización más, la herramienta de trituración tisular incluye una manivela de árbol para mover la superficie de corte hacia la muestra de tejido.

La invención también proporciona un método para usar cualquiera de las herramientas de trituración tisular descritas anteriormente al impulsar la muestra de tejido a través de la superficie de corte de la herramienta. La invención proporciona un método para triturar una muestra de tejido y opcionalmente inyectar una enzima en el recipiente estéril

sellado, de modo que la enzima mejore la digestión del tejido triturado. La enzima puede ser una proteasa, como colagenasa, hialuronidasa o dispasa, por separado o en combinación. Estas etapas pueden incorporarse opcionalmente en un método para separar células de la muestra de tejido triturando y/o digiriendo la muestra de tejido y eliminando fragmentos mayores de aproximadamente 40 micrómetros (por ejemplo, fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 500 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 300 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 250 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 150 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 70 micrómetros, o fragmentos retenidos por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 40 micrómetros). Estos fragmentos más grandes, denominados "tejido no digerido" en el presente documento, pueden eliminarse mediante filtración o sedimentación. Estos métodos son efectivos para purificar células de cualquiera de varios tejidos sólidos. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden separar células, tal como células madre, del tejido graso o del tejido postnatal, como tejido del cordón umbilical o placentario o, más específicamente, un tejido que comprende la gelatina de Wharton. La muestra de tejido está sustancialmente libre de vasos sanguíneos, que opcionalmente pueden diseccionarse de un tejido antes de colocar el tejido en el compartimento.

Breve descripción de las figuras.

Otras características y ventajas de la presente invención, así como la propia invención, pueden entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción de las diversas realizaciones, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 representa esquemáticamente una herramienta de trituración tisular, de acuerdo con una realización de la invención;
- la figura 2 es una vista en perspectiva esquemática de un miembro sólido de una herramienta de trituración tisular, de acuerdo con una realización de la invención;
- la figura 3 es una vista en perspectiva esquemática del miembro sólido de la figura 2;
- la figura 4 es una vista en perspectiva esquemática que muestra parcialmente una superficie de corte, de acuerdo con una realización de la invención;
- las figuras 5A y 5B son vistas esquemáticas que muestran parcialmente un miembro sólido y su compartimento complementario, de acuerdo con realizaciones de la invención;
- la figura 6A es una vista lateral de una herramienta de trituración tisular;
- la figura 6B es una vista en sección transversal a lo largo de la línea E-E de la herramienta de trituración tisular de la figura 6A;
- la figura 6C es una vista despiezada de la herramienta de trituración tisular de la figura 6A;
- la figura 7 es una vista en perspectiva esquemática de una herramienta de trituración tisular;
- la figura 8 proporciona un resumen de las etapas del procedimiento para recoger y aislar células deseadas de una muestra de tejido, de acuerdo con una realización de la invención;
- la figura 9 proporciona un resumen de las etapas del procedimiento para recoger y aislar células deseadas de una muestra de tejido, de acuerdo con una realización de la invención; y
- las figuras 10A-10G representan procedimientos para recoger y aislar células deseadas de una muestra de tejido.

Descripción detallada

Para proporcionar una comprensión general de la invención, ahora se describirán ciertas realizaciones ilustrativas, que incluyen sistemas y métodos para procesar células.

Herramienta de trituración tisular

La figura 1 representa esquemáticamente una herramienta de trituración tisular 10 de acuerdo con una realización de la invención. La herramienta de trituración tisular 10 incluye un compartimento 12 dentro del que puede recibirse y alojarse inicialmente una muestra de tejido, y un recipiente estéril sellado 14. El compartimento 12 se extiende entre los extremos primero y segundo 16, 18, mientras que el recipiente estéril sellado 14 se extiende entre los extremos primero y segundo 18, 20. Una superficie de corte giratoria 108 está situada en el segundo extremo 18 del compartimento 12 o, de manera equivalente, en el primer extremo 18 del recipiente estéril sellado 14, y por lo tanto separa el compartimento 12 del recipiente estéril sellado 14. Como se ilustra, la herramienta de trituración tisular 10 también incluye un miembro sólido 100. El miembro sólido 100 está representado parcialmente situado dentro (como se muestra en líneas discontinuas) del compartimento 12. Una parte del miembro sólido 100 también se muestra situada fuera del compartimento 12. Las roscas 105 se representan en esa parte exterior del miembro sólido 100.

La figura 2 representa una realización del miembro sólido 100 de la herramienta de trituración tisular 10. No se muestran otras porciones de la herramienta de trituración tisular 10 (por ejemplo, el compartimento 12 y el recipiente estéril sellado 14). El miembro sólido 100 incluye un émbolo 104 de mayor diámetro (mostrado con las roscas 105) y un árbol de tornillo 106 de menor diámetro. Un mango 114 está dispuesto en un extremo del miembro sólido 100. En

el extremo opuesto del miembro sólido 100, la superficie de corte 108 está unida al extremo del árbol de tornillo 106 de menor diámetro. Como se ilustra, el árbol de tornillo 106 de menor diámetro se extiende desde la superficie de corte 108 hasta el mango 114 (al que también está acoplado el árbol de tornillo 106 de menor diámetro) y, al hacerlo, el árbol de tornillo 106 de menor diámetro se desplaza a través de una porción hueca 107 (por ejemplo, central) del émbolo 104 de mayor diámetro. En una realización, el árbol de tornillo 106 presenta roscas 109 a lo largo de una cierta longitud del mismo y el émbolo 104 incluye acanaladuras 111 complementarias dentro de su porción hueca 107. De esta manera, el émbolo 104 se engancha de manera roscada con el árbol de tornillo 106. Por consiguiente, cuando se gira el mango 114, también se hace girar el árbol de tornillo 106, al igual que (opcionalmente) la superficie de corte 108 que está unida al extremo del árbol de tornillo 106. Además, la rotación del árbol de tornillo 106 provoca la traslación del émbolo 104, por ejemplo hacia la superficie de corte 108. Una muestra de tejido alojada dentro del compartimento 12 entre el émbolo 104 y la superficie de corte 108 puede presionarse de este modo para que entre en contacto con la superficie de corte giratoria 108 y, como se describe más adelante, se corte de ese modo.

La porción roscada 105 del émbolo 104 de mayor diámetro puede engancharse y encajarse con una porción interior roscada complementaria del compartimento 12 que recibe la muestra de tejido. El enganche roscado entre el émbolo 104 y el compartimento 12 proporciona influencia y control para que el usuario pueda trasladar más fácilmente el émbolo 104 dentro del compartimento 12 usando el mango 114, así como deslizar o empujar la muestra de tejido hacia y a través de la superficie de corte 108. Como se ilustra en la figura 1, el émbolo 104 está dimensionado para encajarse con y sustancialmente llenar una cavidad hueca interior del compartimento 12. En una realización, con referencia de nuevo a la figura 2, puede disponerse una junta 118 en un extremo del émbolo 104. En conjunto, la junta 118 y el émbolo 104 pueden llenar sustancialmente un diámetro interno de la cavidad hueca interior del compartimento 12, creando así un sello de vacío estanco al aire en el compartimento 12. La junta 118 puede tener una forma sustancialmente complementaria a la superficie de corte 108. Por ejemplo, la superficie inferior de la junta y la superficie superior de la superficie de corte 108 pueden ser redondas o planas. En una realización, la junta 118 forma una superficie plana. Una muestra de tejido se impulsa a través de la superficie de corte 108 y, por lo tanto, se tritura cuando la junta 118 entra en contacto y acciona la muestra de tejido.

La superficie de corte giratoria 108 puede ser cualquier superficie configurada para cortar, diseccionar o separar una muestra de tejido en porciones más pequeñas sin dañar las células de la muestra de tejido cuando la muestra de tejido se empuja a través de la superficie de corte 108. Por ejemplo, la superficie de corte 108 puede triturar una muestra de tejido en porciones más pequeñas con una sección transversal media de no más de cuatro milímetros cuadrados, o de un milímetro cuadrado, aunque se contemplan superficies de corte que pueden triturar la muestra de tejido en porciones más grandes o más pequeñas. Una herramienta de trituración tisular puede incluir una segunda superficie de corte para reducir aún más la sección transversal media de las muestras de tejido triturado. Ejemplos de una segunda superficie de corte incluyen una parrilla con bordes afilados, múltiples alambres afilados a través de una abertura, una placa o disco de acero con múltiples orificios que se apoyan en un labio dentro de un compartimento, orificios en una placa que están desplazados y tienen un borde afilado, y una malla de superficies afiladas que definen aperturas. Alternativamente, una superficie de corte define aperturas, un extremo del émbolo 104 puede formar múltiples proyecciones, como dedos, que se encajan con las aperturas de la superficie de corte 108 para ayudar a empujar la muestra de tejido a través de la superficie de corte 108. El extremo del émbolo 104 puede ser plano. Además, la superficie de corte giratoria 108 puede ser texturizada o puede formar múltiples proyecciones (por ejemplo, una garra) para crear una superficie de fricción o para mantener la muestra de tejido en la superficie de corte giratoria 108 a medida que se aplica presión a la muestra de tejido. En una realización adicional, la superficie de corte giratoria 108 puede incluir un sistema de corte automatizado, tal como una tijera semiautomática.

Puede disponerse una tuerca de nariz opcional (no mostrada) alrededor de la superficie de corte 108 para retener la superficie de corte 108 en posición mientras se impulsa una muestra de tejido a través de ella. Por ejemplo, la tuerca de nariz opcional puede unirse de manera extraíble al compartimento 12 que recibe la muestra de tejido. La tuerca de nariz opcional puede incluir una proyección que se engancha con una superficie rebajada del compartimento 12 para formar una conexión de ajuste a presión. Adicional o alternativamente, una porción roscada de la tuerca de nariz opcional puede engancharse con una porción roscada similar y complementaria del compartimento 12. Cuando la tuerca de nariz opcional está completamente enganchada con el compartimento 12, la superficie de corte 108 está dispuesta y retenida en posición mediante un labio de la tuerca de nariz opcional.

La figura 3 representa una vista en perspectiva del miembro sólido 100 de la herramienta de trituración tisular 10. No se muestran otras porciones de la herramienta de trituración tisular (por ejemplo, el compartimento 12 y el recipiente estéril, sellado 14). Como antes, el miembro sólido 100 incluye un émbolo 104 de mayor diámetro (mostrado con las roscas 105) y un árbol de tornillo 106 de menor diámetro. El mango 114 está dispuesto en un extremo del miembro sólido 100. En el extremo opuesto del miembro sólido 100, la superficie de corte 108 está unida al extremo del árbol de tornillo 106 de menor diámetro. En una realización, como se ilustra, la superficie de corte giratoria 108 incluye una cuchilla de corte 110 adyacente a un disco de trituración 112.

La figura 4 representa una vista en perspectiva de una superficie de corte giratoria 108 a modo de ejemplo de la herramienta de trituración tisular 10. La superficie de corte 108 incluye la cuchilla de corte 110. Además, la superficie de corte giratoria 108 incluye el disco de trituración 112 con aperturas 116 que permiten que las muestras de tejido se impulsen a través del mismo.

