

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 741**

51 Int. Cl.:

B04B 1/00 (2006.01)
B04B 5/04 (2006.01)
B04B 5/10 (2006.01)
B04B 7/12 (2006.01)
B04B 11/06 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/04 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13174604 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2821145**

54 Título: **Cámara de centrifugación con capas de membranas permeables a los gases para cultivo celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2020

73 Titular/es:
**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:
**KABAHA, EIAD;
PETERS, RALF-PETER y
MILTENYI, STEFAN**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 741 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 capas de membranas permeables a los gases para cultivo celular

La invención se refiere a una cámara para una centrífuga dispuesta con una pluralidad de capas que consisten en membranas permeables a los gases aplicadas sobre estructuras de soporte para cultivo celular mejorado y un procedimiento para el cultivo celular usando esta cámara.

Antecedentes de la invención

El fraccionamiento y la separación de las células de suspensiones como la sangre o la médula ósea se están convirtiendo cada vez más en parte del tratamiento médico. Para dicho tratamiento, se extraen células de un paciente, luego se las separa para dar las células diana deseadas, que generalmente son estimuladas/manipuladas/expandidas por el cultivo celular antes de introducirlas en el mismo paciente o en otro paciente. La extracción, preparación, fraccionamiento, separación, manipulación e introducción de las células deben realizarse lo más rápido posible para reducir el estrés impuesto sobre las células diana y los pacientes. Contrariamente a estos requisitos, el cultivo celular es un proceso laborioso y lento.

Técnica anterior

El fraccionamiento y la separación de las suspensiones celulares por centrifugación se conoce desde hace mucho tiempo en la técnica para separar muestras de origen biológico en dos o más componentes. Por ejemplo, la separación de la sangre humana en leucocitos, eritrocitos y plasma sanguíneo es un procedimiento que se realiza a menudo y puede llevarse a cabo en aparatos semiautomatizados, tal como se describe en los documentos US 6.605.223, US 4.446.014 o US 81.242.342. Estas publicaciones guardan silencio sobre el cultivo celular.

Los documentos WO 2009/072006 y WO 2009/072003 describen un sistema de centrifugación con cámaras de centrifugación adecuadas para la separación celular. La cámara puede estar dispuesta con capas para adherir y cultivar las células separadas. Los documentos WO 2009/072006 y WO 2009/072003 guardan silencio sobre las condiciones de cultivo celular y la provisión de gases y nutrición a las células. Este sistema de centrifugación y/o cámaras de centrifugación está optimizado para la separación celular en lugar del cultivo celular de las células separadas.

Dado que las nuevas terapias celulares requieren no solo de la separación de las células diana, sino también de la expansión de las células diana para proporcionar un número suficiente de células, un objeto de la invención es disponer de cámaras de centrifugación que permitan la separación celular y el cultivo celular en la misma cámara de centrifugación y de un procedimiento automatizado. Un punto crucial en el cultivo celular es la provisión de gases tales como oxígeno o dióxido de carbono, a las células.

El objeto de la presente invención es disponer de una cámara centrífuga que permita el cultivo celular y la separación celular en un único recipiente sin manipulación manual de las células.

Objeto de la invención

En consecuencia, un objeto de la invención es disponer de una cámara centrífuga que comprenda un cilindro con una placa base y una placa de cubierta, un eje geométrico de rotación con al menos un orificio para la entrada y/o salida de líquidos, al menos un orificio para la entrada y/o salida de gases y una pluralidad de capas para el cultivo celular, en donde la pluralidad de capas para el cultivo celular forman una pila en donde cada capa consista en una membrana permeable a los gases sobre la cual se cultivan las células aplicadas sobre una estructura de soporte en la que las capas están interconectadas con las capas adyacentes o los orificios para la entrada y/o salida de gases por al menos una abertura para permitir la transferencia de gases entre capas. La expresión "cultivo celular en la membrana permeable a los gases" de acuerdo con la invención se refiere a todos los métodos en los que las células se mantienen fisiológicamente activas y, opcionalmente, se modifican. La modificación puede resultar, por ejemplo, en un cambio de fenotipo, función, número o estado de diferenciación de las células. El cultivo celular en la membrana permeable a los gases de acuerdo con la invención puede conducir a:

- a) división celular, diferenciación o proliferación celular,
- b) activación de una cascada de transducción de señales,
- c) cambio del estado de activación celular y/o función celular,
- d) modificación genética de células,
- e) crecimiento de capas de tipos celulares diferentes o idénticos que implica un contacto célula-célula.

En la cámara centrífuga de acuerdo con la invención, las membranas permeables a los gases se aplican sobre una estructura de soporte. En consecuencia, la membrana permeable a los gases tiene una primera superficie en la que se cultivan las células ("lado de las células") y una segunda superficie a la que se suministran los gases ("lado de los

gases"). Para suministrar las células, el gas migra desde el lado de los gases de la membrana al lado de las células.

5 La primera membrana permeable a los gases (en la dirección del flujo de gas) puede aplicarse sobre la placa base de la cámara o sobre una primera estructura de soporte. Al menos un orificio para la entrada de gases de la cámara está conectado a la primera membrana permeable a los gases, lo que significa que los gases pueden suministrarse al volumen entre la primera membrana permeable a los gases y la placa base o al volumen entre la membrana permeable a los gases y la primera estructura de soporte.

10 La primera membrana permeable a los gases (como se ve en la dirección del flujo) puede aplicarse sobre la placa base de la cámara o sobre una estructura de soporte. Al menos un orificio para la entrada de gases de la cámara está conectado a la membrana permeable a los gases, lo que significa que los gases pueden suministrarse al volumen entre la membrana permeable a los gases y la placa base o al volumen entre la membrana permeable a los gases y la estructura de soporte.

15 La Figura 1 muestra una cámara centrífuga patrón de acuerdo con la técnica anterior, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 2009/072006 o WO 2009/072003. Esta cámara centrífuga está dispuesta con dos orificios de entrada/salida en el eje geométrico de la cámara conectados a través de tubos a las aberturas en el interior de la cámara y las capas para el cultivo celular. Las células reciben gas y medios de cultivo celular a través de los orificios de entrada/salida y por difusión, a través del líquido en toda la cámara. La provisión de gases a las células en dicho sistema será insuficiente y/o no homogénea ya que las células en la periferia de las capas o adyacentes a los orificios de entrada/salida estarán mejor abastecidas que las células adheridas más hacia el eje geométrico de rotación.

Descripción general de la cámara de centrifugación de la invención

20 La cámara de acuerdo con la invención comprende una placa base circular y una placa de cubierta circular, ambas orientadas sustancialmente perpendiculares a un eje geométrico de rotación; y un cilindro o una pared que está orientada sustancialmente perpendicular a la base y a la placa de cubierta de tal manera que la placa base, la placa de cubierta y el cilindro se pueden pegar o soldar entre sí de manera estanca al agua y al gas. De este modo, se forma una cámara de centrifugación cerrada que consta de una parte inferior en forma de recipiente y una parte superior en forma de tapa.

25 La Figura 2 muestra, a modo de ejemplo, cámaras de centrifugación de acuerdo con la invención. Las cámaras comprenden una pila de capas para el cultivo celular (1), en donde las capas consisten en membranas permeables a los gases aplicadas sobre estructuras de soporte. Los gases se distribuyen homogéneamente en todo el volumen entre las membranas y la estructura de soporte respectiva y pueden suministrar las células por difusión a través de las membranas permeables a los gases. Los gases pueden entrar en la cámara a través de al menos un orificio (2) al volumen entre la primera capa. El gas que no es consumido por las células puede salir de la cámara a través del orificio (3) en la placa de cubierta. Las capas en la pila están interconectadas por las aberturas 4 y 5 para permitir que el gas fluya a través de la cámara.

35 La cámara de centrifugación de acuerdo con la invención puede usarse como o en un sistema de procesamiento celular y/o el procedimiento de la invención. Por ejemplo, el procesamiento celular de acuerdo con la invención puede realizarse expandiendo primero una muestra de células mediante cultivo celular. La suspensión celular resultante puede separarse posteriormente en dos o más fracciones por centrifugación. El procedimiento de separación puede implicar una o más etapas de lavado y las células diana deseadas pueden expandirse en una etapa de cultivo adicional.

40 En otra variante, el procesamiento celular de acuerdo con la invención implica el enriquecimiento del objetivo deseado para una célula de muestra celular en una primera etapa de centrifugación que incluye una o más etapas de lavado para eliminar las células no deseadas. La fracción celular así enriquecida comprende las células deseadas que luego pueden expandirse mediante una etapa posterior de cultivo celular.

La cámara de centrifugación de acuerdo con esto es especialmente adecuada para procesar células que se originan en la sangre o en la médula ósea, tales como muestras de leucoféresis o similares.

45 **Descripción detallada de la cámara de centrifugación de la invención**

Membrana permeable a los gases

La membrana permeable a los gases de acuerdo con la invención sirve como capa para el cultivo celular. La provisión de las células en la cámara centrífuga de la invención se logra mediante una difusión de gases a través de la membrana.

