

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 654**

51 Int. Cl.:

B04B 1/02 (2006.01)

B04B 5/04 (2006.01)

B04B 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2013** **E 13166581 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 2664384**

54 Título: **Cámara de centrifugación con escudos deflectores**

30 Prioridad:

15.05.2012 EP 12168083

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

11.02.2020

73 Titular/es:

MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE

72 Inventor/es:

MILTENYI, STEFAN;
KABAHA, EIAD, DR.;
STUTH, JULIANE y
PETERS, RALF-PETER, DR.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 741 654 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

Cámara de centrifugación con escudos deflectores

La invención se relaciona con una cámara mejorada para una centrífuga para separar una muestra biológica líquida en al menos dos componentes o fracciones.

5 Antecedentes de la invención

El fraccionamiento y separación de células de las suspensiones similares a sangre o médula ósea se está convirtiendo cada vez más en parte de tratamiento médico. Para tal tratamiento, las células se extraen de un paciente, luego se separan para proporcionar las células objetivo deseadas, que usualmente se estimulan/manipulan/expanden antes de introducirlas en el mismo paciente o en uno diferente. La extracción, preparación, fraccionamiento, separación, manipulación e introducción de las células debe realizarse tan rápido como sea posible para reducir el estrés impuesto sobre las células objetivo y los pacientes. En el mejor de los casos, todo el proceso se realiza en el mismo lugar en el paciente.

10

El fraccionamiento y separación de suspensiones celulares mediante centrifugación se conoce desde hace mucho tiempo en la técnica para separar muestras de origen biológico en dos o más componentes. Los sistemas de centrifugación, especialmente cámaras de centrifugación pueden optimizarse para el tipo de muestra que va a ser separada, para velocidad de procesamiento, calidad de separación o la cantidad de material que va a ser procesado.

15

Para la separación de células de una suspensión similar a sangre mediante centrifugación, es beneficioso monitorizar el proceso de separación y proporcionar a la cámara de centrifugación con puertos de entrada/salida apropiados. A este respecto, los documentos WO 2009/072006 y WO 2009/072003 divulgan un sistema de centrifugación y una cámara de centrifugación con medios para controlar el proceso de separación, y al menos un puerto de entrada y salida ubicado en el eje de rotación de la cámara de centrifugación. La centrífuga y la cámara de los documentos WO 2009/072006 y WO 2009/072003 permiten la centrifugación continua, en donde la muestra, medios, gases y otros materiales pueden entrar y salir del sistema por ejemplo a través de los puertos de entrada y salida sin detener el proceso de centrifugación y rellenar la centrífuga.

20

El documento US 5837150 divulga un aparato que comprende una pared lateral interior y exterior, en donde la sangre puede separarse en una pluralidad de capas mediante centrifugación. La sangre y las capas separadas pueden entrar y/o salir de la cámara a través de las aberturas de la pared lateral interior, que están cubiertas por escudos ubicados contra la dirección de centrifugación. Una cámara de centrifugación con una pared lateral interior y exterior y aberturas en la pared lateral interior es complicada de fabricar. Dado que los escudos de las aberturas en la pared lateral interior están ubicados contra la dirección de centrifugación, la velocidad de eliminación de líquidos será baja.

25

El documento US 5879280 está dirigido a una cámara de centrifugación con barreras para desarrollar un grupo de líquido que se drena para su eliminación desde la cámara. La construcción de un grupo de líquido permitirá la remezcla de capas ya separadas y dará como resultado calidad de separación pobre. Adicionalmente, dado que las barreras están ubicadas contra la dirección de centrifugación de flujo, la velocidad de eliminación de líquido desde la cámara será baja.

35

Cualquier proceso de separación mediante centrifugación involucra al menos las etapas: proporcionar una suspensión celular en la cámara de centrifugación, separación del líquido en varias capas de acuerdo con su densidad y drenar las capas separadas desde la cámara en diferentes recipientes.

La calidad de la etapa de separación es decir la pureza de las capas en la cámara puede ser influenciada por tiempo de centrifugación y fuerzas de gravedad aplicadas (es decir velocidad de rotación de la cámara).

40

Independientemente de la pureza de las capas durante la etapa de centrifugación, se observó que las capas separadas se mezclaron en parte de nuevo durante el drenaje de una capa, especialmente si la velocidad de drenaje es demasiado alta. Reducir la velocidad de drenaje reduciría la remezcla de capas adyacentes pero daría como resultado un tiempo de procesamiento más largo no deseado.

Por consiguiente, hay una necesidad de mejorar el proceso de centrifugación en velocidad de procesamiento y calidad de separación.

45

Sorprendentemente, se encontró que un proceso de centrifugación se puede mejorar al proporcionar a la cámara de centrifugación con puertos de entrada/salida que tengan escudos deflectores de tamaño apropiado.

El documento WO 2009/072006 divulga en la figura 2A una cámara de centrifugación con un escudo deflector. El deflector que se muestra tiene un ancho de aproximadamente 1/3 de la circunferencia de la cámara. El propósito de este deflector no se describe, pero un deflector de este tamaño previene la separación de la muestra en capas durante la centrifugación. La cámara como se muestra en la figura 2A del documento WO 2009/072006 no es adecuada para la separación de muestras en capas mediante fuerzas centrífugas.

50

Objetivo de la invención

Es un primer objetivo de la invención proporcionar una cámara centrífuga para separar una muestra en al menos dos componentes, que comprende un cilindro que tiene una placa base y una placa de cubierta, y un eje de rotación con al menos un puerto para entrada y/o salida de muestra, estando el puerto conectado a un tubo ubicado sobre o en la placa base y/o placa de cubierta y teniendo el tubo una o más aberturas en la cámara centrífuga, en donde al menos una abertura del tubo está ubicada en la placa base o la placa de cubierta y está provista con al menos un deflector en forma plana ubicado en el tubo y en la placa base o la placa de cubierta que tiene una superficie sustancialmente paralela con el cilindro y un ancho en su base de como máximo 1/10 de la circunferencia interior del cilindro.

5

Descripción general de la cámara de centrifugación de la invención

10

La cámara de acuerdo con la invención comprende una placa base circular y una placa de cubierta circular, ambas de las cuales están orientadas sustancialmente perpendiculares a un eje de rotación; y un cilindro o una pared que está orientada sustancialmente perpendicular a la placa base y de cubierta de tal manera que la placa base, placa de cubierta y cilindro se puedan pegar o soldar juntos de una manera estanca al agua y al gas. De esa manera, se forma una cámara de centrifugación cerrada, que consta de una parte inferior similar a cápsula y una parte superior en la forma de un tapón.

15

La figura 1 muestra una cámara centrífuga estándar de acuerdo con la técnica anterior, por ejemplo como se divulga en los documentos WO 2009/072006 o WO 2009/072003. Esta cámara centrífuga está provista con dos puertos de entrada/salida en el eje de la cámara conectados a través de tubos a las aberturas en la cámara. La cámara no tiene deflectores que protejan las aberturas.

20

La figura 2 muestra unas cámaras de centrifugación de acuerdo con la invención. Esta cámara comprende similar a la cámara como se representa en la figura 1 dos puertos de entrada/salida en el eje de la cámara, conectados a tubos incrustados en la placa base y de cubierta, que terminan en aberturas en la cámara.

La abertura de las placas base y de cubierta están provistas con deflectores que reducen la remezcla no deseada de líquido durante el drenaje de la cámara.

25

La cámara de centrifugación de acuerdo con la invención es adecuada para mejorar y/o acelerar la separación física de una muestra en dos o más componentes o por ejemplo para fraccionar la muestra en diferentes capas y finalmente en diferentes recipientes. La muestra es preferiblemente una muestra biológica, tal como sangre, aspirado de médula ósea, muestras de leucaféresis, células o composiciones que comprenden células o componentes celulares o similares.