Las figuras 5A y 5B representan dos realizaciones de un miembro sólido 100 de una herramienta de trituración tisular 10. En una realización representada en la figura 5A, el émbolo 104 del miembro sólido 100 tiene forma sustancialmente cilíndrica cerca de su extremo. En una segunda realización representada en la figura 5B, el émbolo 104 del miembro sólido 100 tiene un extremo ahusado o en forma de cono. En cada realización, el miembro sólido 100 se conforma para encajar con y para llenar el compartimento 12 que tiene una forma complementaria, de manera que el miembro sólido 100 puede moverse dentro del compartimento 12 para impulsar una muestra de tejido dispuesta dentro del compartimento 12 a través de la superficie de corte giratoria 108. A medida que la muestra de tejido pasa a través de la superficie de corte giratoria 108, las porciones cortadas de la misma se depositan dentro del recipiente estéril sellado 14, que puede ser, por ejemplo, una bolsa. Adicional o alternativamente, la cavidad interior del compartimento 12 puede definir un canal o superficie rebajada (por ejemplo, una superficie de leva) para enganchar una proyección que sobresale del émbolo 104, de modo que el miembro sólido 100 puede asegurarse de forma extraíble al compartimento 12 y el usuario aún tiene influencia y control para trasladar el miembro sólido 100 al compartimento 12 (no mostrado).

La figura 6A representa una vista lateral de una herramienta de trituración tisular 200. La figura 6B representa una vista en sección transversal a lo largo de la línea E-E de la herramienta de trituración tisular 200 mostrada en la figura 6A, mientras que la figura 6C representa una vista despiezada de la herramienta de trituración tisular 200 mostrada en la figura 6A. La herramienta de trituración tisular 200 incluye una base 204, un depósito 208 y un mango 212. Como se muestra, la base 204 puede incluir una porción roscada 216 para engancharse de manera roscada con el depósito 208. Por ejemplo, una superficie interior del depósito 208 puede presentar acanaladuras 218 que complementan la porción roscada 216 de la base 204. De este modo, durante el ensamblaje de la herramienta de trituración tisular 200, el depósito 208 puede atornillarse sobre la base 204.

Como se ilustra, una ventosa 220 puede acoplarse a una porción inferior 224 de la base 204. En una realización, la ventosa 220 proporciona estabilidad a la herramienta de trituración tisular 200. Por ejemplo, en funcionamiento, un usuario puede acoplar la herramienta de trituración tisular 200 a una mesa (u otra superficie de soporte) usando la ventosa 220. De este modo, se proporciona estabilidad a la herramienta de trituración tisular 200 cuando, por ejemplo, el usuario gira el mango 212 como se describe a continuación, o imparte fuerza de otro modo a la herramienta de trituración tisular 200.

Como se muestra más claramente en la figura 6B, incluido dentro del depósito 208 hay un compartimento 228 para alojar inicialmente una muestra de tejido. Además, al menos una superficie de corte (que está acoplada al mango 212 a través de una manivela de árbol 232) puede moverse dentro del depósito 208. Por ejemplo, como se muestra más claramente en la figura 6C, una primera superficie de corte 236, una primera rejilla trituradora 240, una segunda superficie de corte 244 y una segunda rejilla trituradora 248 (cada una de las cuales está acoplada al mango 212 a través de la manivela de árbol 232) pueden moverse dentro del depósito 208 a través del accionamiento (por ejemplo, rotación) de la manivela de árbol 232. Un usuario puede, por ejemplo, accionar manualmente la manivela de árbol 232 a través del mango 212, o, alternativamente, puede accionarse automáticamente a través de un dispositivo separado. Como entenderá un experto en la materia, las superficies de corte primera y segunda 236, 244 pueden ser cualquiera de las superficies de corte a modo de ejemplo descritas anteriormente. Además, las rejillas de trituradora primera y segunda 240, 248 pueden incluir, como se ilustra, aperturas de diferentes tamaños.

En funcionamiento, a medida que se gira la manivela del árbol 232, las superficies de corte primera y segunda 236, 244 también se giran y se mueven hacia abajo dentro del depósito 208 hacia la muestra de tejido que está alojada dentro del compartimento 228. La primera superficie de corte 236 hace contacto con y corta la muestra de tejido en una o más porciones más pequeñas. Esas porciones de tejido más pequeñas se hacen pasar posteriormente a través de las aperturas de la primera rejilla trituradora 240, se cortan nuevamente en porciones aún más pequeñas mediante la segunda superficie de corte 244, y finalmente se hacen pasar a través de las aperturas de la segunda rejilla trituradora 248. Las superficies de corte primera y segunda 236, 244 se giran y se mueven hacia abajo dentro del depósito 208 hasta que sustancialmente toda la muestra de tejido (o al menos una cantidad suficiente de la muestra de tejido para una aplicación determinada) se tritura y pasa a través de la segunda rejilla 248. Al pasar a través de la segunda rejilla 248, la muestra de tejido triturado se recoge y se aloja dentro de un recipiente 252 del depósito 208. Aunque no se representa como tal en las figuras 6A a 6C, la porción superior del depósito 208 puede de hecho taparse y la porción interior del depósito 208 puede esterilizarse, de manera que el recipiente 252 sea un recipiente estéril sellado 252.

Como entenderá un experto en la materia, y como se ha descrito anteriormente, el compartimento 228 del depósito 208 está situado, como se muestra en la figura 6B, debajo de las superficies de corte primera y segunda 236, 244 y de las rejillas de trituradora primera y segunda 240, 248, mientras que el recipiente estéril sellado 252 del depósito 208 está situado encima de las superficies de corte primera y segunda 236, 244 y de las rejillas de trituradora primera y segunda 240, 248. Como tal, en las figuras 6A a 6C, los tamaños del compartimento 228 y del recipiente estéril sellado 252 varían a medida que las superficies de corte primera y segunda 236, 244 se giran hacia abajo (o hacia arriba).

Como también entenderá un experto en la materia, la representación de la herramienta de trituración tisular 200 en las figuras 6A-6C no es limitante. De hecho, se contemplan variaciones, modificaciones y otras implementaciones. Por ejemplo, pueden emplearse menos o más de dos superficies de corte 236, 244 y/o de dos rejillas trituradoras 240,

248. Como otro ejemplo, la manivela de árbol 232 y el mango 212 pueden acoplarse de tal manera que el mango 212 pueda girar dentro de un plano vertical en lugar de un plano horizontal (como se ilustra).

La figura 7 representa una herramienta de trituración tisular 300, cuyo principio de funcionamiento es similar al de la herramienta de trituración tisular 200 representada en las figuras 6A-6C. Como antes, la herramienta de trituración tisular 300 incluye una base 304, un depósito 308 y un mango 312. Como se muestra, una porción superior del depósito 308 está acoplada a una porción inferior del mismo a través del uso de tornillos 315 y de tuercas de mariposa 317. La herramienta de trituración tisular 300 también incluye una ventosa 320 para proporcionar la estabilidad descrita anteriormente a la herramienta 300 durante el funcionamiento. También se ilustra el recipiente 352 del depósito 308 dentro del que se recoge la muestra de tejido triturado después de pasar, por ejemplo, a través de una segunda rejilla 348. Como antes, la porción superior del depósito 308 puede taparse y la porción interior del depósito 308 puede esterilizarse, de modo que el recipiente 352 sea un recipiente estéril sellado 352.

Método de aislamiento y recogida de células

La invención también proporciona un método para un procesamiento eficaz y estéril de tejido para aislar y recoger células diana. La figura 8 proporciona un resumen de las etapas de procedimiento para aislar y recoger células. En general, una muestra de tejido puede triturarse inicialmente usando cualquiera de las herramientas de trituración tisular descritas anteriormente, impulsando la muestra de tejido a través de la superficie de corte de la herramienta y hacia un recipiente estéril sellado. También se describen métodos opcionales para seguir digiriendo la muestra de tejido exponiéndola a un químico o a una enzima. Por ejemplo, el tejido triturado puede digerirse inyectando una enzima en el recipiente, de manera que la enzima digiera el tejido triturado. La enzima puede ser una proteasa, como colagenasa, hialuronidasa o dispasa, por separado o en combinación. Estas etapas se incorporan adicional u opcionalmente en un método para separar una muestra de tejido triturado y/o digerido enzimáticamente de cualquier fragmento más grande ("tejido no digerido", como se ha descrito anteriormente), por ejemplo, decantación, aspiración, sedimentación o, preferentemente, filtrado. En una realización, el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente, que puede ser viscoso, se lava o se diluye antes de una etapa de separación. La separación de las células diana del tejido triturado y/o digerido enzimáticamente puede lograrse mediante la sedimentación de las células de una mezcla que contiene el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente. Aunque puede usarse la sedimentación por gravedad, el proceso de sedimentación puede acelerarse, por ejemplo, mediante centrifugación. Además, y alternativamente, las células diana se mueven a un recipiente estéril para criopresevarlas para su uso posterior.

En una realización, los métodos para separar una muestra de tejido triturado y/o digerido enzimáticamente del tejido no digerido pueden incluir dos o más etapas de filtración como se representa en la figura 9. Por ejemplo, la muestra de tejido triturado y/o digerido enzimáticamente puede someterse a múltiples etapas de filtración usando filtros de diferentes tamaños. La muestra de tejido triturado y/o digerido enzimáticamente se somete inicialmente a una primera etapa de filtración usando un filtro de poros grandes de por ejemplo, aproximadamente 500 micrómetros, aproximadamente 250 micrómetros, aproximadamente 150 micrómetros o aproximadamente 100 micrómetros, para eliminar tejido grueso no digerido. Adicionalmente, puede llevarse a cabo una segunda etapa de filtración para filtrar el eluato de la primera etapa de filtración usando un filtro de poros pequeños de por ejemplo, aproximadamente 70 micrómetros o aproximadamente 40 micrómetros, para eliminar contaminantes adicionales como las fibras de colágeno. Debido a que el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente generalmente es viscoso, el tejido puede lavarse o diluirse con una solución estéril apropiada (tal como una solución salina tamponada) en cualquier fase del proceso. Por ejemplo, después de que el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente se haya separado del tejido no digerido después de la primera etapa de filtración, pueden realizarse lavados adicionales para limpiar adicionalmente el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente antes de la segunda etapa de filtración. Después de varias rondas de filtración, las células diana sustancialmente libres de muestra de tejido pueden recogerse por sedimentación.

La figura 10A representa un procedimiento a modo de ejemplo para recoger y aislar células deseadas de una muestra de tejido. La muestra de tejido puede colocarse inicialmente dentro de un compartimento, donde puede triturarse, diseccionarse o separarse en porciones más pequeñas. Una ventaja de triturar la muestra de tejido antes de cualquier digestión enzimática es que aumenta el área superficial total de la muestra de tejido sobre la que puede actuar la enzima. El compartimento puede ajustarse y unirse a un puerto (por ejemplo, una apertura) de un recipiente (por ejemplo, una bolsa de digestión) de manera que una muestra de tejido introducida en el compartimento pueda pasar directamente al recipiente. El compartimento puede estar unido o no de forma extraíble al recipiente.

El recipiente define un espacio interior estéril y sellado que contiene la muestra de tejido triturado y los fluidos. El recipiente puede incluir puertos sellados para introducir o dispensar materiales y fluidos en o desde el recipiente. Por ejemplo, el recipiente puede incluir uno o más puertos de inyección para introducir fluidos y uno o más puertos de extracción para dispensar o aspirar fluidos y materiales del recipiente. Además, en una realización alternativa, cada uno de los puertos de inyección y de los puertos de extracción puede configurarse de manera que los fluidos y los materiales solo puedan moverse en una dirección hacia y desde el recipiente. Además, los puertos pueden disponerse en un extremo opuesto del recipiente desde el compartimento, aunque los puertos también pueden disponerse a lo largo de cualquier porción del perímetro del recipiente. En una realización, los puertos no están asegurados de manera extraíble al recipiente. Adicional o alternativamente, jeringas, orificios de ventilación, orificios de ventilación tapados u otros dispositivos que se encajan con una conexión luer pueden unirse a los puertos. Todos los puertos pueden

limpiarse con una torunda para mantener la esterilidad.

