

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 077**

51 Int. Cl.:

<b>A61M 1/02</b>	(2006.01) <b>B03C 1/032</b>	(2006.01)
<b>A61M 1/36</b>	(2006.01) <b>B03C 1/033</b>	(2006.01)
<b>B03C 1/28</b>	(2006.01) <b>B03C 1/034</b>	(2006.01)
<b>B04B 5/04</b>	(2006.01) <b>G01N 35/00</b>	(2006.01)
<b>B04B 13/00</b>	(2006.01)	
<b>C12M 1/26</b>	(2006.01)	
<b>C12M 1/00</b>	(2006.01)	
<b>B01D 15/38</b>	(2006.01)	
<b>B03C 1/00</b>	(2006.01)	
<b>B03C 1/027</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008** **E 12178904 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 2520643**

54 Título: **Sistemas y métodos para el procesamiento de muestras**

30 Prioridad:

**07.12.2007 US 12361 P**

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

**02.06.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BIEHL, MARTIN;  
KABAHA, EIAD;  
LANTOW, HOLGER;  
MILTENYI, STEFAN;  
NEUSCHÄFER, ELMAR NIKLAS;  
SCHIMMELPFENNIG, WINFRIED y  
SCHULZ, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 764 077 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Sistemas y métodos para el procesamiento de muestras

**Antecedentes de la invención**

5 Actualmente, una variedad de enfermedades humanas no pueden tratarse de manera satisfactoria con los productos farmacéuticos estándar, por lo que se propone el uso de células humanas primarias como una alternativa u opción adicional para el tratamiento de diversas enfermedades. Tales procedimientos de terapia celular requieren usualmente una manipulación significativa y el procesamiento de los productos celulares para separar las funciones deseadas de las no deseadas, por ejemplo, la reducción de células en una reacción del hospedero no deseada y potencialmente peligrosa para la vida en el rechazo al trasplante, o el enriquecimiento de las células implicadas en los efectos deseados del trasplante contra la leucemia y los tumores.

10 Los métodos conocidos en la técnica requieren de una infraestructura inmensa en los hospitales para cumplir con los requerimientos regulatorios y de seguridad, lo que incluye los procedimientos de buenas prácticas de manufactura compatibles con habitaciones limpias y el personal para el mantenimiento de las habitaciones, instrumentos, producción, control de calidad, y procedimientos para el aseguramiento de la calidad. Usualmente, los productos celulares se procesan mediante el uso de una combinación de diversos dispositivos y material desechable con la transferencia manual de muestras entre esos sistemas.

15 La presente invención integra diversas etapas para el procesamiento de células en un dispositivo único y desechable, controlado en un procedimiento totalmente automatizado, que elimina los requerimientos de la transferencia manual de las células, los controles durante el procedimiento, los riesgos relacionados con los productos celulares, y medidas de reducción de riesgo y, por tanto, proporciona un dispositivo y método para la obtención de productos de terapia celular listos para el uso directo. Los productos celulares que se obtienen mediante el uso del sistema de la presente invención típicamente estarán listos para transferirse directamente al paciente.

20 Generalmente, la presente invención se refiere al procesamiento de materiales biológicos. Mas específicamente, la presente invención proporciona sistemas, dispositivos, y métodos para el procesamiento de materiales biológicos para cultivar y/o separar los componentes de una muestra biológica, y para posteriormente separar los componentes de la muestra mediante técnicas de separación, que incluye la aplicación de la separación magnética.

25 Se conocen diversas técnicas para la separación de los componentes de una muestra o material biológico, que usan las técnicas de separación. Tales técnicas incluyen, entre otras, la separación por cribado, separación magnética, centrifugación, filtración, separación por inmunoafinidad, separación por gravitación, separación por gradiente de densidades, y elutriación.

30 Los métodos de inmunoafinidad pueden incluir el marcado selectivo de ciertos componentes de una muestra (por ejemplo, marcado con anticuerpos) y la separación de los compuestos marcados y no marcados. Los métodos de separación magnética típicamente incluyen la etapa de una muestra a través de una columna de separación.

35 La separación magnética es un procedimiento para retener selectivamente los materiales magnéticos en una cámara o columna dispuesta en un campo magnético. Una sustancia diana, que incluye materiales biológicos, puede marcarse magnéticamente mediante la unión a una partícula magnética por medio de un accesorio de unión específico, que se conjuga a la partícula. Después, una suspensión de la sustancia diana marcada se aplica a la cámara. La sustancia diana se retiene en la cámara en presencia de un campo magnético. Después, la sustancia diana retenida puede eluirse mediante un cambio de la fuerza, o por la retirada del campo magnético.

40 Una matriz de material de susceptibilidad magnética adecuada puede colocarse en la cámara, de manera que, cuando se aplica un campo magnético a la cámara, se induce localmente un alto gradiente de campo magnético cerca de la superficie de la matriz. Esto permite la retención de las partículas magnetizadas débilmente. Este procedimiento se denomina separación magnética de alto gradiente (HGMS).

45 El uso de HGMS en las separaciones biológicas requiere que las condiciones proporcionen un alto rendimiento con una pureza sustancial. En consecuencia, sería conveniente proporcionar separadores magnéticos de alto gradiente, dispositivos y métodos que sean relativamente fáciles de construir y usar, y aun así proporcionar gradientes de campo magnético máximos y uniformes y ciertas características de flujo durante su uso. Sería más ventajoso si tales separadores magnéticos, dispositivos y métodos pudieran usarse para realizar una diversidad de clasificaciones celulares o procedimientos de ensayo con la selección del miembro de unión específico apropiado, para el cual la sustancia diana se marcará magnéticamente.

50 En tales ejemplos, las metodologías de separación deben realizarse bajo condiciones que aseguren que no se contamine la muestra o que se mantenga su esterilidad. Por ejemplo, en muchas clínicas comunes los sistemas de separación de células necesitan realizarse en habitaciones limpias de alta calidad para mantener la esterilidad de las muestras. Con frecuencia, asegurar la ausencia de contaminación es difícil, costoso y requiere instalaciones separadas y personal, así como también procedimientos complejos que requieren esfuerzos inmensos para

5 mantener la reproducibilidad y la esterilidad. Además, numerosos procedimientos y etapas de manipulación (por ejemplo, lavados, disminución del volumen, etc.) deben realizarse separados de los sistemas de separación con la subsiguiente introducción de las muestras procesadas, así como también la unión de fluidos de y reactivos, lo cual complica, además, el cumplimiento de la esterilidad. Por tanto, se necesitan métodos y sistemas mejorados para asegurar la ausencia de contaminación de las muestras y/o disminuir la complejidad y los costos del procesamiento de muestras.

10 La publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2002/0173034 A1 describe un aparato para usar en un rotor centrífugo de cubo oscilante para separar componentes de un dispositivo de cultivo celular. Un dispositivo de separación con una cámara de separación transparente se describe en el documento EP 0 535 618 A. Los métodos ópticos, dispositivos y componentes del dispositivo para medir distribuciones bidimensionales de intensidades de luz transmitidas se conocen del documento US 2005/0051466A1.

**Breve compendio de la invención**

15 La presente invención proporciona una cámara de centrifugación para un procedimiento de separación que se puede utilizar para cultivar células y su uso, así como un método para cultivar células y/o para separar una composición en al menos dos componentes.

20 Se proporciona una cámara de centrifugación para procedimientos de separación que se puede utilizar para cultivar células. La cámara de centrifugación comprende una capa para el cultivo de células sobre ella, y un medio para detectar el progreso de una separación, donde el medio para detectar el progreso de la separación en el recipiente giratorio es una ventana, un prisma o un espejo, y donde la ventana, el prisma o espejo se coloca para cubrir un canal formado en una tapa o un fondo del recipiente giratorio en el que el canal está configurado de tal manera que al menos una parte de la muestra puede fluir hacia el canal durante la centrifugación.

En una realización, la capa de la cámara de centrifugación se puede colocar perpendicular a un eje giratorio de la cámara de centrifugación. La cámara de centrifugación puede comprender una pluralidad de capas para hacer crecer células sobre ella.

25 En una realización, la cámara de centrifugación incluye una pluralidad de estructuras en capas para proporcionar cultivos celulares y/o en el que las capas en la cámara son de un material sólido o poroso. La cámara puede estar configurada para girar alrededor de un eje para aplicar una fuerza centrífuga a una muestra dispuesta en la cámara, separando así al menos dos componentes de la muestra.

30 En una realización, los medios para detectar el progreso de la separación se ubican de tal manera que la luz de una fuente de luz pueda penetrar al menos parcialmente a través de al menos una parte de la muestra que se está separando, y la luz que pase a través de al menos una parte de la muestra puede ser detectada por un detector de luz. Los medios para detectar el progreso de la separación pueden estar ubicados en el recipiente giratorio, esencialmente perpendicular a un eje de rotación del recipiente giratorio.

35 En una realización de la cámara de centrifugación, la separación de la muestra se detecta a través de una ventana en la tapa o el fondo de la cámara giratoria. Un área de enfoque del microscopio puede posicionarse en el fondo de la cámara de centrifugación.

Según ciertas realizaciones de la invención, la cámara tiene forma cilíndrica o la cámara de centrifugación está limitada en su lado superior por la tapa. La cámara de centrifugación puede fabricarse en forma desechable o el recipiente giratorio puede ser esterilizable.

40 En una realización, la cámara de centrifugación comprende o está hecha de un material elegido del grupo que consiste en: plásticos, poliestireno, cloruro de polivinilo, policarbonato, vidrio, poliacrilato, poli(acrilamida, polimetilmetacrilato, polietilentereftal, politetrafluoretileno, poliuretano termoplástico, silicona, polietileno, colágeno, quitina, alginato, derivados del ácido hialurónico, poliácido, poliglicólido y sus copolímeros, materiales cerámicos, materiales vítreos, como hidroxilapatita y fosfato de calcio, y composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente.

45 El fondo de la cámara puede poseer una o más aberturas o la cámara puede poseer un sistema de canales para el flujo de gas.

En una realización, la cámara de centrifugación es calentable y refrigerable para proporcionar una temperatura apropiada para la muestra a centrifugar.

50 La temperatura de la muestra en la cámara puede medirse utilizando cristales líquidos que se colocan en la cámara de modo que su posición se pueda detectar con una cámara de microscopio desde el exterior.

La invención también proporciona el uso de una cámara de centrifugación de la invención para cultivar células y/o para separar una composición en al menos dos componentes. Según ese uso, los productos celulares pueden fabricarse para: ingeniería de injertos; trasplante de órganos; tratamiento contra el cáncer que incluye leucemia,

5 que incluye leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y tumores sólidos tales como carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma, cáncer pancreático; tratamiento de enfermedades autoinmunes refractarias tales como lupus eritematoso sistémico o esclerodermia sistémica, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple; terapia celular que incluye la utilización directa de células efectoras; tratamiento de enfermedades infecciosas; regeneración de tejidos incluyendo infarto de miocardio, daño hepático o enfermedades neurodegenerativas; inducción de tolerancia incluyendo trasplante o enfermedad autoinmune; o una preparación automatizada de células mononucleares de sangre periférica o plasma rico en plaquetas.

La invención también proporciona un método para cultivar células y/o para separar una composición en al menos dos componentes, que comprende el uso de una cámara de centrifugación de la invención.

10 En una realización, el método comprende una etapa tomada de un grupo que consiste en las siguientes etapas: la etapa de la fabricación de células madre e injertos progenitores; la etapa de fabricar células dendríticas sanguíneas mDC y pDC; la etapa de fabricar células T específicas de antígeno; la etapa de fabricar células asesinas naturales activadas; la etapa de fabricar células asesinas naturales expandidas; la etapa de fabricar linfocitos T colaboradores expandidos; la etapa de seleccionar células madre positivas para CD133; la etapa de seleccionar células positivas para CD304; la etapa de seleccionar células positivas para CD04; la etapa de agotar las células CD08 positivas; la etapa de separar las células de sangre periférica; la etapa de preparar células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad; y la etapa de procesar la médula ósea.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es un diagrama esquemático de una columna de separación o prefiltración ilustrativa de la presente descripción.

La Figura 2 representa columnas de separación y prefiltración, junto con los contenedores de muestra y de recolección, interconectados mediante una serie de vías para líquidos o circuitos de líquidos. La figura muestra, además, la posición de las válvulas y una bomba peristáltica que se usa en el ejemplo preferido del sistema de separación.

25 La Figura 3 representa una unidad controlada por ordenador en la que se añaden columnas estériles, tuberías desechables, y contenedores para almacenamiento y recolección, como se ilustra en la figura 2. En un aspecto preferido, la unidad controlada por ordenador contiene un imán, válvulas y bomba peristáltica.

La Figura 4 representa el canal de flujo que se forma entre tres esferas adyacentes.

De la Figura 5 hasta la 7 se ilustran un sistema.

30 La Figura 8 ilustra una cámara de un sistema de procesamiento.

La Figura 9 ilustra una cámara de un sistema de procesamiento.

La Figura 9A ilustra una cámara de un sistema de procesamiento.

La Figura 10 muestra una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento.

La Figura 10A ilustra una vista en planta superior de una cámara de procesamiento.

35 La Figura 11 muestra una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento.

La Figura 11A ilustra una vista enfocada de una porción de una cámara de procesamiento como se muestra en la figura 11.

La Figura 12 muestra una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento.

40 La Figura 12A muestra una vista sobre la parte inferior de la cámara de procesamiento con una abertura para el suministro de gas y una membrana hidrofóbica unida.

La Figura 12B muestra la parte inferior de la cámara con canales espirales para la aireación a través de la membrana unida a la parte inferior de la cámara.

La Figura 13 ilustra un sistema.

De la Figura 14A hasta la 14N se ilustra un método de procesamiento de muestras representativo.

45 La Figura 15 ilustra un dispositivo de aireación que puede ser parte del sistema.

La Figura 16A muestra una cámara para la mezcla de gases que puede ser parte del sistema.

