

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 023**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2011** **E 11159252 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 2502986**

54 Título: **Un sistema de procesamiento de células de cartílago**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2020

73 Titular/es:

CARTIREGEN B.V. (100.0%)
Breullaan 1 K
3971 NG Driebergen-Rijsenburg , NL

72 Inventor/es:

HENDRIKS, JEANINE ANNA ALPHOSE;
RIESLE, JENS UWE;
WILSON, CLAYTON ELLIS y
VAN DEN DOEL, MIRELLA AGEETH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 746 023 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

Un sistema de procesamiento de células de cartílago

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos para preparar un vehículo de siembra celular a partir de un material biológico.

La invención se refiere además a un módulo de preparación de cartílago para uso en un dispositivo de procesamiento de células de cartílago.

La invención se refiere además a un método de procesamiento de células de cartílago.

Antecedentes de la invención

10 Las células primarias son células altamente especializadas presentes en los diversos tipos específicos de tejido en un organismo. Están involucradas en el mantenimiento, reparación y soporte de la función de dicho tejido. En la mayoría de las situaciones donde ocurre un defecto en el tejido vivo, se desencadena una reacción intrínseca o extrínseca. Las células primarias que están presentes en el tejido dañado pueden producir un crecimiento específico y otros factores que se secretarán al entorno del defecto. Esto tiene como objetivo desencadenar la proliferación de las células aún viables, por lo que el defecto puede llenarse. A continuación, si es necesario, las células pueden diferenciarse en el tipo de célula requerido para producir y mantener tejido especializado completamente funcional. Sin embargo, en muchos casos, la reacción de reparación del cuerpo no conduce o no completamente a un tejido funcional. Esto puede deberse a una variedad de razones, como el tamaño del defecto, la poca disponibilidad de células primarias en el sitio del defecto para soportar la función de reparación, o la falta de flujo de células multipotentes, que pueden diferenciarse al tipo de célula requerido, por ejemplo, a través del torrente sanguíneo. El cartílago articular cubre los extremos de los huesos largos de las articulaciones sinoviales y consiste en aproximadamente el 30% de proteínas de la matriz extracelular y aproximadamente el 70% de agua. Los condrocitos son el único tipo de célula que se encuentra en el cartílago articular normal, pero contribuyen con menos del 2% del peso húmedo en el tejido adulto humano sano. La matriz extracelular consiste predominantemente en moléculas de proteoglicano específicas de cartílago con glucosaminoglicano sulfatado altamente cargado (cadenas laterales GAG, así como fibrillas de colágeno tipo II). Las cadenas laterales GAG pueden unir moléculas de agua, secuestrando agua y generando una presión de hinchamiento interno dentro de la matriz del cartílago. Estas propiedades de tipo hidrogel son esenciales para los patrones de flujo de fluido intersticial observados dentro de la matriz durante la carga funcional del cartílago, en cuyo punto el agua es expulsada del tejido a una cantidad que permite que las cadenas de GAG cargadas negativamente se repelen entre sí. Tras la liberación de la carga de compresión, el agua se absorbe nuevamente en la matriz de tejido. La red de colágeno, junto con el GAG unido al agua, permite que el cartílago articular resista grandes cargas de compresión, lo que le da al tejido su función única en las articulaciones sinoviales: articulación suave y sin dolor, propagación de la carga aplicada sobre el hueso subcondral y absorción de golpes mecánicos. La matriz del cartílago articular maduro no está vascularizada ni inervada, y contiene condrocitos en cantidades bajas que no se dividen después de la madurez esquelética. Es en parte por esta razón que el cartílago articular no se repara espontáneamente o solo en un grado muy limitado. Los enfoques actuales para la reparación del cartílago se basan en la eliminación de restos de tejido, el acceso al sistema de cicatrización de heridas del hueso al penetrar en la placa ósea subcondral y el trasplante de tejidos y las terapias basadas en células. Las terapias clínicas actuales se limitan a las terapias basadas en células autólogas, como la implantación de condrocitos autólogos (ACI) y la mosaicoplastia (también conocidas como injertos osteocondrales autólogos). Debido a graves inconvenientes, ambas terapias actualmente solo pueden abordar una parte limitada del mercado de reparación de cartílago. Para la mosaicoplastia, una desventaja importante es la limitación a pequeños defectos debido a la disponibilidad limitada de tejido donante para trasplante. Para ACI, los inconvenientes incluyen la necesidad de realizar dos operaciones quirúrgicas, los altos costos debido al cultivo requerido de células in vitro y la pérdida del fenotipo de las células del cartílago. Las células del cartílago se diferencian tras la expansión celular, que es parte del proceso ACI. Por lo tanto, requieren varios meses después de la cirugía antes de recuperar su fenotipo original. Solo entonces puede comenzar la verdadera reparación del cartílago. Recientemente, se ha desarrollado una ACI de segunda generación que involucra condrocitos autólogos en una matriz de biomaterial. Esta técnica resuelve algunos de los problemas de ACI, particularmente el procedimiento quirúrgico largo y abierto que se requería en ACI. Sin embargo, quedan tres inconvenientes importantes: deben realizarse dos procedimientos quirúrgicos, altos costos y una larga rehabilitación. Por consiguiente, existe la necesidad de mejoras adicionales en el campo de la reparación de defectos tisulares, en particular para defectos que no se reparan o no se reparan suficientemente de manera espontánea.

55 El documento WO 2008/082829 describe una construcción de tejido de cartílago de capa única similar a hialina que incluye células condrogénicas dispersas dentro de una matriz extracelular producida endógenamente. La construcción de tejido de cartílago de una sola capa tiene un contenido de glucosaminoglicano sustancialmente igual al contenido de glucosaminoglicano del tejido de cartílago nativo. También se describe el método para generar una construcción de tejido de cartílago de capa única que incluye aislar una población de células condrogénicas y luego expandir la población de células condrogénicas. A continuación, la población de células condrogénicas se siembra

en un biorreactor que tiene un volumen definido por membranas permeables a los gases dispuestas de forma opuesta.

5 El documento JP2008212019 describe un dispositivo para descomponer el tejido del cuerpo vivo. El dispositivo está equipado con un recipiente para almacenar líquido digestivo que contiene una enzima digestiva para descomponer el tejido del cuerpo vivo y una cuchilla agitadora, que se sumerge en el líquido digestivo almacenado en el recipiente. La cuchilla de agitación agita el líquido digestivo al moverse relativamente con respecto al recipiente. El dispositivo comprende además un dispositivo de accionamiento para accionar la cuchilla agitadora y una parte que determina el estado de descomposición para determinar el estado progresivo de la descomposición del tejido del cuerpo vivo. El dispositivo de accionamiento está equipado con una fuente de accionamiento y un cuerpo elástico que conecta la fuente de accionamiento con la cuchilla agitadora. La parte que determina el estado de descomposición determina el estado progresivo de descomposición del tejido del cuerpo vivo, en función del retraso del movimiento de la cuchilla agitadora en relación con el movimiento de la fuente de accionamiento.

Sumario de la invención

15 Es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo eficiente de procesamiento celular. Más en particular, es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo de procesamiento celular capaz de permitir un tratamiento quirúrgico único de defectos de cartílago, por ejemplo, en una articulación de la rodilla. Aún más en particular, es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo de procesamiento de células de cartílago en el que sea posible la modificación personalizada de su arquitectura de hardware y/o del modo de operación.

20 Para este fin, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de procesamiento de células de cartílago de células modulares automatizado o semiautomatizado para preparar un vehículo de siembra celular a partir de un material biológico, dicho dispositivo comprende al menos un módulo de preparación de cartílago, un módulo de aislamiento de células, un módulo de mezcla de células y un módulo del vehículo de siembra de celular. En este dispositivo, el módulo de mezcla de células y el módulo del vehículo de siembra celular están integrados para proporcionar una sola unidad y el módulo de preparación de cartílago comprende un mezclador que comprende una cuchilla que puede girar en dos direcciones, cada dirección de rotación provoca un efecto sustancialmente único de la cuchilla en las células del cartílago.