Posteriormente, el tejido triturado puede ser digerido opcionalmente, por ejemplo, exponiéndolo a un químico o a una enzima. En una realización, el tejido triturado puede ser digerido por una enzima, por ejemplo, una proteasa, tal como una colagenasa, una hialuronidasa o una dispasa, por separado o en combinación. La enzima puede introducirse directamente en el recipiente, de modo que la enzima digiera el tejido triturado. Por ejemplo, una jeringa, o cualquier otro dispositivo que pueda alojar fluidos, materiales o aire, puede conectarse al recipiente (por ejemplo, a través de una conexión luer) y usarse para dispensar, por ejemplo, una proteasa en el recipiente para digerir la muestra de tejido triturado. Para mejorar la digestión de la muestra de tejido triturado, el recipiente puede invertirse para hacer circular la enzima sobre el recipiente. Dependiendo de la velocidad de descomposición enzimática de la muestra de tejido triturado, el recipiente puede dejarse en reposo y la muestra de tejido triturado puede incubarse con la enzima a 37 °C durante un período de tiempo, por ejemplo, durante aproximadamente una a tres horas, aunque se contempla más o menos tiempo, para digerir la muestra de tejido triturado. Adicional o alternativamente, para ayudar en el proceso de incubación, el recipiente puede de forma opcional mezclarse periódicamente con un agitador orbital o moverse a través de una serie de rodillos o de otro dispositivo de compresión para ayudar a la descomposición de la muestra de tejido triturado dentro del recipiente. En un ejemplo en el que la muestra de tejido es de aproximadamente 10 ml, un usuario puede inyectar aproximadamente 10 ml de enzima en el recipiente, aunque se contempla más o menos enzima. Una vez que se digiere la muestra de tejido triturado, se obtiene una muestra de tejido digerido de aproximadamente 20-30 ml.

Antes de separar las células del tejido triturado y/o digerido enzimáticamente, cualquier fragmento restante de tejido no digerido se elimina opcionalmente para facilitar la posterior purificación de las células. Dependiendo de su tamaño, el tejido no digerido puede eliminarse, por ejemplo, mediante extracción física, decantación, aspiración, sedimentación o, preferentemente, filtrado. Opcionalmente, el tejido no digerido que se elimina puede almacenarse y/o usarse para otros fines, tal como fuente de cultivo para la expansión de células madre.

Las figuras 10A-10D ilustran varias formas en las que la separación se logra por filtración. Específicamente, las figuras 10A-10D representan un paso de fluido que conecta el recipiente que contiene la muestra de tejido digerido a una unidad de filtro que puede unirse de manera extraíble al recipiente. La unidad de filtro puede usar un solo filtro, o una pluralidad de filtros, opcionalmente de tamaño decreciente. Alternativamente, puede ajustarse y disponerse un filtro en el recipiente de tal manera que el recipiente esté dividido en dos subespacios. El filtro puede colocarse de forma simétrica o asimétrica dentro del recipiente. Adicional o alternativamente, el filtro puede ajustarse dentro de un puerto, por ejemplo, un puerto de extracción. El tamaño del filtro puede ser de aproximadamente 500 micrómetros, aproximadamente 250 micrómetros, aproximadamente 150 micrómetros, aproximadamente 100 micrómetros, aproximadamente 70 micrómetros, aproximadamente 40 micrómetros o cualquier intervalo de estos, dependiendo de la aplicación. La muestra de tejido digerido, que puede ser viscosa, puede diluirse antes de filtrarla, de modo que la muestra de tejido resultante pueda moverse más fácilmente a través del filtro a recipientes o componentes aguas abajo para su posterior procesamiento. Ejemplos de soluciones diluyentes incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), albúmina de suero humano al 5 %, solución salina, heta-almidón y plasma fresco (por ejemplo, plasma autólogo). En una realización se usa una jeringa o cualquier otro dispositivo que pueda alojar fluidos, para dispensar una solución diluyente en el recipiente a través de un puerto de inyección. En un ejemplo en el que la muestra de tejido digerido es de aproximadamente 20-30 ml, un usuario puede inyectar aproximadamente 250 ml de una solución diluyente en el recipiente, aunque se contempla más o menos solución. Como resultado, el recipiente contiene aproximadamente 250-300 ml de una muestra de tejido digerido y diluido. Después de la filtración, el eluato puede ser propulsado, por ejemplo, por vacío, succión o gravedad, en un segundo recipiente estéril (por ejemplo, una bolsa de lavado/centrifugación) a través de un paso de fluido preferentemente regulado por abrazaderas de línea (por ejemplo, abrazaderas de línea de mariposa).

El aislamiento de las células del tejido diluido, triturado y/o digerido enzimáticamente puede lograrse mediante diversos mecanismos. En un ejemplo, las células diana se aíslan del tejido diluido, triturado y/o digerido enzimáticamente por sedimentación. Aunque puede usarse la sedimentación por gravedad, el proceso de sedimentación puede acelerarse, por ejemplo, mediante centrifugación. Pueden usarse cubetas de centrifuga personalizadas, insertos y contrapesos para asegurar una centrifugación adecuada del sistema.

La sedimentación separa las células diana de la muestra de tejido diluido, triturado y/o digerido enzimáticamente. Para facilitar la recogida de células, los sobrenadantes sustancialmente libres de células se eliminan opcionalmente a través de un puerto de salida y de un paso de fluido preferentemente regulado por abrazaderas de línea. El sobrenadante puede eliminarse, por ejemplo, mediante decantación o aspiración. En un ejemplo en el que el segundo recipiente estéril es una bolsa compresible, el sobrenadante puede decantarse presionando físicamente la bolsa. Alternativamente, el sobrenadante puede eliminarse, por ejemplo, mediante vacío, succión o gravedad. Opcionalmente, el sobrenadante puede eliminarse en un recipiente de desechos que está conectado al segundo recipiente estéril a través de un puerto de salida y de un paso de fluido regulado por abrazaderas de línea. En una realización, el sobrenadante eliminado puede almacenarse y/o usarse para otros fines tales como el mantenimiento de células (en cultivo).

Para recoger las células diana, puede añadirse un pequeño volumen de una solución diluyente (por ejemplo, 20 ml de

plasma autólogo) para volver a poner en suspensión el sedimento celular que puede acumularse en la parte inferior del segundo recipiente estéril. Como se muestra en la realización representada en la figura 10A, el segundo recipiente estéril puede tener una parte inferior que se estrecha en un ángulo suficiente para facilitar el movimiento de las células diana en un paso de fluido situado en la parte inferior del recipiente, y opcionalmente en un recipiente de transferencia (por ejemplo, una bolsa de transferencia). Alternativamente, como se representa en la figura 10B, las células diana pueden moverse a un paso de fluido situado en el lado del recipiente, y opcionalmente a un recipiente de transferencia. El movimiento de las células fuera del segundo recipiente estéril y hacia el paso de fluido y, opcionalmente, hacia un recipiente de transferencia puede facilitarse mediante vacío o succión y puede regularse mediante abrazaderas de línea.

Si es necesario, las células diana purificadas pueden usarse inmediatamente. Normalmente, sin embargo, las células se criopreservan para su uso posterior. Para lograr un almacenamiento a largo plazo, las células pueden transferirse desde el recipiente de transferencia opcional a un recipiente estéril sellable susceptible de congelación (por ejemplo, una bolsa criogénica). Alternativamente, las células pueden recogerse directamente del segundo recipiente estéril en un recipiente congelable para su uso posterior. Se añaden crioprotectores para ayudar en el almacenamiento y la preservación de las células diana, y pueden incluir, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), albúmina y/o dextrano, por separado o en combinación. Los crioprotectores pueden añadirse a las células dentro del segundo recipiente estéril después de la sedimentación. Alternativamente, los crioprotectores pueden añadirse y mezclarse con las células dentro del recipiente de transferencia opcional o dentro del recipiente congelable para su almacenamiento a largo plazo y su uso posterior.

Los métodos para separar el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente del tejido no digerido pueden incluir dos o más etapas de filtración como se representa en las figuras 10C-10D. Por ejemplo, el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente puede someterse a una primera etapa de filtración para eliminar el tejido grueso no digerido. Debido a que el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente generalmente es viscoso, el tejido puede lavarse o diluirse con una solución estéril apropiada en cualquier fase del proceso. Por ejemplo, después de que el tejido triturado y/o digerido enzimáticamente se haya separado del tejido no digerido tras la primera etapa de filtración, pueden realizarse lavados adicionales para limpiar más el tejido antes de una segunda etapa de filtración. En una realización, la segunda etapa de filtración puede utilizar un filtro de menor tamaño para eliminar contaminantes tales como fibras de colágeno del tejido triturado y/o digerido enzimáticamente. Tras la segunda etapa de filtración, las células diana pueden recogerse por sedimentación y moverse a una bolsa de transferencia opcional a través de un paso de fluido situado en la parte inferior del recipiente (figura 10C) o en el lado del recipiente (figura 10D). Alternativamente, las células pueden recogerse directamente en una bolsa criogénica estéril para su almacenamiento a largo plazo y su uso posterior.

En las figuras 10E-10G se representan procesos a modo de ejemplo adicionales para separar muestras de tejido triturado. En cada uno de estos procesos, una muestra de tejido se coloca en una trituradora, tal como la trituradora de la figura 7. En funcionamiento, la trituradora fuerza la muestra de tejido a través de una o más superficies de corte y deposita el tejido finamente triturado en el otro lado de la(s) superficie(s) de corte. Se proporciona una bolsa de solución salina para permitir lavar el tejido de la trituradora; normalmente, pueden usarse hasta 500 ml de solución salina para este fin. Cuando se lava de la trituradora, el tejido triturado puede fluir a una bolsa de digestión opcional (como se muestra), en la que el tejido triturado puede digerirse enzimáticamente (como se ha descrito con referencia a las figuras 10A-10D) antes de continuar con el procesamiento. La bolsa de digestión opcional está en comunicación fluida con una bolsa de dilución. Alternativamente, si el triturado mecánico ha obviado la necesidad de cualquier digestión enzimática, el tejido triturado puede fluir directamente a una bolsa de dilución. El tejido triturado de forma mecánica (esté o no sujeto a digestión enzimática) puede ser viscoso. La bolsa de dilución puede manipularse mecánicamente para estimular la mezcla del tejido y la solución salina. La bolsa de dilución también está equipada con un puerto de inyección opcional, que permite la inyección de solución salina adicional en la bolsa de dilución según sea necesario.

La suspensión de tejido se filtra a continuación, una vez que la viscosidad se ha reducido lo suficiente. Como se muestra en las figuras 10E-G, la suspensión pasa de la bolsa de dilución a una bolsa de filtro que tiene al menos un filtro en la bolsa. La figura 10E representa una realización con un único filtro en la bolsa que retiene partículas mayores de aproximadamente 40-70 μm . La figura 10F representa una realización con un único filtro en la bolsa que retiene partículas mayores de aproximadamente 150-250 μm . En la figura 10F, el filtrado del filtro en la bolsa luego pasa a través de una segunda unidad de filtro en línea que retiene partículas mayores de aproximadamente 40-70 μm . La figura 10G representa una realización en la que la bolsa de filtro contiene dos filtros en la bolsa en sucesión, teniendo cada uno de ellos un área superficial de al menos 300 cm^2 ; el primer filtro retiene partículas mayores de aproximadamente 500 μm y el segundo filtro retiene partículas mayores de aproximadamente 100 μm . En cada una de las figuras 10E-G, la bolsa de filtro incluye un puerto que permite la eliminación del retenido del primer filtro. Este retenido puede usarse opcionalmente como un explanto de tejido para el cultivo de células.