La Figura 16B muestra la parte inferior de la cámara para la mezcla de gases que puede ser parte del sistema de acuerdo a la descripción.

5 La Figura 17 muestra una vista del interior de una tapa para la cámara que rota con un canal o brecha en la cual la muestra fluye durante la centrifugación, con un medio en forma de prisma para detectar el progreso de la separación de la muestra.

La Figura 18 muestra el curso de la luz a través de la muestra por medio del prisma. El prisma (prisma doble) se configura de manera que la luz a partir de una fuente de luz pueda penetrar, al menos parcialmente, a través de al menos una parte de la muestra que se separa a través de la centrifugación, y que la luz que pasa a través de al menos una parte de la muestra pueda detectarse mediante un detector de luz.

10 La Figura 19 muestra un prisma doble que es parte de una nervadura ubicada en la tapa de la cámara que rota.

De la Figura 20 a la 29 se muestran los resultados de experimentos realizados con un sistema según la presente descripción, mediante el uso de un método según la presente invención.

La Figura 20 muestra médula ósea sin procesar (A, C) y células CD133 seleccionadas (B, D).

La Figura 21 muestra productos de aféresis sin procesar (A, B) y productos enriquecidos en CD14 (C, D).

15 La Figura 22 muestra la recolección de aféresis sin procesar (izquierda) y enriquecido en PDC (derecha).

La Figura 23 muestra la selección de CD4 mediante el uso de la presente invención, la capa leucocitaria sin procesar (izquierda), células diana enriquecidas en CD4 (derecha).

La Figura 24 muestra la capa leucocitaria antes (izquierda) y después (derecha) de la reducción de CD8 mediante el uso de la presente invención.

20 La Figura 25 muestra el crecimiento de la línea celular K562 en la cámara de la centrifugadora.

La Figura 26 muestra médula ósea sin procesar (izquierda) y células seleccionadas CD34 o CD133 después de la elución directa en 20 ml (derecha).

La Figura 27 muestra médula ósea sin procesar (izquierda) y células seleccionadas CD34 o CD133 después de la elución directa en un volumen pequeño de 6 ml (derecha).

25 La Figura 28 muestra médula ósea sin procesar (izquierda) y células seleccionadas CD34 o CD133 después de la reducción del volumen final por filtración (derecha).

La Figura 29 muestra médula ósea sin procesar (izquierda) y células seleccionadas CD34 o CD133 después de la elución directa en 20 ml (medio) y después de la reducción del volumen final por columna AutoMACS.

### **Descripción detallada de la invención**

30 La presente descripción proporciona sistemas de procesamiento de muestras que integran ambos, los sistemas de separación de muestras y las técnicas de procesamiento de muestras. Un sistema puede incluir una unidad de procesamiento de muestras configurada para realizar ciertas etapas de procesamiento antes de los métodos de separación, tales como separación magnética, cultivo de células o manipulación de las células. En consecuencia, la presente descripción puede incluir un sistema de procesamiento de muestras y un sistema de separación de  
35 muestras combinados. Los sistemas o unidades de procesamiento de muestras pueden proporcionar procesamientos de muestras tales como cultivo de células, lavados, preparación, incubación, marcado, etc. Además, las unidades/sistema de procesamiento de muestras pueden incluir técnicas basadas en la separación por centrifugación, donde una fuerza centrífuga se aplica a la muestra para separar al menos un primer componente y un segundo componente de una muestra.

40 Por tanto, un sistema de la presente descripción típicamente incluirá ambos, una unidad de procesamiento de muestras y una unidad de separación de muestras. El sistema puede comprender o contener, además, una pluralidad de unidades de procesamiento de muestras y/o una pluralidad de unidades de separación de muestras. El sistema combinado de procesamiento/separación de la descripción puede incluir un sistema cerrado que puede programarse para realizar automáticamente una diversidad de etapas complejas de procesamiento de células, que  
45 incluye la separación basada en la densidad, la separación por inmunofluorescencia, la separación magnética que incluye las inmunomagnéticas, cultivo/estimulación/activación de células, lavados o etapas de formulación finales. Para este propósito, el sistema puede controlarse por un programa informático que puede ejecutarse en un ordenador. Las etapas del procesamiento de células pueden incluir, además, el suministro a las células de ciertas sustancias, que incluyen citocinas, materiales genéticos como ADN, ARN, virus, factores de transcripción, antígenos u otras  
50 sustancias químicas.

Se describe un sistema que minimiza los errores del usuario, mantiene la esterilidad, realiza etapas complejas de procesamiento de células que requieren poca o ninguna interacción manual, y minimiza la exposición del operario cuando se procesa un material infeccioso. Es posible el procesamiento en la cabecera de un enfermo o en una sala quirúrgica. El dispositivo puede operarse mientras se conecta a un paciente del cual se obtiene una muestra o al cual se le administra una muestra procesada o fracciones de esta. Por ejemplo, la médula ósea que se obtiene de un paciente puede procesarse directamente dentro de una bolsa de entrada del conjunto de tubos. Desde ahí, el ejemplo de la médula ósea puede procesarse, es decir, separarse en al menos dos componentes. Al menos uno de esos componentes puede administrarse al paciente, posiblemente después de procesar el componente en una forma adecuada.

- 5
- 10 Los procedimientos de separación en base a la densidad realizados con la unidad de procesamiento de muestras del sistema de la invención incluyen, entre otros, lavado de células, generación de la capa leucocitaria, separación basada en la densidad mediante el uso de medios, por ejemplo, Ficoll™, Percoll™ (GE Healthcare), separación basada en la densidad del marcado (por ejemplo, Rosettesep (Stem Cell Technologies), u otros procedimientos de marcado por densidades), separación por la velocidad de sedimentación, por ejemplo, la eliminación de trombocitos, elutriación, adhesión celular, etc. Otras técnicas/etapas de procesamiento que pueden realizarse con una unidad de procesamiento de muestra del sistema de la invención incluyen el cultivo de células, que incluye la expansión, estimulación, diferenciación, nueva diferenciación, carga de antígenos, transfección, transducción, cultivos, de células adherentes o en suspensión, capas múltiples de varios tipos celulares o mixtos, cultivos estacionarios o con fuerzas de cizallamiento o combinaciones. Los materiales de partida incluyen, entre otros, sangre, leucoferesis, medula ósea, liposucción, leche, cualquier fluido corporal, células de tejidos, por ejemplo, células de diversos órganos, células tumorales, células únicas, grupos celulares, aglomeraciones celulares, tejido disecado mecánicamente o junto con enzimas.

Como se estableció anteriormente, un sistema descrito en este documento incluirá, típicamente, una unidad/sistema de procesamiento de muestras y una unidad/sistema de separación de muestras.

- 25 Las células procesadas mediante el uso de la presente invención pueden usarse para diversos propósitos, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades, mediante el uso de su potencial para hacer proliferar y para diferenciarse así como también sus funciones biológicas en organismos vivos, por ejemplo, sangre o tejidos.

Las aplicaciones de las células que pueden procesarse mediante el uso de la presente invención incluyen, entre otras:

- 30 - ingeniería de trasplantes, por ejemplo, junto con el trasplante de células madre
- trasplante de órganos
- tratamiento del cáncer que incluye, entre otros, leucemia, que incluye la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y tumores sólidos tales como el carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma, cáncer de páncreas
- 35 - el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias refractarias tales como el lupus eritematoso sistémico o esclerodermia sistémica, Diabetes tipo 1, esclerosis múltiple
- la terapia celular incluye entre otras el uso directamente de células efectoras
- el tratamiento de enfermedades infecciosas
- 40 - la regeneración de tejidos que incluye, entre otros, infarto del miocardio, daño del hígado, o enfermedades neurodegenerativas, y
- la inducción de tolerancia que incluye, entre otras, enfermedades autoinmunitarias o por rechazo al trasplante.

Los métodos de procesamiento que usa la presente invención pueden combinarse a partir de diversas operaciones básicas que incluyen el lavado de células, cambio del medio, concentración de células, incubación de las células con diversas sustancias (que incluyen anticuerpos, citocinas, reactivos para la separación magnética, medios), separación magnética de las células, filtración y cultivo de células.

- 50 Los métodos de separación magnética pueden comprender ambos procedimientos, de enriquecimiento y de reducción (Bosio et al. en "Engineering of Stem Cells", Springer 03/2009). Si las células diana pueden identificarse en base a proteínas de superficie, las células diana pueden enriquecerse con alta pureza. En algunas situaciones, las células no deseadas pueden identificarse en base a sus características funcionales no deseadas dentro de un contexto clínico específico. Estas células no deseadas pueden eliminarse a partir del producto celular, que resulta en una mezcla heterogénea de diferentes células diana.

Los productos celulares procesados mediante la presente invención para los procedimientos de ingeniería de trasplantes pueden enriquecerse para CD34, CD133 o reducirse para CD3, CD3 y CD19, CD6, CD4 y CD8, el receptor alfa/beta de células T (TCR alfa/beta) o CD3/CD19/CD16/CD14, lo que da como resultado ya sean

preparaciones celulares enriquecidas en células madre o células madre suplementadas con otras células inmunitarias tales como las células asesinas naturales y las células dendríticas.

5 Los productos celulares procesados mediante la presente invención para procedimientos de terapia celular pueden enriquecerse, por ejemplo, para CD14 (monocitos), CD56 (células naturales asesinas), CD335 (células naturales asesinas, NKp46), CD4 (células T auxiliaadoras), CD8 (células T citotóxicas), CD1c (subconjunto de células dendríticas de la sangre, BDCA-1), CD303 (BDCA-2), CD304 (subconjunto de células dendríticas de la sangre, BDCA-4), NKp80 (células T naturales asesinas gamma/delta, células T efectoras/memoria), "6B11" (células T naturales asesinas invariantes, Va24/Vb11), CD137 (células T activadas), CD25 (células T reguladoras) o reducirse para CD138 (células plasmáticas), CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD45RO. Las células asesinas naturales, 10 células T asesinas naturales, células T y sus subgrupos pueden usarse como células efectoras en los procedimientos de infusión linfocitaria de donantes para eliminar células infectadas por virus, células tumorales o bacterias. Las células dendríticas, ya sea generadas a partir de monocitos en cultivos celulares o aisladas directamente, pueden usarse para "vacunar" a los pacientes para promover la inmunidad con especificidad antigénica y natural contra células infectadas con virus, células tumorales, hongos y/o bacterias.

15 Ventajosamente, la presente invención permite la obtención de productos celulares mediante la clasificación para dos o más parámetros que puede realizarse en un solo conjunto de tubos sin necesidad de transferir la suspensión celular de uno de los tubos del conjunto de tubos que se usa a otro; por tanto, se evita el daño potencial al producto celular (infección, contaminación, aumento de la temperatura). Dos aplicaciones de clasificación de parámetros incluyen la generación de células T reguladoras altamente enriquecidas (primero se eliminan las células CD8 y/o 20 CD19 y/o CD49d del producto celular y subsecuentemente queda enriquecido para CD25), de células asesinas naturales altamente enriquecidas (reducidas las CD3, enriquecidas con CD56) y de subgrupos de células dendríticas de la sangre altamente enriquecidas (reducidas las CD19, enriquecido en CD1c).

25 Los procedimientos de regeneración de tejidos usualmente utilizan células progenitoras de la sangre, médula ósea o tejidos para vascularizar nuevamente los tejidos, promover la generación de tejido nuevo o proporcionar directamente tejido generado in vitro. Las células utilizadas pueden incluir productos celulares enriquecidos para CD133, CD34, CD271 (LNGFR, células madre mesenquimales), anti-MSCA-1 (W8B2, células madre mesenquimales), CD144 (células endoteliales).

30 Es una caracterización específica y novedosa de la presente invención que la obtención de productos celulares mediante la separación celular y el cultivo pueda realizarse en un único conjunto de tubos sin necesidad de transferir la suspensión celular de células de uno de los tubos que se usa del conjunto de la tubería a otro. En particular, la presente invención puede usarse para obtener células madre, células T, células dendríticas, células NK, células B, monocitos, células positivas para un marcador particular, tales como CD133, CD34, CD3, CD4, 8, 56, 19, 14, CD141 (BDCA-3), CD303 (BDCA-2), CD304 (BDCA-4), CD144, CD1c (BDCA-1), NKp46, NKp80, CD45RO, CD45RA, CD137, CD25, o CD138.

35 Composición/formulación:

Es una caracterización específica y novedosa de la descripción que los productos celulares que se obtienen mediante operaciones básicas como se describió anteriormente puedan componerse para un uso clínico directo. Los métodos conocidos en la técnica requieren un procesamiento manual posterior de los productos de las células transformadas para adaptarlos a los requerimientos clínicos. Con el sistema de la presente descripción, el producto 40 celular puede formularse directamente para su uso inmediato. Las etapas de formulación incluyen: el ajuste a un volumen o concentración celular deseado, el intercambio de los líquidos de procesamiento por los líquidos inyectables, la adición de estabilizadores (tales como plasma o suero autólogo, albuminas de suero, otras proteínas o polímeros sintéticos) o de adyuvantes, la suplementación con agentes crioprotectores tales como DMSO para el almacenamiento posterior, la extracción de muestras de retención para el control de calidad, el suministro a combinaciones de bolsas o jeringuillas para infusión. Algunos componentes de la formulación final, por ejemplo, 45 plasma, plaquetas o componentes de plaquetas pueden derivarse a partir de la muestra de origen.

El sistema de separación magnética de la presente descripción puede usarse para marcar magnéticamente y aislar cualquier sustancia diana deseada. De particular interés es la separación de un componente específico a partir de una mezcla compleja. El sistema de separación de la presente descripción tiene gran versatilidad, en el sentido de 50 que casi cualquier sustancia diana puede separarse una vez que esté disponible un miembro de unión específico. La sustancia diana o analito puede ser cualquier miembro de un par de unión específico, o una sustancia asociada con un miembro de un par de unión específico. Como un ejemplo, puede usarse un par de unión antígeno de superficie celular y anticuerpo para aislar el propio antígeno, las células que expresan el antígeno, un orgánulo particular implicado en el procesamiento del antígeno, etc. Los dispositivos y métodos de la presente descripción se aplican ventajosamente, además, a técnicas de diagnóstico que implican la unión de un receptor y un ligando, tales como 55 los inmunoensayos, etc.