25 Se apreciará que en una realización solo se pueden procesar células de cartílago. Alternativamente, el dispositivo según la invención puede funcionar para permitir el procesamiento de las células de cartílago y combinarlas con médula ósea cruda, células mononucleadas de médula ósea o células multipotentes de médula ósea u otros tejidos antes de la siembra. Para el vehículo adecuado se puede usar un armazón o gel.

30 Se encuentra que se pueden proporcionar beneficios clínicos sustanciales a los pacientes cuando el dispositivo de procesamiento de células de cartílago semiautomático o completamente automático basado en módulos de acuerdo con lo anterior se usa durante una intervención de reparación de cartílago, ya que se puede habilitar el tratamiento de cirugía única del cartílago de la rodilla.

35 A partir del documento WO 2006-051538 se conoce una realización de un dispositivo general de procesamiento celular. En el dispositivo conocido, se extraen células madre, en particular de células madre mesenquimales y/o hematopoyéticas. De acuerdo con el dispositivo conocido, se coloca una masa adecuada de tejido blando, por ejemplo, una placenta o un cordón umbilical en un recipiente sellable provisto de un disruptor de órganos dispuesto para romper una estructura del órgano, produciendo así una suspensión celular. El disruptor está dispuesto como un cuerpo giratorio, convertible o vibrátil.

40 Una realización adicional de un dispositivo de procesamiento celular se conoce por el documento US 2007-0148756. En el dispositivo conocido, se puede preparar una suspensión celular. Para este propósito, el dispositivo comprende un elemento de disociación móvil dispuesto dentro de un recipiente para enganchar un tejido para causar dicha disociación. El elemento de disociación puede implementarse como una cuchilla, un miembro dentado, un miembro que tiene rugosidad superficial, una hebra giratoria o un miembro que tiene las características de disociación 3D. Las cuchillas del dispositivo de disociación conocido pueden tener forma triangular con bordes de corte biselados. La cuchilla del dispositivo de disociación conocido se puede girar a una velocidad relativamente lenta para simplemente distribuir el tejido dentro del recipiente en lugar de cortarlo.

45 Debido al hecho de que el dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la invención comprende varios módulos separados, que pueden ser extraíbles y/o desechables, se puede construir un sistema de procesamiento celular automatizado o semiautomatizado personalizado que tenga una arquitectura flexible. Como resultado, un material biológico adecuado puede procesarse de forma totalmente automática en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago de acuerdo con la invención, de modo que el vehículo de siembra celular, como un armazón, gel u otro biomaterial implantable, pueda prepararse convenientemente manteniendo la esterilidad. Se considera ventajoso proporcionar módulos desechables, sin embargo, también es posible proporcionar una porción adecuada del dispositivo como un elemento reutilizable. Sin embargo, se apreciará que el uso de módulos desechables cerrados, preferiblemente asépticos, es ventajoso ya que se evita la manipulación manual del material biológico entre diferentes módulos separados mejorando la calidad sanitaria del

procedimiento en su conjunto. Sin embargo, también se permite un modo semiautomático, por ejemplo, cuando la transferencia se lleva a cabo utilizando un luerlock o una interfaz similar.

5 En general, a modo de ejemplo, el proceso de preparación del armazón puede verse como sigue. El cartílago adecuado se puede recoger y cortar, picar o procesar mecánicamente de una manera diferente para formar un cartílago picado. El cartílago picado puede procesarse adicionalmente para el aislamiento de condrocitos usando, por ejemplo, un proceso de digestión seguido de un proceso de aislamiento y lavado de las células deseadas. El material biológico así formado y preparado, que puede contener una suspensión celular tamponada adecuada, puede contarse junto con células adecuadas (células mononucleares y/o células multipotentes) que pueden prepararse usando glóbulos rojos filtrantes, eliminando plasma y lavando las células restantes. Se apreciará que las células mononucleares y/o las células multipotentes pueden derivarse de tejido, médula ósea o de cualquier otra fuente adecuada. Después de contar las células, el material biológico puede mezclarse, por lo que la cantidad de células puede determinarse adicionalmente antes del paso de mezcla. Después de completar el paso de mezcla, las células se pueden sembrar en un armazón preparado, que se puede dimensionar más o procesar antes de la implantación. Se proporcionarán más detalles sobre este proceso con referencia a la figura 1.

15 Se encuentra que es particularmente ventajoso integrar el paso de mezcla y el paso del vehículo de siembra celular en un módulo. Como resultado, no se requiere transporte de material biológico y se puede aumentar la precisión tanto de la mezcla como de la siembra.

20 Por ejemplo, al usar un depósito adecuado puede usarse para mezclar/sembrar que recoge células de un módulo adecuado del dispositivo de acuerdo con la invención después de que las células se hayan liberado. El depósito puede lograr una población homogénea de células. Se discutirán más detalles sobre esta realización con referencia a la figura 6.

25 Preferiblemente, la cortadora es una cortadora de cizalla que comprende una cuchilla. Sin embargo, se puede usar una pluralidad de cuchillas. La cuchilla puede fabricarse de un material plástico. Sin embargo, también se puede usar metal. El mezclador comprende una cuchilla que puede girar en dos direcciones. La cuchilla provoca un efecto sustancialmente único en las células del cartílago presentes en el mezclador. Por ejemplo, se puede usar una primera dirección de rotación para ejercer fuerzas de corte sobre el material biológico y la segunda dirección se puede usar para masajear y presionar el material biológico. Esto tiene la ventaja de permitir la preparación de una masa biológica sustancialmente homogénea. Sin embargo, la cortadora puede adaptarse para empujar el cartílago a través de una rejilla de cuchillas o cables de corte. El mezclador está adaptado para combinar un paso de corte con un paso de giro o rotación.

30 Como resultado, el mezclador está adaptado para combinar un paso de corte con un paso de mezcla o giro y rotación. Se darán más detalles sobre estas realizaciones con referencia a las figuras 3 y 4.

35 En otra realización adicional del dispositivo de procesamiento de células de cartílago, el módulo de aislamiento celular comprende un filtro que tiene un tampón de liberación y/o una unidad de centrifugación. Se discute una realización del módulo de aislamiento celular con referencia a la figura 5.

40 Preferiblemente, el contador es operable usando un principio seleccionado de: un volumen a través del flujo, una muestra de portaobjetos o una muestra a través del flujo. Se apreciará que se puede usar un módulo de conteo adecuado para contar las células aisladas y/o para contar las células de condrocitos. Preferiblemente, el recuento está adaptado para ser adecuado para contar tanto las células de condrocitos como las células. El recuento puede realizarse dentro de un período de tiempo relativamente corto, menos de un minuto, por ejemplo.

45 El método de conteo de volumen a través del flujo puede usarse en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención. Tal recuento puede llevarse a cabo cuando las células pasan a través de un orificio de precisión, que puede tener menos de 0.1 mm de diámetro. La restricción fuerza a las células en una sola fila. Puede ser preferible que un pasaje utilizado para acomodar el flujo celular esté adaptado para causar un flujo laminar. Este método de medición puede basarse en una variación en la impedancia eléctrica de un electrolito que comprende partículas a medida que pasan a través del orificio. Otro método de medición puede basarse en las propiedades ópticas de un haz de luz adecuado, como un láser, que incide en las células que se fuerzan en un solo archivo. El rayo láser puede causar un enfoque hidrodinámico. Cuando las células pasan en un flujo laminar e interceptan el rayo láser, la luz se dispersa, lo que puede ser monitoreado por un detector adecuado.

50 El método de conteo de muestras de portaobjetos se puede utilizar como alternativa. Sin embargo, se apreciará que los sistemas basados en portaobjetos pueden ser destructivos y pueden requerir cepas adicionales o colorantes fluorescentes, pero pueden realizar mediciones que son rápidas y reproducibles. El volumen de muestra requerido para llevar a cabo dicho conteo es de aproximadamente 20 microlitros. El número total óptimo de células requeridas para una prueba puede depender de la velocidad de conteo deseable. Preferiblemente, se pueden usar aproximadamente 40 células por cuadrante a un volumen de muestra de 20 microlitros produciendo una concentración mínima de muestra de 6000 células/ml.