La cámara de acuerdo con la invención puede usarse por ejemplo en los siguientes procesos:

30

- reducir el volumen de una muestra mediante drenaje al menos parcialmente de fracción o capa no deseada de la muestra

- separar una muestra en capas que tienen diferente densidad y eliminación de las capas de la cámara en diferentes recipientes, por ejemplo separar sangre o médula ósea en diferentes fracciones

35

- lavado de células separadas o no separadas por ejemplo con medios reguladores y subsiguientemente separar las células lavadas de los medios y descargar el líquido de lavado

- Separación de células al agregar aditivos tipo Ficoll o Percoll para proporcionar una preparación de gradiente de densidad

- Concentración de una preparación de muestra mediante eliminación de líquido.

40

- Preparación de muestra previa a la separación mediante centrifugación, separación por flujo magnético y/o inmunológico y/o fluorescente

- Procesamiento celular tipo activación celular, proliferación celular, transfección celular, tinción celular seguida o subsiguientemente a una etapa de separación o lavado

La cámara de acuerdo con la invención es especialmente adecuada para los siguientes procesos:

- aislar leucocitos al separar y descargar eritrocitos y plasma de sangre humana

45

- aislar ciertas subpoblaciones de leucocitos, por ejemplo leucocitos que tienen uno o más de los siguientes marcadores de superficie CD4, CD8, CD25, CD 34 y/o CD 133 al separar leucocitos de sangre humana con marcado celular subsiguiente

- preparación de leucocitos al descargar eritrocitos y plasma de sangre humana seguido por una o más etapas de lavado con medios celulares y/o aditivos de gradiente de densidad

- aislar, enriquecer o agotar células que tienen uno o más de los siguientes marcadores de superficie CD4, CD8, CD25, CD 34 y/o CD 133 de sangre humana para uso en medicina regenerativa, arteria periférica, enfermedad del hígado o terapia de células madre cardíacas

- sistemas de captura de citoquinas

5 Descripción detallada de la invención

Una cámara de centrifugación de acuerdo con la invención comprende preferiblemente como se muestra en la figura 2, un eje de rotación con un sello giratorio y preferiblemente con dos líneas de fluido o puertos (1) de entrada/salida. La cámara centrífuga comprende adicionalmente una placa (4) de cubierta, una placa (5) base unida por el cilindro (9). La placa (4) de cubierta y la placa (5) base están ambas provistas con tubos (2, 3), que están conectados a los respectivos puertos (1) de entrada/salida y aberturas (6, 7) en la cámara. Las aberturas (6, 7) están provistas con deflectores (8, 10). El deflector (8) de la placa (5) base está ubicado en el tubo (3) entre la abertura (7) del tubo y cilindro (9). De esa manera, el deflector (8) protege la abertura (7) del volumen entre la abertura y pared (9) de cilindro. El deflector (10) de la placa (4) de cubierta está ubicado entre la abertura (6) de tubo (2) y el eje de rotación del cilindro. El deflector (10) protege la abertura (6) del volumen interno de cilindro (9).

15 En una primera realización de la invención, al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el cilindro. Ubicado aquí, este deflector protege la abertura del volumen entre la abertura y el cilindro y previene durante el drenaje de este volumen la succión no deseada de líquido de otra parte de la cámara es decir del volumen entre la abertura y el cilindro (9) de la cámara. Esta realización se muestra mediante la abertura (7) y deflector (8) en la figura 2.

20 En una segunda realización, al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el eje de rotación del cilindro. Contrario de la primera realización, este deflector protege la abertura del volumen de la cámara entre abertura y pared de cilindro y previene succionar líquido de este volumen al drenar el volumen interno de la cámara. Esta realización se muestra mediante la abertura (6) y deflector (10) en la figura 2.

25 En una tercera realización de la invención la cámara comprende deflectores en ambas ubicaciones de la primera y segunda realización de la invención, es decir al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura de un primer tubo y el cilindro y al menos una abertura de un segundo tubo y el eje de rotación del cilindro. La ubicación de los deflectores con respecto a las aberturas y/o la distancia al cilindro puede ser igual o diferente. La figura 2 muestra esta realización de la invención con abertura (6,7) y deflector (8,10) en la figura 2.

30 En la tercera realización de la invención, dos aberturas de la cámara están conectadas o dan acceso a dos volúmenes diferentes de la cámara y pueden usarse para drenar el líquido provisto en la misma. La figura 3 muestra la línea respectiva de flujo y el volumen de la cámara drenada desde los tales puerto y tubo. El puerto inferior en el eje de rotación drena el volumen exterior o capa (O), mientras que el puerto superior en el eje de rotación está conectado al volumen (I) interior. Con el efecto de protección de los deflectores de la invención, se reduce la remezcla de las capas durante el drenaje, dando como resultado en pureza más alta de las fracciones obtenidas al drenar las capas y/o la habilitación de velocidad de drenaje más alta.

35 Los deflectores están ubicados en los tubos. La cámara centrífuga de acuerdo con la invención puede comprender uno a ocho, diez o doce tubos teniendo cada uno una abertura con deflector, preferible dos o cuatro tubos teniendo cada uno una abertura con deflector. Los tubos/aberturas pueden ubicarse todos en la placa base, todos en la placa de cubierta o en la placa base y de cubierta. Si se usan más de dos tubos/aberturas, se prefiere distribuir los tubos/aberturas de una forma simétrica independientemente de si los tubos/aberturas están ubicados en la placa base o de cubierta. Por ejemplo, una cámara con en total 4 tubos puede tener dos tubos/aberturas ubicados en la placa base y dos en la placa de cubierta orientados de una manera transversal (ángulo de 90°).

40 Las aberturas se pueden formar como orificios o entradas de línea y su posición en la cámara de centrifugación se puede configurar de tal manera que sean más adecuadas para la separación de una muestra particular o para el drenaje de fluidos particulares dentro o fuera de la cámara. Dependiendo de los componentes de una muestra particular y el volumen relativo de cada componente en la muestra, las aberturas se pueden posicionar de una forma que se pueda lograr la eliminación y/o detección más rápida de una capa particular. Además, el tamaño de las aberturas se puede optimizar para la capa deseada, por ejemplo en vista del tamaño de las células objetivo y/o flujo de volumen optimizado.

45 Los deflectores utilizados en la presente invención son en forma plana similar a una placa y sus superficies son sustancialmente paralelas con el cilindro es decir el deflector está doblado en sustancialmente el mismo radio de curva como el cilindro. La forma del deflector puede ser rectangular, triangular, medio redonda o elíptica. En una realización preferida, el deflector tiene una base amplia ubicada en la abertura de un tubo y un área de pico más pequeña con el fin de bajar las fuerzas de corte aplicadas a las células durante la centrifugación. Los bordes del deflector deben biselarse para evitar pérdidas de células mediante el corte o desgarre de la membrana celular en los bordes. Lo más preferido, el deflector es medio redondo o medio elíptico. La figura 4 muestra a modo de ejemplo tales deflectores unidos a tapas para el cierre de los canales.

El tamaño de los deflectores debe ser suficiente para reducir el flujo de volumen no deseado, por ejemplo el volumen drenado desde la parte de la cámara ubicada detrás de la abertura en dirección hacia el exterior de la cámara cuando se desea el drenaje de la parte de la cámara ubicada hacia el eje de rotación.

5 El tamaño de los deflectores depende del volumen de la cámara, es decir cuanto mayor sea el volumen que va a ser protegido, mayor será el deflector y la velocidad de drenaje prevista. Independientemente de su forma, el deflector debe tener un ancho en la base (en la abertura de un tubo) de 1/10 a 1/60, preferible de 1/25 a 1/40 de la circunferencia interior del cilindro. Por ejemplo, un cilindro que tiene un diámetro interior de 10 cm está provisto con deflectores que tienen un ancho en la base (en la abertura de un tubo) de 1 a 2 cm.