Los filtrados en las figuras 10E-G pasan a una bolsa de centrifugación como las que se representan en las figuras 10A-D. Las células se separan de la suspensión por sedimentación (por ejemplo, por centrifugación) y se concentran en la porción inferior de la bolsa, o en un paso de fluido conectado a la porción inferior de la bolsa. El sobrenadante puede eliminarse (por ejemplo, mediante decantación, aspiración, vacío, succión o comprimiendo la bolsa) a través de un

tubo opcionalmente conectado a un recipiente de desechos. El sobrenadante puede usarse para otros fines, como mantener las células en cultivo.

5 Para recoger las células diana, puede añadirse un pequeño volumen de una solución diluyente (por ejemplo, 20 ml de plasma autólogo) para volver a poner en suspensión las células sedimentadas. Como se muestra en las figuras 10E-G, las células que se han vuelto a poner en suspensión pueden pasar de la bolsa de centrifugación a una bolsa de transferencia, opcionalmente después de pasar a través de una segunda bolsa de filtro, tal como una segunda bolsa de filtro que contiene un filtro que tiene un área superficial de al menos 100 cm² y que retiene partículas mayores de aproximadamente 40 µm, como se muestra en la figura 10G. Las células pueden transferirse a una bolsa criogénica y
10 pueden añadirse uno o más crioprotectores, como DMSO, albúmina y/o dextrano, como se ha descrito anteriormente para las figuras 10A-D.

15 Los métodos descritos en el presente documento son eficaces para purificar células de varios tejidos sólidos. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden separar células, como las células madre, del tejido graso o del tejido postnatal, como tejido del cordón umbilical o placentario o, más específicamente, un tejido que comprende la gelatina de Wharton. Las células madre de la gelatina de Wharton purificadas pueden usarse para tratar o regenerar cualquiera de varios tejidos, como hueso, cartílago, grasa o músculo. Estas células también pueden facilitar el injerto hematopoyético y tienen el potencial de regular y suprimir las respuestas inmunes en un huésped.

20 Además de las células purificadas, los métodos descritos en el presente documento también producen productos útiles adicionales. Por ejemplo, cuando las células se separan del tejido triturado y/o digerido enzimáticamente, el tejido restante, empobrecido de células, es una solución estéril rica que puede usarse para mantener las células (en cultivo, por ejemplo). Además, cualquier fragmento de tejido no digerido que quede después de un proceso de digestión también puede ser útil. Por ejemplo, el tejido del cordón umbilical no digerido puede usarse como fuente de cultivo
25 para la expansión de las células madre mesenquimales.

REIVINDICACIONES

1. Una herramienta de trituración tisular (10) que comprende:
 - 5 un compartimento (12) para una muestra de tejido; un miembro sólido (100) accionable mediante un mango (114) y que puede moverse dentro del compartimento (12); una superficie de corte giratoria (108) en un extremo del compartimento; y un recipiente estéril, sellado (14), en la que el compartimento (12) está dispuesto para colocar la muestra de tejido entre el miembro sólido (100) y la superficie de corte giratoria (108) y el accionamiento del mango (114) en una dirección hace que el miembro sólido (100) se mueva solo hacia la superficie de corte giratoria (108), y además, en la que la superficie de corte giratoria (108) separa el compartimento (12) del recipiente estéril sellado (14), de manera que una muestra de tejido que se presiona, a través del miembro sólido (100), para que entre en contacto con y a través de la superficie de corte giratoria (108) se deposita como tejido triturado dentro del recipiente estéril sellado (14).
 - 10
 - 15
2. La herramienta de trituración tisular (10) de la reivindicación 1, en la que la superficie de corte giratoria (108) está dimensionada para triturar la muestra de tejido en fragmentos que tienen una sección transversal media no mayor de cuatro milímetros cuadrados.
- 20 3. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una segunda superficie de corte para reducir la sección transversal media de los fragmentos.
4. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la superficie de corte giratoria (108) comprende un sistema de corte automatizado.
- 25 5. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una rejilla trituradora situada cerca de la superficie de corte giratoria (108).
- 30 6. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una ventosa (320) para estabilizar la herramienta de trituración tisular (10) durante su funcionamiento.
7. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el recipiente estéril sellado (14) comprende al menos un puerto de acceso sellado que permite la introducción estéril de un fluido en el recipiente (14).
- 35 8. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una superficie interior del compartimento (12) está roscada.
- 40 9. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una junta (118) para sellar el compartimento (12).
10. Una herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una porción del compartimento (12) cerca de su extremo tiene una sección transversal sustancialmente constante.
- 45 11. La herramienta de trituración tisular (10) de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el miembro sólido (100) está conformado para encajar en la porción del compartimento (12) y para llenarla.
- 50 12. La herramienta de trituración tisular de la reivindicación 1, que comprende además una manivela de árbol para mover la superficie de corte (108) hacia la muestra de tejido.
13. Un método para triturar una muestra de tejido situada entre el miembro sólido (100) y la superficie de corte giratoria (108) de la herramienta de trituración tisular (10) de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 - 55 presionar la muestra de tejido, mediante el miembro sólido (100), para que entre en contacto con la superficie de corte giratoria (108) de la herramienta de trituración tisular (10), a través de ella.
14. El método de la reivindicación 13, que comprende además diluir la muestra de tejido, filtrar posteriormente la muestra de tejido diluido, sedimentar un filtrado generado por la filtración, volver a poner en suspensión las células sedimentadas y filtrar las células sedimentadas que se han vuelto a poner en suspensión.
- 60 15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, que comprende además inyectar una enzima, en el que preferentemente la enzima es una colagenasa, en el recipiente estéril sellado (14), mediante lo cual la enzima digiere el tejido triturado.
- 65 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la muestra de tejido

comprende células madre de gelatina de Wharton.