- El método de muestra a través del flujo puede ser otra forma de realización adecuada de un método de recuento utilizado en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención. Este método requiere la preparación de una muestra representativa de la solución celular en términos de concentración y volumen celular, agregando los colorantes requeridos o etiquetas fluorescentes y pasándolo a través de un dispositivo de conteo y viabilidad, como un citómetro de flujo. Este método usualmente utilizaba etiquetas de anticuerpos fluorescentes en las células que se clasifican pasando células a través de una boquilla adecuada adaptada para romper la corriente de células en gotas. Se aplica una carga a las gotas así formadas y se clasifican por un campo eléctrico.
- 5 También es posible contar células usando un análisis de imagen de un portaobjetos teñido adecuadamente.
- En una realización ventajosa adicional, el módulo del vehículo de siembra celular está integrado con una unidad de mezcla. Preferiblemente, comprende al menos una jeringa parcialmente desechable o una punta de concentración. Se presentarán más detalles sobre esta realización con referencia a la figura 6.
- 10 En otra realización adicional del dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención, el módulo del vehículo de siembra celular está dispuesto para medir un volumen de la suspensión celular para no desbordar el vehículo usando un dispositivo de medición. Un contador y un dispositivo de medición pueden usarse para dos propósitos diferentes:
- 15 i) determinar el recuento celular;
- ii) para determinar el volumen de suspensión celular que se agregará al máximo a la suspensión celular de condrocitos.
- Se encuentra que esta característica es ventajosa, porque la precisión de la siembra automatizada con vehículos puede mejorarse en mayor medida. Por ejemplo, cuando el sistema detecta que no hay suficiente material biológico para preparar el vehículo de siembra celular deseado, se puede dar una señal de advertencia que indica que el número de conteo de una materia adecuada, por ejemplo, los condrocitos, no es óptima.
- 20 Se apreciará que, para mejorar los requisitos de esterilidad con respecto al procedimiento de preparación del armazón, al menos uno de los módulos del dispositivo de preparación de células de cartílago puede comprender antibióticos adecuados. Sin embargo, alternativamente, las soluciones utilizadas en el dispositivo de base modular según la invención pueden proporcionar antibióticos en su lugar.
- 25 En una realización adicional, en la que el material biológico comprende glóbulos rojos, el módulo de aislamiento celular es operable usando un método para lisar los glóbulos rojos, preferiblemente usando NH_4Cl .
- Por ejemplo, las células mononucleares pueden aislarse de los glóbulos rojos usando los siguientes pasos:
- 30 1. medir el volumen de la médula ósea y transferir el aspirado de médula ósea a un frasco estéril de 125 ml o 500 ml (médula ósea entera, más conocida como WBM).
2. si es necesario, retirar la muestra de médula ósea completa antes del procesamiento posterior (por ejemplo, cultivo de células, siembra de WBM, etc.).
- 35 3. si se requiere plasma de médula ósea, continuar con los pasos de centrifugación de médula ósea durante 20 minutos, 300 g a temperatura ambiente;
4. lisar las células diluyendo 50 veces usando tampón de lisis de glóbulos rojos (ejemplo: agregar a 1 ml de médula ósea 49 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos).
5. mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces y transferir a tubos de 50 ml para incubación a temperatura ambiente hasta que el líquido se vea rojo claro (aproximadamente 5-30 min).
- 40 6. centrifugar durante 2 minutos a 750 g, temperatura ambiente.
7. desechar el sobrenadante, que contiene el tampón de lisis y las células lisadas.
8. lavar las células volviendo a suspender el sedimento celular en un total de 50 ml de medio (por ejemplo, RPMI o DMEM, que contiene PenStrep), por tubo y centrifugar 2 min a 750 g, RT. deseche el sobrenadante y resuspender los sedimentos celulares en un total de 10-30 ml de medio + PenStrep. El volumen puede depender del conteo de WBM: por ejemplo, si es mucho
- 45 9. contar las células;
- diluir 10x pipeteando 50 μl de WBM + 450 μl de tampón de lisis de glóbulos rojos, incubar durante 5 a 10 min;

• tomar 20 µl de células lisadas + 20 µl de azul de tripán y contar: cuando sea difícil de contar debido al alto número de glóbulos rojos, repetir este paso con una nueva dilución: preparar una dilución de 50 x (20 µl de WBM + 980 µl de tampón de lisis de glóbulos rojos);

10. mantener las células a temperatura ambiente hasta un procesamiento adicional.

5 La invención se refiere además a un módulo de preparación de cartílago para uso en un dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos, en el que el módulo de preparación de cartílago comprende un mezclador como se define en la reivindicación 16.

Un método de procesamiento de células de cartílago, según la invención, comprende la siguiente secuencia de pasos automatizados:

- 10 - preparación de células de cartílago;
- aislamiento celular;
- mezcla de células usando las células de cartílago preparadas y las células aisladas;
- siembra de células en un vehículo usando dicha mezcla

15 en la que la mezcla de células y la siembra de células se lleva a cabo en un dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos automatizados o semiautomatizados como se define en la reivindicación 1.

20 Para el vehículo se puede usar un armazón, gel u otro portador implantable. Ejemplos adecuados del armazón, gel u otro vehículo implantable son poli (tereftalato de etilenglicol) (PEGT) y polímeros de poli (tereftalato de butileno) (PBT), armazón o gel de colágeno, armazones de ácido hialurónico esterificado, pegamento de fibrina, alginato, ácido hialurónico, PLGA, armazones o geles a base de PEG, vehículos de poliacrilamida, vehículos a base de dextrano como hidrogel reticulado de dextrano-tiramina y geles a base de autoensamblaje, y derivados de los mismos. Se apreciará que los ejemplos anteriores no son limitantes ni exhaustivos. Se apreciará además que se describen ejemplos adicionales de vehículos adecuados que se pueden practicar con la presente invención en una publicación de patente WO2005/087239 del Solicitante.

25 Estos y otros aspectos de la invención se discutirán adicionalmente con referencia a los dibujos en los que los números de referencia similares se refieren a elementos similares. Se apreciará que los dibujos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no se pueden usar para limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta de forma esquemática un esquema de bloques de pasos de procesamiento que se pueden usar en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención.

30 La figura 2 presenta una vista esquemática de la arquitectura global del dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención.

La figura 3 presenta de manera esquemática una realización de una cortadora de cizalla que puede usarse en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago de acuerdo con un aspecto de la invención.

35 La figura 4a presenta una vista esquemática de una realización de un mezclador que puede usarse en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención.

La figura 4b presenta una vista esquemática de una realización de una cuchilla mezcladora que puede usarse en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención.

La figura 5 presenta esquemáticamente una realización del módulo MNC para uso en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención.

40 La figura 6 presenta de manera esquemática una realización de un dispositivo de armazón de mezclar y sembrar células.

Descripción detallada de los dibujos

45 La figura 1 presenta de forma esquemática un esquema de bloques de pasos de procesamiento que se pueden usar en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención. En esta realización, se explicará uno de los muchos pasos posibles de procesamiento celular que usan el dispositivo de la invención que se muestra en la figura 2.

En el paso 2 se puede llevar a cabo la preparación del cartílago. Se apreciará que el corte de cartílago puede ser crítico para los siguientes parámetros del proceso:

- el tamaño de las piezas de cartílago que influyen en la velocidad con la que se liberan los condrocitos;
- la viabilidad de las células puede ser sensible a las condiciones de procesamiento, como el tamaño de las piezas de cartílago cortadas y el proceso de corte;
- la calidad de las células puede ser sensible a las condiciones de procesamiento, como el tamaño de las piezas de cartílago cortadas y el proceso de corte.

Se encuentra que un corte automatizado usando un dispositivo de corte adecuado es beneficioso para producir un alto rendimiento de células que tienen buena calidad. Las cuchillas de corte de plástico, que pueden usarse en una cortadora de cizalla o mezclador pueden ser ventajosas. Se encuentra que una cortadora de cizalla es capaz de producir piezas de cartílago con un tamaño sustancialmente constante.