10 La altura del deflector es preferible igual o menor que el ancho en su base, por ejemplo 50 a 95% del ancho en la base. El deflector debe ser tan delgado como sea mecánicamente posible, pero sin presentar bordes afilados que puedan dañar o cortar las células. Preferiblemente, el grosor de los deflectores está entre 0,5 mm y 2 mm.

El tamaño de (una) superficie de un deflector se puede calcular o estimar a partir de los rangos dados en ancho y altura, pero usualmente está entre 0.1 cm² y 10 cm². En cualquier caso, el tamaño del deflector no debería obstaculizar la separación de la muestra en capas sino reducir el flujo no deseado de líquido desde las capas separadas.

15 La cámara de la invención puede comprender varios deflectores, que pueden tener el mismo o diferente tamaño y/o altura y/o anchura.

20 Las figuras 2 y 3 muestran una cámara en vista lateral con tubos o canales ubicados en la placa base y de cubierta de la cámara, cada tubo provisto con un deflector. En este caso, la abertura y el deflector en la placa base están ubicados a 2 - 20 mm y la abertura y el deflector en la placa de cubierta están ubicados a 0,1 - 10 mm de las paredes de la cámara. La ubicación de la abertura y el deflector definen un volumen residual de la cámara que se llena con líquido durante la centrifugación.

25 Al ajustar la ubicación de la abertura y el deflector es decir ajustando la distancia de la abertura y el deflector al cilindro, este volumen residual se puede ajustar a las necesidades del proceso de separación deseado. Por ejemplo, si se desea un volumen residual bajo, la abertura y el deflector deben ubicarse más hacia el cilindro y viceversa. Si la cámara comprende más de una abertura con deflector, las distancias de la abertura desde el cilindro pueden ser iguales o diferentes.

30 Las aberturas y los deflectores se pueden proporcionar en la placa base y/o de cubierta dependiendo de las necesidades del proceso de separación. En una realización adicional de la invención, la cámara está provista con dos aberturas que tienen una distancia diferente del cilindro en dos tubos diferentes que llevan a dos puertos diferentes en donde cada abertura está provista con un deflector. Se muestra un ejemplo donde todas las aberturas/tubos están ubicados en la placa base y están conectados a diferentes entradas/salidas en la figura 5.

35 En una aún otra realización de la invención, la cámara está provista con dos aberturas que tienen la misma distancia desde el cilindro en dos tubos diferentes que llevan al mismo puerto en donde cada abertura está provista con un deflector. Se muestra un ejemplo donde todas las aberturas/tubos están ubicados en la placa base y están conectados al mismo puerto de entrada/salida en la figura 6.

La cámara puede comprender uno o más de estos tubos combinados, por ejemplo pueden estar conectados dos tubos/aberturas de la placa base a un primer puerto y dos tubos/aberturas de la placa de cubierta estar conectados a un segundo puerto, en donde los tubos de la placa base y de cubierta comparten un ángulo de 90° entre sí. La ventaja de tubos combinados es que se puede lograr una velocidad de drenaje más alta del líquido desde la cámara.

40 Los tubos pueden incrustarse en la placa base y/o placa de cubierta al proporcionar canales en la placa base y/o placa de cubierta que están cubiertos por una tapa. En este caso, es preferible unir el deflector a la tapa durante su fabricación. La figura 4 muestra a modo de ejemplo tales tapas con deflectores (8,10). Las tapas se pueden insertar en los canales en una provisión estanca al agua, por ejemplo mediante pegamento apropiado o soldadura de HF. Las tapas mostradas en la figura 4 adicionalmente proporcionan el eje (A) de rotación para la cámara que incluye la tubería para los puertos de salida/entrada.

En una variante alternativa de la invención, los tubos no son canales cubiertos por tapas, sino agujeros en la placa base y/o placa de cubierta, que alcanzan desde el exterior de la placa el eje de rotación. Esta realización de la invención se muestra en la figura 5. Los agujeros (1, 2) están abiertos hacia el exterior de la cámara durante la fabricación y necesitan estar cerrados de una manera estanca al agua y al gas, por ejemplo con tapones (3).

50 La cámara puede tener un diámetro interior de 2 cm a 20 cm, preferible 8 a 15 cm y una altura interior de 5 mm a 10 cm, preferible 2 cm a 7 cm. El volumen total de la cámara puede estar entre 10 cm³ y 2000 cm³, preferible entre 200 cm³ y 1000 cm³.

La centrifugación se lleva a cabo preferentemente entre 10 y 2000 x g, preferible entre 100 y 500 x g. En una realización preferida, la cámara se puede calentar y enfriar para proporcionar una temperatura apropiada para la muestra que va

a ser centrifugada. Para este propósito, se pueden ubicar medios de calentamiento y/o enfriamiento en la cámara o alrededor de la cámara.

5 Dado que la cámara se produce a partir de una placa base circular, una placa de cubierta circular y un cilindro que se pegan o sueldan entre sí de una manera estanca al agua y al gas, el volumen de una cámara dada se puede ampliar al usar un cilindro más alto con placa de cubierta/base que tiene el mismo diámetro interior. Las cámaras con un volumen ampliado pueden llenarse con un mayor volumen de muestra, poniendo de esa manera una mayor masa en movimiento dando como resultado mayores fuerzas que actúan sobre las paredes de cilindro. Con el fin de proporcionar suficiente estabilidad mecánica de la cámara, especialmente cuando se usa con alta carga y altas velocidades de centrifugación, es beneficioso proporcionar al cilindro en la superficie exterior con una o más lengüetas. Se muestra una cámara con tales lengüetas en el exterior en las figuras 5, 6 y 7.

10 En una realización adicional de la invención, la cámara está provista con orificios de ventilación en la placa base y/o de cubierta, en donde los orificios de ventilación están conectados a través de tubos de ventilación en el eje de rotación al volumen interior de la cámara. Los tubos de ventilación son preferibles perpendiculares a las líneas que conectan las aberturas provistas con los deflectores y los puertos de entrada/salida del eje de rotación. La figura 7 muestra esta realización a modo de ejemplo. Aquí, la abertura (1) está conectada a través del tubo (2) al puerto 3. Los orificios (4) de ventilación en el eje de rotación están abiertos a la atmósfera exterior de la cámara a través de los tubos (6) a los orificios en la placa (5) base. La ventilación y/o gasificación de la cámara puede realizarse por los orificios en la placa base incluso durante la centrifugación a través del sistema de accionamiento (no se muestra).

15 La cámara de la invención consiste en un cilindro, una placa base y una de cubierta. El cilindro, la placa base y de cubierta pueden ser objetos redondos o circulares con el fin de simplificar la producción y reducir cualquier desbalance durante el proceso de centrifugación. En otra realización, al menos el cilindro puede ser en forma ligeramente elíptica, con un diámetro en una primera dimensión que es 0,5 a 10, preferible 0,5 a 5% más grande que en una segunda dimensión orientada perpendicular a la primera dimensión. Por ejemplo el cilindro puede tener en una primera dimensión un diámetro de 120 mm y en una segunda dimensión estar orientado perpendicular a la primera dimensión un diámetro de 122 mm.

20 La base y cubierta pueden tener la misma forma elíptica o pueden ser objetos redondos / circulares. Se prefiere que los tubos que comprenden aberturas con deflectores estén orientados en la dimensión más grande del cilindro elíptico. En este caso, las células se moverán por la fuerza de centrifugación a lo largo de las paredes de cilindro en la dirección de la dimensión más grande del cilindro es decir en cercanías a las aberturas.