5

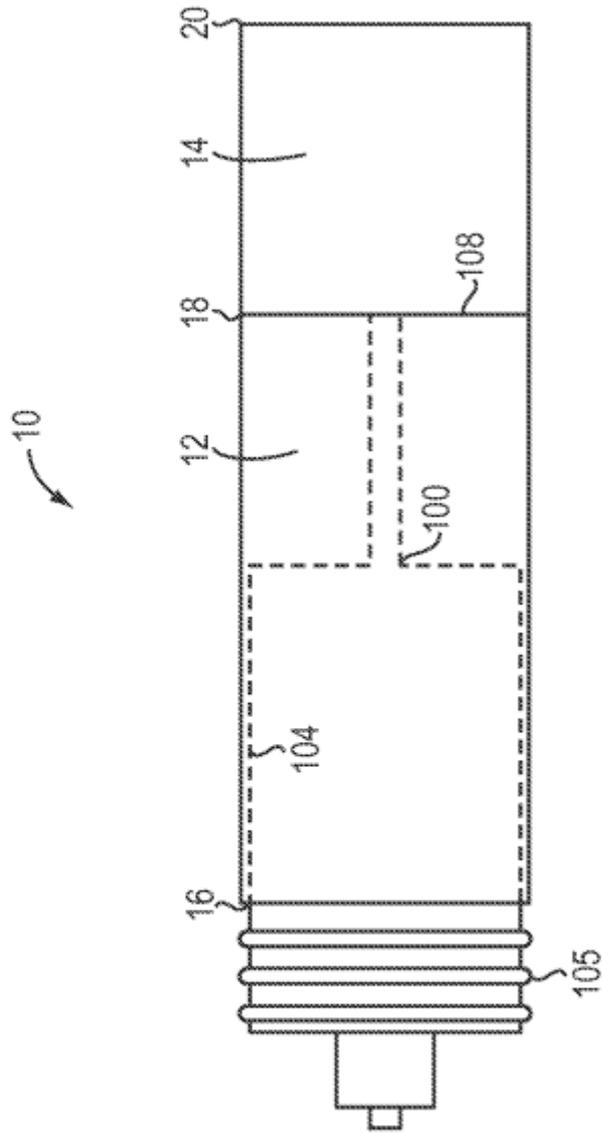


FIG. 1

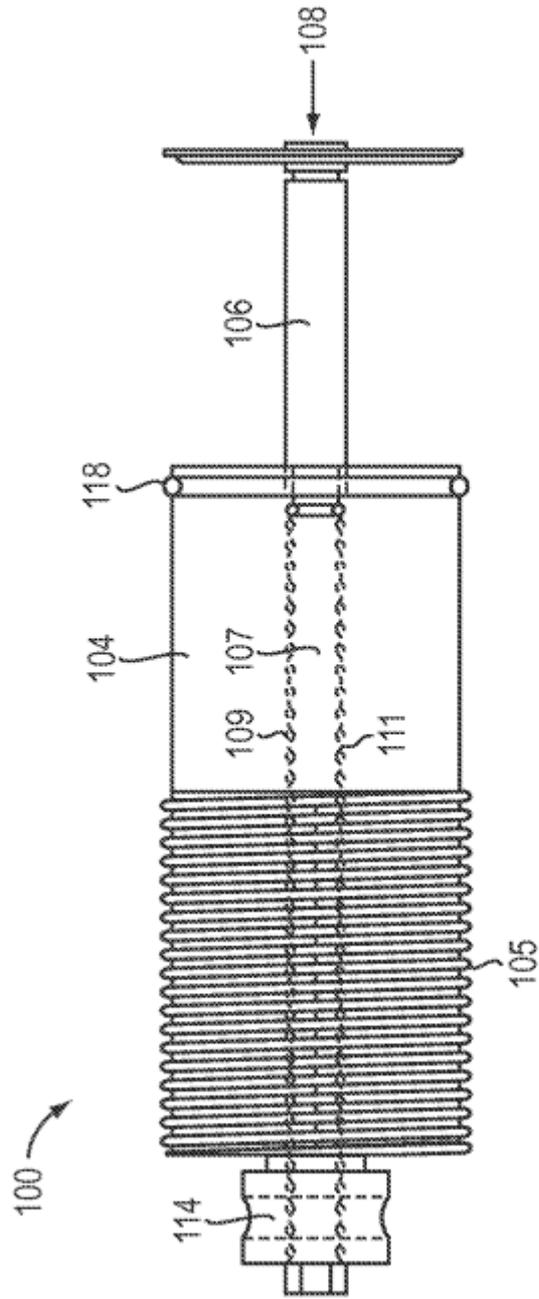


FIG. 2

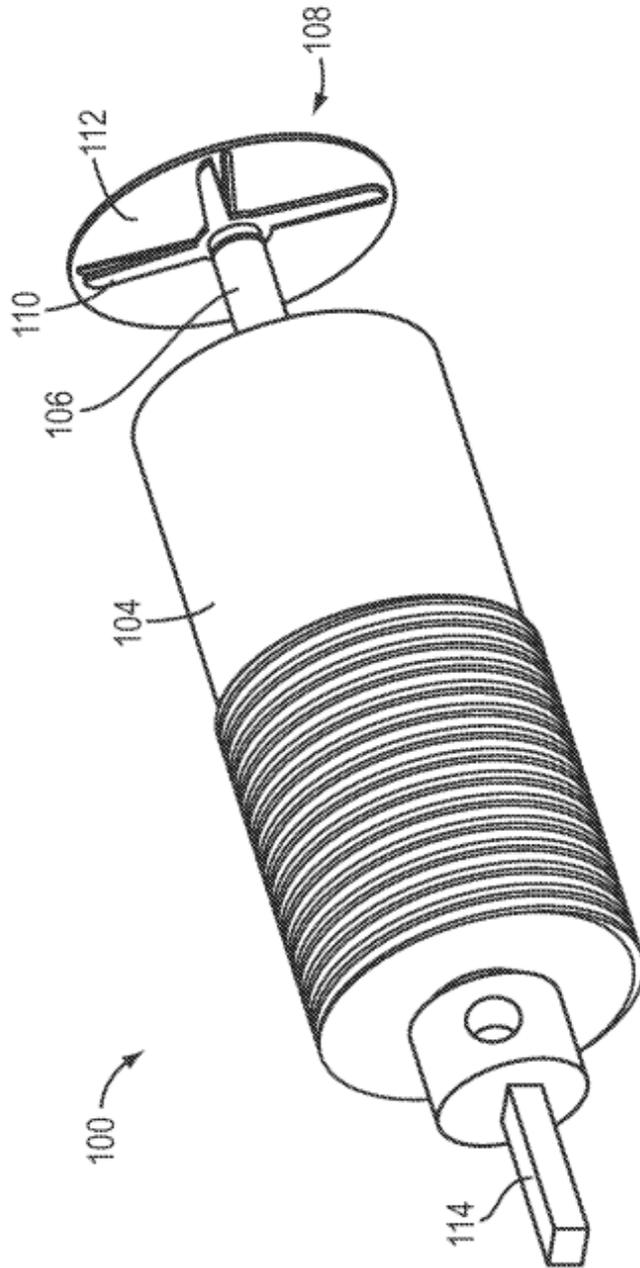


FIG. 3

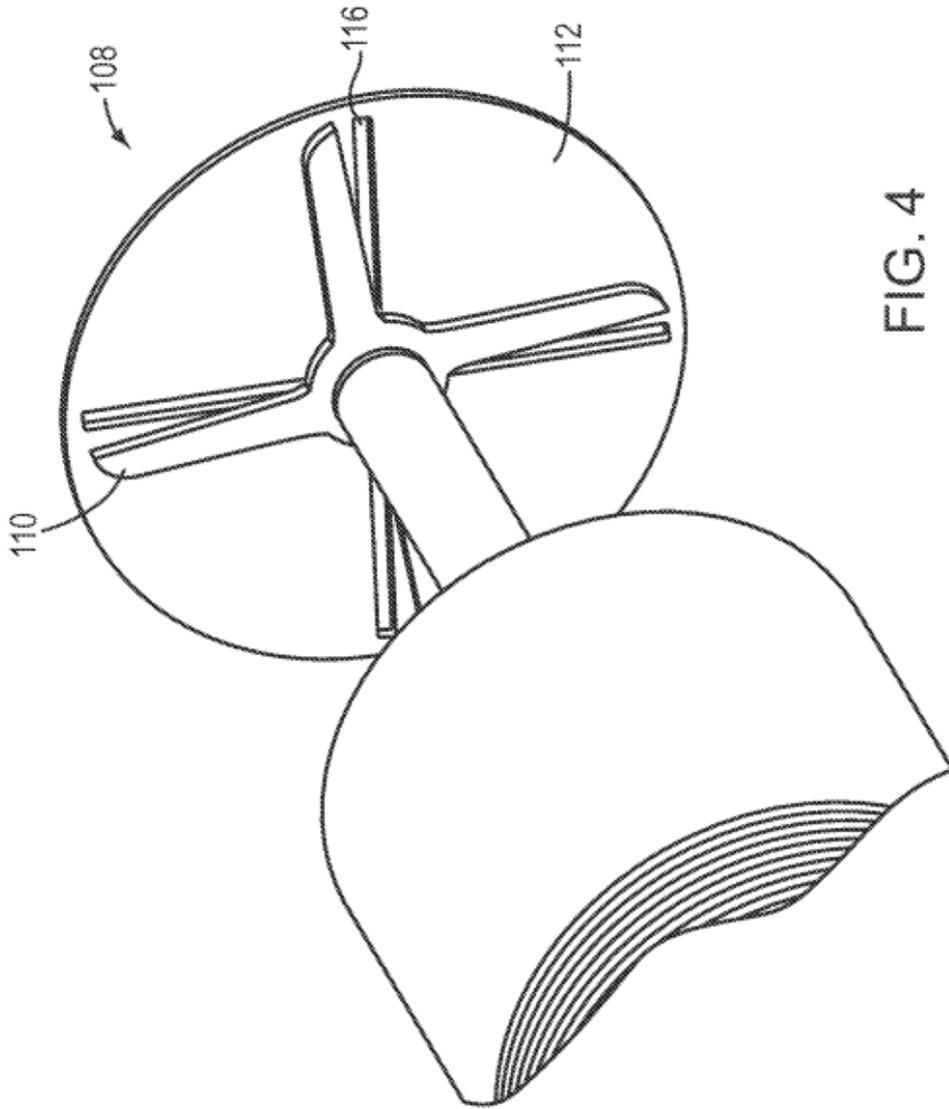


FIG. 4

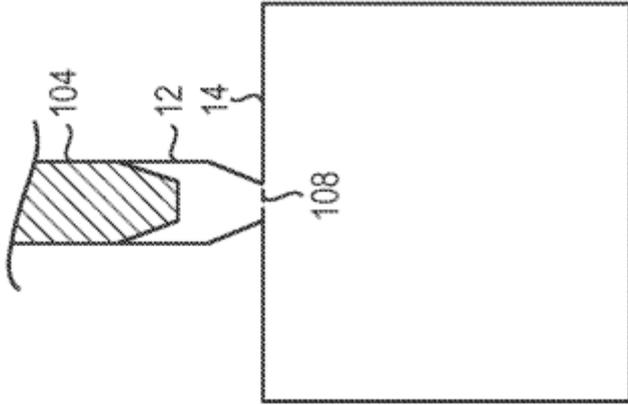