- 10 Se usa un mezclador en la invención reivindicada para preparar las piezas de cartílago en el paso 2 de la figura 1. El mezclador puede ser ventajoso ya que es más rápido que la cortadora de cizalla. El mezclador puede comprender una cuchilla que está fabricada de, por ejemplo, material plástico o metálico. Una forma de la pala se puede adaptar para que no sea plana, por ejemplo, para que tenga forma de hélice. Además, la cuchilla está dispuesta para ser giratoria en dos direcciones, en el que en la primera dirección se cortará el cartílago y en la segunda dirección se masajearán las células produciendo una masa sustancialmente homogeneizada.

Otra ventaja al usar el mezclador es que puede integrarse con la mezcla de colagenasa y/o con un paso de digestión. Preferiblemente, el mezclador está sellado, lo cual es beneficioso en términos de esterilidad. El mezclador se puede adaptar para proporcionar tanto corte como agitación, lo que puede reducir el tiempo de digestión por debajo de 30-45 minutos, más o menos.

- 20 Se apreciará que el paso 2 como se describe con referencia a lo anterior puede llevarse a cabo usando un hardware dedicado fuera del dispositivo de acuerdo con la especificación como se muestra en la figura 2.

En el paso 4 se lleva a cabo el aislamiento de condrocitos, en un módulo del dispositivo automatizado de acuerdo con la invención. El paso de aislamiento de condrocitos puede ir acompañado de una digestión y un paso de lavado. Se encuentra que el aislamiento de condrocitos puede ser sensible a las condiciones de aislamiento que pueden afectar el número celular, la viabilidad celular, la calidad celular y el tiempo de digestión. Se encuentra que es preferible llevar a cabo el paso de aislamiento a una temperatura de 37 grados centígrados, utilizando un medio tampón, como MEM o RPMI, y un modo de mezcla optimizado.

- 25 En el paso 8, las células de condrocitos pueden contarse usando un método 8a de recuento adecuado, como se describe con referencia a lo anterior.

- 30 Paralelamente a los pasos 2 - 8, es posible llevar a cabo el paso 6 de la preparación de MNC, preferiblemente usando un módulo de preparación de MNC dedicado. El usuario puede agregar una biopsia de médula ósea, cualquier fluido requerido al módulo MNC para procesar las células MNC en, por ejemplo, RPMI.

El paso 6 puede incluir los pasos adicionales, como el paso de lisar o filtrar glóbulos rojos; separación de MNC del plasma, lisis con un tampón adecuado, etc. También se puede prever el lavado de células, así como la adición de un tampón de células adecuado, como RPMI.

- 35 El MNC aislado se sigue hasta la etapa de conteo en el paso 8, en el que el rendimiento de MNC se cuenta usando un contador 8b. Preferiblemente, el método de conteo usado para los condrocitos es el mismo que el método de conteo usado para las células MNC, de modo que se puede usar una etapa de conteo universal. Esto tiene la ventaja de simplificar la arquitectura del dispositivo en general.

- 40 En el paso 10 después de contar las células, se está produciendo la mezcla celular. Por ejemplo, todos los condrocitos pueden agregarse en este paso seguido de una medición adicional de la cantidad de MNC. Después de que las células se mezclan adecuadamente, se puede eliminar el exceso de tampón celular, como RPMI.

El paso 10 es seguido por el paso 14 de siembra de células en una preparación de armazón proporcionada en el paso 12. Se apreciará que se proporcionan ventajas particulares cuando los pasos de mezclar y sembrar se llevan a cabo utilizando el mismo módulo de hardware.

- 45 Después de sembrar el armazón preparado, el material biológico resultante puede procesarse adicionalmente, por ejemplo, puede dimensionarse e implantarse adecuadamente.

La figura 2 presenta una vista esquemática de la arquitectura global del dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención. El dispositivo 20 según la invención está adaptado para permitir un transporte continuo del material biológico entre los diferentes módulos del dispositivo de forma automatizada. Se apreciará que los módulos pueden ser desechables. Se apreciará además que al menos algunos de los módulos pueden estar integrados.

- 50

El dispositivo 20 comprende un módulo 21 de preparación de cartílago que comprende una unidad cortadora/digestor, un puerto de suministro de fluido para suministrar una enzima o un fluido de lavado. El módulo de preparación de cartílago puede tener un volumen interno de aproximadamente 5 ml. Un puerto de salida del módulo 21 de preparación de cartílago puede estar provisto de un filtro adecuado.

- 5 En esta realización, el dispositivo 20 comprende además un módulo 22 de MNC que comprende una unidad de aislamiento adecuada, tal como un filtro 23 y una bomba. El módulo MNC 22 está conectado a través de un conducto 22a con el módulo 29 para mezclar/sembrar provisto de una jeringa 29a.

El módulo 22 de MNC puede estar provisto además de un depósito 25 de residuos para recoger plasma, por ejemplo. El módulo MNC puede funcionar utilizando un filtro de afinidad o un dispositivo centrífugo adecuado.

- 10 El dispositivo 20 comprende además un depósito 24 adecuado para acomodar el tampón, tal como PMI que se usan durante el proceso de preparación de un material biológico para la siembra con armazones. La cortadora 26 de punta puede usarse para abrir la jeringa 29a cerrada del módulo 29 de mezclar y sembrar. Las células preparadas se siembran usando la jeringa 29a sobre una muestra 27a de armazón proporcionada en una mesa 27 de soporte de armazón desplazable. Preferiblemente, la mesa de soporte de armazón es giratoria y comprende una pluralidad de
15 nidos para acomodar diferentes muestras de armazón.

- La figura 3 presenta de manera esquemática una realización de una cortadora de cizalla que puede usarse en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago de acuerdo con un aspecto de la invención. La figura 3 en la vista 30a representa esquemáticamente un módulo de preparación de cartílago que comprende una cortadora/digestor 21, un módulo 22 de aislamiento MNC y un dispositivo 29 de mezclar/sembrar. De acuerdo con la
20 invención, el material biológico respectivo adecuado se transfiere automáticamente entre estos módulos del dispositivo de acuerdo con la invención, como se describe con referencia a la figura 2.

- La vista 30b representa esquemáticamente una realización de la unidad de corte/digestión, en la que el corte del cartílago se lleva a cabo utilizando cuchillas de corte. El uso de cuchillas de corte tiene la ventaja de que se proporcionan piezas de cartílago de tamaño sustancialmente igual. Para mejorar la liberación del cartílago de las
25 cuchillas, se puede proporcionar un recubrimiento específico sobre las mismas.

La vista 30c representa esquemáticamente una realización de un mezclador que puede ser adecuado para usarse en la unidad de corte/digestión 21. El mezclador puede estar provisto de una cuchilla fabricada de un material plástico. Se presentan más detalles sobre el mezclador con referencia a la figura 4a.

- La figura 4a presenta una vista esquemática de una realización de un mezclador 40 del módulo 21 de corte y digestión de cartílago discutido con referencia a la figura 2, que puede usarse en el dispositivo de procesamiento de
30 células de cartílago según la invención.

- El mezclador 40 comprende un puerto 41 de entrada de fluido y para suministrar enzima y/o líquido de lavado al volumen interno del mezclador. El volumen interno del mezclador puede ser de aproximadamente 5 ml. Las vistas 40a y 40b representan esquemáticamente una sección transversal del mezclador a lo largo de una línea horizontal. La cuchilla 44 está motorizada y está adaptada preferiblemente con una punta angulada que tiene una porción 42a
35 más larga y una porción 42b más corta. Se apreciará que la pala 44 puede ser un cuerpo sustancialmente plano, o, alternativamente, puede tener la forma de una hélice.

- En la vista 40a, se representa un primer modo de operación, en el que la cuchilla se mueve con la porción 42a más larga como extremo delantero. En este caso, la cuchilla ejercerá una acción de corte sobre las piezas de cartílago 43 y proporcionará una manera adecuada de cortar las piezas de cartílago para una digestión óptima.
40

En la vista 40b, se representa un segundo modo de funcionamiento de la cuchilla 44, cuando la cuchilla se mueve con su lado 42b más corto como el extremo delantero. Debido a que hay un espacio entre el extremo 42b más corto de la cuchilla y la pared 42 de la cortadora/digestor, dicho espacio es comparable con las dimensiones de las piezas 43 de cartílago, tal modo de rotación de la cuchilla ejercerá una acción de masaje sobre el cartílago.