50 La membrana permeable a los gases se puede fabricar de poliestireno, silicona, tal como el producto SILPURAN 6000/50 o SILPURAN 2450 (Wacker Chemie AG), película de polimetilpenteno o carbono y se puede formar por pegado, soldadura o prensado sobre la estructura de soporte o sobre la placa base de la cámara de manera estanca al agua y al gas.

Para mejorar la distribución homogénea de los gases a la membrana permeable a los gases, la membrana permeable

a los gases puede estar dispuesta con una pluralidad de elementos espaciadores o canales en su lado de los gases. Los elementos espaciadores o canales de la membrana permeable aseguran un volumen suficiente y/o un espacio definido entre la membrana y la estructura de soporte o la membrana y la placa base para mejorar la distribución de gases sobre la superficie de la membrana.

5 Los elementos espaciadores pueden tener forma de puntos, texturas o taqués o similares y tener una altura de 0,1 a 0,5 mm. Los canales pueden tener una profundidad y una anchura de 0,1 a 0,5 mm y pueden estar dispuestos en cualquier forma geométrica tal como forma de espiral, red o laberinto. La Figura 6 muestra, a modo de ejemplo, una membrana permeable a los gases con una pluralidad de elementos espaciadores (14) para disponer un volumen (15) entre la membrana y la estructura de soporte (2). Naturalmente, los canales de los elementos espaciadores están orientados entre la membrana permeable a los gases y la estructura de soporte o la placa base y no están en contacto con las células.

La membrana permeable a los gases tiene preferiblemente una transparencia óptica adecuada para microscopía óptica, es decir que tiene una turbidez y una transmitancia de luz comparables al vidrio. La superficie de la membrana permeable a los gases debe ser lo más lisa posible para este fin.

15 Dado que las capas en la pila están interconectadas por aberturas, las membranas también están dispuestas con aberturas. La Figura 4 muestra una membrana (8) dispuesta con elementos espaciadores (9) y aberturas (4, 5) para la transferencia de gases entre las capas. Las aberturas pueden estar dispuestas con respiraderos, ya sea como válvulas de retención o válvulas que se abren a cierta presión de gas.

Estructura de soporte

20 Las estructuras de soporte dan a las membranas permeables a los gases una estabilidad mecánica suficiente en condiciones de centrifugación y proporcionan un volumen definido debajo de la membrana. La primera estructura de soporte está ubicada en o sobre la placa base. En alternativa a una primera estructura de soporte, la placa base puede usarse como primer soporte para la primera membrana permeable a los gases.

25 Para permitir la extracción de líquidos de la cámara a través de las aberturas conectadas al orificio para la entrada y/o salida de líquidos en el eje geométrico de rotación, la estructura de soporte está dispuesta con orificios o aberturas en los lugares apropiados. Si la cámara está dispuesta con deflectores en las aberturas, la estructura de soporte está dispuesta con aberturas o bien con orificios para los deflectores o los deflectores están unidos a la estructura de soporte.

30 Para mejorar la distribución homogénea de los gases a las membranas permeables a los gases, las estructuras de soporte pueden estar dispuestas con una pluralidad de elementos espaciadores o canales. Los elementos espaciadores pueden tener forma de puntos, texturas o taqués o similares y tener una altura de 0,1 a 0,5 mm. Los canales pueden tener una profundidad y una anchura de 0,1 a 0,5 mm y pueden estar dispuestos en cualquier forma geométrica, tal como forma de espiral, red o laberinto. La Figura 8 muestra, a modo de ejemplo, dos estructuras de soporte con canales.

35 Las estructuras de soporte tienen preferiblemente una transparencia óptica adecuada para microscopía óptica, es decir que tiene una turbidez y una transmitancia de luz comparables al vidrio. Las superficies de la estructura de soporte deben ser lo más lisas posible para este fin.

40 Dado que las capas en la pila están interconectadas por aberturas, las estructuras de soporte también están dispuestas con aberturas. La Figura 5 muestra una membrana (7) permeable a los gases unida a una estructura de soporte (8), cada una dispuesta con aberturas (4) y (5) para la transferencia de gases entre las capas. Las aberturas pueden estar dispuestas con respiraderos, ya sea como válvulas de retención o válvulas que se abren a cierta presión de gas.

Pila de capas para el cultivo celular

45 La cámara de acuerdo con la invención comprende una pila de capas para el cultivo celular, consistiendo cada capa en una membrana permeable a los gases aplicada sobre una estructura de soporte. Preferiblemente, la pila comprende de 2 a 20 capas, más preferiblemente entre 5 y 10. Las capas pueden tener una distancia entre sí de entre 2 y 10 mm, preferiblemente de 2 a 5 mm. La Figura 3 muestra un ejemplo de tal pila.

50 Para disponer de un flujo suficiente de gas a través de la cámara, es decir, entre las capas, las membranas permeables a los gases y las estructuras de soporte pueden estar dispuestas con aberturas con un cuello que encaja dentro o en el cuello de la siguiente capa. Por ejemplo, el cuello de las aberturas de la estructura de soporte puede tener un diámetro mayor que el cuello de las aberturas de las membranas permeables a los gases adyacentes. Dichos cuellos se pueden apilar entre sí, disponiendo así de un canal estanco a los gases que conecta las capas en una pila. Las Figuras 4 y 5 muestran aberturas de la estructura de soporte y membranas permeables a los gases que tienen cuellos con diferentes diámetros.

55 Es posible dirigir los gases en una ruta predefinida sobre las capas o a través de la pila disponiendo las aberturas en la estructura de soporte y las membranas permeables a los gases en una condición abierta o cerrada. En otra

realización de la invención, las capas (que consisten en una estructura de soporte y una membrana permeable a los gases) están dispuestas con dos aberturas que tienen cuellos, uno de los cuales está cerrado y el otro en estado abierto. Al apilar tales capas entre sí de manera que una abertura cerrada esté encima de una abierta, los gases son empujados en zigzag a través de la cámara. La Figura 7a muestra esta realización, donde los gases (representados con una línea punteada) entran en la primera capa a través del orificio 3 y son guiados por las aberturas 4 y 5 a través de todas las capas hasta salir de la cámara por las aberturas 6. La Figura 7c muestra un primer plano del paso de gas a través de 4 capas.

En una realización alternativa de la invención, las capas (que consisten en una estructura de soporte y una membrana permeable a los gases) están dispuestas con dos aberturas que tienen cuellos, de los cuales ambos están en estado abierto. La Figura 7b muestra esta realización, donde los gases (representados con una línea punteada) entran en la primera capa a través de los orificios 3 y son guiados a través de las aberturas 4 y 5. En esta realización, la cámara puede someterse a una presión de gas constante cerrando las aberturas 6 (o disponiendo respiraderos apropiados en las aberturas 6) y suministrando gas nuevo a través del orificio 3. El gas se distribuye a través de la cámara/capas de acuerdo con el consumo de las células.

La pila de capas para el cultivo celular se puede fijar en el eje geométrico de rotación de la cámara. De este modo, la pila se somete a la misma velocidad de rotación que la cámara/el eje geométrico de rotación. En una primera variante de esta realización de la invención, las células se adhieren a la membrana y pueden cultivarse en las capas a baja velocidad de rotación de la cámara. A velocidades de rotación más altas, las células son eliminadas por las fuerzas centrífugas de las membranas y quedan suspendidas en los medios de cultivo celular. Las células suspendidas pueden separarse unas de otras por centrifugación de la cámara de acuerdo con su respectiva velocidad de sedimentación.

En una segunda variante de esta realización de la invención, la pila no está fijada en el eje geométrico de rotación de la cámara, sino que puede girar libremente alrededor del eje geométrico de rotación de la cámara. En esta variante de la invención, los medios celulares se distribuyen a través de la cámara por rotación de la capa con respecto a la cámara. La pila no permanecerá en reposo sino que girará lentamente de forma similar al movimiento de un fermentador de rodillos.

En una tercera variante de esta realización de la invención, la pila no está firmemente fijada en el eje geométrico de rotación de la cámara, sino que puede girar aproximadamente un cuarto a la mitad de una vuelta hasta que se bloquee la rotación libre adicional. En esta variante, la cámara puede cambiar su dirección de rotación con frecuencia y las células son alimentadas por medios celulares que se distribuyen por el movimiento de la cámara. A velocidades de rotación más altas, la rotación libre de la pila se bloquea y las células son eliminadas de la superficie debido a las fuerzas de corte. Después de dispersarse en los medios de cultivo celular, las células pueden separarse unas de otras por centrifugación de la cámara de acuerdo con su respectiva velocidad de sedimentación.

Cámara de centrifugación

La cámara puede tener un diámetro interno de 2 cm a 20 cm, preferiblemente de 8 a 15 cm y una altura interna de 5 mm a 10 cm, preferiblemente de 2 cm a 7 cm. El volumen total de la cámara puede ser entre 10 cm³ y 2.000 cm³, preferiblemente entre 200 cm³ y 1.000 cm³.