En su forma más simple, el sistema de separación de células de la presente descripción tiene dos componentes principales: un separador magnético y un reactivo de separación de células. En la figura 1 se proporciona un diagrama esquemático de un dispositivo separador magnético. El diagrama muestra la construcción general del

separador y la etapa uniforme del fluido que resulta del uso de una matriz de esferas metálicas. La figura 2 representa un dispositivo de separación más complejo, que incluye las posiciones generales de la etapa del fluido, los contenedores de recolección y almacenamiento y la columna de separación. Los circuitos de fluido pueden construirse con válvulas integradas, o las válvulas pueden aplicarse externamente a las vías del fluido.

5 Un tercer componente opcional para el sistema de separación de células preferido es un instrumento de separación de células. La Figura 3 representa un instrumento de separación de células, preferentemente, controlado por un ordenador, que puede incorporar las válvulas junto con un imán, bomba y teclado para el control. Un dispositivo similar al de la figura 2, que se construye sin las válvulas, puede montarse directamente sobre el instrumento de la figura 3 para usar en la separación automatizada de células diana.

10 El reactivo de separación de células, que puede, además, denominarse conjugado, reactivo de anticuerpo/partícula magnética o marcador magnético, incluye un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico. Hay muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos usados en los métodos de separación magnética. Se describe el uso de partículas o micropartículas magnéticamente sensibles. Las partículas magnéticas adecuadas se describen en la Patente de los Estados Unidos de Molday n.º. 4.452.773, y en la memoria descriptiva de la Patente Europea EP 452342 B. Las partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos de Owen n.º. 4.795.698, y la Patente de los Estados Unidos de Liberti et al. n.º. 5.200.084, son, además, adecuadas.

La expresión "miembro de unión específico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un miembro de un par de unión específica, es decir, dos moléculas, usualmente dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas se une específicamente a la otra molécula a través de medios químicos o físicos. Los miembros complementarios de un par de unión específica se denominan a veces ligando y receptor. Además de los pares antígeno y anticuerpo con especificidad de unión, los pares de receptor de células T y antígeno peptídico en el MHC; los pares con especificidad de unión alternativos de interés incluyen biotina y avidina o estreptavidina; carbohidratos y lectinas; las secuencias de nucleótidos complementarias (que incluyen secuencias de ácido nucleico usadas como sondas y agentes de captura en ensayos de hibridación de ADN); ligandos peptídicos y receptor; moléculas efectoras y receptoras; hormonas y proteínas de unión a hormonas; cofactores de enzimas y enzimas; inhibidores enzimáticos y enzimas; marcadores de secreción, tal como se describe en la solicitud Internacional PCT/US93/10126, anticuerpos monoclonales autólogos, etc. Los pares con especificidad de unión pueden incluir análogos, derivados y fragmentos del miembro de unión específico original. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un antígeno proteico puede reconocer, además, fragmentos peptídicos, miméticos peptídicos sintetizados químicamente, proteínas marcadas, proteínas derivatizadas, etc. siempre que haya un epítipo presente.

Los pares inmunológicos con especificidad de unión incluyen antígenos y anticuerpos con especificidad antigénica o antígenos de receptores de células T. Los antígenos adecuados pueden ser haptenos, proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. Pueden usarse métodos de ADN recombinante o síntesis de péptidos para producir análogos quiméricos, truncados o de cadena sencilla de cualquiera de los miembros del par de unión, donde las proteínas quiméricas pueden proporcionar mezcla(s) o fragmento(s) de estos, o una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión específicos. Los anticuerpos y receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden producirse mediante animales transgénicos, animales inmunizados, células B humanas o de animales inmortalizadas, células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o el receptor de células T, etc. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su adecuación para usar como miembros de unión específicos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En aras de la brevedad, el sistema de separación se describirá principalmente en términos de su capacidad para seleccionar y separar específicamente una población definida de células (células diana) a partir de una población heterogénea de células, tales como sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical o placenta, sangre fetal o un producto de leucaferesis. Además, se apreciará que algunos tejidos pueden fragmentarse hasta una célula única o suspensión monodispersa para permitir el aislamiento de un subgrupo celular particular, tal como la separación de los linfocitos infiltrantes del tumor en una masa tumoral, la separación de islotes celulares a partir del tejido renal, etc. Por ejemplo, diversos tipos celulares pueden marcarse con un anticuerpo específico para permitir la depuración celular y/o el enriquecimiento celular. La población de células diana se identifica generalmente mediante un miembro de unión específico, como se describió anteriormente, que se une selectivamente a un antígeno de superficie celular presente en las células diana. Sin embargo, debe entenderse, que el presente aparato y método no se limita a tales usos.

Por simplicidad, el miembro de unión específica se ejemplificará en la presente descripción por un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse directa o indirectamente a una partícula magnética. Si el anticuerpo se une directamente a la partícula magnética, entonces la población de células diana se marca magnéticamente cuando el anticuerpo se une al antígeno de superficie celular. Si el anticuerpo se une indirectamente a la partícula magnética, entonces la población de células diana es susceptible al marcado magnético cuando el anticuerpo se une a las células diana. La población de células unidas a anticuerpos se marca realmente por medio de un contacto ulterior de las células con un miembro de unión específico para el anticuerpo, donde ese miembro de unión específico se une por sí mismo a una partícula magnética. Después, las células diana, identificadas mediante tal marcado magnético, se separan de otras células por medio de un campo magnético. Por ejemplo, un miembro de unión específico tal como la avidina

puede conjugarse a una partícula magnética donde la avidina se une a un anticuerpo biotinilado que a su vez se une específicamente a las células diana.

El miembro de unión específico puede unirse directamente a la partícula magnética. Esto puede lograrse por medio de grupos reactivos sobre el miembro de unión específico y la partícula magnética propiamente dicha.

5 Alternativamente, el miembro de unión específico y la partícula magnética pueden unirse por medio de un agente de acoplamiento o un enlazador. Las expresiones "agente de acoplamiento" o "enlazador", como se usan en la presente descripción, incluyen diversos agentes bifuncionales formadores de uniones cruzadas o de acoplamiento, es decir, moléculas que contienen dos grupos reactivos o "extremos", que pueden separarse por un espaciador.

Las matrices convencionales de separación magnética de alto gradiente se preparan, típicamente, a partir de materiales tales como alambres, fibra revestida con metal o lana de acero. En el dispositivo de separación magnética mejorado de la presente invención, la matriz intensificadora de gradiente del separador magnético de alto gradiente se forma a partir de esferas pequeñas de material ferromagnético o magnéticamente susceptible. Tales materiales incluyen, entre otros, a hierro, acero, cobalto, níquel y otros metales ferromagnéticos de tierras raras o aleaciones de estos. Por ejemplo, el material de matriz puede incluir esferas metálicas ferromagnéticas tales como esferas de hierro (por ejemplo, MARABU Balls, Kugelfabrik Schulte & Co., Wermelskirchen, Alemania). Se conocen muchos métodos diferentes de fabricación de esferas. Usualmente las esferas tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 1,5 mm para la separación de células grandes o complejos celulares y de aproximadamente 0,05 a 0,2 mm de diámetro para material subcelular. Preferentemente, las esferas tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 0,5 mm, y más preferentemente, las esferas se seleccionan para tener un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 0,3 mm. Es deseable que el tamaño de las esferas sea relativamente homogéneo, que usualmente no varíe más de aproximadamente 15% del tamaño promedio, más usualmente, en no más de aproximadamente 10% y, preferentemente, en no más de aproximadamente 5%.

La forma esférica sustancialmente simétrica y el tamaño sustancialmente uniforme de las esferas son deseables para la construcción de una matriz separadora magnética, ya que las esferas pueden asumir una configuración entramada en donde las brechas entre las esferas formen canales o poros regulares en la matriz. La configuración entramada es una estructura modelada de esferas que forma canales de tamaño regular entre las esferas adyacentes y a lo largo de la matriz. Después de la aplicación de un campo magnético al separador, se crean gradientes de campo magnético en las brechas entre las esferas. El tamaño uniforme, y por tanto el espaciado, de las esferas proporciona un gradiente magnético sustancialmente uniforme a lo largo de la matriz, y características de flujo de fluido sustancialmente uniformes. En la figura 4 se representa un canal de flujo. Las dimensiones del canal pueden describirse por la bola o partícula de tamaño máximo que encajaría entre las esferas de la matriz. Con respecto a la figura 4, la relación geométrica es  $r = \text{aproximadamente } 0,155 R$ . Se apreciará a partir de las enseñanzas de la presente descripción que el tamaño del canal puede ajustarse a un diámetro promedio óptimo para el procedimiento de separación deseado mediante la variación del tamaño de las esferas que se usan para formar la matriz.

La forma esférica proporciona la formación de una estructura de matriz sustancialmente estable cuando las esferas se empaquetan dentro de una carcasa que define una cámara de separación. Como se describe con detalle más abajo, la matriz se reviste, además, con un material sustancialmente impermeable a los fluidos tal como un polímero plástico. Cuando se aplica un recubrimiento de polímero plástico, se cierran las brechas estrechas entre las esferas, lo que resulta en una matriz hidrodinámicamente optimizada. La matriz ferromagnética resultante usualmente ocupará entre 60% y 75% del volumen total de la cámara de separación y será permeable a los fluidos. El recubrimiento impermeable ocupará aproximadamente de 1 a 5% del volumen total. El volumen libre variará de aproximadamente el 20% al 40% del volumen total de la cámara de separación. En una realización preferida, la matriz total ocupará aproximadamente de 75% a 80% del volumen total de la cámara de separación.

La Figura 1 presenta un esquema de una columna de separación ilustrativa. Las esferas no se representan a escala, sino para representar mejor la formación de una matriz tridimensional permeable al fluido 6. Las esferas se empaquetan en una carcasa 4 que se hace de un material no magnético. La carcasa del separador magnético sirve como el cuerpo de la columna de separación, y el interior de la carcasa define una cámara de separación. Las carcasas de varias longitudes, formas y diámetros se hacen ventajosamente de plástico. Los materiales no magnéticos adecuados para la construcción de una carcasa del separador magnético incluyen acero inoxidable, vidrio, plástico, etc.

En un aspecto preferido, la carcasa del separador magnético es un plástico al que se adherirá el recubrimiento de matriz, lo que permitirá propiedades hidrodinámicas mejoradas en el límite de la matriz y la carcasa. Se apreciará que el material de recubrimiento y el material de la carcasa se seleccionarán por su compatibilidad entre sí, por ejemplo, debe seleccionarse un recubrimiento de barniz que no resulte en la acumulación de residuos plásticos no adherentes en la columna. Se conocen diversos mecanismos mediante los cuales los materiales se adhieren entre sí y pueden explotarse para este propósito. Convenientemente, la selección para la compatibilidad puede hacerse en base al disolvente que se usa junto con el barniz. El disolvente será ligeramente reactivo con la carcasa de plástico, de manera que el barniz se adherirá en el disolvente, pero no tan reactivo para que se vea comprometida la integridad estructural de la columna durante el procedimiento de curado del barniz. Por ejemplo, el material de

recubrimiento puede seleccionarse para incluir un disolvente que provoque una ligera disolución del interior de la carcasa de plástico. Después del curado, el material plástico se endurece y, por consiguiente, se une o sella entre sí al material de recubrimiento y al material de la carcasa. Cualquier experto en la técnica apreciará que la información relativa a tal reactividad está generalmente disponible. Un ejemplo de una combinación adecuada de una carcasa y un disolvente es metiletilcetona y el plástico ULTEM® (General Electric).

Preferentemente, cada uno de los materiales seleccionados para la construcción de la columna de separación 2 será compatible, además, con los procedimientos de esterilización. Preferentemente, la carcasa tiene forma cilíndrica para facilitar el flujo de la muestra a través de la cámara de separación, así como también, la formación de la matriz tridimensional 6 dentro de la carcasa. Las paredes de la carcasa tienen, preferentemente, un grosor de aproximadamente 1 a 3 mm. La columna de separación tiene puertos de entrada 12 y salida 14 para la introducción y descarga de fluidos. Generalmente, los puertos de entrada y salida son estructuras estrechas con relación al cuerpo principal de la carcasa. Esto facilita la unión del separador a los otros circuitos de fluido en un sistema de separación y mantiene el dispositivo, ventajosamente, como un sistema cerrado. Los puertos de entrada y de salida pueden ubicarse en sitios diferentes de los representados en la figura 1, pero se apreciará que la estructura global del separador proporcionara, preferentemente, una cámara de separación que tenga el menor número de curvas o esquinas que pudieran, de alguna otra manera, frenar el flujo del fluido o crear espacios donde la muestra podría acumularse.

En la entrada y salida de la columna, la columna se construye para tener un mecanismo de alimentación que asegure una distribución homogénea óptima y un flujo a través de la matriz. El mecanismo de distribución está comprendido por el volumen delante de la capa de la tapa 8 y la propia capa de tapa, que sirve como resistencia de flujo. El volumen de distribución (en mililitros) puede definirse con relación al ancho de la columna (en milímetros), que usualmente tiene una relación de aproximadamente 0,1 a 10. El volumen de la cámara delante de la capa base 10, así como la propia capa de base, sirven, además, como mecanismos de alimentación para fluidos que pasan a la cámara a través del orificio de salida.