FIG. 5A

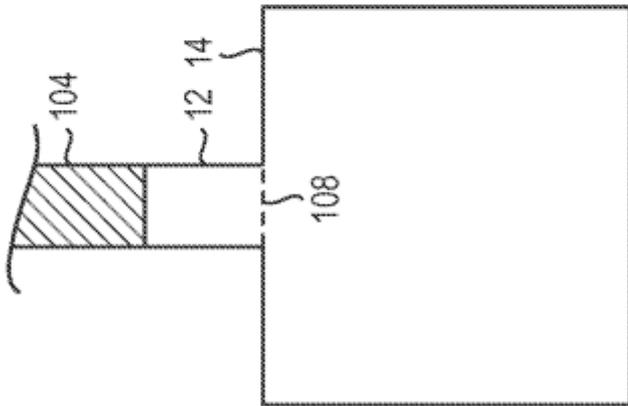


FIG. 5B

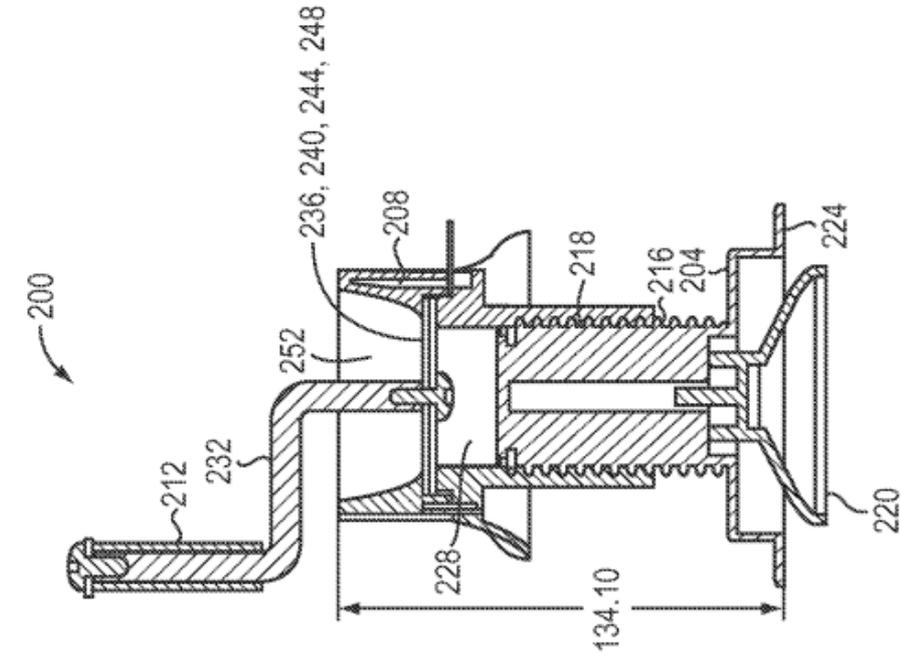


FIG. 6A

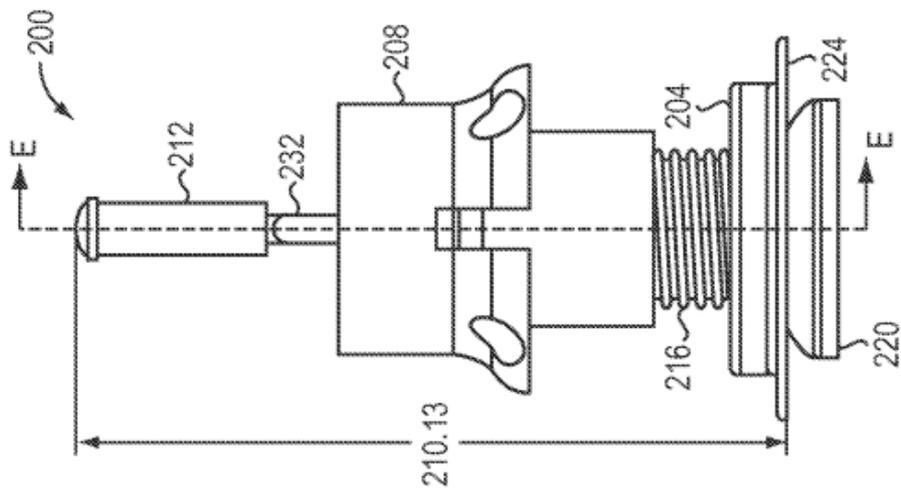


FIG. 6B

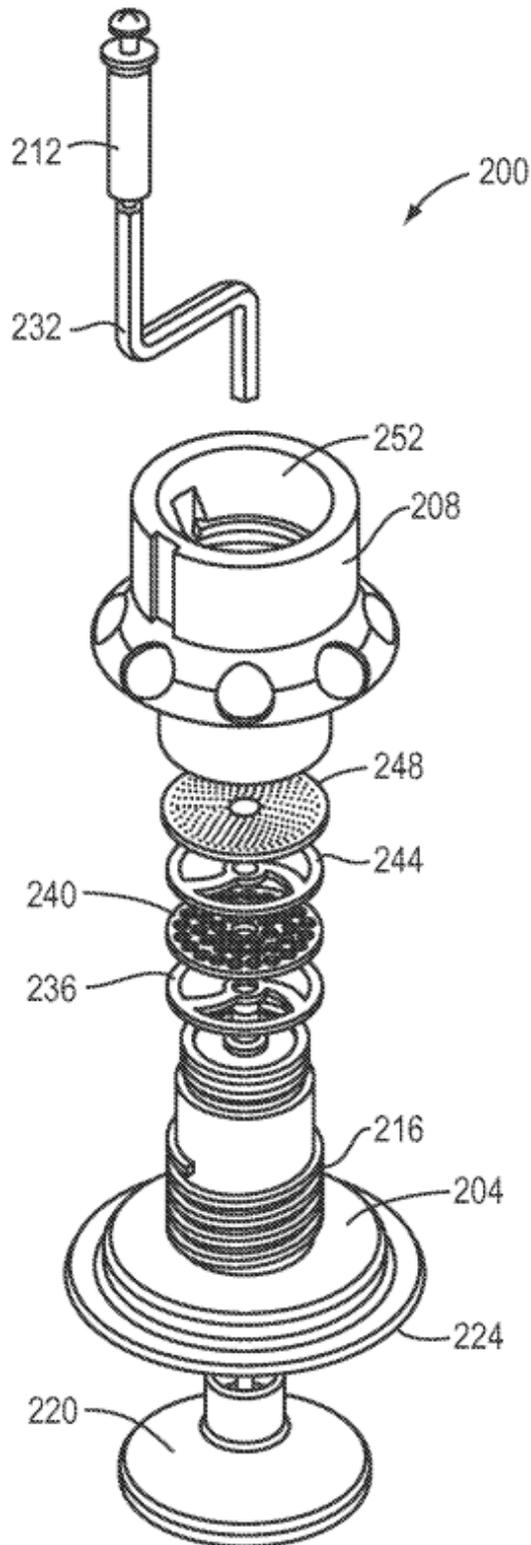


FIG. 6C