La cámara de la invención consiste en un cilindro, una base y una placa de cubierta y se muestra en la Figura 9 (que omite la pila de capas). El cilindro, la base y la placa de cubierta pueden ser objetos redondos o circulares para simplificar su producción y reducir cualquier desequilibrio durante el procedimiento de centrifugación. En otra realización, al menos el cilindro puede tener una forma ligeramente elíptica, con un diámetro en una primera dimensión que es de 0,5 a 10, preferiblemente de 0,5 a 5% más grande que en una segunda dimensión orientada perpendicularmente a la primera dimensión. Por ejemplo, el cilindro puede tener, en una primera dimensión, un diámetro de 120 mm y en una segunda dimensión orientada perpendicular a la primera dimensión, un diámetro de 122 mm.

La base y la 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 del cilindro en la dirección de la dimensión más grande del cilindro, es decir, cerca de las aberturas.

La cámara y las estructuras de soporte pueden estar hechas de varios materiales tales como cerámica, poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo, policarbonato, vidrio, poliácrlato, poliácrlamida, polimetilmetacrilato (PMMA) y/o polietilentereftalato (PET). El politetrafluoretileno (PTFE) y/o el poliuretano termoplástico (TPU), la silicona o composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente. Además, la cámara puede comprender o estar hecha de material biodegradable tal como colágeno, quitina, alginato y/o derivados de ácido hialurónico, polilactida (PLA), alcohol polivinílico (PVA), oligilcolida (PGA) y sus copolímeros.

El procesamiento celular de acuerdo con la invención implica la separación de la suspensión celular en dos o más fracciones por centrifugación. Después de separar las fracciones celulares, se eliminan los líquidos no deseados o las suspensiones celulares de la cámara a través de aberturas en la placa base y/o la placa de cubierta y a través de los

orificios de entrada/salida. Una etapa de separación celular puede comprender opcionalmente una o más etapas de lavado en donde los líquidos de lavado se separan de la centrifugación en suspensión celular y posteriormente se eliminan a través de las aberturas y los orificios de entrada/salida de líquidos de la cámara.

5 La adición y eliminación de la suspensión celular, líquidos de nutrición y/o líquidos de lavado desde/hacia la cámara de centrifugación son posibles a través de los orificios de entrada/salida de líquidos que están conectados a las aberturas apropiadas en la cámara.

10 Las aberturas de la cámara (por ejemplo (7) y (8) en la Figura 9) se pueden configurar como agujeros o entradas en línea y su posición en la cámara de centrifugación se puede configurar de modo 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, se pueden colocar las aberturas de manera que se logre la eliminación y/o detección más rápida de una capa en particular. Además, se puede optimizar el tamaño de las aberturas para la capa deseada, por ejemplo, en vista del tamaño de las células diana y/o del flujo de volumen optimizado.

15 En caso de que el cilindro tenga una forma ligeramente elíptica, se prefiere que las aberturas con deflectores estén orientadas 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 del cilindro en la dirección de la dimensión más grande del cilindro, es decir, cerca de las aberturas.

20 En una realización adicional, la cámara de acuerdo con la invención comprende un medio para controlar el avance de la separación de la muestra, colocada en la placa base o en la placa de cubierta de la cámara. Los medios para controlar el avance de la separación de la muestra se colocan preferiblemente en un canal o en un espacio situado en la placa base o en la placa de cubierta de la cámara de modo que la muestra pueda entrar en el canal o espacio durante la centrifugación y, por lo tanto, sea detectable. Debido a la fuerza centrífuga, los diferentes componentes de la muestra formarán capas que son detectables por la luz, por ejemplo, con una cámara o un detector de luz. De este modo, se genera una señal que permite determinar cuándo se completa la formación de la capa o la separación de la muestra. Los medios adecuados para controlar el avance de la separación de la muestra se describen en los documentos WO 2009/072006 o WO 2009/072003.

25 La cámara de centrifugación se puede usar para procedimientos de separación celular, con fines de cultivo celular y para el procesamiento adicional de las células que crecen allí. La cámara permite realizar una amplia gama de métodos de cultivo celular, como el crecimiento de células, la separación, el lavado, el enriquecimiento de las células o diferentes tipos de células, u otros métodos. Para este propósito, la cámara puede comprender más aberturas de entrada/salida, por ejemplo, para gases, medios de cultivo celular o similares. Las condiciones de cultivo celular son conocidas en la técnica.

30 El procedimiento de cultivo celular con la cámara de la invención con o sin condiciones de centrifugación se lleva a cabo hasta que se alcanza el número deseado de células diana o se agota la capacidad de la capa. La duración del procedimiento depende de las células diana deseadas y no está limitada. Habitualmente, el procedimiento para el cultivo celular puede tomar entre 1 y 24 horas.

35 La centrifugación se lleva a cabo preferiblemente entre 10 y 2.000 x g, preferiblemente entre 100 y 500 x g. En una realización preferida, la cámara se puede calentar y enfriar para dar una temperatura apropiada para la muestra que se centrifuga. Para este fin, se pueden ubicar medios de calentamiento y/o enfriamiento en la cámara o alrededor de la cámara.

Cámara con deflectores para un procedimiento de separación mejorado

El procedimiento general del procesamiento celular puede mejorarse o acelerarse mediante modificaciones en la cámara, especialmente al disponer deflectores en las aberturas de los orificios de entrada/salida de líquidos a la cámara.

45 En otra realización de la cámara centrífuga de acuerdo con la invención, al menos un orificio para la entrada y/o salida de líquidos está conectado a aberturas ubicadas en la placa base y/o placa de cubierta en el interior de la cámara centrífuga y al menos una abertura está dispuesta con al menos un deflector que tiene una anchura en su base de como máximo 1/10 de la circunferencia interna del cilindro.

50 En una primera realización de la invención, al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura y el cilindro. Ubicado allí, este deflector protege la abertura del volumen entre la abertura y el cilindro y evita, 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 de la cámara. Esta realización se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 9 (que omite la pila de capas) con la abertura (7) y el deflector (6). En esta realización, la cámara puede estar dispuesta con 2, 4, 6 u 8 aberturas tanto en la base como en la placa de cubierta.

55 En una segunda realización, al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura y el eje geométrico de rotación del cilindro. A diferencia de la primera realización, este deflector protege la abertura del volumen de la cámara

entre la abertura y la pared del cilindro y evita la succión de líquido de este volumen al drenar el volumen interno de la cámara. Esta realización se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 9 (que omite la pila de capas) con la abertura (8) y el deflector (9). En esta realización, la cámara puede estar dispuesta con 2, 4, 6 u 8 aberturas tanto en la base como en la placa de cubierta.

5 En una tercera realización de la invención, la cámara comprende deflectores en ambas ubicaciones de la primera y segunda realizaciones de la invención, es decir, al menos un deflector está ubicado entre al menos una abertura y el cilindro y al menos una abertura de un segundo tubo y el eje geométrico 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 9 (que omite la pila de capas) muestra esta realización de la invención con la abertura (7, 8) y el deflector (6, 9). En esta realización, la cámara puede estar dispuesta con 2, 4, 6 u 8 aberturas tanto en la base como en la placa de cubierta.

10 En la tercera realización de la invención, las dos aberturas de la cámara están conectadas o dan acceso a dos volúmenes diferentes de la cámara y pueden usarse para drenar el líquido dispuesto en la misma. Con el efecto de protección de los deflectores de la invención, se reduce la nueva mezcla de las capas durante el drenaje, lo que da como resultado una mayor pureza de las fracciones obtenidas drenando las capas y/o permitiendo una mayor velocidad de drenaje.

15 Los deflectores usados en la presente invención son preferibles sustancialmente paralelos al cilindro, es decir, son doblados de acuerdo con el radio de curvatura del cilindro. La forma del deflector puede ser rectangular, triangular, semicircular 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 para reducir las fuerzas de corte aplicadas a las células durante la centrifugación. Los bordes del deflector deben biselarse para evitar pérdidas celulares al cortar o rasgar la membrana celular en los bordes. Lo más preferido, el deflector es semicircular o semielíptico.

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

25 El tamaño de los deflectores depende del volumen de la cámara, el volumen a protegerse y la velocidad de drenaje prevista. Por ejemplo, cuanto mayor sea el volumen a proteger, más grande será el deflector. Independientemente de su forma, el deflector debe tener una anchura en la base (en la abertura de un tubo) de 1/10 a 1/60, preferiblemente de 1/25 a 1/40 de la circunferencia interna del cilindro. Por ejemplo, un cilindro que tiene un diámetro interno de 10 cm está dispuesto con deflectores que tienen una anchura en la base (en la abertura de un tubo) de 1 a 2 cm. La altura del deflector es preferiblemente igual (100%) o menor, tal como de 50 a 95% de la anchura en la base.