Es preferible disponer de dimensiones de columna donde la relación del diámetro con respecto a la longitud sea al menos de 0,2 a 1. Las dimensiones reales de la columna dependerán del material que se va a separar, y del caudal deseado para la separación. Las dimensiones de la columna proporcionarán una cámara que aceptará una matriz que tenga un área superficial adecuada para crear gradientes de campo magnético suficientes en la cámara de separación y que permita una retención eficaz del material marcado magnéticamente. El volumen necesario para una separación dada puede determinarse empíricamente y variará con el tamaño, la densidad del antígeno en la superficie celular, la afinidad del anticuerpo, etc. Como un ejemplo, un área local de 3 cm<sup>2</sup> permite un caudal de 5 a 40 ml/minuto. La capacidad de unión de una matriz de 2 x 4 cm es de aproximadamente 10<sup>9</sup> células marcadas.

Para facilitar la fabricación de la columna de separación, la capa de base 10 del material poroso no magnético se coloca en la carcasa de manera que cuando las esferas ferromagnéticas se colocan en la cámara no pasan a través del puerto de salida 14. Los materiales porosos adecuados para la formación de la capa base incluyen, entre otras a, plástico poroso, metales sinterizados o vidrio, rejillas, etc. Por ejemplo, pueden usarse diversos sinterizados porosos disponibles de Porex Singwitz, Alemania. Usualmente, el material poroso tendrá un tamaño de poro de aproximadamente 20 a 200 µm, preferentemente de 50 a 150 µm. Se seleccionará un tamaño de poro adecuado según las dimensiones de la sustancia diana y la composición del material de muestra. Además, el tamaño de poro no será tan grande como para permitir que las esferas llenen las aberturas porosas del material de la capa. Después de la inserción de las esferas en la cámara, la carcasa puede sacudirse o hacerse vibrar para facilitar el asentamiento de las esferas en una configuración más uniforme. Opcionalmente, la capa de tapa 8 de material poroso no magnético se coloca en la carcasa sobre la matriz para mantener la configuración uniforme de la matriz durante el almacenamiento, la manipulación y el uso. Además, puede aplicarse presión a la capa de tapa 8 para empacar más firmemente las esferas dentro de la cámara. La parte superior 16 de la columna de separación, que incluye el puerto de entrada 12 en esta realización se coloca entonces en la parte superior de la carcasa 4 y se une a la carcasa. Por ejemplo, cuando se usan materiales plásticos, la parte superior 16 puede pegarse o soldarse ultrasónicamente a la carcasa 4 para completar la formación de la columna de separación. Después de completar la carcasa, se recubre la matriz.

Con respecto a la Figura 1, se aplica un recubrimiento a la matriz permeable al fluido descrita anteriormente. El recubrimiento se selecciona para ser sustancialmente impermeable a los iones y, por tanto, protege el material de la matriz metálica de la corrosión, así como también inhibe el escape de los cationes de la matriz, lo que podría dañar las células. Además de la formación de una capa protectora impermeable sobre el material de la matriz, un recubrimiento completo de la matriz cierra las brechas entre las esferas, lo que proporciona tanto la estabilidad mecánica de la matriz, como una matriz optimizada hidrodinámicamente. Dicha estabilidad mecánica es particularmente ventajosa cuando la matriz se forma a partir de pequeñas esferas de metal, susceptibles o sensibles magnéticamente, como se describió anteriormente. Un material de recubrimiento tal como un recubrimiento de barniz puede fluir hacia el puerto de entrada 12 de la columna de separación. El barniz fluye a través de la capa de tapa 8, matriz 6 y capa de base 10, y por consiguiente recubre la superficie porosa de cada componente. El exceso de barniz se deja pasar desde el puerto de salida 14 de la cámara. La columna de separación revestida puede centrifugarse para expulsar, además, el exceso de material de recubrimiento de la cámara. Después, se deja secar el recubrimiento. La columna de separación puede calentarse para promover, además, el secado del recubrimiento.

Por ejemplo, la columna de separación recubierta puede colocarse en un horno a 110°C durante cuatro a cinco horas seguido del secado continuo a temperatura ambiente durante tres a siete días.

Al secarse, el recubrimiento se endurece, y por consiguiente le proporciona un soporte mecánico a la matriz. Este soporte mecánico no solo ayuda a mantener la integridad de la matriz durante el almacenamiento y manipulación de la columna de separación, sino que, además, le proporciona a la matriz una estructura rígida que no presenta una elasticidad significativa. Esta rigidez es ventajosa porque de otra manera la matriz podría deformarse tras la aplicación de un campo magnético externo a la columna de separación. La fuerza del campo magnético aplicada de los medios magnéticos externos está, típicamente, dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 Tesla, y más preferentemente, entre aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8 Tesla. El campo debe ser lo suficientemente grande y la distancia entre el imán y la columna de separación debe ser lo suficientemente pequeña como para inducir gradientes intensificados del campo magnético dentro de la matriz. Para mantener gradientes magnéticos uniformes en el separador, el material de la matriz debe moverse o desplazarse en la cámara tras la aplicación del campo magnético. Los componentes metálicos esféricos, la carcasa y el recubrimiento se combinan ventajosamente para proporcionar una matriz mejorada con suficiente rigidez para resistir una deformación sustancial cuando la columna de separación se coloca dentro de un campo magnético.

Es preferible recubrir la matriz cuando los componentes metálicos esféricos están dentro de la columna de separación en la carcasa. El recubrimiento de la matriz dentro de la carcasa evita la interrupción de la matriz después que se aplica el recubrimiento. Además, la matriz dentro de la carcasa sirve para llenar o sellar pequeños espacios huecos, hendiduras intersticiales formadas cerca de los puntos de contacto entre las esferas, así como también entre las esferas y la carcasa, mientras que simultáneamente proporciona una superficie uniforme a los canales o es formada por los puntos separados de las esferas. Estos canales o poros dan como resultado la permeabilidad de la matriz. Al sellar los espacios vacíos, hay una disminución en las áreas donde las células u otros componentes sólidos de la muestra pueden formar una brecha o quedar atrapadas físicamente, incluso en ausencia de un campo magnético.

En la columna de separación terminada, la selección de materiales de recubrimiento de la matriz resultará, preferentemente, en canales o rutas a través de la matriz permeable que tienen un diámetro promedio entre 20 y 60  $\mu\text{m}$  y una ocupación de aproximadamente 60% a 80% del volumen total de la cámara de separación. Por ejemplo, una columna de separación para la separación de las células de la sangre puede tener un tamaño de canal recubierto final con un promedio de 20  $\mu\text{m}$ , ocupando la matriz aproximadamente el 80% del volumen total de la cámara.

Después de la preparación del recubrimiento sustancialmente impermeable, la matriz y otras superficies interiores de la cámara de separación se tratan además, preferentemente, mediante la adición de un material hidrófilo tal como polividona (BASF, Ludwigshafen, Alemania). Otros materiales de recubrimiento hidrófilos adecuados incluyen, entre otros, polivinilpirrolidina, polietilenglicol, hidroxietil-almidón, y recubrimientos hidrófilos, tales como acrilamidas, tensioactivos o agentes humectantes de tipo detergente, y materiales biológicos que incluyen, entre otros, heparina y albumina de suero humano. La superficie interior de la cámara de separación puede, además, hacerse hidrófila mediante plasma o grabado en corona de la superficie. El recubrimiento hidrófilo proporciona al interior de la columna de separación y la matriz permeable a los fluidos una superficie fácilmente humectable. Mediante la mejora de la capacidad de humectación de estas superficies, la introducción de fluido en la columna de separación producirá un frente de fluido uniforme cuando éste pase a través de la cámara. Esto facilita la eliminación de burbujas de aire de la matriz permeable y otros espacios vacíos en la cámara de separación. Es deseable mantener la columna de separación y otros componentes del dispositivo como un sistema cerrado sustancialmente libre de aire durante el procedimiento de separación. La presencia de aire en el sistema durante la separación de las células diana afecta a las tensiones superficiales interiores y las áreas no ventiladas, lo que puede conducir a la destrucción celular.

Con respecto a la Figura 2, que representa un dispositivo de separación, la columna de separación 40 puede precederse por un dispositivo de prefiltración. La figura representa el dispositivo de prefiltración como una columna 30, sin embargo, debe entenderse que pueden usarse otras configuraciones, tales como el prefiltro. Generalmente, la columna de prefiltración es una estructura tridimensional que puede ser sustancialmente idéntica a la columna de separación en términos de su composición estructural. Sin embargo, la columna de prefiltración puede tener dimensiones diferentes, la matriz puede hacerse de esferas que tengan una composición diferente, por ejemplo, un material no ferromagnético o la matriz puede hacerse de esferas que tengan un diámetro diferente al que se usa en la columna de separación, lo que proporciona de esta manera un tamaño de poro o canal diferente del que se encuentra en la columna de separación. En una realización, la columna de prefiltración es idéntica a la columna de separación. La etapa de la muestra a través de la columna de prefiltración sirve para atrapar y eliminar los componentes del fluido que no se desean en el producto de separación final. Por ejemplo, en las separaciones de células de la sangre, las células "pegajosas" tales como monocitos, granulocitos y plaquetas pueden eliminarse de la suspensión celular mediante la columna de prefiltración. Alternativamente, la columna de prefiltración puede construirse para tener un tamaño de poro promedio que sea menor que el que se encuentra en la columna de separación. Por ejemplo, el tamaño de poro de la matriz permeable puede seleccionarse para eliminar células tumorales grandes de la muestra antes de la etapa del fluido a través de la columna de separación. La etapa de la muestra del fluido a través de la columna de prefiltración puede servir, además, para separar agregados, tales como

agregados celulares, que pueden existir en el fluido. Además, debido a que la columna de prefiltración contiene materiales sustancialmente idénticos a los de la columna de separación, los componentes de la muestra que podrían unirse no específicamente a la columna de separación son atraídos ventajosamente por la columna de prefiltración. Por tanto, la columna de prefiltración reduce la posibilidad de ensuciar la columna de separación durante el procedimiento de separación, y esto reduce la recuperación de células o componentes del fluido no deseados en el producto de separación final.

Con respecto a la Figura 2, se representa una realización preferida del dispositivo de separación 25. El contenedor de muestras 81 se conecta a un filtro de suspensión opcional 35. El filtro de suspensión puede usarse para eliminar las partículas componentes no deseadas de la muestra del fluido y se selecciona para disponer de un tamaño de poro suficiente para eliminar partículas por encima de un cierto tamaño. Por ejemplo, el filtro de suspensión puede ser un filtro Pall (Pall SQ40S, Pall Biomedical, Inc., Puerto Rico) con un tamaño de poro seleccionado para eliminar partículas mayores de 40  $\mu\text{m}$ , tales como coágulos y conglomerados de células en muestras de células hematopoyéticas. El filtro de suspensión se conecta por la vía fluida dos 12 al puerto de entrada 32 de la columna de prefiltración 30.

El puerto de salida 34 de la columna de prefiltración 30 se conecta por la vía del fluido cinco 15 al puerto de entrada 42 de la columna de separación 40 a la que se aplicará el campo magnético durante el procedimiento de separación. El puerto de salida 44 de la columna de separación se conecta por la vía del fluido ocho 18 al canal de distribución 88 que conduce al contenedor de recolección de producto 83, al contenedor de desecho de lavado final 84 y al contenedor de muestra no marcada 85. Las vías de fluido separadas, nueve 19, diez 20, veinte y once 21 conducen a estos contenedores, respectivamente.

Este dispositivo de separación incluye, además, un contenedor 80 de lavado o tampón y un contenedor 82 de desecho del lavado inicial, los cuales se conectan por las vías de fluido uno 16 y tres 17, respectivamente, a la vía de fluido dos 12. El contenedor tampón 80 se conecta, además, a través del conducto de lavado o de la línea tampón 90 (vía de fluido seis) al canal de distribución 88. La línea de tampón se conecta, además, a la vía de fluido cinco 15 por medio de la vía de fluido cuatro 14. Las vías de fluidos, recipientes, filtros y columnas pueden acoplarse entre sí por medio de cualquier medio adecuado tal como clavos estándar, cerraduras Luer, conectores macho-hembra, conectores en T, conectores en Y, y conectores de 4 vías u otros accesorios como se usan comúnmente en los conjuntos de suministro de solución intravenosa.

El caudal a través de los circuitos de fluido del dispositivo de separación puede controlarse por medio de válvulas ubicadas dentro de la(s) vía(s) de fluido. Las vías de fluido del uno al once se asocian con las correspondientes válvulas de uno a once (1-11). Las válvulas pueden estar dentro de las mismas vías o pueden ser externas a las vías. El caudal puede controlarse, además, por una bomba. Por ejemplo, cuando las vías de fluido se hacen de un material flexible, tal como un tubo flexible, las válvulas adecuadas para el control del transporte de fluido incluyen válvulas de pinza. Las válvulas de pinza cierran la vía del fluido porque presionan las paredes del tubo una contra la otra. Los expertos en la técnica apreciarán que tales válvulas de pinza se seleccionarán para acomodar el tamaño de la tubería elegida para usar como una vía de fluido. Además, la fuerza de compresión de la válvula de pinza se seleccionará para lograr la compresión de la tubería elegida y, de esta manera, incidir en el cierre de la vía de fluido. Las especificaciones de la válvula, por tanto, se adaptarán a las especificaciones de suavidad o dureza (durómetro) de la tubería seleccionada.

Un aspecto del dispositivo de separación incluye, además, el bucle de recirculación 92 (vía de fluido siete) de manera que el fluido que ya pasó a través de la columna de separación 40 puede recircularse a través de la columna de separación. Típicamente, una bomba 64 se conectará al bucle de recirculación para facilitar el reciclado del fluido a través de la columna de separación, así como también para controlar el flujo a través de la columna. Los expertos en la técnica apreciarán que puede usarse una diversidad de bombas. Una bomba ilustrativa es una bomba peristáltica que puede controlar la etapa de fluido a través del bucle de recirculación en ambas direcciones y a velocidades variables. El dispositivo de separación que tiene un bucle de recirculación permite separaciones secuenciales en una columna, mediante un procedimiento de unión y elución, seguido por un segundo procedimiento de unión y elución. Las separaciones secuenciales proporcionan una pureza mejorada en la población diana final.