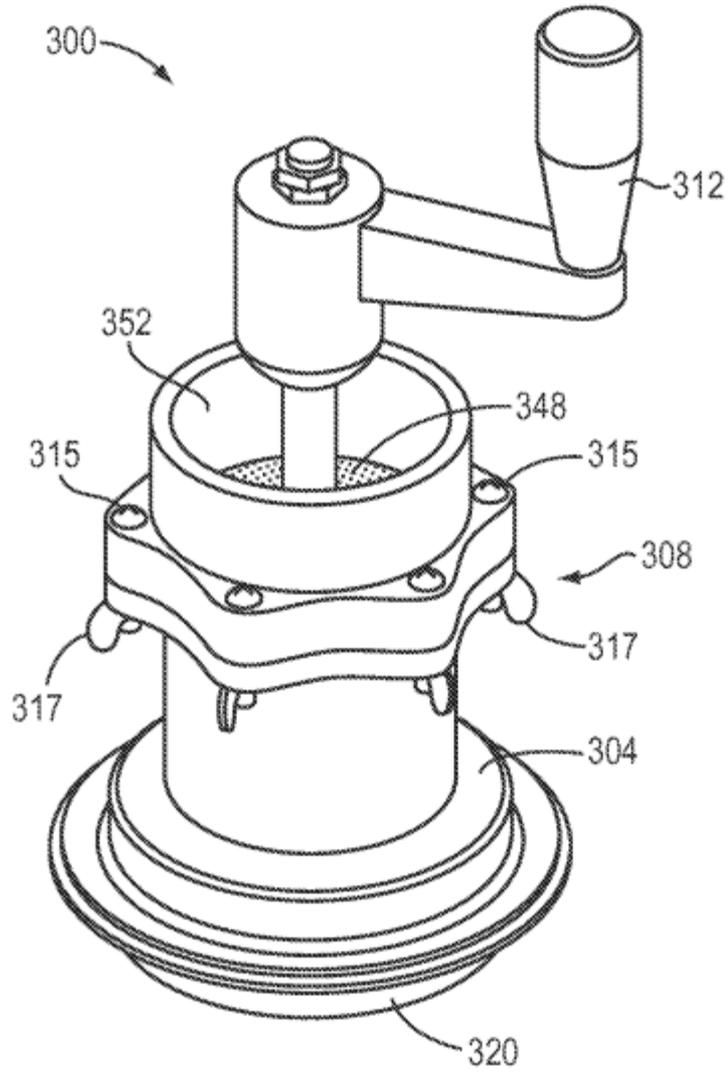


FIG. 7

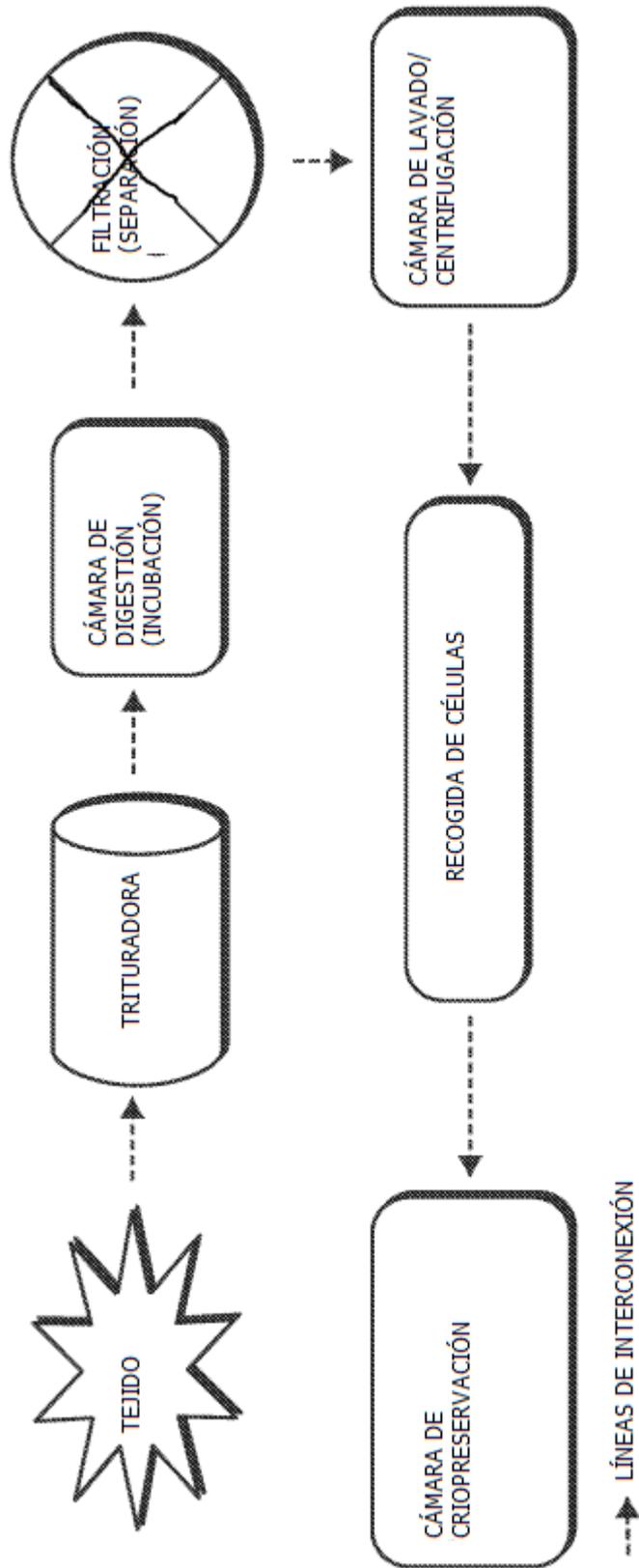


FIG. 8

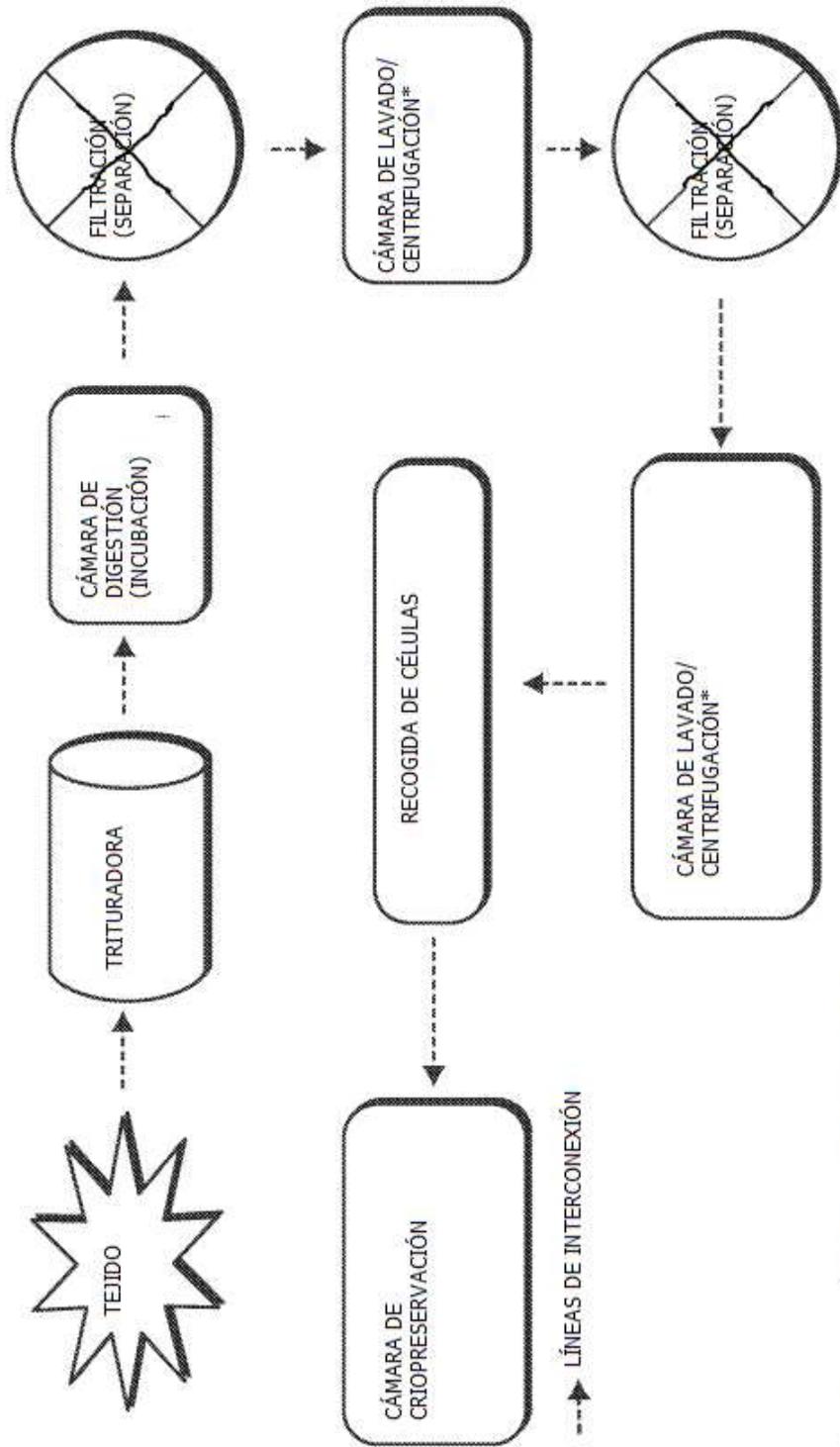


FIG. 9

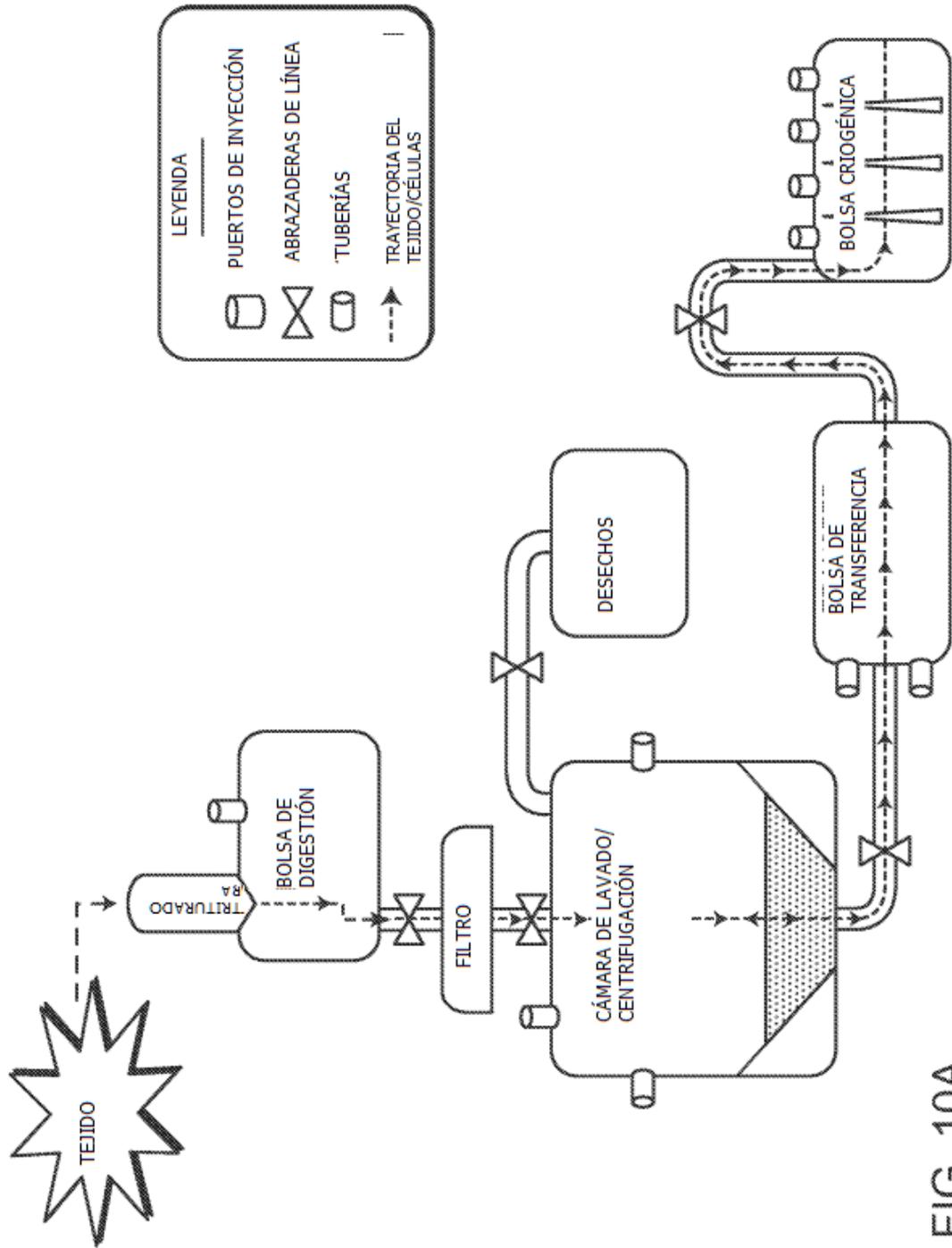
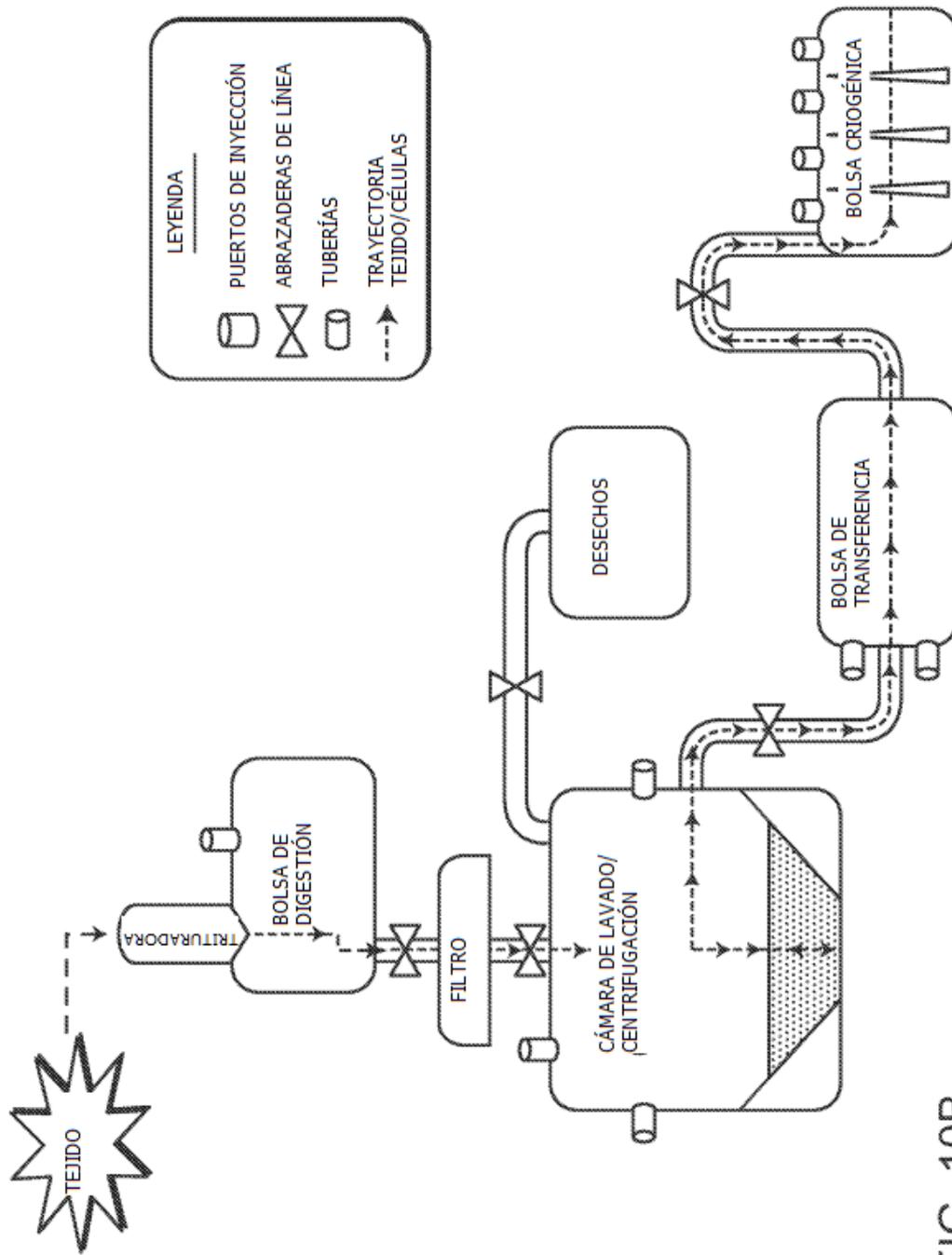