30 El tamaño de la superficie de un deflector se puede calcular o estimar a partir de los intervalos dados en anchura y altura, pero generalmente se encuentra entre 0,1 cm² y 10 cm². En cualquier caso, el tamaño del deflector no debe obstaculizar la separación de la muestra en capas, sino reducir el flujo no deseado de líquido desde las capas separadas.

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

Si la cámara de la invención está dispuesta con deflectores en las aberturas, la membrana permeable a los gases y la estructura de soporte están dispuestas con orificios o aberturas para los deflectores y las aberturas.

40 Una cámara de centrifugación de acuerdo con la invención comprende preferiblemente, tal como se muestra en la Figura 9 (que omite la pila de capas), un eje geométrico de rotación con una obturación giratoria y preferiblemente con dos líneas de fluido u orificios de entrada/salida (10) para líquidos. La cámara centrífuga comprende, además, una placa de cubierta (11), una placa base (12) unida por un cilindro (5). La placa base (12) está dispuesta con tubos, que están conectados a los respectivos orificios de entrada/salida (10) y las aberturas (6, 8) en la cámara. Las aberturas (6, 8) están dispuestas con deflectores (7, 9).

45 En la realización mostrada en la Figura 9 (que omite la pila de capas), la placa base y la placa de cubierta de la cámara están dispuestas con al menos un orificio para la entrada (3) y/o salida (4) de gases.

Los orificios para la entrada y/o salida de los gases pueden estar dispuestos con un filtro estéril. La cámara puede comprender 1, 2 o 4 orificios para la entrada y/o salida de gases.

50 Si la cámara centrífuga de acuerdo con la invención está dispuesta con protectores deflectores, las capas para el cultivo celular preferibles tienen un diámetro al menos 5% más pequeño que el diámetro interno del cilindro. Por ejemplo, el diámetro de las capas debe ser 80-90 5% del diámetro interno del cilindro.

Membrana permeable a los gases con superficies funcionalizadas

En otra realización de la invención, la membrana permeable a los gases puede estar dispuesta de una superficie funcionalizada, es decir que es tratada con medios químicos o físicos o que comprende un recubrimiento de

compuestos bioactivos inmovilizados químicos o físicos.

La expresión "superficie funcionalizada de la membrana permeable a los gases" tal como se usa en la presente solicitud, incluye todos los tipos de superficies que pueden proporcionar un estímulo a una célula. Habitualmente, la superficie funcionalizada comprende un recubrimiento de compuestos bioactivos inmovilizados químicos o físicos, tales como:

5

- proteínas, péptidos, ácidos nucleicos;

- moléculas espaciadoras que mejoran la adhesión de células o compuestos bioactivos a las superficies de modificación de células tales como los polímeros hidrófilos (polilactato funcionalizado, alcoholes polivinílicos, polisacáridos; dextranos funcionalizados);

10

- partículas orgánicas o inorgánicas como portadoras de compuestos bioactivos, especialmente partículas magnéticas recubiertas con polilactato funcionalizado, alcoholes polivinílicos o dextranos funcionalizados;

- sustancias que mejoran la adhesión celular, por ejemplo polipéptidos, lípidos, polisacáridos;

- virus y retrovirus o partículas de los mismos;

15

- células que pueden usarse para modificar una célula diana, tales como células presentadoras de antígeno, "células accesorias" que producen ciertos factores bioactivos o líneas celulares transfectadas con ciertas moléculas funcionales;

- estímulos proporcionados por mitógenos, citocinas, anticuerpos estimulantes o ligandos receptores;

- estímulos proporcionados por las propiedades hidrófilas de la superficie.

20

En una variante de la invención, la membrana permeable a los gases puede funcionalizarse con cualquier sustancia que sea adecuada para el cultivo celular y útil o requerida para introducir condiciones de cultivo celular preferibles para un tipo celular dado.

La membrana permeable a los gases puede funcionalizarse mediante un tratamiento químico, por ejemplo, con bases fuertes, oxígeno o una mezcla de flúor y oxígeno o mediante un tratamiento físico con corona o plasma para mejorar las propiedades hidrófilas.

25

La membrana permeable a los gases puede funcionalizarse para mejorar la adherencia y/o proliferación de células en las superficies de modificación celular. Las sustancias adecuadas para la funcionalización de la membrana permeable a los gases son: glicoproteínas, polipéptidos, glicosaminoglicanos, disacáridos, moléculas de unión a biotina o etiquetas de proteínas. Por ejemplo, la membrana permeable a los gases puede estar recubierta con proteínas de matriz extracelular que incluyen todos los tipos de colágeno (I a VIII).

30

Además, la membrana permeable a los gases puede funcionalizarse con un sistema de unión por afinidad. Uno de los sistemas de unión por afinidad más usados es el sistema avidina-biotina o estreptavidina-biotina. Por ejemplo, la superficie de modificación de células puede recubrirse primero con avidina y/o estreptavidina (o sus derivados) para facilitar la unión de una molécula biotinilada como un anticuerpo biotinilado. Además, es posible recubrir la superficie de modificación de células primero con biotina (o sus derivados) para facilitar la unión de otra molécula funcionalizada con estreptavidina y/o avidina. Ambas variantes dan como resultado una unión de alta afinidad de la segunda molécula a las superficies de modificación de células. La fuerte interacción entre estreptavidina o avidina-biotina se hace mucho más débil mediante el uso de una combinación de avidina o estreptavidina modificada y biotina modificada como desthiobiotina o un derivado de la misma, tal como el producto DSB-X Biotin (Hirsch et al., 2002: "Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation". Analytical Biochemistry 308: 343-357; documento US 2008/0255004 A1). Una proteína, tal como un anticuerpo, puede biotinilarse con la biotina modificada. Cuando esta proteína se inmoviliza uniendo la biotina modificada a una estreptavidina opcionalmente modificada o una molécula de avidina unida a la superficie de modificación de células, puede liberarse en condiciones moderadas agregando biotina libre.

35

40

45

Otros sistemas de unión por afinidad adecuados para las superficies de modificación de células comprenden anticuerpos, por ejemplo anticuerpos contra biotina o etiquetas de proteínas, por ejemplo IIsopeptago, BCCP o etiqueta Myc.

La membrana permeable a los gases puede recubrirse, además, con bibliotecas de sustancias sintetizadas con métodos de química combinatoria para identificar las sustancias que funcionan mejor como sistema de unión para un tipo celular dado.

50

Ciertos polímeros bioactivos pueden usarse como moléculas espaciadoras que mejoran la adhesión de las células o la unión de otras sustancias en la membrana permeable a los gases, tales como ácido poliláctico funcionalizado, alcoholes polivinílicos, polisacáridos o dextranos o sus derivados. Este sistema de unión es especialmente útil como recubrimiento básico de una membrana permeable a los gases producida a partir de un material plástico hidrófobo

como el policarbonato, el poliestireno o el polietileno. La membrana permeable a los gases de las membranas puede recubrirse con polímeros altamente reactivos como por ejemplo los descritos en el documento US 6.977.138 B2.

La membrana permeable a los gases puede comprender una o más sustancias que mejoran la adhesión y/o la proliferación de las células. Especialmente útiles son una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en tipos de colágeno (I a VIII), fibronectina, gelatina, laminina, elastina, ácido hialurónico, queratosulfato, sulfato de condroitina, proteoglicanos de heparán sulfato, poli-d-lisina, avidina, estreptavidina, biotina, anticuerpos, anticuerpos contra biotina o etiquetas de proteínas, etiquetas de proteínas tales como IISopeptag, BCCP, etiqueta Myc, etiqueta de calmodulina, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta His, etiqueta de proteína de unión a maltosa, etiqueta Nus, etiqueta de glutatión-S-transferasa, etiqueta de proteína verde fluorescente, etiqueta de tiorredoxina, etiqueta S, Softag 1, Softag 3, etiqueta Strep, etiqueta SBP, etiqueta Ty, certia, polilactato, alcoholes polivinílicos, polisacáridos y dextrano.

En otra variante de la invención, la modificación celular comprende una modificación de células tal como activación, proliferación, desdiferenciación y/o diferenciación de células. Por consiguiente, las superficies de modificación de células de la membrana permeable a los gases pueden funcionalizarse con cualquier sustancia que sea adecuada para la modificación de células tales como activación, proliferación, desdiferenciación y diferenciación de células. La membrana permeable a los gases se puede funcionalizar, además, con partículas que se funcionalizan con al menos una sustancia adecuada para la modificación de células, tales como activación, proliferación, desdiferenciación y diferenciación de células.

En particular, la modificación de células a través del método y del dispositivo de la invención comprende la alteración de la expresión génica, la expresión de proteínas, las modificaciones postraduccionales o postranscripcionales de genes, ARNm o proteínas, fosforilación de proteínas, modificación de histonas o modificación de cascadas de señalización intracelular (por ejemplo, influjo de Ca²⁺).

Además, la modificación de células puede comprender la activación celular, por ejemplo, por anticuerpos agonistas o antagonistas, citocinas, factores de crecimiento, ligandos (des)activadores, sustancias farmacológicamente activas, mitógenos, sustancias modificadoras de ADN o ARN.