25 La cámara y las tapas y/o deflectores pueden estar hechos de diversos materiales similares a cerámica, poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo, policarbonato, vidrio, poliácido, poliácridamida, polimetilmetacrilato (PMMA), y/o polietilentereftalato (PET). Politetrafluoroetileno (PTFE) y/o poliuretano termoplástico (TPU), silicona o composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente. Adicionalmente, la cámara puede comprender o estar hecha de material biodegradable como colágeno, quitina, alginato, y/o derivados de ácido hialurónico, polilactida (PLA), alcohol polivinílico (PVA), poliglicolida (PGA) y sus copolímeros.

30 En una realización adicional, la cámara de acuerdo con la invención comprende un medio para controlar el progreso de la separación de muestra, posicionado en la placa base o la placa de cubierta de la cámara. El medio para controlar el progreso de la separación de muestra se posiciona preferiblemente en un canal o en una brecha ubicada en la placa base o la placa de cubierta de la cámara de tal manera que la muestra pueda entrar en el canal o brecha durante la centrifugación y de este modo sea detectable. Debido a la fuerza centrífuga, los diferentes componentes de la muestra formarán capas, que son detectables mediante luz, por ejemplo con una cámara o un detector de luz. De es manera, se genera una señal que permite determinar cuando se completa la formación de capa o separación de muestra. Los medios adecuados para controlar el progreso de la separación de muestra se divulgan en los documentos WO 2009/072006 o WO 2009/072003 incorporados aquí como referencia.

35 En otra realización, la cámara está configurada de tal manera que pueda servir como o acomodar un recipiente para cultivación de células. De esa manera, la cámara de centrifugación se puede usar para procesos de separación celular, para propósitos de cultivo celular y para procesamiento adicional de las células cultivadas en la misma. La cámara permite que sea realizado un rango grande de métodos de cultivo celular, tal como crecimiento de células, separación, lavado, enriquecimiento de las células o diferentes tipos de células, u otros. Para este propósito, la cámara puede comprender aberturas adicionales de entrada/salida, por ejemplo para gas, medios de cultivo celular o similares. Las condiciones de cultivo celular son conocidas en la técnica.

40 En una realización adicional, la centrífuga de la presente invención puede ser parte de un sistema de procesamiento de muestras, tal como se conoce de los documentos WO 2009/072006, WO 2009/072003 o EP 0 869 838 B1, que se incorpora aquí como referencia. La unidad de procesamiento de muestras se puede acoplar al puerto de entrada/salida de la cámara de centrifugación y puede comprender un sujetador de columna de separación, una bomba, una pluralidad de recipientes para almacenamiento (intermedio) de líquidos durante el proceso de separación y una pluralidad de válvulas configuradas para controlar al menos parcialmente el flujo de fluido a través de una circuitería de fluido y una columna de separación posicionada en el sujetador.

Ejemplos

5 Se investigó el enriquecimiento de leucocitos del aspirado de médula ósea humana con el fin de aislar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD133+. Tales células se usan para terapia con células madre similar a terapia con células madre cardíacas, en donde las células se aíslan primero de la médula ósea de un paciente y luego se introducen en el músculo cardíaco al mismo paciente. Dado que la introducción de células en el músculo cardíaco se realiza durante la narcosis del paciente, el aislamiento de las células necesita estar con bajas pérdidas de células y tan rápido como sea posible. Las aplicaciones adicionales para células CD133+ enriquecidas están en el campo de medicina regenerativa, arteria periférica, y enfermedad del hígado.

10 La centrifugación de sangre completa se realizó en una cámara de centrifugación de acuerdo con la invención y para comparación en una cámara de centrifugación como se muestra en la figura 1. Cada cámara se construyó en un sistema de separación divulgado en el documento WO 2009/072006 y se usó para separar sangre humana en fracciones que comprenden leucocitos, eritrocitos y plasma. El progreso de la separación fue monitorizado mediante una unidad de cámara, que se instaló sobre la cámara de centrifugación.

Cámara de centrifugación

15 La cámara de acuerdo con la invención usada en los ejemplos se muestra en la figura 2 y tenía un diámetro interior de aproximadamente 12 cm y una altura interior de aproximadamente 3.5 cm. La abertura del canal superior está ubicada en la periferia de la cámara, adyacente a la pared exterior (0,5 mm de distancia a la pared). La abertura del canal inferior estaba ubicada a una distancia de aproximadamente 6 mm a la pared exterior, proporcionando de esa manera un volumen total entre la abertura del canal inferior y la pared exterior de aproximadamente 70 ml. Ambas aberturas de la cámara estaban provistas con deflectores semiredondos que tenían un ancho en la base (en las aberturas) de aproximadamente 1.5 cm y una altura de aproximadamente 1 cm. Ambos deflectores estaban ligeramente doblados de acuerdo con el radio de curva del cilindro y tenían el mismo tamaño y forma.

20 La cámara no está de acuerdo con la invención (cámara de centrifugación estándar) tenía las mismas dimensiones, puertos, canales y aberturas que las descritas anteriormente, pero no está provista con deflectores, por ejemplo como se muestra en la figura 1 o se divulga en el documento WO 2009/072006.

1. Proceso de separación celular de ejemplo

30 Se introdujeron 250 ml de sangre en la cámara y se sometieron a una fuerza centrífuga de 400 x g (aproximadamente 2500 rpm) durante aproximadamente 15 minutos. La centrifugación de la muestra dio como resultado la separación de la muestra en capas, que comprenden leucocitos (l), eritrocitos (e), y plasma (p), mostrado esquemáticamente en la figura 8. Durante la centrifugación, las capas se pueden observar en la cámara como anillos, en donde el anillo exterior consiste en la fracción de eritrocitos. Los leucocitos (incluyendo células CD133+) forman un anillo blanco delgado adyacente a la capa de eritrocitos. El anillo interior consiste en la fracción de plasma de color amarillo.

35 La capa (e) exterior que comprendía eritrocitos se eliminó en parte desde la cámara a través del canal superior. La capa (e) se eliminó hasta que la capa (l) que comprendía leucocitos alcanzó la ubicación entre la abertura del canal inferior y la pared de cámara. Luego, la capa (p) que comprendía la fracción de plasma de color amarillo se eliminó a través del canal inferior a un recipiente. Después de vaciar la cámara, la capa (l) que comprendía leucocitos se lavó varias veces con regulador estándar. Para este propósito, se agrega el regulador a la cámara a través del puerto de entrada y se inicia la centrifugación para separar las capas. Luego, la capa interior que comprende el regulador se elimina hasta que el volumen de la capa (l) que comprende leucocitos se reduce hasta 70 ml y entonces se repite el proceso (etapa de drenaje).

Resultados

45 La figura 9 muestra una tabla con pérdidas de células debido al drenaje de la capa interior que comprende el regulador (etapa de drenaje) dependiendo de la velocidad de bombeo. Para cada velocidad de bombeo, se realizaron 3 experimentos con la misma muestra para descartar artefactos. La concentración celular se determinó usando un analizador de hematología automatizado (por ejemplo Sysmex KX-21N). Con la cámara de centrifugación estándar, las pérdidas de células aceptables solo se pueden obtener con velocidades de bombeo muy bajas (columna izquierda). Tales velocidades de bombeo bajas no son aceptables para la separación celular para propósitos de tratamiento médico.

50 Como se puede ver en la segunda y tercera columna (desde la izquierda), velocidades de bombeo más altas dan como resultado en pérdidas de células ligeramente más altas para la cámara de acuerdo con la invención (menos de 1%), pero hasta 5% de pérdidas de células con la cámara estándar. Más de 2,5% de pérdida de células no es aceptable para el tratamiento médico.