- 45 Como resultado, cuando el primer modo y el segundo modo se alternan, se puede lograr una mejora del cartílago debido a dicha acción mecánica alterna sobre el material del cartílago.

- La figura 5 presenta esquemáticamente una realización del módulo de aislamiento MNC para uso en el dispositivo de procesamiento de células de cartílago según la invención. El módulo MNC de acuerdo con un aspecto de la invención comprende un depósito 51, que está conectado usando conductos 51a, 51b, 51c, 51d adecuados a
50 diferentes módulos y/o partes del dispositivo como se describe con referencia a la figura 2.

- En una realización preferida del módulo de aislamiento de MNC, está conectado a un filtro 52 de afinidad. El conducto 51b puede usarse para suministrar médula ósea al módulo 51 de aislamiento de MNC. El conducto 51d puede ser opcional para eliminar adicionalmente glóbulos rojos usando un paso de lavado. Se puede suministrar un fluido de liberación adecuado al filtro 52 de afinidad desde un depósito 53 conectado. Cuando se aíslan las células
55 MNC, los desechos se pueden descargar usando un depósito 54. El MNC aislado y cosechado puede suministrarse

usando el conducto 51c junto con el fluido de liberación suministrado desde el depósito 53 al dispositivo 29 de mezclar y sembrar, como se describe con referencia a la figura 2. El módulo MNC puede estar conectado a un contador de células adecuado, como se discute con referencia a lo anterior.

5 La figura 6 presenta de manera esquemática una realización de un dispositivo de armazón de mezclar y sembrar células. El módulo 60 de mezclar y sembrar de celda es preferiblemente un módulo comprende partes desechables. Aunque en el contexto del dispositivo como se representa en la figura 2, se prevé un transporte totalmente automatizado del material biológico entre los respectivos módulos del dispositivo, también es posible que solo el dispositivo de mezclar y sembrar esté completamente automatizado. Preferiblemente, el dispositivo de mezclar y sembrar comprende una centrífuga para proporcionar la mezcla celular en una jeringa 62 desechable. Se encuentra que es ventajoso proporcionar la jeringa 62 desechable, ya que simplifica la aplicación del armazón preparadas de células para la siembra a un paciente. Preferiblemente, antes en el armazón de siembra el material del armazón se hidrata. Más preferiblemente, el dispositivo de mezclar y sembrar está adaptado para controlar en línea el recuento de células y para proporcionar una señal de advertencia en caso de que no haya suficientes células para un armazón predeterminado, por ejemplo, para un armazón de 18 mm \varnothing . Dicha advertencia es ventajosa ya que el cirujano puede tomar una decisión adecuada si procede con el armazón predeterminado (18 mm) o si aborta el procedimiento. De esta manera, el número de células permite que un cirujano proporcione a un paciente un implante de reparación de cartílago eficaz. La jeringa 62 puede estar provista ventajosamente de una punta 62a rompible, que puede retirarse de la jeringa cuando las células se depositan allí dentro. Se apreciará que la longitud de la jeringa y el ángulo de su inclinación con respecto al cuerpo del dispositivo de mezclar y sembrar pueden optimizarse para lograr una deposición sustancialmente completa del material biológico dentro de la jeringa. Se encuentra que esto es ventajoso para minimizar aún más el desperdicio indeseable del valioso material biológico.

15 Se apreciará que los módulos que se analizan con referencia a las figuras 3 - 6 pueden formar parte integral del dispositivo de acuerdo con la invención, o alternativamente, pueden proporcionarse como elementos extraíbles y/o desechables. Se apreciará además que la invención se refiere tanto a los módulos individuales, como se describe con referencia a lo anterior, como al dispositivo que comprende estos módulos.

25 Aunque puede haberse hecho referencia específica con anterioridad al uso de realizaciones de la invención en el contexto del procesamiento de células de cartílago, se apreciará que la invención también se puede usar en otras aplicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos automatizados o semiautomatizados para preparar un vehículo de siembra celular a partir de un material biológico, que comprende al menos un módulo de preparación de cartílago, un módulo de aislamiento de células, un módulo de mezcla de células y un módulo del vehículo de siembra celular, en el que el módulo de mezcla de células y el módulo del vehículo de siembra celular están integrados para proporcionar una sola unidad;
- 5 en el que el módulo de preparación de cartílago comprende un mezclador que comprende una cuchilla que es giratoria en dos direcciones, cada dirección de rotación provoca un efecto sustancialmente único de la cuchilla en las células de cartílago.
- 10 2. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según la reivindicación 1, en el que el material biológico se transporta automáticamente entre dichos módulos.
3. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el vehículo de siembra celular comprende un armazón, un gel, o se basa en otros vehículos implantables seleccionados de un grupo que consiste en: polímeros PEGT/PBT, armazones de ácido hialurónico esterificado,
- 15 pegamento de fibrina, alginato, ácido hialurónico, PLGA, armazones o geles a base de PEG, vehículos de poliacrilamida, vehículos basados en dextrano y derivados de los mismos.
4. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el módulo de aislamiento de células está adaptado para operar usando las células mononucleares (MNC) o las células multipotentes.
- 20 5. El dispositivo de procesamiento de cartílago basado en módulo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material biológico comprende glóbulos rojos, el módulo de aislamiento celular está adaptado para operar usando un método para lisar los glóbulos rojos, preferiblemente usando NH_4Cl .
6. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una cortadora.
- 25 7. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cortadora es una cortadora de cizalla que comprende una cuchilla.
8. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según la reivindicación 6, en el que la cortadora está adaptada para empujar el cartílago a través de una rejilla de cuchillas o alambres de corte.
9. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según la reivindicación 1, en el que el mezclador está adaptado además para combinar un paso de corte con un paso de giro o rotación.
- 30 10. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según la reivindicación 1, en el que el módulo de aislamiento celular comprende un filtro que tiene un tampón de liberación y/o una unidad de centrifugación.
11. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el módulo de siembra de células está adaptado para medir un volumen de la suspensión de células para no desbordar el vehículo usando un contador o dispositivo de medición.
- 35 12. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el contador es operable usando un principio seleccionado de: volumen a través del flujo, una muestra de portaobjetos o una muestra a través del flujo.
- 40 13. El dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el módulo del vehículo de siembra celular integrado con el módulo de mezcla comprende al menos una jeringa parcialmente desechable o una punta de concentración de células desechables.
14. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos uno de los módulos comprende antibióticos.
- 45 15. Dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los módulos respectivos son reemplazables y/o desechables.
16. Un módulo de preparación de cartílago para usar en un dispositivo de procesamiento de células de cartílago de base modular según la reivindicación 1 para preparar un vehículo de siembra celular a partir de material biológico, en el que el módulo de preparación de cartílago comprende un mezclador que comprende una cuchilla que es giratoria en dos direcciones, cada dirección de rotación provoca un efecto sustancialmente único de la cuchilla en la celda de cartílago.
- 50

17. El módulo de preparación de cartílago según la reivindicación 16, que comprende además una cortadora en el que la cortadora es una cortadora de cizalla que comprende una cuchilla.

18. El módulo de preparación de cartílago según la reivindicación 16, en el que el mezclador está adaptado además para combinar un paso de corte con un paso de giro o rotación.

5 19. Un método de procesamiento de células de cartílago que comprende la siguiente secuencia de pasos automatizados o semiautomatizados:

- preparación de células de cartílago;

- aislamiento celular;

- mezcla de células usando las células de cartílago preparadas y las células aisladas;

10 - siembra celular en un vehículo utilizando dicha mezcla,

en el que la mezcla de células y la siembra de células se lleva a cabo en un dispositivo de procesamiento de células de cartílago basado en módulos automatizados o semiautomatizados de la reivindicación 1.