Sistema de procesamiento celular

En una realización adicional, la centrifuga de la presente invención puede ser parte de un sistema de procesamiento de muestras, tal como se conoce por los documentos WO 2009/072006, WO 2009/072003 o EP 0 869 838 B1. La unidad de procesamiento de muestras se puede acoplar al orificio de entrada/salida de la cámara de centrifugación y puede comprender un soporte de columna de separación, una bomba, una pluralidad de recipientes para el almacenamiento (intermedio) de líquidos durante el procedimiento de separación y una pluralidad de válvulas configuradas para controlar al menos parcialmente el flujo de fluido a través de un sistema de circuitos de fluido y una columna de separación colocada en el soporte.

Cultivo celular con la cámara de centrifugación de la invención

El cultivo celular requiere la provisión de medios de cultivo celular y de gases. Los medios de cultivo celular son proporcionados en un flujo continuo o discontinuo a través de los orificios de entrada/salida de la cámara o la cámara se llena una vez con medios celulares suficientes para el procedimiento de cultivo celular previsto. Los medios celulares adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen uno o más de los siguientes medios: DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, medio de Iscove, X-VIVO™, cada uno complementado opcionalmente, por ejemplo, con suero de ternera fetal, suero humano o sustitutos del suero u otros nutrientes o estímulos celulares tales como las citocinas. Los medios pueden ser medios celulares estándar como los medios mencionados anteriormente o medios especiales por ejemplo, para cultivo primario de células humanas (por ejemplo, para células endoteliales, hepatocitos o queratinocitos) o células madre (por ejemplo, maduración de células dendríticas, expansión hematopoyética, queratonocitos, células madre mesenquimales o expansión de linfocitos T). Los medios pueden tener suplementos o reactivos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, albúminas y proteínas de transporte, aminoácidos y vitaminas, antibióticos, factores de fijación, factores de crecimiento y citocinas, hormonas o agentes solubilizantes. Varios medios están disponibles comercialmente, por ejemplo mediante LifeTechnologies o Sigma-Aldrich.

La temperatura y la composición del gas de la cámara de centrifugación pueden controlarse y ajustarse, de ser apropiado, para los tipos de células o las etapas de modificación a realizar. Para este fin, se pueden unir medios de calentamiento y/o enfriamiento al dispositivo de la invención. En el método de la invención, las células que se van a cultivar reciben gases tales como aire, O₂, N₂ y CO₂ por difusión a través de la membrana permeable a los gases.

Uso de la cámara

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

- procesamiento celular tal como activación celular, proliferación celular, transfección celular, tinción celular seguida o posteriormente a una etapa de separación o lavado;

ES 2 755 741 T3

- aislamiento de leucocitos separando y descargando eritrocitos y plasma de sangre humana;

- aislamiento de 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, separando los leucocitos de sangre humana con el posterior marcado celular;

5 - preparación de leucocitos mediante la descarga de eritrocitos y plasma de sangre humana seguido de una o más etapas de lavado con medios celulares y/o aditivos de gradiente de densidad;

- aislamiento, enriquecimiento o agotamiento de 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 su uso en medicina regenerativa, arteria periférica, enfermedad hepática o terapia con células madre cardíacas.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cámara centrífuga que comprende un cilindro (5) que tiene una placa base (12) y una placa de cubierta (11), un eje geométrico de rotación con al menos un orificio (10) para la entrada y/o salida de líquidos, al menos un orificio (2, 3) para la entrada y/o salida de gases y una pluralidad de capas para el cultivo celular, caracterizado por que la pluralidad de capas para el cultivo celular forman una pila en la que cada capa consiste en una membrana (7) permeable a los gases sobre la cual se cultivan las células aplicadas sobre una estructura de soporte (8) en donde las capas están interconectadas con las capas adyacentes o los orificios para la entrada y/o salida de gases por al menos una abertura (4, 5) para permitir la transferencia de gases entre las capas.
- 10 2. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la placa base está cubierta con una membrana permeable a los gases conectada a al menos un orificio para la entrada y/o salida de gases.
3. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la membrana permeable a los gases y/o la estructura de soporte y/o la placa base están dispuestas con una pluralidad de elementos espaciadores.
- 15 4. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la estructura de soporte está dispuesta con canales.
5. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la membrana permeable a los gases está conectada a la estructura de soporte o la placa base de manera estanca a los gases.
6. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que la membrana permeable a los gases y la estructura de soporte tienen una transparencia óptica adecuada para microscopía óptica.
- 20 7. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que la primera y/o última capa de la pila (en la dirección del flujo de gas) comprende aberturas cubiertas con filtros estériles.
8. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que cada capa para el cultivo celular comprende una abertura que interconecta las capas en la pila y en donde las aberturas de dos capas adyacentes no están ubicadas a lados opuestos de la capa con respecto al eje geométrico de rotación.
- 25 9. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que las capas están conectadas con las capas adyacentes o los orificios para la entrada y/o salida de gases por al menos dos aberturas.
10. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que la superficie de la membrana permeable a los gases está funcionalizada para cultivo celular.
- 30 11. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que la primera capa de la pila, en la dirección del flujo de gas, está conectada a al menos un orificio para la entrada de gases.
12. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que al menos un orificio para la entrada y/o salida de líquidos está conectado a aberturas ubicadas en la placa base y/o placa de cubierta en el interior de la cámara centrífuga y al menos una abertura está dispuesta con al menos un deflector que tiene una anchura en su base de como máximo 1/10 de la circunferencia interna del cilindro.
- 35 13. Una cámara centrífuga de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada por que las capas para el cultivo celular tienen un diámetro al menos 5% más pequeño que el diámetro interno del cilindro.
14. Una cámara centrífuga de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, caracterizada por que al menos un primer deflector está ubicado entre al menos una abertura y el eje geométrico de rotación del cilindro y al menos un segundo deflector está ubicado entre al menos una abertura y el cilindro.
- 40 15. Una cámara centrífuga de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizada por que el deflector es sustancialmente paralelo al cilindro y tiene una anchura de 5 a 50 veces la anchura de la abertura en la que se encuentra.