55 La primera y segunda columna de la derecha muestran las pérdidas de células obtenidas bajo altas velocidades de bombeo en una cámara de acuerdo con la invención. Las cámaras de centrifugación de acuerdo con la invención permiten un aumento de 4 veces de velocidades de bombeo que dan como resultado en un tiempo de procesamiento

mucho más rápido en comparación con una cámara estándar con pérdidas de células similares (comparar primera y cuarta columna desde la izquierda).

En otras palabras, las cámaras de centrifugación con deflectores de acuerdo con la presente invención permiten velocidades de bombeo más altas con menor pérdida de células objetivo.

5 2. Proceso de lavado de células de ejemplo

El lavado de células se realizó en una cámara de acuerdo con la invención como se describe en el ejemplo 1 y una cámara no de acuerdo con la invención (cámara de centrifugación estándar) con las mismas dimensiones, puertos, canales y aberturas que se describen anteriormente, pero sin deflectores.

10 En este ejemplo, la cámara de acuerdo con la invención se usó para centrifugación en gradiente de densidad. Se introdujeron 100 ml de sangre y 100 ml de Ficoll en la cámara, dando como resultado dos capas (mostrado esquemáticamente en la figura 10, dibujo superior) y se sometieron a una fuerza centrífuga de 400 x g (aproximadamente 2500 rpm) durante aproximadamente 15 minutos. La centrifugación de la muestra dio como resultado la separación de la muestra en las capas que comprenden leucocitos (l), eritrocitos / granulocitos (e), Ficoll (F) y plasma (p) (mostrado esquemáticamente en la figura 10, dibujo inferior). En la cámara, las capas se observan como anillos, en donde el anillo exterior consiste en la fracción de eritrocitos/granulocitos seguida (en dirección hacia el eje de la cámara) de la capa de Ficoll. A continuación, se observa un anillo blanco delgado que comprende leucocitos. El anillo interior consiste en la fracción de plasma de color amarillo.

15 La capa (e) (exterior) que comprendía eritrocitos y la capa de Ficoll (F) se eliminaron en parte de la cámara a través del canal superior. Las capas se eliminaron hasta que la capa que comprendía leucocitos alcanzó la ubicación de la abertura del canal inferior. Luego, la capa que comprendía leucocitos se eliminó a través del canal inferior en un recipiente de reaplicación. Después de vaciar la cámara, la capa que comprendía leucocitos se introdujo de nuevo en la cámara y se lavó varias veces con regulador estándar. Para este propósito, se agrega regulador a la cámara a través del puerto de entrada y se inicia la centrifugación para separar las capas. Luego, la capa interior que comprende el regulador se elimina hasta que el volumen de la capa (exterior) que comprende leucocitos se reduce hasta 70 ml. El proceso puede repetirse varias veces.

20 Se encontró que el proceso de lavado en la cámara de acuerdo con la invención es aproximadamente 4 veces más rápido con misma pureza y/o pérdidas de células que en la cámara estándar debido a la velocidad de drenaje más rápida de los líquidos de lavado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cámara centrífuga para separar una muestra en al menos dos componentes, que comprende un cilindro (9) que tiene una placa (5) base y una placa (4) de cubierta, y un eje de rotación con al menos un puerto para entrada y/o salida de muestra, estando el puerto conectado a un tubo (2, 3) ubicado sobre o en la placa base y/o placa de cubierta y teniendo el tubo una o más aberturas (6, 7) en la cámara centrífuga, caracterizada porque al menos una abertura (6, 7) del tubo (2, 3) está ubicada en la placa base o la placa de cubierta y está provista con al menos un deflector (8, 10) en forma plana ubicado en el tubo y en la placa base o la placa de cubierta que tiene una superficie sustancialmente paralela con el cilindro (9) y un ancho en su base de como máximo de 1/10 de la circunferencia interior del cilindro.
- 10 2. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el cilindro.
3. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el eje de rotación del cilindro.
- 15 4. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque al menos un primer deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el eje de rotación del cilindro y al menos un segundo deflector está ubicado entre al menos una abertura de un tubo y el cilindro.
5. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el deflector tiene una altura menor que el ancho en su base.
- 20 6. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque los tubos están ubicados en la placa base y/o placa de cubierta al proporcionar canales en la placa base y/o placa de cubierta que están cubiertos por una tapa.
7. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el deflector está unido a la tapa.
8. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque las aberturas están provistas en la tapa.
- 25 9. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque los tubos son agujeros en la placa base y/o placa de cubierta, que alcanzan desde el exterior de la placa el eje de rotación.
10. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el cilindro está provisto en la superficie exterior con una o más lengüetas.
- 30 11. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque la cámara está provista con orificios de ventilación en la placa base y/o de cubierta, en donde los orificios de ventilación están conectados a través de tubos de ventilación en el eje de rotación al volumen interior de la cámara.
12. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque la placa base y/o la placa de cubierta está provista con medios para controlar el progreso de la separación de muestra.
- 35 13. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque el cilindro tiene una forma elíptica con un diámetro en una primera dimensión que es 0.5 a 10% más grande que en una segunda dimensión orientada de manera perpendicular a la primera dimensión.
14. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque los tubos que comprenden aberturas con deflectores están orientados en la dimensión más grande del cilindro elíptico.