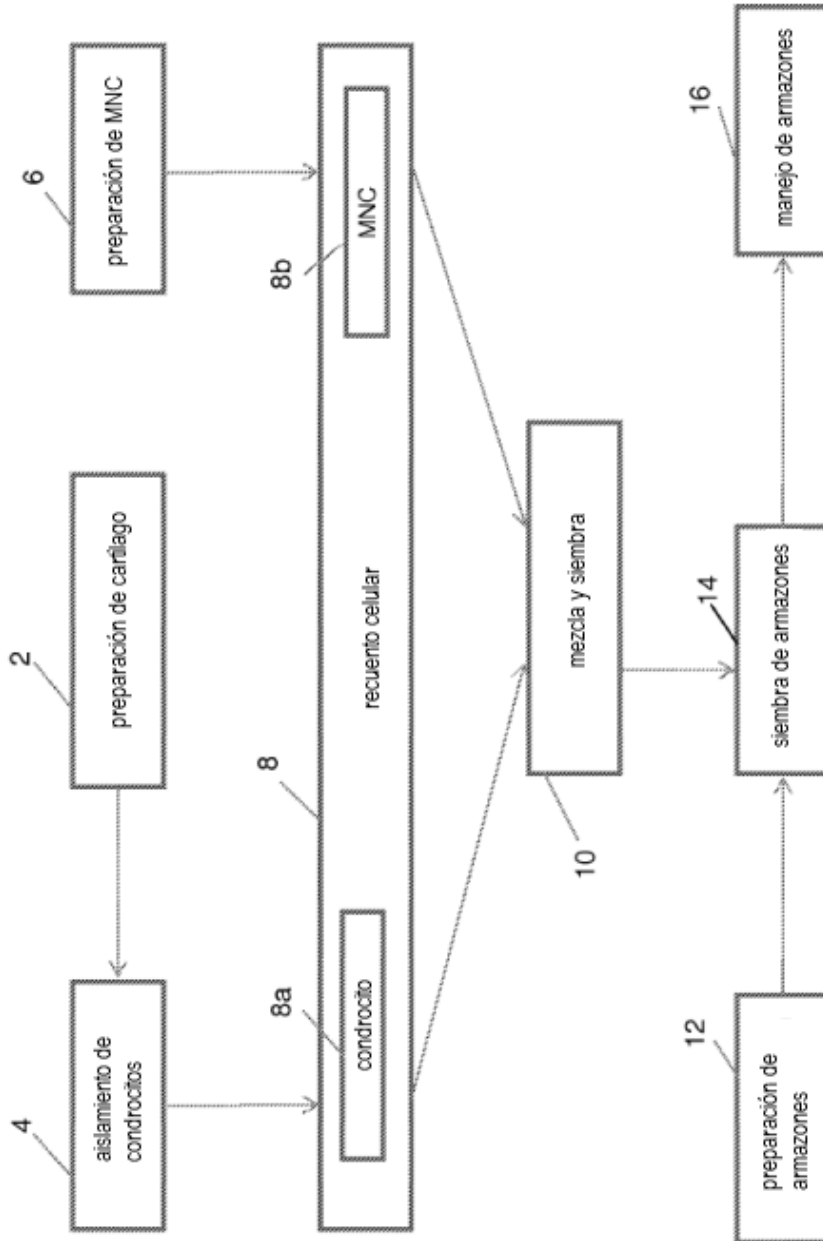


Fig. 1

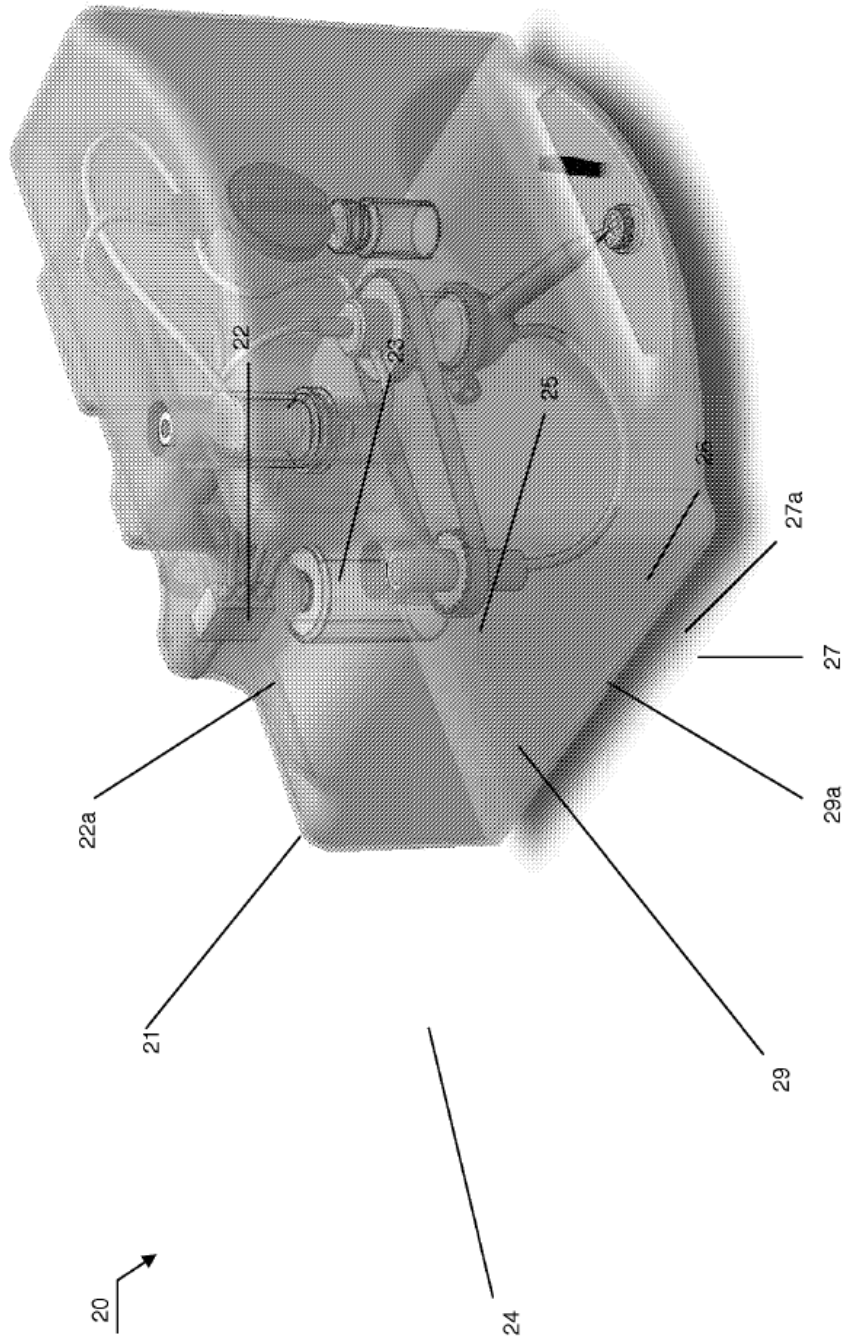


Fig. 2