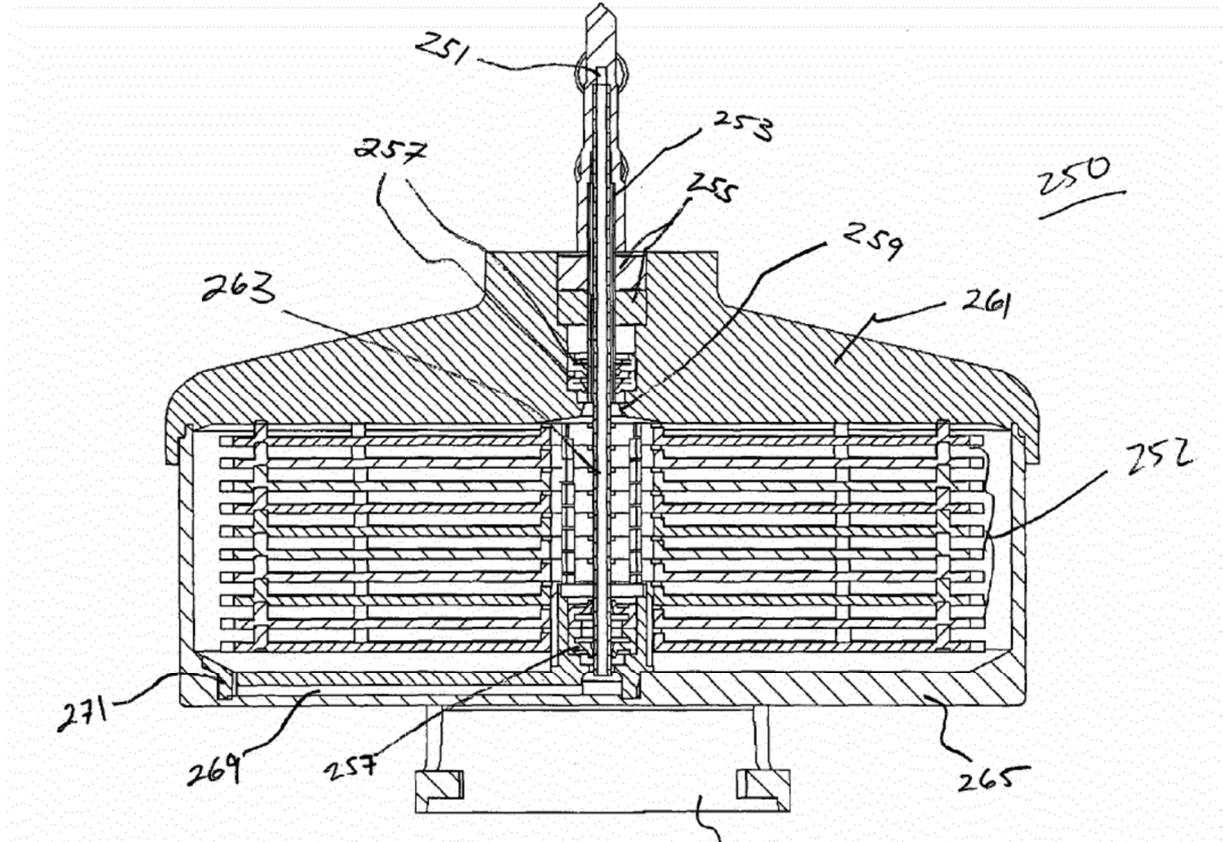


Fig. 1

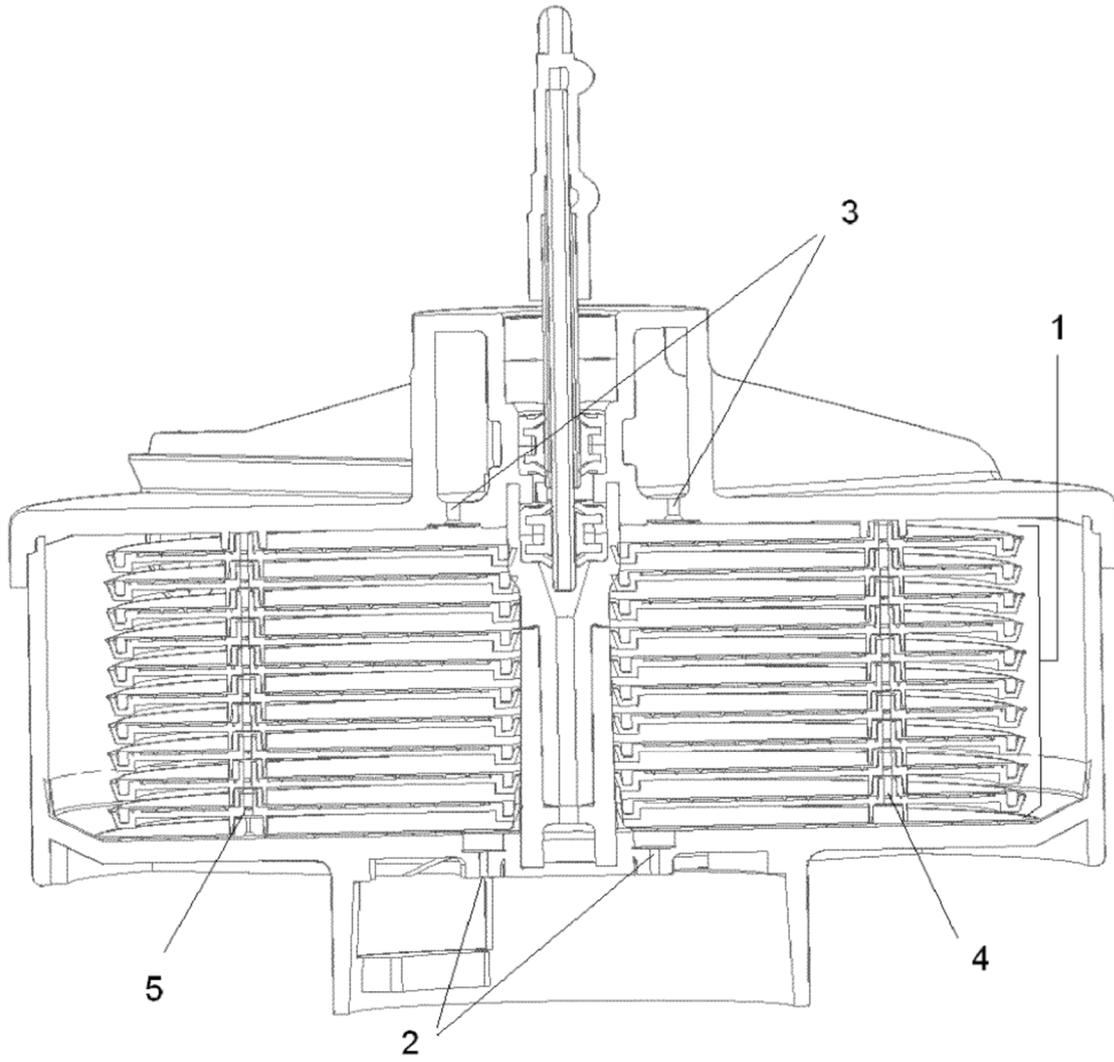


Fig. 2

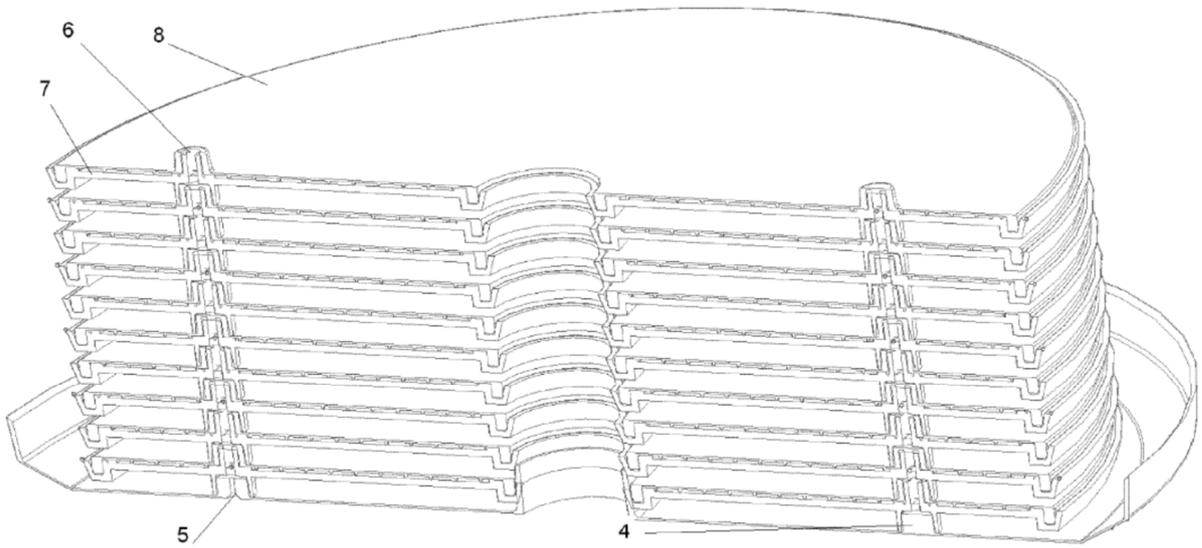