La Figura 2 representa esquemáticamente un dispositivo de separación. Sin embargo, se apreciará que puede lograrse un procedimiento de separación mediante el uso de los componentes básicos del sistema, es decir, el separador magnético mejorado y los recipientes de recolección.

Los expertos en la técnica apreciarán que los medios de recirculación y las vías de caudal son adecuados, además, para usar en sistemas de separación alternativos. Por ejemplo, los medios de recirculación pueden usarse, ventajosamente, en un sistema en donde los medios de separación implican técnicas de centrifugación, columnas de absorción o medios químicos como alternativas a los medios de separación magnética o electromagnética.

En un procedimiento de separación de células ilustrativo, las vías de fluido y las columnas se ceban para permitir que un líquido de lavado fluya a través de todas las vías y columnas de fluido, preferentemente, a velocidades de flujo y presiones variables. El líquido de lavado puede contener materiales tal como una proteína fisiológicamente

aceptable, tal como albumina de suero humano (HSA), que inhibe la adhesión de las células a las superficies interiores de los componentes plásticos del dispositivo. El líquido de lavado puede contener, además, pequeñas cantidades de tensioactivos o detergentes fisiológicamente aceptables para mejorar la humectación de las superficies interiores.

5 Se encontró que las grandes burbujas de aire en las vías de fluido son perjudiciales para la recuperación de células viables. En la técnica se conocen métodos para eliminar las burbujas de aire de las vías de fluido, y pueden emplearse para este propósito. Un método de particular interés hace uso de la observación de que un sinterizado permeable, tal como los que se usan en la capa de tapa y/o la capa de base, no permitirá la etapa de burbujas de  
10 burbujas de aire mediante la circulación del líquido de lavado a través de un bucle de recirculación a velocidades de flujo menores que aproximadamente 400 ml/minuto. Una columna puede liberarse de las burbujas de aire se acumulan entonces fuera de la columna en las capas de base y/o tapa. Después, se invierte la dirección del flujo y las burbujas son eliminadas del sistema dentro de una bolsa de desecho adecuada. Preferentemente, la secuencia se repite para asegurar la eliminación de todas las burbujas. Las burbujas existentes pueden ampliarse intencionalmente por la generación de presión  
15 negativa.

En tal procedimiento ilustrativo, pueden usarse anticuerpos conjugados magnéticamente para dirigirse específicamente a las células deseadas en una población heterogénea de células. El reactivo magnético se incuba con la población heterogénea de células, después las partículas no unidas se eliminan por cualquier medio conveniente, por ejemplo, centrifugación, etc. Cuando se desea la esterilidad de las células, las incubaciones de  
20 anticuerpos y los lavados pueden realizarse en un procedimiento de recipiente cerrado, donde los anticuerpos y líquidos de lavado se añaden a un recipiente estéril por medio de una jeringuilla estéril o dispositivo similar. De esta manera, se minimiza la contaminación por microorganismos transmitidos por aire de las células deseadas. En un sistema cerrado de este tipo, particularmente cuando el recipiente es una bolsa flexible, la mezcla de células y anticuerpos puede mejorarse mediante la inyección de una pequeña cantidad de aire estéril en una relación de  
25 aproximadamente 0,5 a 2 de aire a líquido, dentro del recipiente.

La suspensión de células incubadas, que ahora contiene células diana marcadas magnéticamente, se pasa a través del dispositivo de separación. El sistema transporta las células a través de un separador magnético que se ubica dentro o adyacente a un campo magnético. La fuente del campo magnético puede ser un imán permanente o un electroimán. La columna de separación se construye, preferentemente, para incluir una matriz ferromagnética de  
30 esferas ferromagnéticas apiladas, como se describió anteriormente. Opcionalmente, la muestra se pasa a través de una columna de prefiltración, que se construye, además, como se describió anteriormente, antes de pasarla a través de la columna de separación. Si la columna de separación contiene una matriz compuesta de esferas diferentes a las ferromagnéticas, entonces la muestra puede pasarse primero a través de una columna de prefiltración que es sustancialmente idéntica a esa columna de separación.

35 Las células marcadas magnéticamente se acumulan en la columna de separación en respuesta al campo magnético. Las células no marcadas y otros componentes de la suspensión pasan a través de la columna de separación y hacia un recipiente de muestra no marcado y/o recipiente de desecho. Después, las células marcadas o purificadas pueden eluirse de la columna de separación ya sea mediante la eliminación de la columna de separación del campo magnético o por la retirada del campo magnético de la columna de separación. Para lavar las células marcadas de la  
40 columna de separación se pasa una solución de lavado, tal como un líquido tamponado, a través de la columna de separación y hacia un recipiente de recolección del producto. El recipiente de recolección puede usarse para el procesamiento ulterior de las células diana o la crioconservación de las células diana.

La columna de separación es una columna de separación magnética de alto gradiente que se construye a partir de esferas ferromagnéticas, como se describió anteriormente. Los recipientes referidos en la presente descripción son,  
45 típicamente, bolsas de plástico, tales como las que se usan para el almacenamiento y el suministro de fluidos intravenosos, pero puede usarse cualquiera de los recipientes adecuados. Los recipientes se seleccionarán por su volumen de almacenamiento o de recolección necesario, su capacidad para la esterilización y su capacidad para usarse en un sistema cerrado, es decir, un sistema de separación del que puede eliminarse sustancialmente todo el aire antes de usar.

50 En otro aspecto, las células marcadas magnéticamente se recirculan a través de la columna de separación para mejorar la selección de las células diana y la eliminación de células u otros componentes no deseados de la suspensión. Algunos aspectos incluyen, además, el uso de una columna de prefiltración. Sin embargo, la columna de prefiltración no se somete a ningún campo magnético. En su lugar, la etapa preliminar de la suspensión de células a través de la columna de prefiltración resulta en la captura de componentes de la suspensión o materiales  
55 que de cualquier otra manera podrían unirse no específicamente a la columna de separación. Tales uniones no específicas pueden provocar el bloqueo o la suciedad de la columna de separación, lo que a su vez, podría inhibir o reducir la separación y recolección de la población de células marcadas.

Las vías de fluido, los recipientes de recolección, los filtros de la suspensión, la columna de prefiltración y la columna de separación, pueden construirse, interconectarse y suministrarse como un dispositivo de separación desechable.  
60 Las células diana se recolectan, preferentemente, en un recipiente de transferencia de sangre estéril a partir del cual

las células pueden trasplantarse al paciente o en el que las células pueden almacenarse o someterse a un procesamiento adicional. El dispositivo completo de separación de células puede empaquetarse previamente en recipientes adecuados. El dispositivo empaquetado previamente puede esterilizarse y proporcionarse listo para usar en el procedimiento de separación magnética mejorado de la presente descripción. Los reactivos necesarios para el procedimiento de separación deseado pueden proporcionarse, además, en forma de estuche. Por ejemplo, un conjugado específico para la población de células diana u otro analito puede proporcionarse por separado o con el dispositivo. El estuche puede incluir, además, soluciones de lavado, por ejemplo, una solución salina estéril estándar, y/u otros líquidos tamponados, tales como una solución salina tamponada con fosfato, EDTA 1 mmol/l y albumina de suero humano al 0,5%. Estos reactivos u otras soluciones pueden proporcionarse en recipientes tales como bolsas de plástico que pueden conectarse a las etapas de fluido apropiados del dispositivo de separación de células.

El sistema de separación mejorado de la presente invención puede automatizarse totalmente. En el sistema automatizado, un ordenador controla el caudal a través de los circuitos de fluido y la columna de separación, controla la fuerza del campo magnético o la colocación del imán y/o la columna de separación para proporcionar la retención y liberación de las células diana o analitos marcados magnéticamente, y dirige los productos de recolección final hacia los recipientes apropiados.

Un aspecto de un instrumento automatizado de separación de células, como se representa en la figura 3, incluye componentes mecánicos, electromecánicos y magnéticos. Los componentes mecánicos pueden incluir: una cubierta exterior o carcasa 15 del instrumento; soporte del recipiente ajustable 21; bomba peristáltica 64; el soporte de la columna de prefiltración 32 y el soporte de la columna de separación 42. Los componentes electromecánicos pueden incluir: válvulas de pinza solenoide 1-11; un motor interno (no mostrado) para accionar la bomba peristáltica 64; un motor interno (no mostrado) para mover el soporte de la columna de separación 42 (y de esa manera mover la columna de separación 40) dentro o fuera del campo magnético, o para mover el imán 50; y un detector de burbujas (sensor ultrasónico) 65, que se usa para detectar la presencia de fluido en los circuitos de fluido. Los medios magnéticos pueden incluir imanes permanentes y electroimanes. Se apreciará que estos componentes individuales pueden seleccionarse de una serie de suplentes fácilmente disponibles y pueden combinarse en una variedad de configuraciones sin apartarse de la descripción general del sistema de separación magnética mejorado.

En un aspecto del dispositivo de separación, las vías de fluido, los recipientes de solución y de recolección, el filtro de suspensión, la columna de prefiltración, la columna de separación y los conectores se proporcionan como un componente desechable preensamblado al sistema de separación. El dispositivo de separación se monta sobre el instrumento de separación para realizar el procedimiento de separación. Una vez completado el procedimiento de separación, el recipiente de recolección de producto puede retirarse y los componentes restantes del dispositivo de separación se desechan.

Preferentemente, un microprocesador incorporado (no mostrado) controla todos los componentes electromecánicos del instrumento, y el programa dirige al sistema para realizar las operaciones apropiadas en una secuencia estándar. Una pantalla 62 y el teclado del operario 60 permiten al operario supervisar el funcionamiento automático del sistema y controlar el funcionamiento del instrumento en un modo manual. Una impresora (no mostrada) puede conectarse al microprocesador para imprimir la información de procedimiento, etiquetas, etc.

La Figura 3 representa un instrumento de separación y un dispositivo de separación montado. El dispositivo de separación se monta o instala sobre el instrumento mediante el posicionamiento de la tubería de las vías de fluido en sus respectivas válvulas de pinza externas 1-11, como se describió anteriormente. La columna de prefiltración 30 se coloca dentro del soporte 32 de la columna de prefiltración. La columna de separación 40 se coloca dentro del soporte de la columna de separación 42 que se mueve con relación al imán 50 por medio del brazo retráctil 44. La manija ajustable 20 se usa para asegurar el brazo de suspensión 21 en una posición elevada. Hay monturas o clavijas 22 en el brazo de suspensión sobre las cuales se coloca el recipiente de desecho de lavado inicial 82 y los recipientes de tampón y muestra (no mostrados) según sea apropiado. El aparato puede incluir, además, el compartimento de almacenamiento 70 para separar el recipiente de desecho final y el recipiente de muestra no marcada del recipiente de recolección de producto (no mostrado).

Como se mencionó anteriormente, los sistemas de separación como se describió anteriormente pueden integrarse además con diversos sistemas de procesamiento de muestras/células para realizar las etapas de preparación de la muestra antes de la separación del componente de la muestra mediante las técnicas de separación magnética descritas. La figura 5 ilustra un sistema según la presente descripción. Como se describió anteriormente, un sistema de la presente descripción puede incluir diversos componentes mecánicos, electromecánicos y magnéticos. El sistema 100 incluye una unidad de separación 106 y una unidad de procesamiento 104 integradas en un sistema único que contiene una cubierta exterior o carcasa 105. El sistema 100 puede incluir un sistema o unidad de separación magnética similar a los descritos anteriormente. El sistema 100 incluye una unidad de separación magnética 106 que incluye una carcasa para colocar una columna de separación (por ejemplo, una columna de separación magnética como se describió anteriormente, figura 1) en la unidad de separación magnética 106. El sistema 100 incluye además una bomba 108 y una pluralidad de medios o válvulas de control del caudal, como se ilustra por medio de la válvula 110. Se observa que, mientras que solamente la válvula 110 se identifica específicamente por un número, el sistema 100, como se muestra en la figura 5, ilustra un número de válvulas que

son identificables al tener una estructura ilustrada idéntica a esa de la válvula 110. Además, se reconocerá que, mientras que cada uno de la pluralidad de medios/válvulas de control de flujo son idénticos en la figura 5 con propósitos ilustrativos, los medios de control de flujo según la presente descripción pueden tomar una variedad de realizaciones y pueden incluir uno o más tipos diferentes de medios/válvulas en un sistema único. Los componentes del sistema 100 (por ejemplo, válvulas, bomba, unidad de separación, etc.) pueden acoplarse o conectarse mediante una o más vías de flujo para formar una serie de vías de fluido o circuitos de fluido similares a los descritos anteriormente. El sistema incluye, además, un sistema de control por ordenador o unidad 112 que proporciona la supervisión y/o el control de uno o más aspectos del sistema 100.

El sistema de control por ordenador 112, tal como se describió anteriormente, puede incluir uno o más dispositivos de entrada y/o salida, pantallas gráficas, interfaces de usuario y puede permitir el control manual y/o automático del funcionamiento y las funciones del sistema 100. El sistema de control por ordenador 112 puede incluir un módulo o sistema para procesar información (por ejemplo, información de flujo, etc.) dentro del sistema 100, y puede incluir una amplia variedad de ordenadores personales y/o disponibles comercialmente, componentes o electrónicos que tienen una o más estructuras de procesamiento etc, con tales sistemas que a menudo comprenden un equipo y/o programa de procesamiento de datos configurados para implementar cualquiera o una combinación de las etapas de los métodos, como se ha descrito en la presente descripción. El programa comprenderá, típicamente, un código de instrucciones de programación, legible por la máquina, incorporadas en un medio tangible tal como una memoria, medios de grabación digital u ópticos, señales telemétricas ópticas, eléctricas, o inalámbricas, o similares, y una o más de estas estructuras pueden usarse, además, para emitir o transmitir datos, señales o información entre los componentes del sistema en cualquiera de una amplia variedad de arquitecturas de procesamiento de señales.