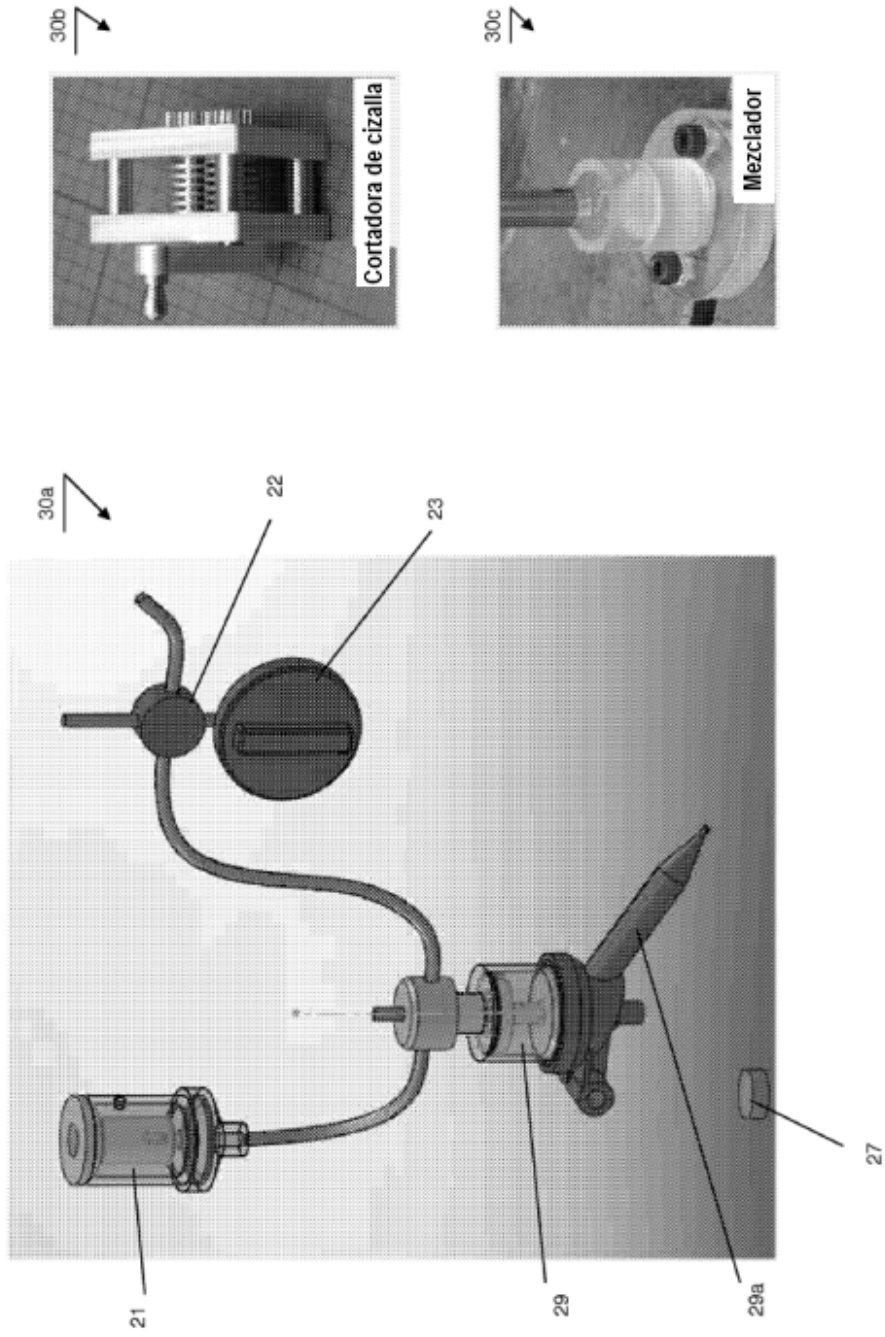


Fig. 3

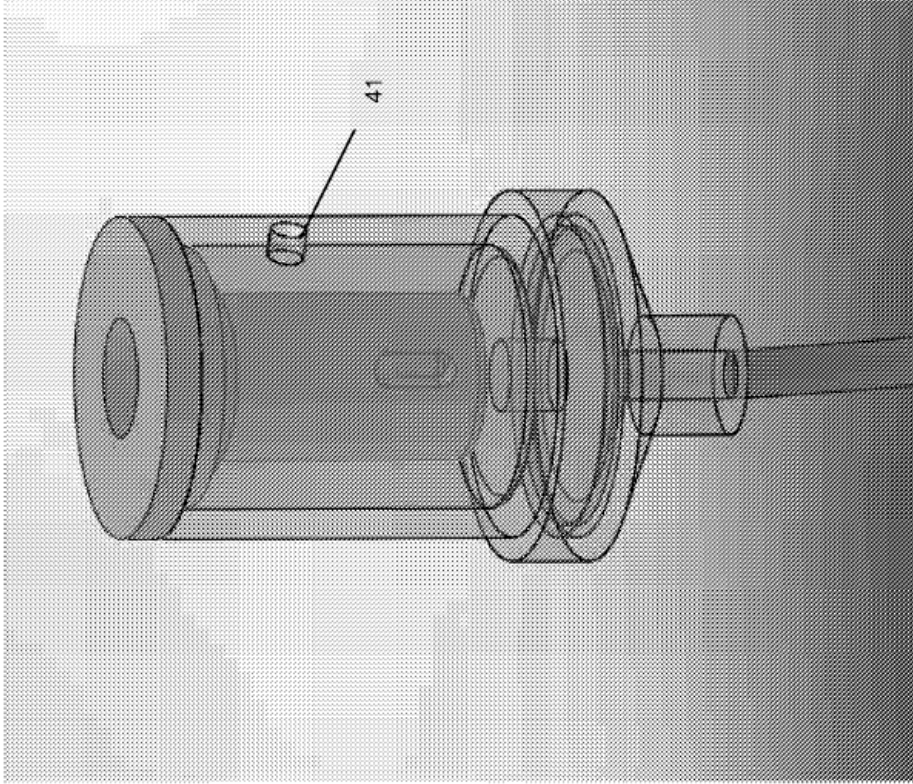
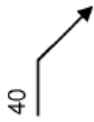