Fig. 3

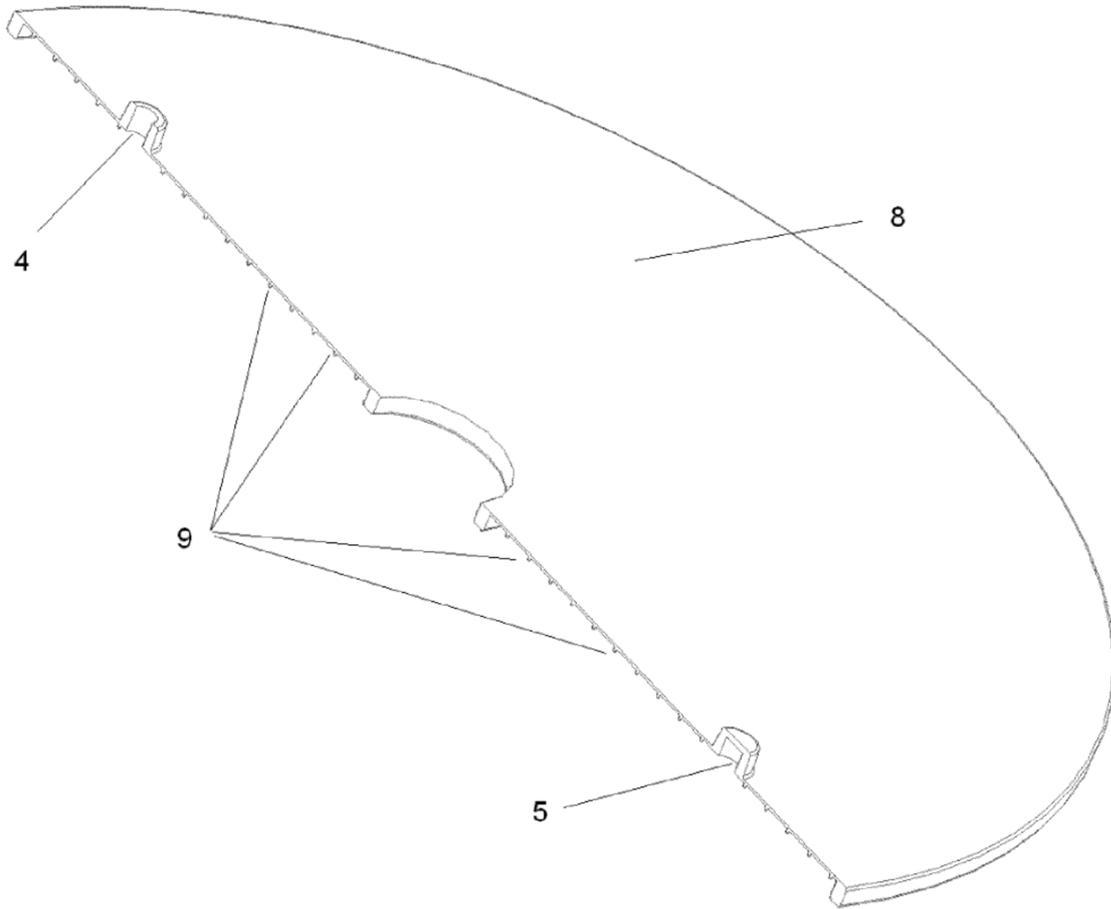


Fig. 4

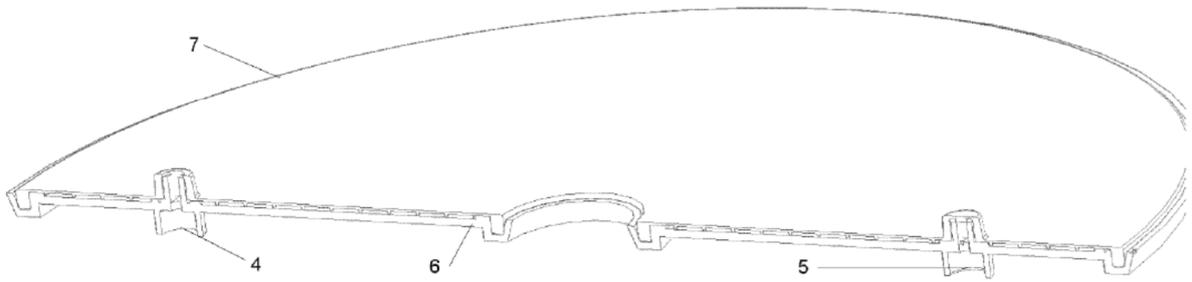
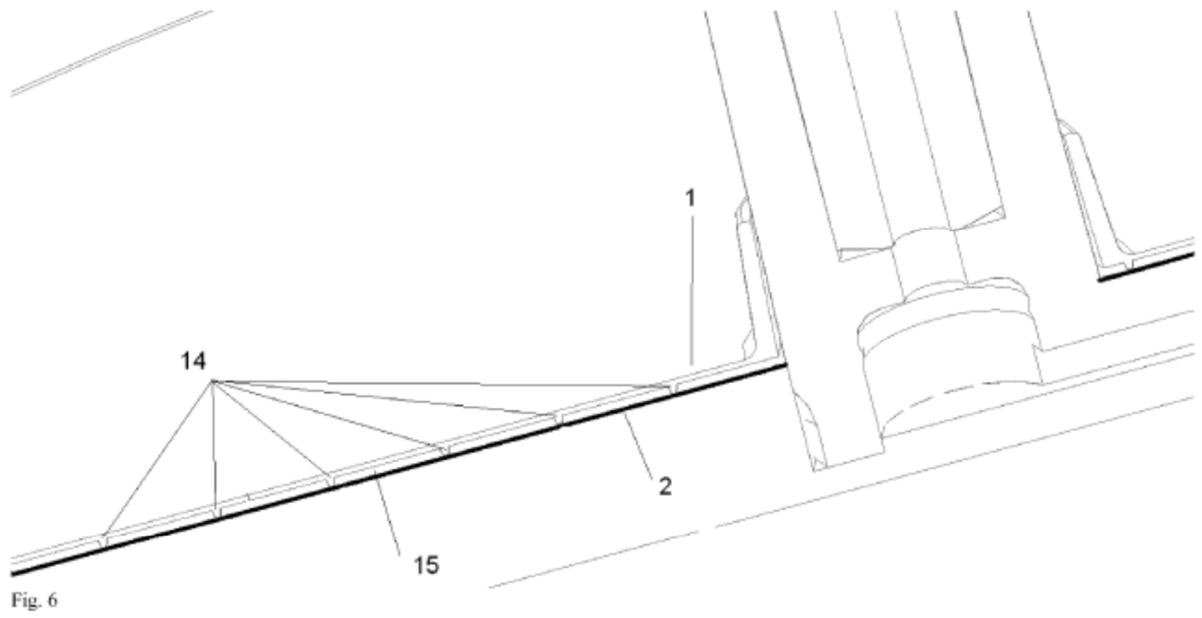