El sistema puede incluir, además, diversos soportes, sensores, carcasas, etc. para diversos componentes que pueden acoplarse con el presente sistema para realizar los métodos como se describió en la presente descripción. El sistema 100 incluye, además, una o más estructuras de soporte 114 configuradas para sostener y/o soportar diversos fluidos, reactivos, muestras de depósitos de fluido, filtros etc, que pueden usarse con el sistema 100 según la presente descripción. Las estructuras de soporte pueden incluir diversas configuraciones de gancho o suspensión, o soporte (por ejemplo, soporte de filtro o carcasa) y no se limitan a ningún diseño particular. Los fluidos, tampones, reactivos, etc. colocados sobre un soporte 114 pueden acoplarse a una vía de fluido o tubería, que puede a su vez conectarse a más o más componentes del sistema 100. El sistema 100 puede incluir sensores para supervisar y/o controlar además el caudal a través del sistema. Los sensores pueden incluir, por ejemplo, sensores de líquidos, que pueden incluir detectores de burbujas (detector ultrasónico), sensores de presión, etc. Se muestran el detector de burbujas 116 y los sensores de presión 118. Se muestra un soporte 120, que puede configurarse para contener un filtro o unidad de reducción de volumen. El área de recolección 122 puede soportar recipientes de recolección, reactivos, etc.

El sistema 100 se ilustra además con respecto a la Figura 6. La unidad de procesamiento 104 puede incluir una carcasa o cubierta 124, que puede moverse (por ejemplo, extraerse) alrededor de una o más bisagras. La cubierta 124 define, al menos parcialmente, un área de procesamiento 126 que puede controlarse por temperatura y acoplarse a componentes de supervisión y control de temperatura que pueden alojarse dentro de la carcasa 105 del sistema 100. La unidad de procesamiento 104 incluye una cámara de muestra 128 configurada para el soporte y procesamiento de una muestra (por ejemplo, centrifugación, cultivo, separación de los componentes de muestra, etc.). La cámara de muestra 128 que se muestra es una cámara que rota, que se mantiene en su posición alrededor de un eje, que puede incluir un bloqueo antirrotación 130. La unidad de procesamiento 104 puede incluir uno o más sistemas de detección, tal como un detector óptico 132 ubicado dentro de la cubierta 124 y configurado para detectar o supervisar el procesamiento de una muestra en la cámara 128. Una o más líneas de entrada/salida de fluido pueden acoplarse a la cámara 128 y pueden mantenerse en posición mediante un soporte 134.

La Figura 7 ilustra una vista posterior del sistema 100. La unidad de control por ordenador 112 se muestra con un componente acoplado a la carcasa del sistema 105 alrededor de un eje rotacional, y la unidad 112 que tiene una ranura de entrada de medios de almacenamiento (por ejemplo, tarjeta de programación) 138. Se muestra un gancho 140, que puede proporcionar soporte para componentes externos, equipo de recolección, etc. El sistema 100 incluye conexión de energía y conmutador 142 y varias conexiones de interfaz 144 (por ejemplo, conexión de lector de código de barras, conexión de impresora, conexión de red, etc.); ventilación 146; y el disipador de calor 148 que proporciona un componente de los sistemas de control interno de temperatura.

Los componentes de una unidad de procesamiento, que incluye una cámara de muestra, se describen además con respecto a las figuras 8 hasta la 12. Con respecto a la Figura 8, se ilustra la cámara de procesamiento 150 que tiene una porción superior 152 y una porción de base inferior 154. La porción superior 152 puede incluir una estructura de refuerzo o soporte 156. La cámara 150 incluye, además, un eje 158 alrededor del cual gira la cámara 150, el eje 158 tiene una cerradura rotacional y el eje 158 se extiende a través del centro de la cámara 150 y se extiende hacia fuera de la parte superior 152. Los medios de rotación o cojinete 160 proporcionan un movimiento de rotación de la cámara 150 alrededor del eje 158. La cámara 150 incluye, además, puertos de fluido o conexiones de línea 162, 164 acoplados a una estructura de carcasa que rodea el eje 158, y los puertos 162, 164 conectados de manera fluida a uno o más compartimentos internos de la cámara de procesamiento 150.

Uno de los puertos puede usarse como ventilación para intercambiar gases.

- Una cámara de procesamiento según otro aspecto de la presente descripción se describe con respecto a la figura 9. La cámara 170 incluye una porción superior 172 y una porción inferior 174, con un eje de rotación 176 y los puertos 178, 180 configurados de manera similar como se describió anteriormente. La porción superior 172 incluye una estructura de soporte 182, así como también la estructura 184 que incluye un canal 186 que puede incluir al menos una porción visible a través de una ventana o prisma 188. El canal 186 puede acoplarse de manera fluida a un compartimiento que contiene la muestra en la cámara 170 y configurarse para la supervisión externa o la detección del procesamiento de la muestra. Por ejemplo, un componente (por ejemplo, células) en el fluido en el canal 186 puede separarse visiblemente durante las etapas de procesamiento, lo que indica, de esta manera, la separación de células o los componentes de muestra en uno o más compartimientos internos de la cámara.
- La cámara 170 puede comprender, además, al menos una ventilación, que comprende, preferentemente, una membrana o tapón hidrófobo estéril. Preferentemente, estas membranas o tapones pueden situarse en la parte superior o inferior de la cámara. La, al menos una, ventilación en la cámara tiene la ventaja particular de que el volumen en la cámara puede cambiarse fácilmente sin cambiar la presión en la cámara o proporcionar puertos adicionales de entrada y/o salida para el intercambio de aire o gas.
- Las centrifugas permiten una centrifugación por lotes, así como también una continua: las muestras, medios, gases y otros materiales pueden entrar y salir del sistema, por ejemplo, a través de los puertos de entrada y salida (por ejemplo, 178 y 180 en la Fig. 1) sin necesidad de detener la rotación de la cámara de centrifugación y rellenar la centrifuga (centrifugación por lotes). Esto permite una concentración continua de la muestra y el producto puede retirarse solo una vez al final de la centrifugación; por tanto, se evita la contaminación potencial debido a una manipulación adicional.
- En la figura 9a, se muestra un recipiente rotatorio o cámara de centrifugación 500. En la parte inferior de la cámara que rota 500 se coloca una zona de enfoque de microscopio 505 que comprende al menos una almohadilla de sensor 504. Debajo de la cámara que rota 500 se encuentra un módulo de cámara de microscopio 503 que comprende un microscopio óptico 501 y un motor para accionar el microscopio 502 para enfocar la óptica. El microscopio óptico 501 se configura de manera que puede enfocarse automáticamente para detectar la muestra que se separa en al menos dos componentes durante la centrifugación. De esta manera, el módulo de la cámara de microscopio 503 puede usarse para detectar diferentes capas formadas por la muestra separada en la cámara 500 debido a las fuerzas centrifugas. Además, puede medirse el valor de pH de los componentes de la muestra. Para este propósito, se usa un indicador en la cámara 500 que cambia su color en dependencia del valor de pH que está presente. Además, es posible que la temperatura de la muestra en la cámara se mida mediante el uso de cristales líquidos que se ubican en la cámara de manera que su posición pueda detectarse con un módulo de cámara de microscopio 503 desde el exterior. De esta manera, puede determinarse la temperatura en la cámara 500.
- El módulo de cámara de microscopio 503 puede montarse de forma móvil, de manera que el módulo 503 puede dirigirse con su microscopio óptico 501 a diferentes sensores de almohadilla 504 ubicados en la pared de la cámara 500. Esto facilita la detección de varias capas formadas en la cámara 500 o la detección del pH o la temperatura en diferentes posiciones dentro de la cámara 500.
- La Figura 10 ilustra una vista en sección transversal de una cámara de procesamiento de muestras según una realización de la presente invención. La cámara 190 incluye una porción superior 192 y una porción de base 194, y uno o más compartimientos internos. La cámara 190 se configura para que gire alrededor de un eje para aplicar una fuerza centrífuga a una muestra dispuesta en uno o más compartimientos en la cámara, de esta manera, se separan al menos dos componentes de la muestra. La cámara incluye la línea central 196 conectada de manera fluida a al menos un compartimiento de la cámara. Los componentes de la cámara 190 incluyen, además, la línea externa 198; el cojinete giratorio 200, las juntas rotativas 202, 204, 206; la línea de entrada exterior a la cámara 205; el canal radial inferior 208; la línea de entrada interior 210 a un compartimiento de la cámara; inclinación 212 y deflector 214. El retenedor de cámara 216 se incluye y configura para un posicionamiento/acoplamiento seguro de la cámara 190 con los otros componentes de un sistema de la descripción.
- La cámara de centrifugación 190 comprende, preferentemente, una junta giratoria, opcionalmente con dos líneas de fluido, preferentemente, con dos líneas de fluido. Las líneas de fluido pueden entrar en la cámara 190 en diferente posición. Por ejemplo, es posible colocar una primera línea de fluido en el perímetro exterior de la parte superior 192 (tapa). Una segunda línea de fluido podría situarse más hacia adentro, por ejemplo, de 2 mm a 20 mm más hacia el centro de la cámara 190. Opcionalmente, una ventilación puede situarse en la porción superior 192, por ejemplo, en forma de una membrana.
- Generalmente, la posición de las aberturas tales como puertos o entradas de línea en la cámara de centrifugación puede configurarse de manera que sean las más adecuadas para la centrifugación de una muestra particular. En dependencia de los componentes de una muestra particular, y del volumen relativo de cada componente en la muestra, las aberturas pueden posicionarse de manera que pueda lograrse la eliminación y/o la detección de un componente particular.

La Figura 10A ilustra una vista en planta superior de una cámara 201. La cámara 201 incluye una línea interna 203, un canal radial inferior 205, una entrada de la línea interior 207 a la cámara, opcionalmente un deflector 209, una inclinación 211 y una etapa de luz 209.

5 La Figura 11 ilustra una vista en sección transversal de una cámara. La cámara 220 incluye un eje alrededor del cual la cámara rota, una conexión de línea central 222 y una conexión de línea exterior 224, y uno o más compartimentos internos. Se ilustran además, el cojinete rotacional 226, así como también los sellos rotacionales 228, 230, 232; el canal interior 234, el canal de detección óptica 236 (de manera similar a lo que se describió anteriormente); la línea de entrada interior 238 a la cámara; la línea interior 240, y el canal radial inferior 242. Además, la cámara incluye un refuerzo interior 246 y un retenedor de la cámara 248. La Figura 11A ilustra una vista enfocada de la porción de una  
10 cámara 220 descrita anteriormente. Se muestran un canal de detección óptico 236, un prisma 237, y una etapa de luz 239 (que se indica además por flechas).

En otro aspecto de la presente invención, la parte inferior de la cámara puede tener una o más aberturas (Fig. 12A, 291) cubiertas con una membrana hidrófoba 292. Estas aberturas pueden usarse para suministrar gases dentro o eliminarlos de la cámara, por ejemplo, para los procedimientos de cultivos de células. La membrana puede pegarse,  
15 térmicamente, ultrasónicamente o unirse por otros medios a la parte inferior de la cámara en una forma que asegure la conexión estéril con la cámara.

Como se muestra en la Fig. 12B, la cámara puede tener un sistema de canales para el flujo de gases, por ejemplo, canales ensamblados como un sistema espiral 293, que garantiza un área de contacto extensa entre los gases y la membrana unida sobre los canales (no mostrado). Estos canales pueden ubicarse en la parte inferior o en la parte  
20 superior de la cámara. El sistema de canales tiene al menos una entrada (abertura) 294 y una salida opcional (abertura) 295 para los gases.

Las entradas o puertos de los canales de las Fig. 8-11A pueden variar en número y ubicación dentro del canal.

La Figura 12 ilustra una vista en sección transversal de una cámara. La construcción de la cámara 250 es similar en muchos aspectos a las cámaras que se describieron anteriormente, pero incluye, además, una pluralidad de  
25 estructuras estratificadas 252. Las estructuras estratificadas 252 pueden configurarse para proporcionar estructuras para cultivos de células o capas. Durante el uso, la muestra que incluye células puede introducirse en la cámara y fluir sobre las capas 252. El procedimiento de separación puede incluir la rotación de la cámara de manera que las células que se adhieren a las capas se separan de aquellas con menor afinidad por las capas. La rotación y/o parada intermitente durante la rotación pueden además desunir las células cultivadas de la superficie de las  
30 estructuras estratificadas 252 para el procesamiento de separación. Sorprendentemente, se encontró que este procedimiento intermitente es capaz, además, de suspender los aglutinamientos o el material biológico unido, como las células después del cultivo. La cámara incluye, además, la línea central ilustrada 251, la línea externa 253, el cojinete 255, los sellos rotacionales 257, la entrada de la línea exterior 259 a la cámara, la porción superior 261, el canal interior 263, la porción de la base 265, el retenedor 267, el canal radial inferior 269 y la línea de entrada 271 a la cámara.  
35

La cámara puede comprender o puede hacerse de diversos materiales. En una realización preferida, se usan materiales transparentes como plásticos, poliestirol (PS), poliestireno, policloruro de vinilo, policarbonato, vidrio, poliacrilato, poliácridamida, polimetilmetacrilato (PMMA) y/o tereftalato de polietileno (PET), politetrafluoretileno (PTFE) y/o poliuretano termoplástico (TPU), silicona o composiciones que comprenden uno o más de los materiales  
40 mencionados anteriormente. Además, la cámara puede hacerse de polietileno (PE). En una realización preferida, las capas en la cámara comprenden o se hacen de derivados de colágeno, quitina, alginato y/o ácido hialurónico. Además, son posibles polilactida (PLA), poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, que son biodegradables. Alternativamente, pueden usarse materiales no biodegradables, tales como poliestirol (PS), poliestireno, policarbonato, poliacrilato, polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA) y/o tereftalato de polietileno (PET). Pueden usarse, además, politetrafluoroetileno (PTFE) y/o poliuretano termoplástico (TPU). Otras alternativas incluyen  
45 materiales de cerámica y de vidrio, como hidroxilapatita (HA) o fosfato de calcio. Las capas en la cámara pueden ser de material sólido o poroso.