Fig. 4a



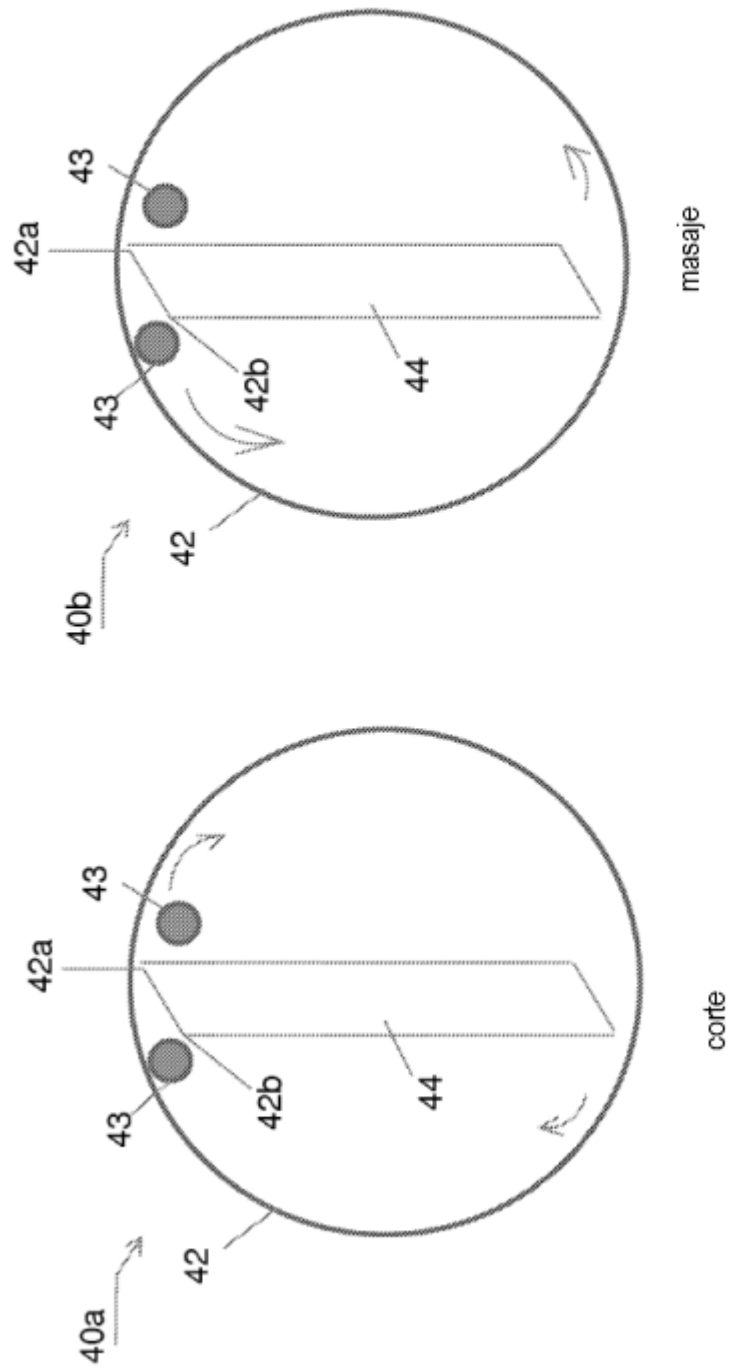


Fig. 4b

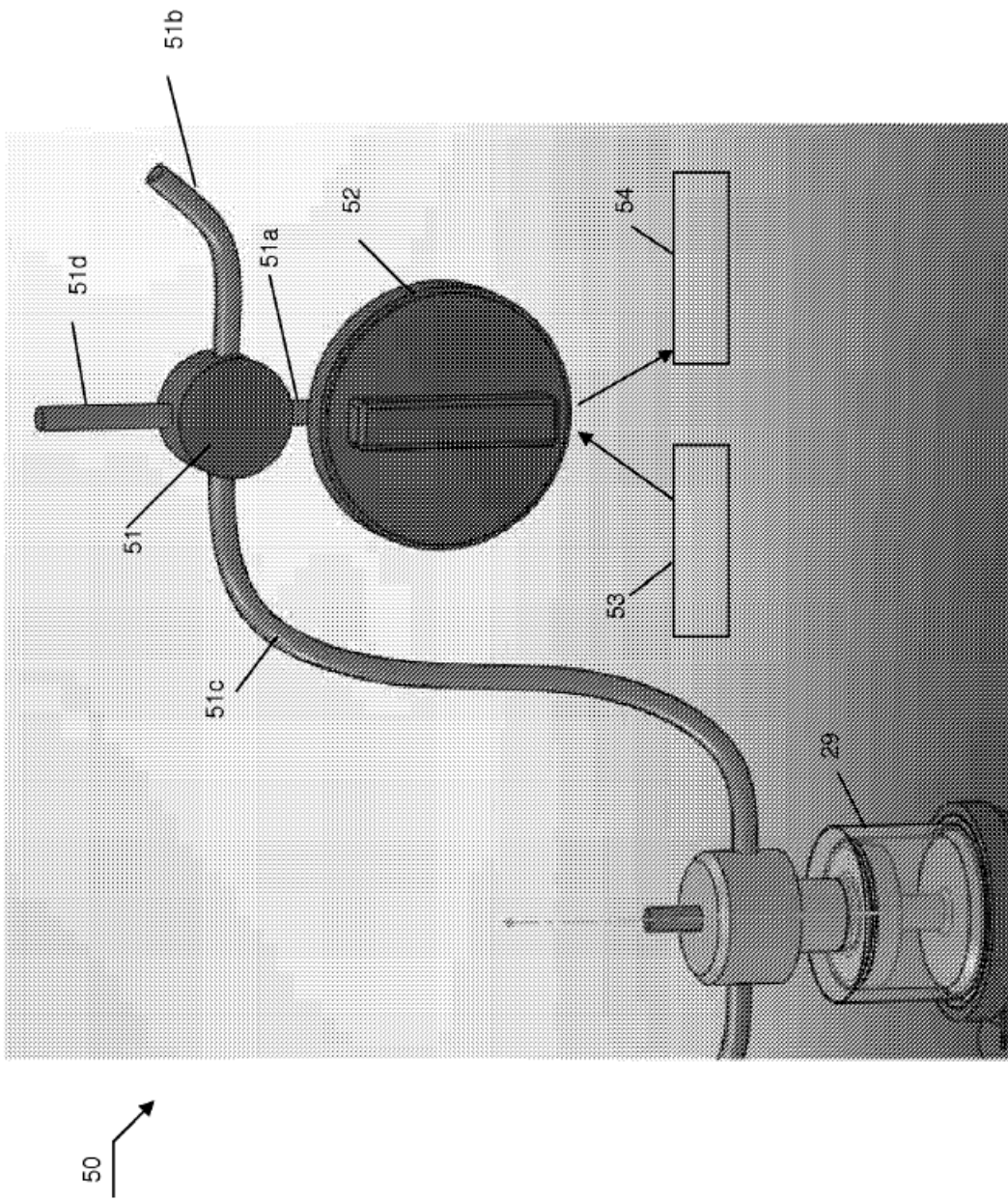


Fig. 5

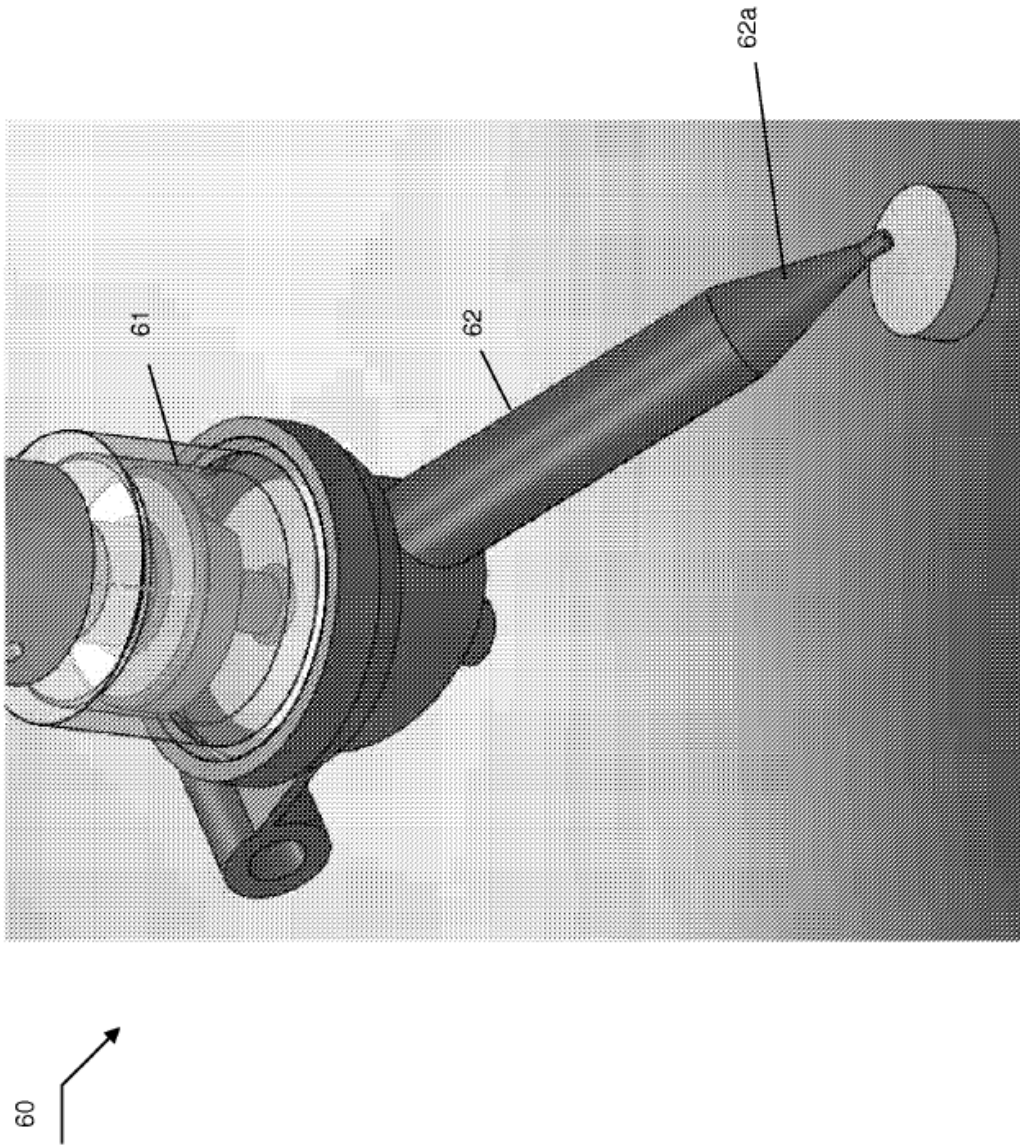


Fig. 6