Fig. 5



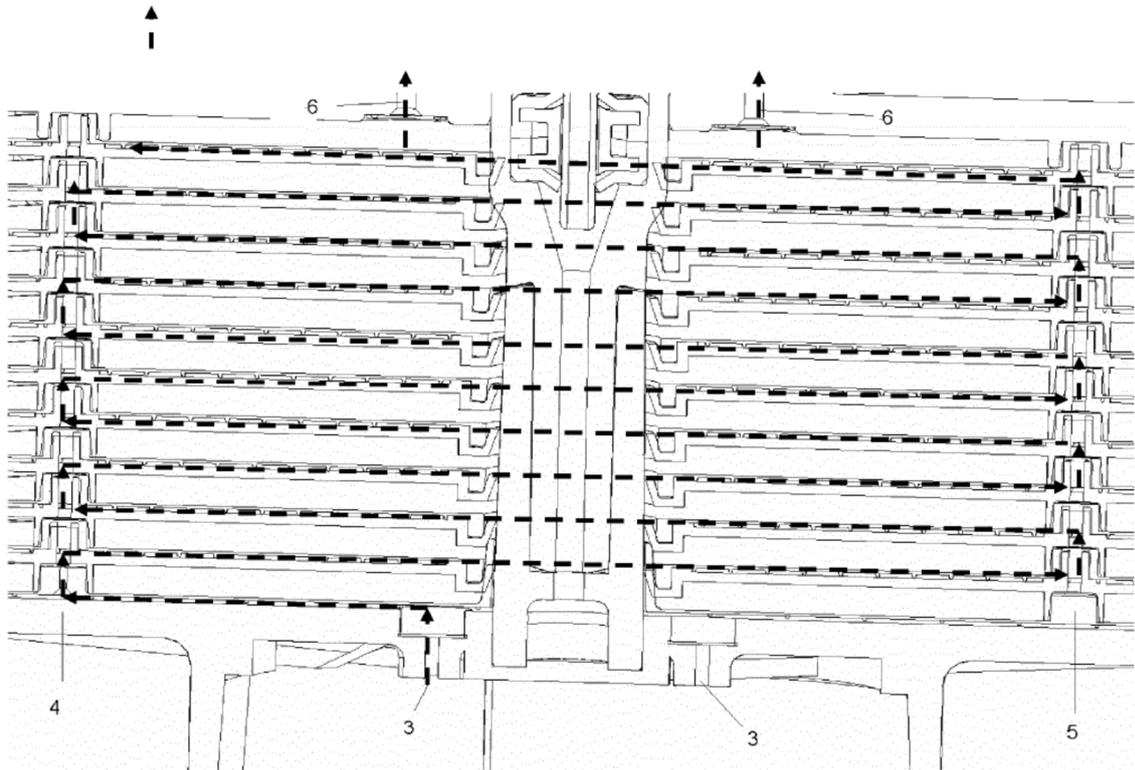


Fig. 7a

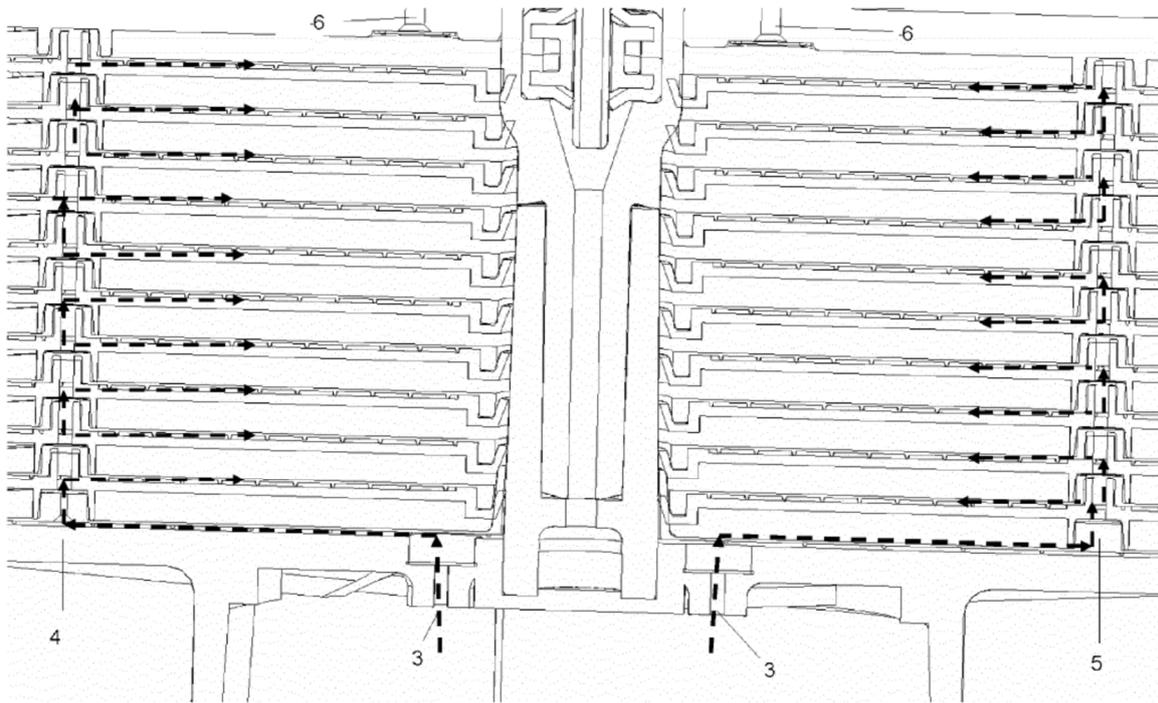


Fig. 7b

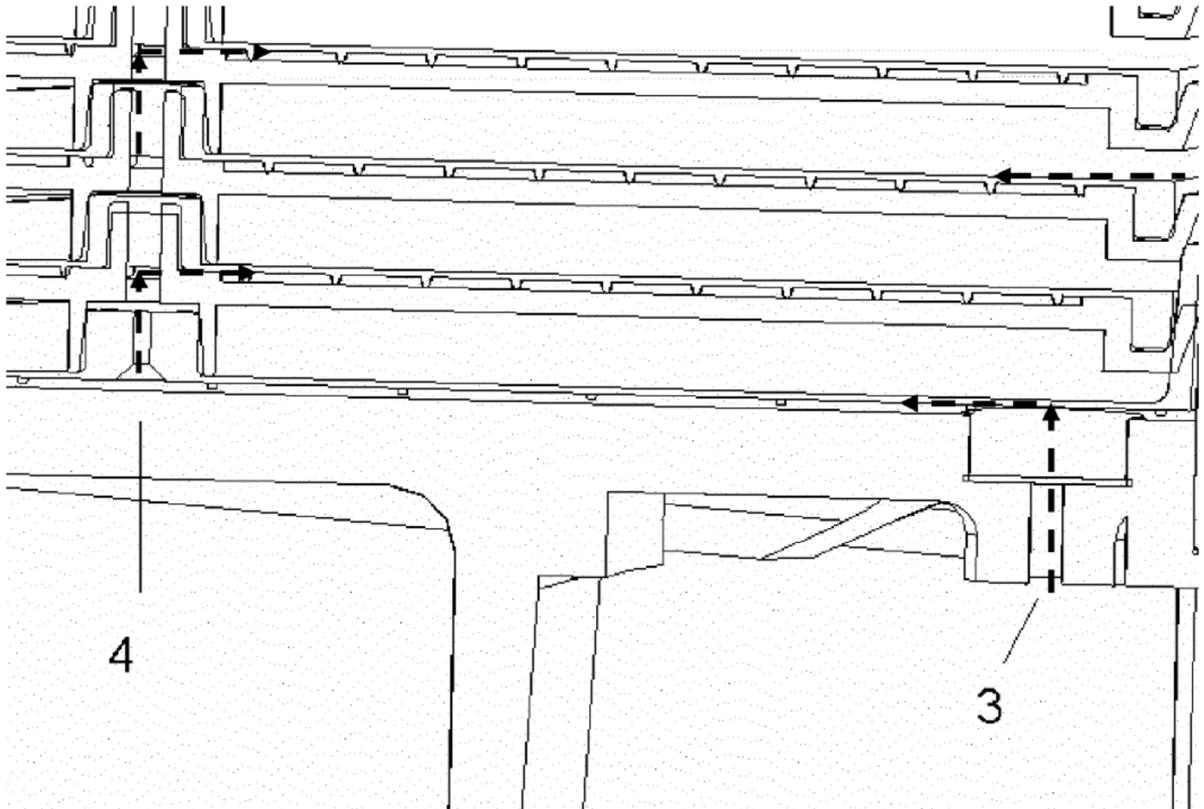


Fig. 7c

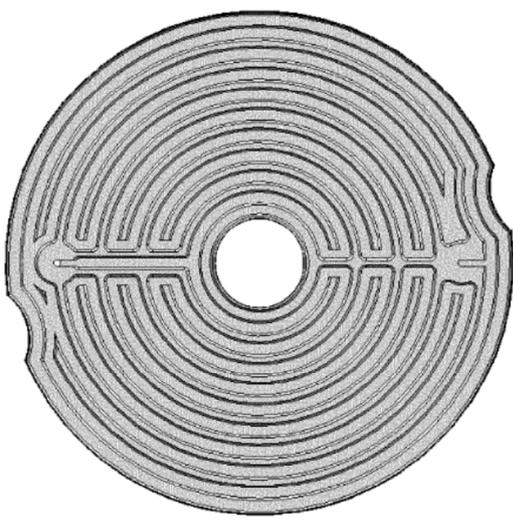


Fig. 8

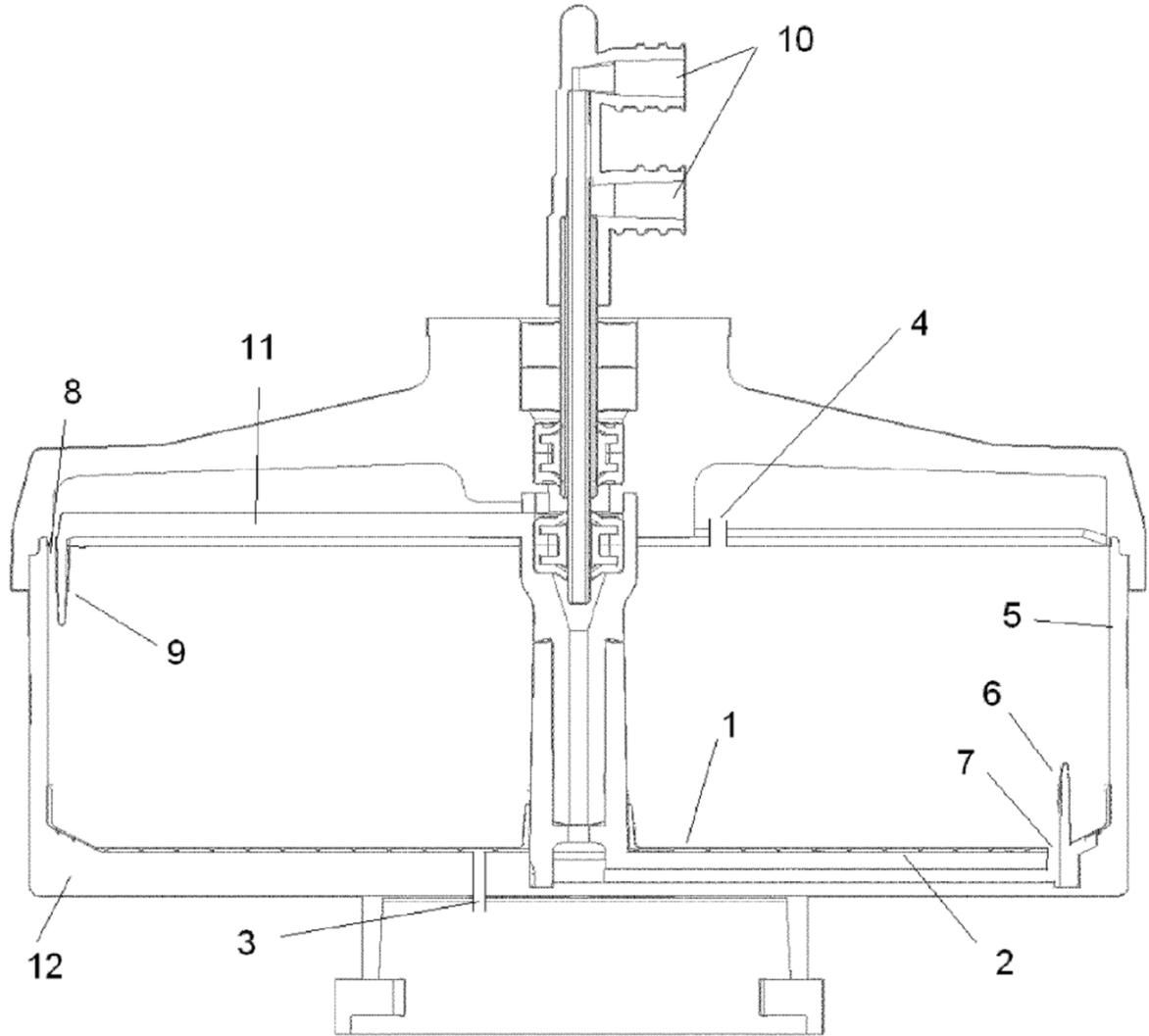


Fig. 9