FIG. 10A



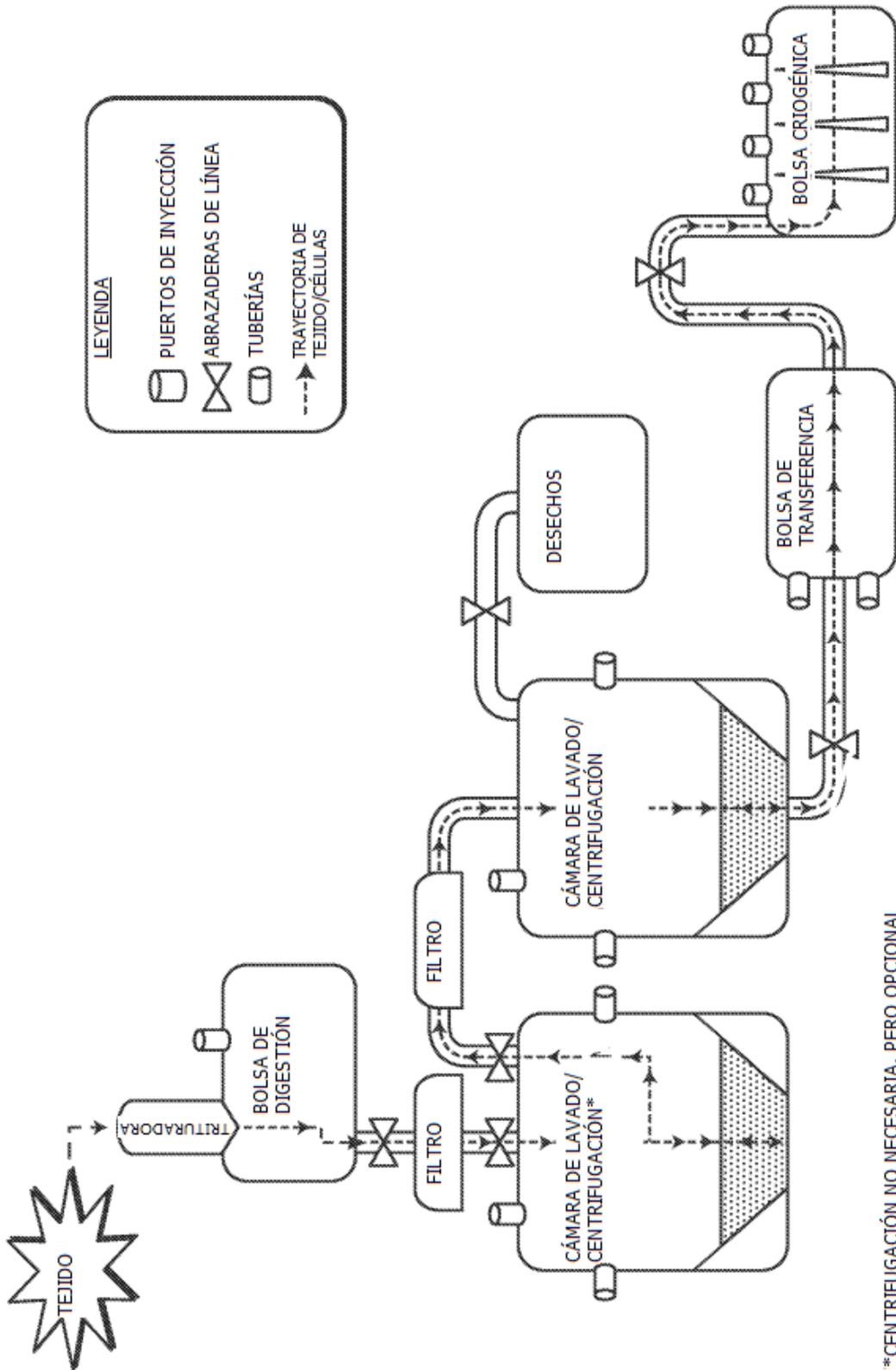


FIG. 10C

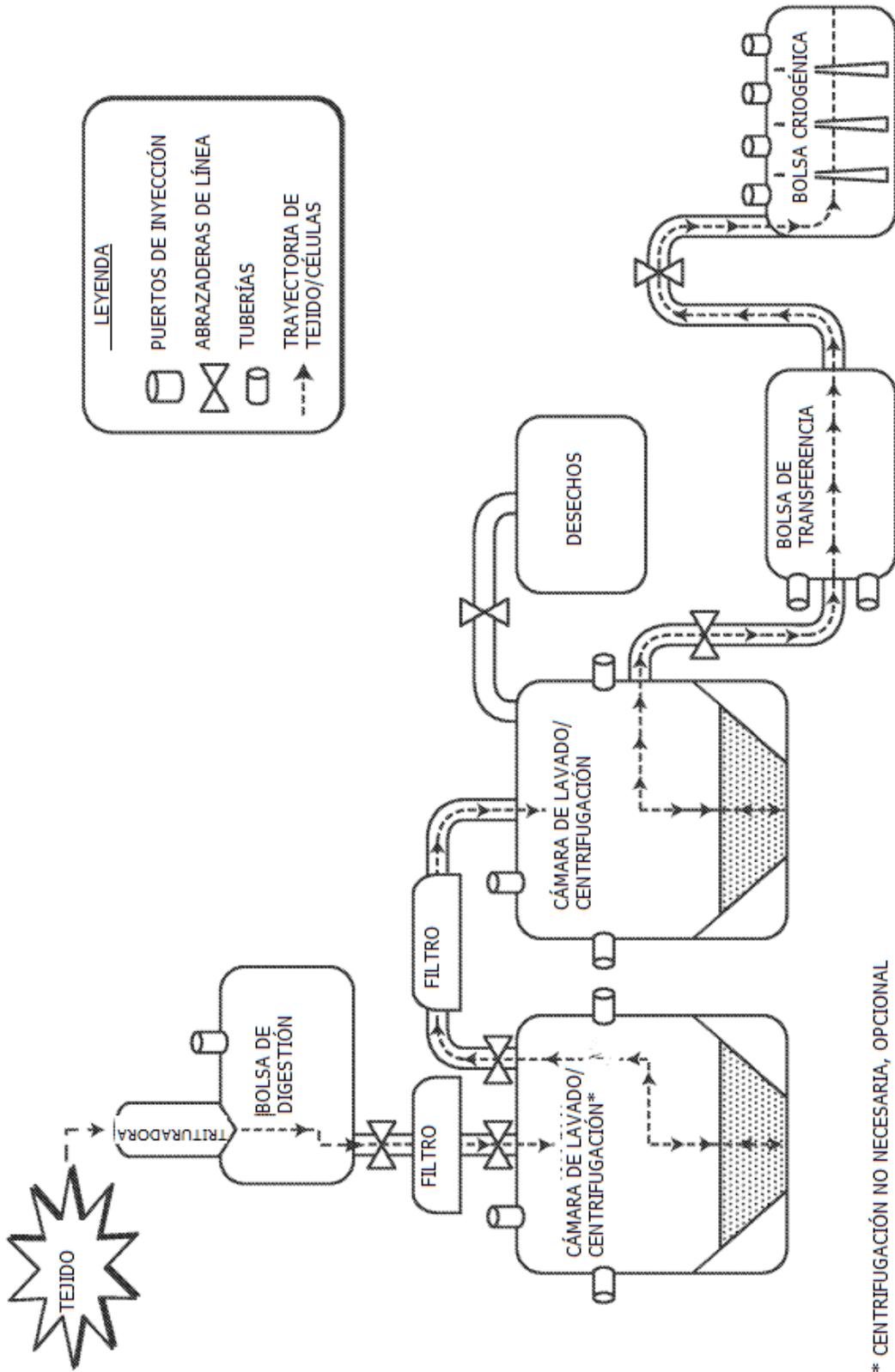


FIG. 10D

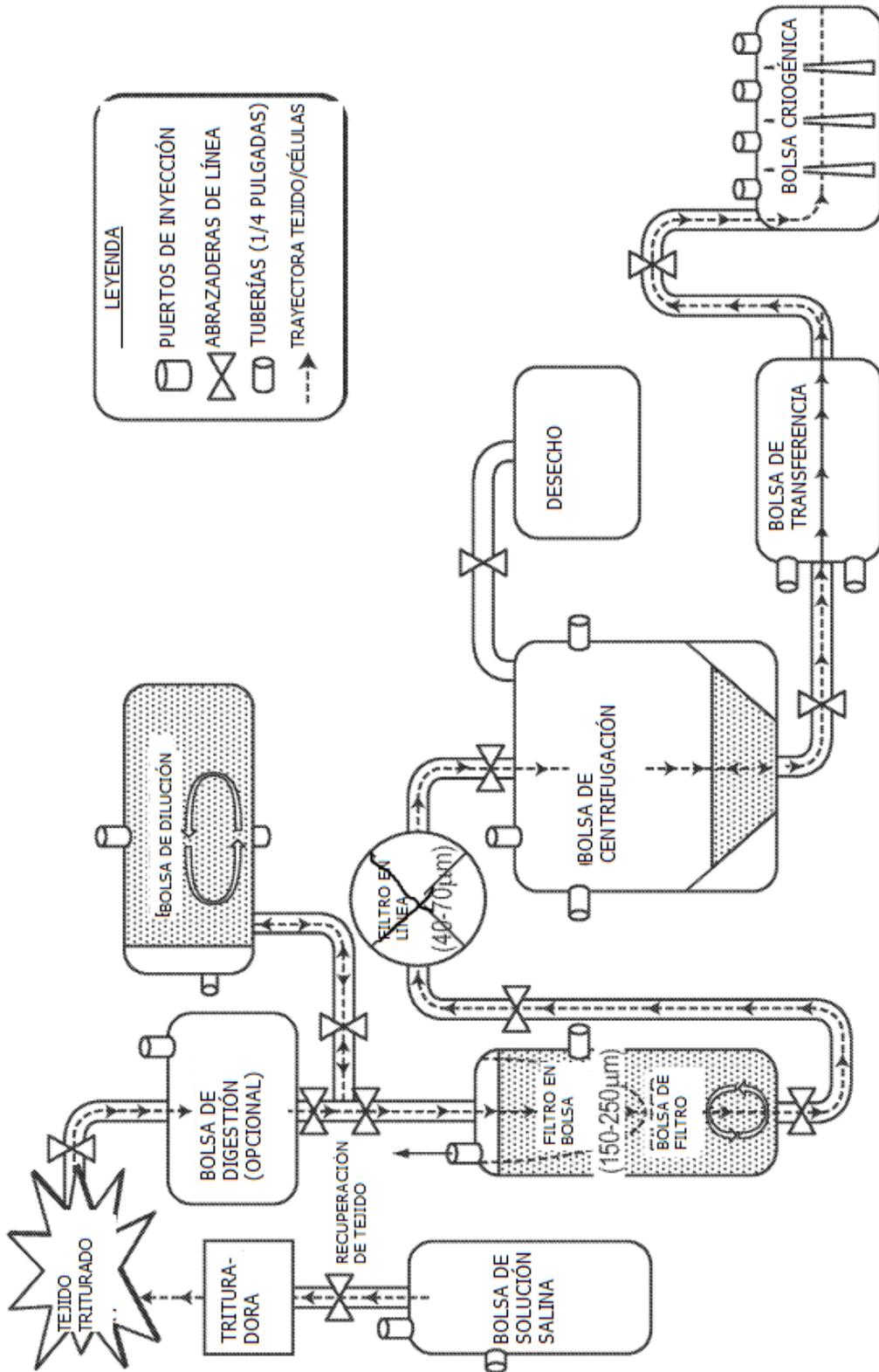


FIG. 10E

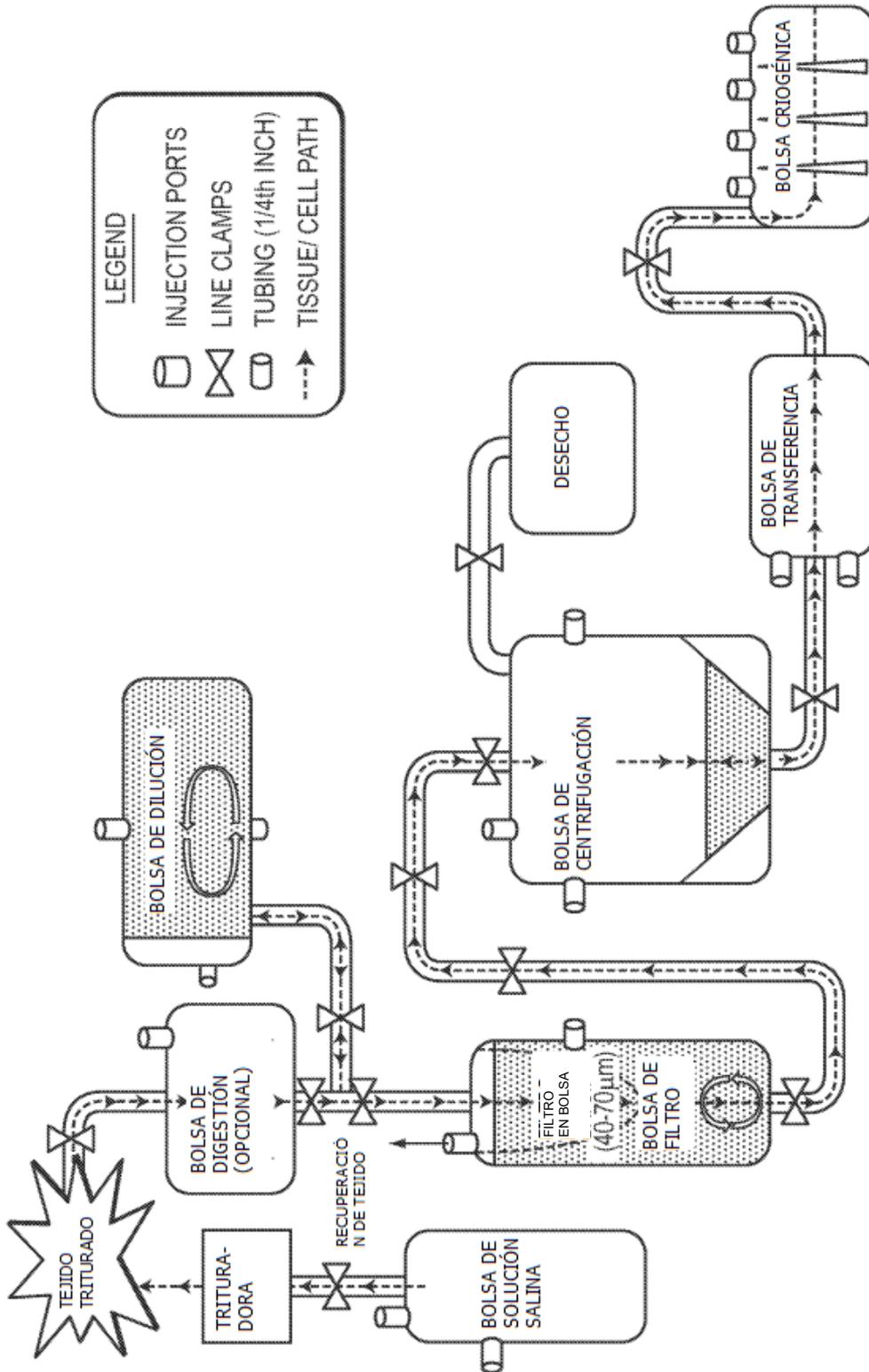


FIG. 10F