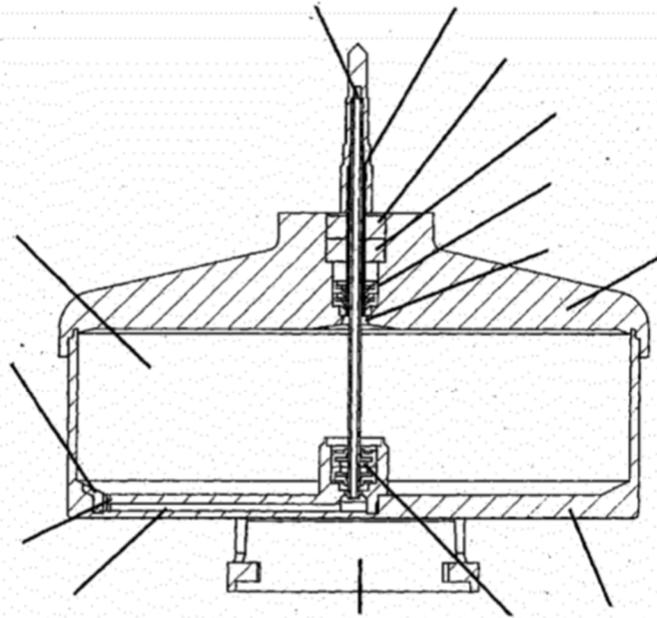


Fig. 1

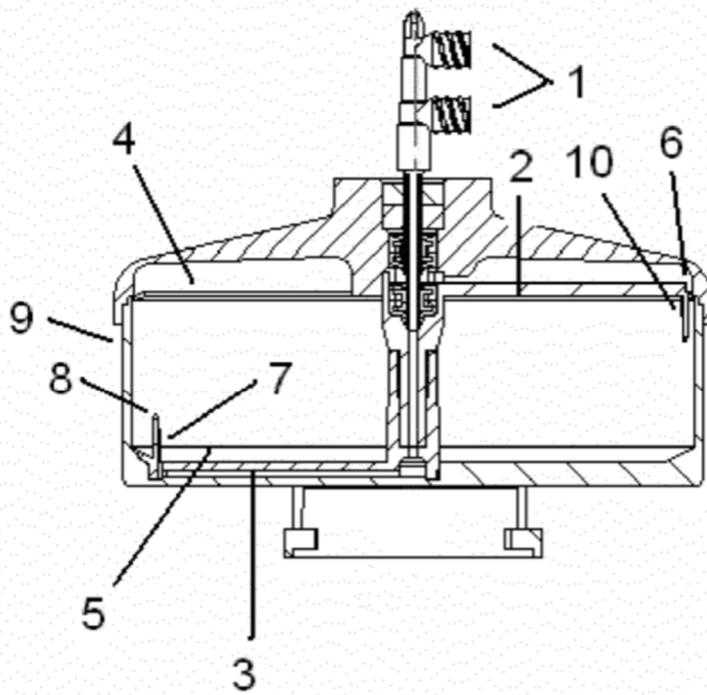


Fig. 2

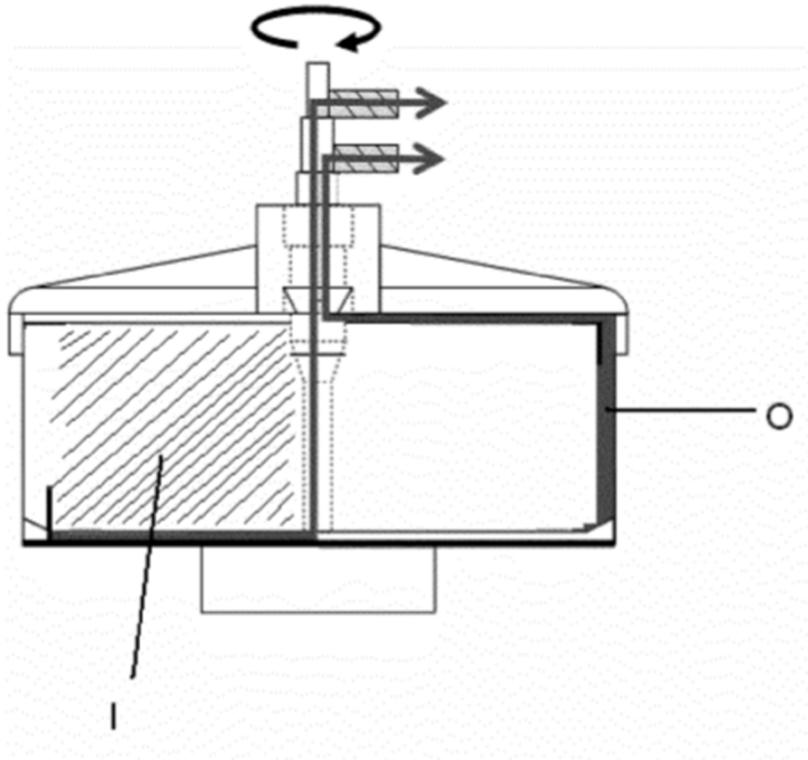


Fig. 3