En un aspecto, la cámara tiene un tamaño de 2 cm a 50 cm de diámetro y una altura de 5 mm a 50 cm. La centrifugación se realiza, preferentemente, hasta 1000 xg.

50 El número de capas y la distancia entre las capas es variable.

En una realización preferida, la cámara puede calentarse y enfriarse para proporcionar una temperatura apropiada para centrifugar la muestra. Para este propósito, se ubican en el sistema un sistema de calentamiento y/o enfriamiento.

Como se muestra en la Figura 17, la cámara de centrifuga de forma cilíndrica puede limitarse en su lado superior por una tapa 800, que puede llevar una o más nervaduras de estabilización 805 sobre la superficie superior plana. Al menos una de estas nervaduras radiales 805 puede cubrir una brecha estrecha o canal 801, abierto al volumen interior de la centrífuga cuando la tapa 800 se sujeta sobre la cámara de centrifuga. La brecha 801 se extiende en dirección axial desde la superficie interior de la tapa que pasa la tapa 800 unos milímetros en la nervadura 805. Por  
55

tanto, cuando se usa material transparente puede verse desde el exterior dentro de la nervadura 805. En la extensión radial, la brecha 801 alcanza desde cerca del centro hasta la pared cilíndrica de la centrífuga (Fig. 17).

5 Durante la centrifugación, las mismas fuerzas surten efecto en la brecha 801 como en la cámara de centrifugación completa. Las capas de suspensión en forma de anillos colindantes se extienden paralelas en la brecha 801 y se muestran como zonas delgadas en posición colindante al eje, como una capa fina cortada en cruz, bien detectable por sensores ópticos externos.

10 El ancho de la brecha 801 puede determinarse libremente, además, lo suficientemente pequeño para un análisis de la luz transmitida por todas las áreas asociadas a las capas en la brecha. De esta manera, es posible cuantificar las densidades ópticas y los colores de todas las capas de la suspensión en la cámara de centrífuga de una manera "sin contacto" desde el exterior a través de mediciones de transmisión óptica.

Para permitir una iluminación vertical y la posición del sensor para observar los movimientos de las capas en la brecha, puede añadirse una ventana, un espejo o, preferentemente, un prisma sobre ambos lados de la nervadura, que puede preformarse, preferentemente, por el propio material de la carcasa transparente.

15 El prisma 810 refracta el haz luminoso vertical generado a través de la brecha (horizontal) y regresa a la parte superior, de nuevo vertical (Fig. 18). Durante la centrifugación, una luz de destello electrónico activada por una posición sincrónica puede transmitir luz a un lado del prisma 810, por ejemplo, el prisma izquierdo, que ilumina la brecha por refracción. El resultado de la transmisión se refracta por el otro lado del prisma 810, por ejemplo, el prisma derecho, de vuelta a un sensor montado verticalmente o cámara, posiblemente en la cercanía de la fuente de destello superior en la parte superior. La unidad de sensor óptico resultante es fácil de manejar como un sensor reflejo, pero al mismo tiempo permite realizar mediciones de transmisión a escala completa.

20 La disposición de los ángulos del prisma asegura la "reflexión total" sobre la superficie interior del prisma por los rayos de destellos que iluminan y evitan los reflejos directos sobre sus superficies exteriores entre la fuente de luz y la cámara. Por tanto, no es necesario el recubrimiento de espejos y las tecnologías de moldeo por inyección pueden usarse sin el remodelado de las instalaciones que se requieren (Fig. 19).

25 Como se ilustra en la Figura 13 un sistema de procesamiento incluye varios componentes acoplados, canales de flujo, tampones, reactivos, etc. Se reconocerá que hay numerosas configuraciones disponibles y que la presente configuración se proporciona con propósitos ilustrativos. Con respecto a la Figura 13, los componentes incluyen un sistema de tampón 300, puerto de clavo 301, filtro estéril 302, bolsa de plasma/en proceso 303, recipiente de reactivo para marcado magnético 304, puerto de clavo 305, filtro estéril para el reactivo magnético 306, filtro estéril 307, bolsa de medio/tampón 308, puerto para el medio de cultivo de células, puerto auxiliar 309, válvula de única dirección hacia abajo 310 que posiblemente incluye un filtro, válvula de única dirección hacia arriba 311, bolsa de muestra 312, conector de bolsa de muestras 313, filtro de muestras 314, puerto de muestra 315, filtro 316, filtro de separación previa 320, bolsa de almacenamiento en proceso 321, columna de separación magnética 322, bolsa de desecho 323, unidad de reducción de volumen 324, bolsa de fracción positiva 325, bolsa de fracción negativa 326, filtro de aire estéril 327, bomba 328, filtro de aire para el sensor de presión 1 329, filtro de aire para el sensor de presión 2 330, unidad de procesamiento de muestra/células 332.

40 Un uso típico de un sistema como el que se ilustra en la Figura 13 y se describe anteriormente, se discute con respecto a las figuras 14A a 14N. La activación de varios componentes del sistema puede seleccionarse para dirigir el flujo a lo largo de una vía deseada. El flujo seleccionado se ilustra con respecto a las Figuras 14A a 14N y se muestra por vías de flujo oscurecidas y flechas de dirección de flujo. La Figura 14A ilustra la carga de la muestra en una cámara que rota/cámara de procesamiento de la unidad de procesamiento de muestra. La muestra fluye desde la fuente de la muestra a través de las válvulas abiertas 5, 9, 16 y a través de la bomba y hacia la unidad de procesamiento. La Figura 14B ilustra el aclarado de las líneas/componentes del sistema, con el tampón que fluye a través de las válvulas abiertas 1, 9, 16, bomba y hacia la unidad de procesamiento. La muestra y el tampón pueden fluir como se ilustra, se centrifuga la muestra en la unidad de procesamiento para separar los componentes y se repite el procedimiento de aclarado. La Figura 14C ilustra la reducción y la eliminación de los glóbulos rojos de la sangre de la muestra. Como se indicó anteriormente, la muestra puede centrifugarse en la unidad de procesamiento para separar los componentes, lo que incluye la formación de una capa leucocitaria para la separación de los glóbulos rojos. Después, el componente de glóbulos rojos de la sangre puede retirarse de la unidad de procesamiento y hacerlo fluir a través del sistema por las válvulas abiertas 17, 12 y hacia el recipiente de desecho. La Figura 14D ilustra la eliminación del plasma de la cámara en la unidad de procesamiento, donde el enjuague del plasma/componente fluye a través del sistema por las válvulas abiertas 16, 12 y hacia el recipiente de desecho. La Figura 14E ilustra la recolección de plasma, cuando el plasma se elimina de la unidad de procesamiento fluye a través del sistema por las válvulas abiertas 16, 9, 4 y hacia un recipiente de recolección de plasma. La Figura 14F ilustra la carga del reactivo en la cámara y el marcado de las células. El reactivo (por ejemplo, el marcado magnético) fluye a través del sistema por las válvulas abiertas 2, 9, 16 y hacia la cámara. Las células pueden procesarse (por ejemplo, agitarse, reconstituirse, mezclarse con reactivo, etc.) para la incubación con el reactivo de marcado. La Figura 14G ilustra la adición de plasma dentro de la cámara. El plasma procedente del recipiente de plasma fluye a través del sistema por las válvulas abiertas 4, 9, 16 y hacia la cámara. Pueden preformarse etapas de procesamientos adicionales, aclarado, etc. (por ejemplo, como se ilustra en la figura 14B). La Figura 14H ilustra la

separación magnética de componentes marcados y no marcados de la muestra. La muestra/células marcadas suspendidas fluyen a través del sistema a través de la válvula abierta 16, a través de un filtro o columna previa (por ejemplo, un filtro de separación basado en el tamaño, de manera que se eliminan las aglomeraciones de células), válvulas abiertas 7, 11, a través de la columna magnética donde se unen las células marcadas, con células primariamente no marcadas que fluyen a través de la válvula abierta 19 y hacia el recipiente para células no marcadas/negativas. La Figura 14I ilustra el lavado de la columna donde el tampón fluye a través del sistema por las válvulas abiertas 1, 15, 7, 11, 19 y hacia el recipiente de células. Las etapas de lavado se seleccionan para lavar las células no marcadas de la columna de separación magnética/sistema. La Figura 14J ilustra la elución de células de la columna y la nueva aplicación. La aplicación magnética se desactiva y el fluido fluye como se ilustra a través de las válvulas abiertas 11, 10, 14, por ejemplo, a altas velocidades, para lavar las células de la columna. La aplicación del campo magnético se vuelve a activar para volver a unir las células marcadas a la columna de separación magnética. La Figura 14K ilustra el aclarado de la columna con un tampón de elución. El tampón fluye como se ilustra para lavar, preferentemente, las células no marcadas de la columna de separación y hacia el recipiente de desecho. La Figura 14L ilustra el lavado de la columna para eliminar las células marcadas desde la columna y hacia la bolsa para una nueva aplicación. Como se muestra, el campo magnético se desactiva para liberar las células marcadas de la columna. La Figura 14M ilustra las etapas de reducción de volumen. La solución que contiene las células fluye como se ilustra para pasar la solución a través del filtro F7. El filtro incluye un filtro de membrana que recoge las células a medida que fluye la solución. La Figura 14N ilustra la elución final y la recolección del producto en el recipiente de recolección. El plasma fluye como se ilustra, a través de las válvulas abiertas 4, 9, 14, 18, con el fluido que pasa a través del filtro F7 para lavar las células desde el filtro y hacia el recipiente de recolección positivo.

El conjunto de tubos puede usarse para la administración de medio nutriente, citocinas, factores de crecimiento, suero y otras sustancias necesarias para el cultivo de las células, o para extraer muestras de la cámara de cultivo. El medio nutriente puede suministrarse continua o periódicamente dentro de la cámara o retirarse de la cámara a través de los puertos 222 y 224 (Fig. 11) mediante el uso de la bomba 328 (Fig. 13) o mediante el uso de jeringuillas adicionales que se conectan al conjunto de tubos. Durante el procedimiento de cultivo de células el medio puede intercambiarse total o parcialmente con medio recién preparado. El medio puede enriquecerse con O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, aire u otros gases necesarios para el crecimiento de las células. El enriquecimiento del medio puede hacerse por inyección directa de los gases en la cámara de cultivo a través de los puertos 222 o 224 (Fig. 11), a través de una abertura adicional en la parte inferior de la cámara de cultivo recubierta con una membrana hidrófoba (Fig. 12A y 12B) y/o mediante el uso de un dispositivo de aireación, situado fuera de la cámara de cultivo (Fig. 15).

Un ejemplo de tal dispositivo de aireación se representa en la figura 15. Este consta de dos partes (415 y 416) hechas de, por ejemplo, policarbonato (PC) o polimetacrilato (PMMA) con canales grabados en un lado. Ambas partes se unen para formar un espacio hueco entre ellas, separado en dos o más compartimentos por al menos una membrana (417). La membrana puede unirse a una de las partes o varias membranas pueden unirse en ambas partes. Los compartimentos contienen al menos un puerto de entrada (418) y un puerto de salida (419) para la conexión con el conjunto de tubos. El primer compartimento se usa para la mezcla de gases. El segundo compartimento se usa para el medio nutriente, que tiene que enriquecerse con los componentes de la mezcla de gases. La membrana que se ubica entre ambos compartimentos es permeable para los gases y no es permeable para los líquidos. Preferentemente, esta es una membrana hidrófoba, por ejemplo, membrana hidrófoba de nailon. Preferentemente, los poros de la membrana hidrófoba son más pequeños que 0,2 µm, lo que asegura una conexión estéril entre el medio nutriente y la mezcla de gases. En otro aspecto del dispositivo de aireación, una o más membranas adicionales pueden unirse a cualquiera de las partes representadas en la figura 15, de manera que el gas fluye entre los compartimentos que contienen el medio. En este caso, la superficie de contacto entre el medio y la mezcla de gases es mayor en gran número en dependencia del número de membranas usadas.

Las membranas del dispositivo de aireación pueden unirse a las partes por medio de unión térmica, unión ultrasónica o pegado, u otro procedimiento de unión adecuado, que permita una conexión estéril entre las partes plásticas y la membrana.

El dispositivo de aireación puede esterilizarse por medio de irradiación (por ejemplo, radiación gamma, beta), plasma (por ejemplo, peróxido de hidrogeno), vapor caliente/vapor a presión (por ejemplo, autoclave) o esterilización con óxido de etileno (EtO). Preferentemente, el dispositivo de aireación se usa como parte del conjunto de tubos desechables.

La composición de gases usada para el dispositivo de aireación se compone, preferentemente, mediante el uso de una cámara de mezcla de gases. Un aspecto de la cámara de mezcla de gases se muestra en la figura 16 A. Esta consiste en dos partes (421 y 422), preferentemente, hechas de material plástico, por ejemplo POM (polioximetileno), que se conectan con pernos, se pegan térmicamente o se unen ultrasónicamente entre sí, de manera que formen un espacio hueco entre ellas. Preferentemente, una de las partes contiene un canal para un anillo de obturación, que asegura el sellado entre ambas partes (433, figura 16B). La cámara de mezcla de gases tiene al menos un puerto de entrada y al menos un puerto de salida (423). Esta comprende un puerto (430) para la conexión de un dispositivo sensor de presión para medir la presión dentro de la cámara. La cámara de mezcla de gases contiene, opcionalmente, otro puerto (432, Fig. 16b) para la conexión con una válvula de seguridad, que se abre automáticamente, cuando la presión en la cámara sube sobre un cierto valor. La cámara de mezcla de gases

tiene entradas y salidas (435) para la conexión con al menos una válvula de entrada y al menos una válvula de salida, así como también perforaciones roscadas (436) para la conexión de las válvulas de entrada y de salida a las paredes de la cámara de mezcla de gases.