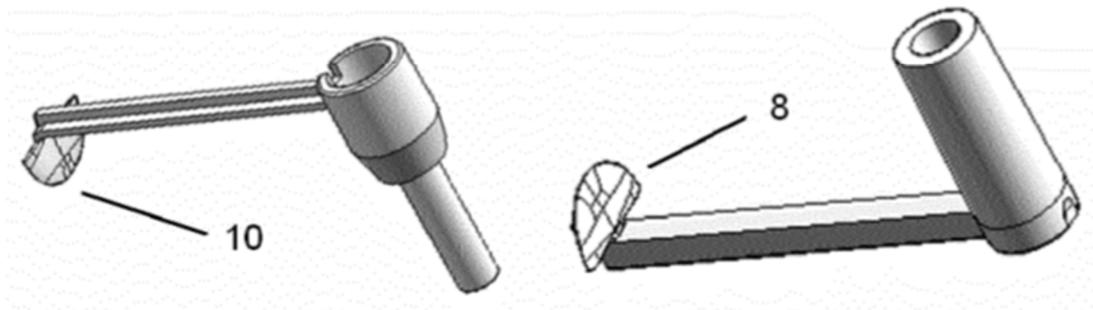


Fig. 4

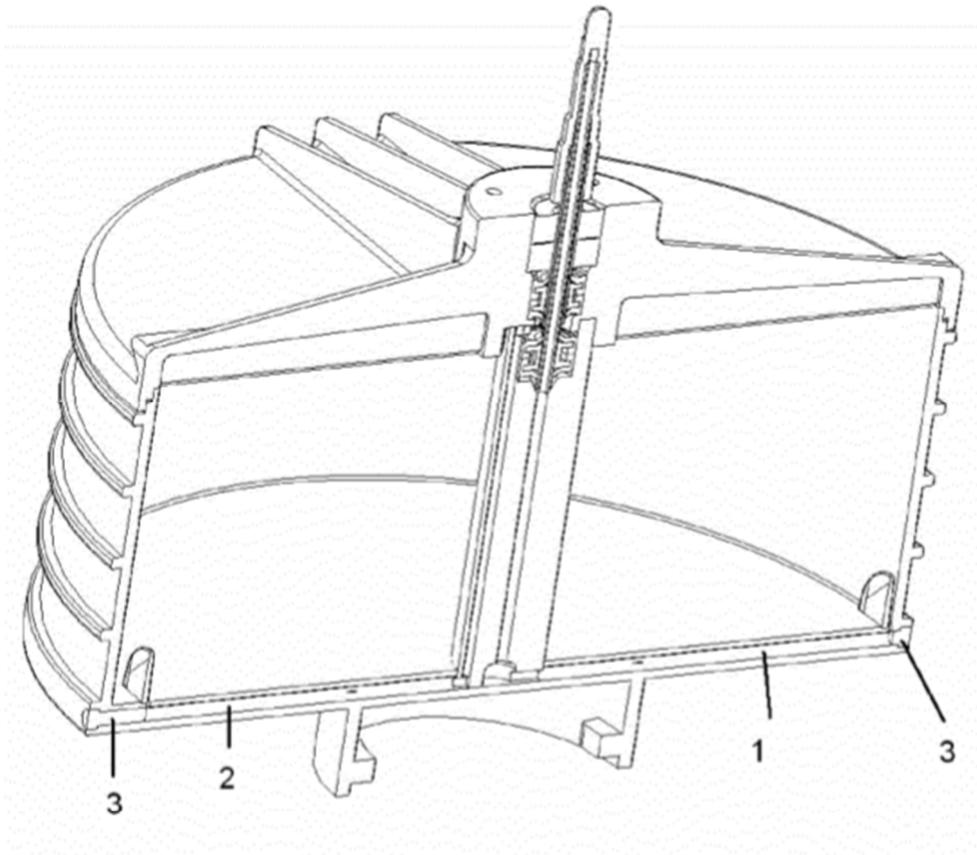


Fig. 5

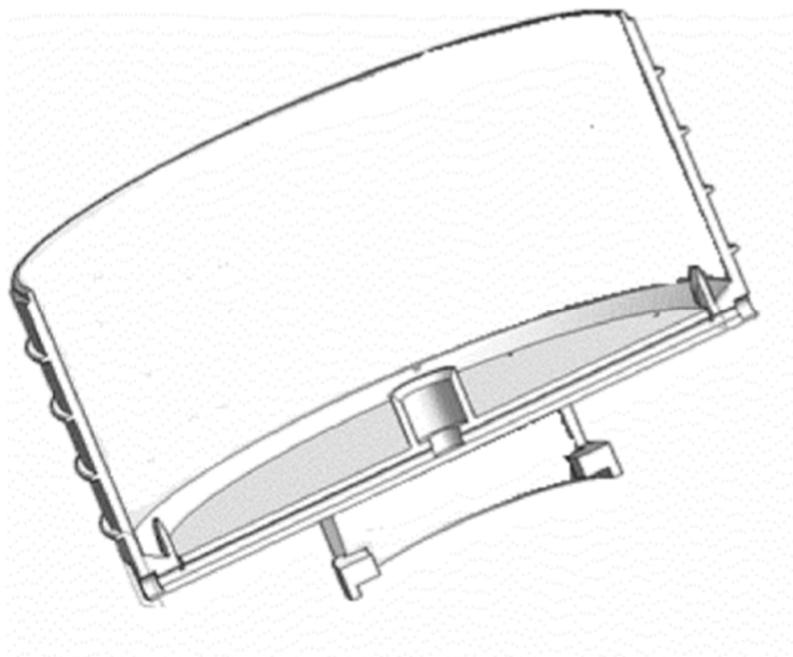


Fig. 6

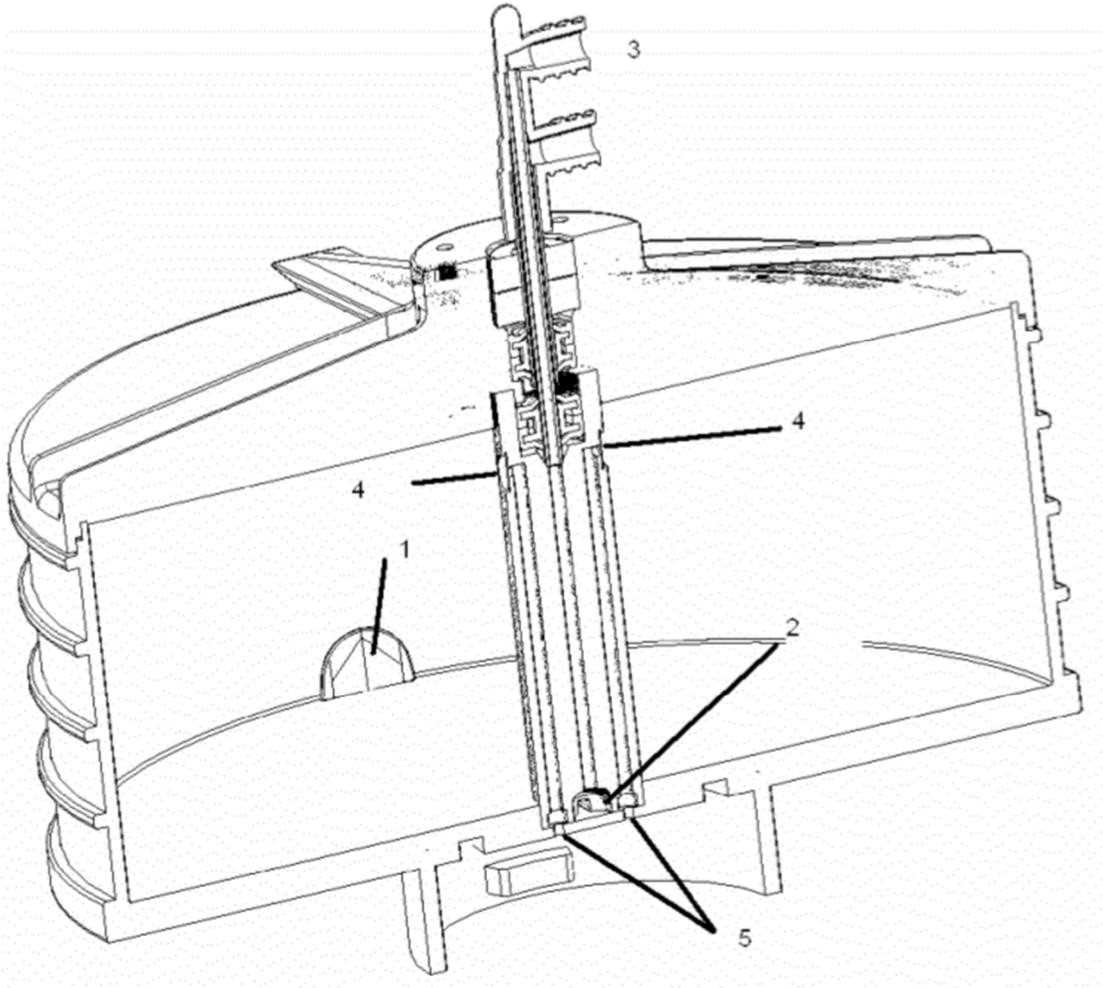


Fig. 7

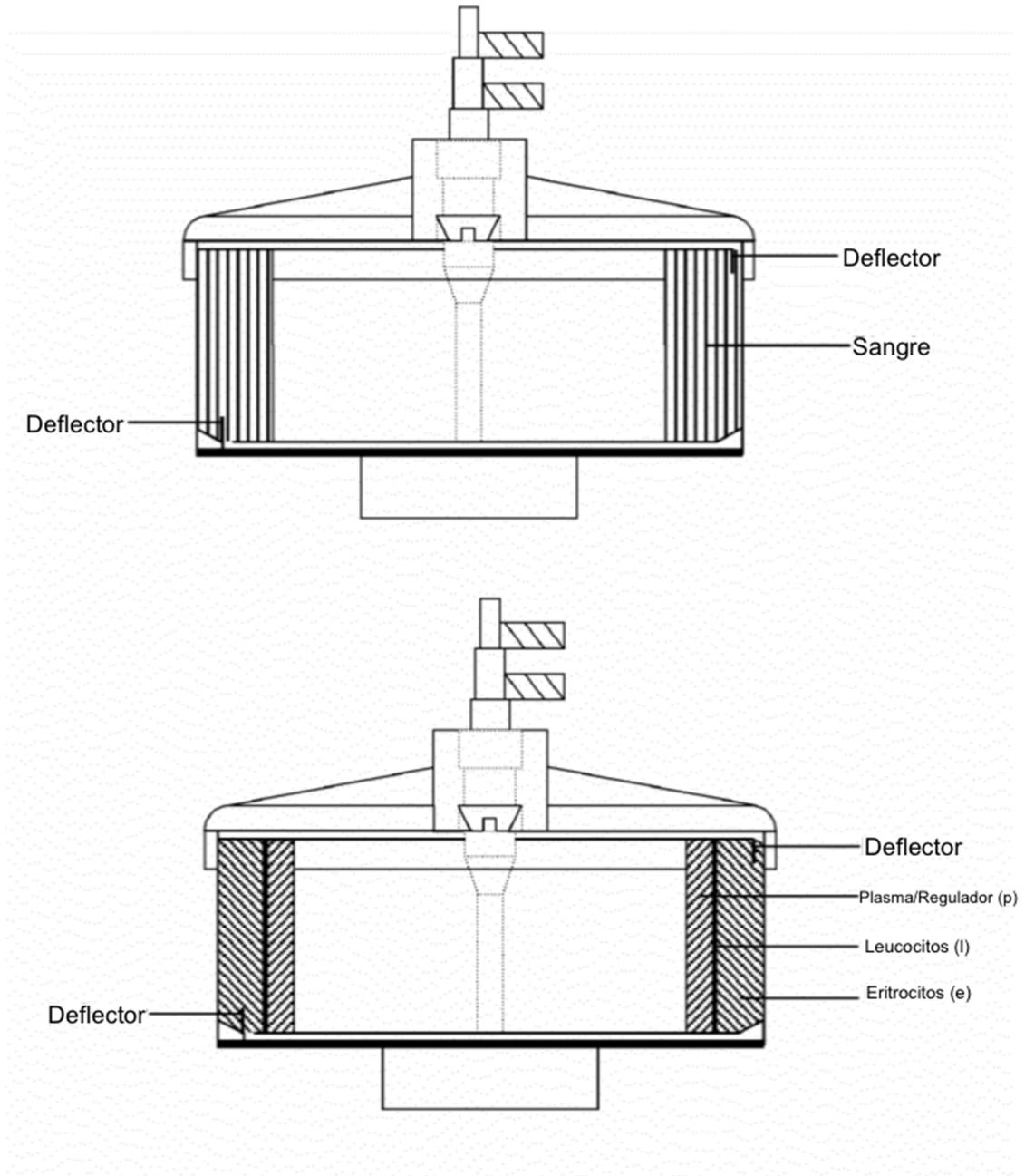


Fig. 8

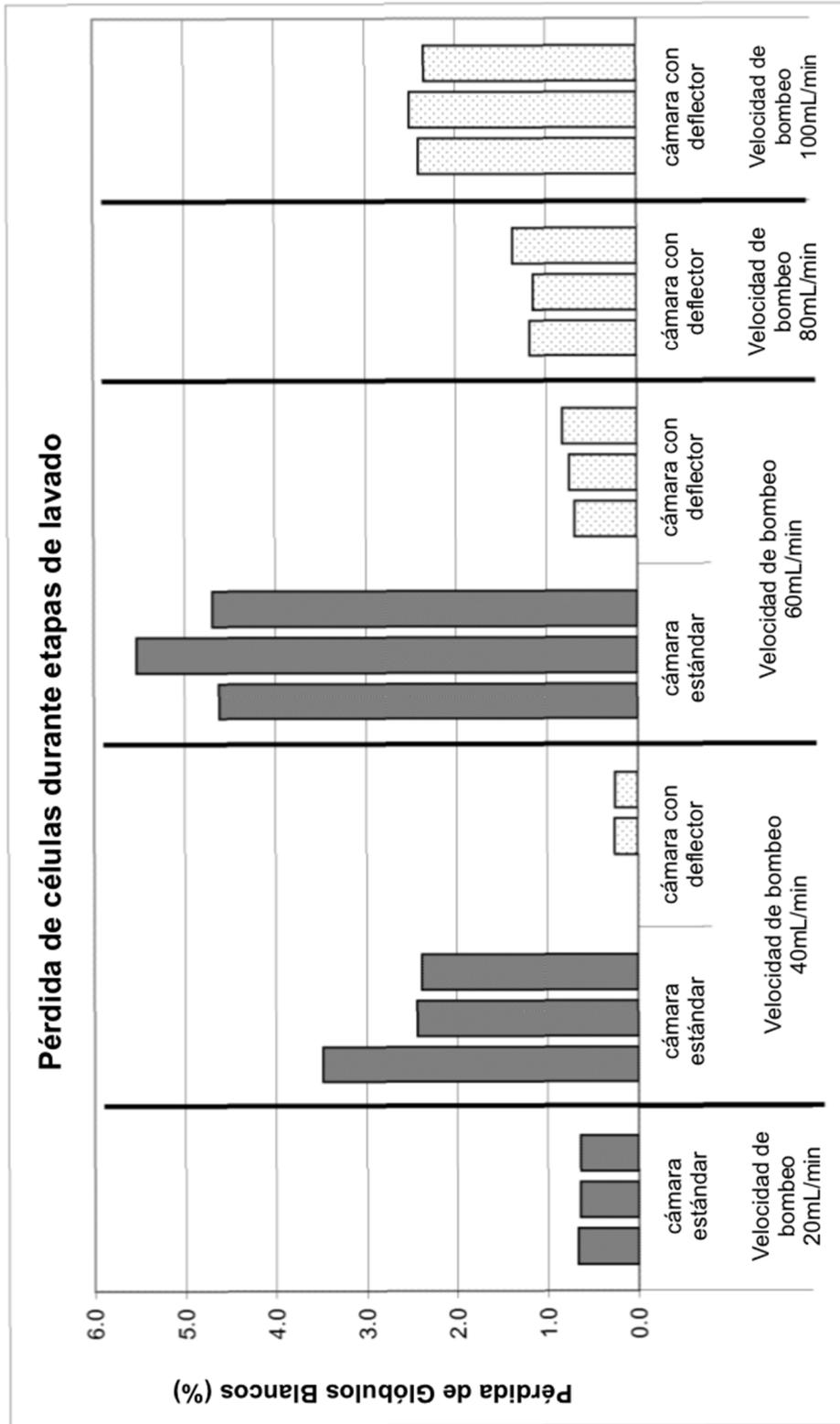


Fig. 9

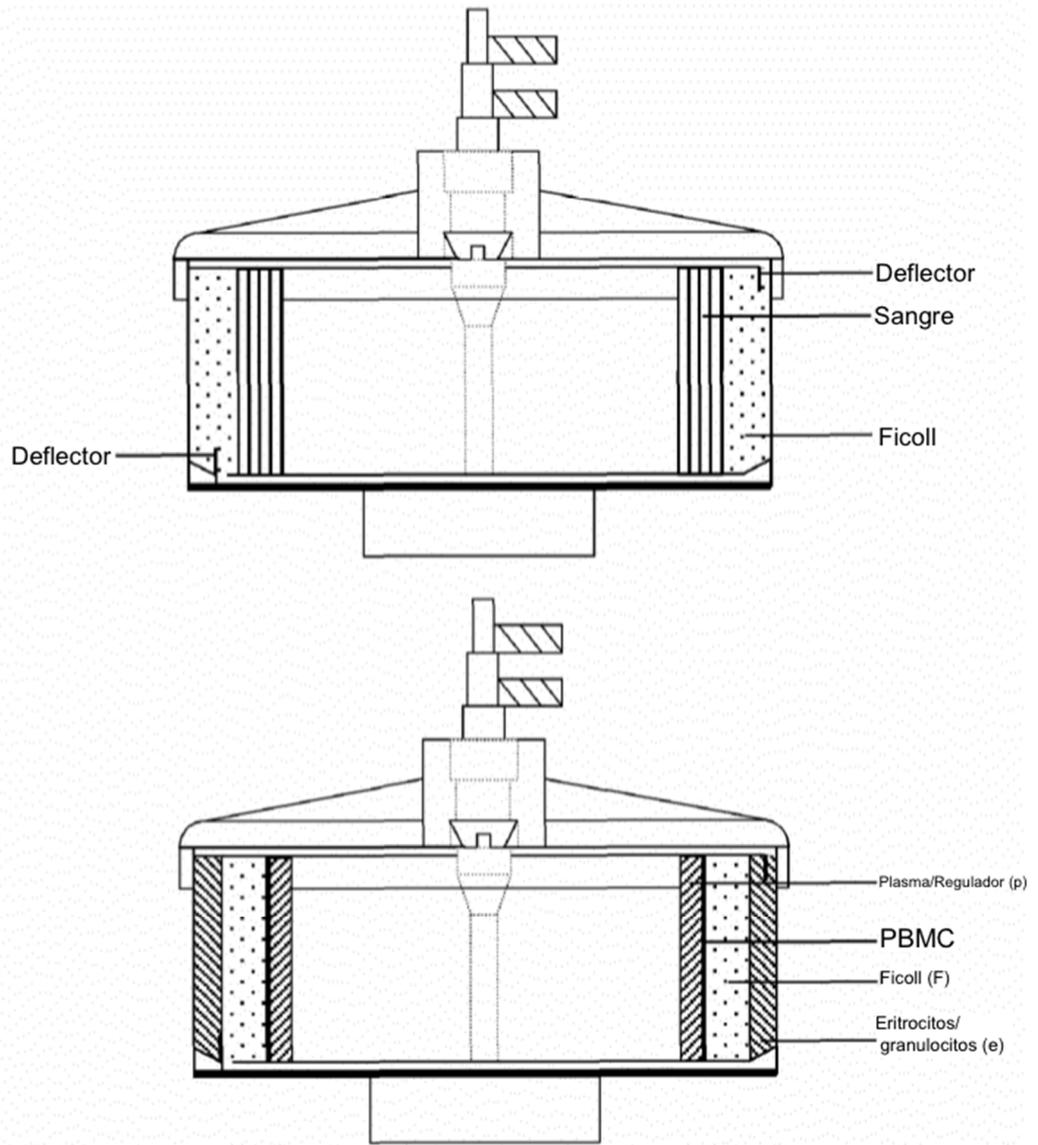


Fig. 10