5 Para la reducción del régimen de flujo de los gases en y/o fuera de la cámara de mezcla de gases, las mezclas pueden incluirse, opcionalmente, en las paredes.

Principio de funcionamiento de la cámara de mezcla de gases: los puertos de entrada de la cámara de mezcla de gases se conectan con un suministro de gases. El suministro de los gases de entrada debe tener una presión superior a la presión atmosférica, por ejemplo, 2 bar. El operario debe proporcionar el contenido de la composición de gases deseada mediante el uso de un programa informático de medición y automatización. El contenido de cada uno de los gases de la composición deseada es dado como la presión parcial de ese gas en la mezcla de gases. El procedimiento de composición de gases comienza con el primer componente de la mezcla de gases, el que se controla por la válvula de entrada 424 (Fig. 16A). La válvula de entrada se abre durante un periodo de tiempo, por lo general entre 50 ms y 200 ms, y después se cierra y se lee el sensor de presión. La presión que se mide en la cámara es  $P_m$ . Si la presión  $P_m < P_1$ , donde  $P_1$  es la presión dada por el operario, la válvula de entrada se abre otra vez. El procedimiento se repite hasta  $P_m \geq P_1$ . Después, se abre la válvula de entrada 425 y la composición del segundo componente de gas tiene lugar como se describió en el caso de la válvula de entrada 424. Cuando todos los gases de entrada están compuestos en la cámara de mezcla, la válvula de salida 427 se abre hasta que la presión en la cámara de mezcla de gases alcanza un valor  $P_{salida}$ , proporcionada por el operario de manera preliminar.  $P_{salida}$  es siempre igual a la presión atmosférica o más alta. El tiempo y la frecuencia de la abertura de la válvula de salida pueden proporcionarse, además, por el operario. Después, el procedimiento de composición de gases comienza de nuevo con la abertura de la primera válvula de entrada (424). Las válvulas de salida 428 y 429 pueden usarse opcionalmente para la aireación de otras cámaras de cultivo de células, bolsas u otros recipientes.

La cámara de muestras permite realizar una amplia gama de métodos de cultivo de células, tales como el crecimiento de células, la separación, el lavado, el enriquecimiento de células o diferentes tipos de células, u otros. Además, el sistema de la invención puede usarse para formular fármacos.

La obtención de preparaciones celulares necesarias para la terapia celular puede incluir diversas combinaciones de operaciones básicas para obtener un producto celular definido con características definidas. Es único que todas estas operaciones básicas pueden realizarse en un único conjunto de tubos cerrados, lo que elimina los riesgos de las etapas manuales para la transferencia de muestras, requeridas de cualquier otra manera.

30 Las condiciones de cultivo de células para los ejemplos son conocidas en la técnica.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de células madre y progenitoras de la sangre del cordón para injerto.

La sangre del cordón humano se diluye con tampón CliniMACS PBS/EDTA, mediante centrifugación se ajusta el volumen de marcado definido, se añade el Reactivo CD34 o CD133 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, el reactivo de acceso se elimina mediante lavado en la cámara de centrifugación, las células CD34 o CD133 positivas se enriquecen a partir de la suspensión celular y se eluyen directamente de la columna MACS con el medio de cultivo celular, y se transfieren a la cámara de cultivo de células. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las células madre enriquecidas o aisladas se cultivan hasta por tres semanas. El medio de cultivo de células suplementado se añade intermitentemente. Las células de la sangre de cordón expandidas se lavan por centrifugación para eliminar el medio de cultivo celular y las células se suspenden en solución de infusión (solución salina) suplementada con albumina de suero humano y se transfieren al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla).

Ejemplo 2: Obtención de vacuna de células dendríticas

La cosecha de sangre entera humana o aféresis se diluye con tampón CliniMACS PBS/EDTA, se ajusta el volumen de marcado definido mediante centrifugación, se añade el reactivo CD14 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se retira el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, los monocitos CD14 positivos se enriquecen a partir de la suspensión celular y se eluyen de la columna MACS directamente con el medio de cultivo celular y se transfieren a la cámara de cultivo de células. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Los monocitos enriquecidos o aislados se cultivan encima de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos. Los medios se intercambian por centrifugación y se añaden automáticamente suplementos adicionales desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las células se cultivan y después de la maduración se añaden automáticamente antígenos (proteína recombinante, péptidos, lisados celulares, ADN) desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las células dendríticas derivadas de monocitos se cultivan para el procesamiento de antígenos. El medio de cultivo celular se elimina mediante centrifugación y las células se suspenden en solución de infusión (solución salina) suplementada con albumina de suero humano y se transfieren al recipiente de producto final (bolsa de infusión o jeringuilla).

## Ejemplo 3: Obtención de una vacuna de células dendríticas de la sangre mDC y pDC

La cosecha de la aféresis se diluye automáticamente con tampón CliniMACS PBS/EDTA, se reducen las CD19 y subsecuentemente se enriquece para CD304 (BDCA-4, CD1c, Neurofilina-1) o CD1c (BDCA-1) a través de la columna MACS. Las DC se eluyen directamente de la columna MACS con el medio de cultivo celular y se transfieren a la cámara de cultivo de células. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas, componentes activadores como proteína recombinante, péptidos, lisados celulares, ADN) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos y las células se cultivan durante 24 horas para lograr una maduración y activación óptimas. El medio de cultivo celular se elimina mediante centrifugación y las células se suspenden en solución de infusión (solución salina), opcionalmente suplementada con albumina de suero humano, y se transfieren al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla). El recipiente del producto se elimina del conjunto de tubos para usar posteriormente.

## Ejemplo 4: Obtención de células T con especificidad antigénica

La cosecha de sangre entera humana o aféresis se lava y se diluye con medio de cultivo celular y se transfiere a la cámara de cultivo celular. El antígeno (proteína recombinante, conjunto de péptidos o lisado de células tumorales) y suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas) se añaden automáticamente desde los recipientes unidos al conjunto de tubos. Las células y el antígeno se cultivan durante 3-16 horas para estimular nuevamente a las células T con especificidad antigénica. El volumen de la suspensión de células definido para el marcado se ajusta mediante centrifugación, se añade el reactivo IFN-gamma Catchmatrix de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado y el reactivo de acceso se elimina mediante lavado en la cámara de centrifugación. Las células se transfieren hacia el recipiente de cultivo de células y se incuban para la liberación de citocinas. El volumen de la suspensión de células definido para el marcado se ajusta mediante centrifugación, se añade el Reactivo de Enriquecimiento IFN-gamma de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo especificado para el marcado, se elimina el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, las células con especificidad antigénica se enriquecen magnéticamente a partir de la suspensión de células, y se concentran hasta un pequeño volumen inyectable por elución directa de la columna MACS mediante el uso de una solución de infusión suplementada, y se transfieren al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla).

## Ejemplo 5: Obtención de células asesinas naturales activadas

La recogida de sangre entera humana o aféresis se diluye con tampón PBS/EDTA de CliniMACS, se ajusta al volumen de marcado definido mediante centrifugación, se añade el Reactivo CD3 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se retira el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, las células CD3 positivas se retiran de la suspensión de células. Las células diana negativas de CD3 se ajustan al volumen de marcado, se añade el Reactivo CD56 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se elimina el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, se enriquecen las células CD56 positivas y se eluyen directamente de la columna MACS con el medio de cultivo celular y se transfiere a la cámara de cultivo celular. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas tales como IL-2 y/o IL-15) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las células NK enriquecidas o aisladas se cultivan durante 8-48 horas. El medio de cultivo celular se elimina del producto celular mediante centrifugación y las células se suspenden en solución de infusión (solución salina) suplementada con albumina de suero humano y se transfieren al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla).

## Ejemplo 6: Obtención de células naturales asesinas expandidas

La recogida de sangre entera o aféresis se diluye con tampón PBS/EDTA de CliniMACS, se ajusta al volumen de marcado definido mediante centrifugación, se añade el Reactivo CD3 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se retira el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, las células CD3 positivas se eliminan de la suspensión de células. Las células diana negativas de CD3 se ajustan al volumen de marcado, se añade el Reactivo CD56 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se elimina el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, se enriquecen las células CD56 positivas y se eluyen directamente de la columna MACS con el medio de cultivo celular y se transfiere a la cámara de cultivo celular. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las Perlas para la Expansión Celular cargadas con anticuerpos dirigidos contra CD2 y CD335 (NKp46) o CD314 (NKG2D) y CD335 (NKp46) se transfieren desde el recipiente al compartimiento de cultivo celular. Las células NK enriquecidas o aisladas se cultivan durante una semana, se comienza el día 7, el medio de cultivo celular suplementado se añade cada 3 días en una relación de 1:1 y las células se cultivan hasta el día 14-21.

Las células NK expandidas se pasan por la columna MACS para eliminar las perlas de expansión celular. Opcionalmente, las células NK expandidas se purifican además por reducción de CD3 o enriquecimiento de CD56 (ver más arriba). El medio de cultivo celular se elimina del producto celular mediante centrifugación y las células se

suspenden en solución de infusión (solución salina) suplementada con albumina de suero humano y se transfieren al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla).

Ejemplo 7: Obtención de células T auxiliaoras expandidas

5 La recogida de sangre entera o aféresis se diluye con tampón PBS/EDTA de CliniMACS, se ajusta al volumen de marcado definido mediante centrifugación, se añade el Reactivo CD4 de CliniMACS y se deja incubar con la muestra de células durante el tiempo de marcado especificado, se retira el reactivo de acceso mediante lavado en la cámara de centrifugación, las células CD4 positivas se enriquecen y se eluyen directamente de la columna MACS con medio de cultivo celular y se transfieren hacia la cámara de cultivo de células. Los suplementos de medios (albumina de suero humano, citocinas) se añaden automáticamente desde el recipiente unido al conjunto de tubos. Las Perlas para la Expansión Celular cargadas con anticuerpos dirigidos contra CD2, CD3 y CD28 o alternativamente CD3 y CD28 se transfieren desde el recipiente al compartimiento de cultivo de células. Las células T auxiliaoras aisladas se cultivan, se comienza el día 3, se añade medio de cultivo celular suplementado cada 2 días en una relación 1:1 y las células se cultivan hasta el día 14. Las células T expandidas se pasan por la columna MACS para eliminar las perlas de expansión celular. El medio de cultivo celular se elimina del producto celular mediante centrifugación y las células se suspenden en solución de infusión (solución salina) opcionalmente suplementada con albumina de suero humano y se transfiere al recipiente del producto final (bolsa de infusión o jeringuilla). El recipiente del producto se elimina del conjunto de tubos de la invención para usar posteriormente.

Ejemplo: 10 Selección de células madre CD133 positivas

20 El antígeno CD133 es un marcador de células madre y se expresa específicamente en un subgrupo de células CD34+ inmaduras, en células progenitoras endoteliales circulantes y en un subgrupo de células madre CD34- (De Wynter et al., 1998). Las células CD133 positivas enriquecidas o aisladas mediante el uso del sistema CliniMACS para CD133 se usan para la expansión ex vivo de células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón, y en trasplantes autólogos (Pasino et al., 2000) y alogénicos (Kohl et al., 2002).

25 Las células madre CD133+ pueden usarse en aplicaciones no hematológicas para medicina regenerativa. Las células CD133 seleccionadas de la médula ósea han devenido en foco de atención, por ejemplo, con respecto al tratamiento de las enfermedades cardíacas isquémicas (Stamm et al., 2003).

El enriquecimiento o el aislamiento de células CD133+ da como resultado una eliminación de células no deseadas de más del 99,4 % (2,2 log). Ver Tabla 1.

Tabla 1: Células CD133 positivas se aislaron a partir de médula ósea mediante el uso de la presente invención:

Volumen inicial [ml]	Frecuencia inicial de CD133+	Pureza final de CD133+	reducción logarítmica de CD133-	Número final de células CD133+	Rendimiento de CD133+
17	0,51%	56,54%	2,2	5,5E5	60,89%
42	0,26%	51,15%	2,5	1,3E6	87,32%
53	0,62%	66,16%	2,7	2,5E6	56,65%
34	0,26%	48,89%	2,3	8,4E5	77,96%
62	0,55%	60,51%	2,7	1,8E6	54,04%
(* calculado con relación a las células CD133+ recuperadas en todas las bolsas)					

30 Para las comparaciones, todos los productos de médula ósea se procesaron, además, mediante el uso del Sistema CliniMACS® CD133 con resultados similares.

Los diagramas de puntos en la Figura 20 muestran las características de la muestra antes (izquierda) y después (derecha) del procesamiento automatizado mediante el uso de la presente invención.

35 Ejemplo 11: Selección de Células CD14 Positivas

40 El antígeno CD14 pertenece al complejo del receptor de LPS y los monocitos expresan fuertemente el antígeno. Los monocitos CD14 seleccionados pueden usarse para la generación subsiguiente de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (MoDCs; Campbell et al., 2005). Las células dendríticas tienen un gran potencial como vacunas celulares para diversas enfermedades, que incluyen tumores sólidos, neoplasias malignas hematológicas, infecciones virales y enfermedades autoinmunitarias.

Se aislaron monocitos a partir de la recogida de dos leucaferesis mediante el uso de la presente invención y el Reactivo CD14 de CliniMACS. Los monocitos se enriquecieron de 19,7%/31,8% (recogidas sin procesar) al 98,2%/99,7% (producto celular final) con un rendimiento del 58%/21% (ver la Figura 21).

5 Las MoDC se generaron a partir de monocitos aislados mediante el uso de la presente invención y mostraron características idénticas a las MoDC generadas a partir de monocitos aislados con CliniMACS.

Los monocitos se aislaron, además, a partir de la capa leucocitaria de sangre entera humana mediante el uso de la presente invención y pudieron enriquecerse de 9,8% (capa leucocitaria no procesada) hasta 98,9% de pureza (producto celular final) con un rendimiento de monocitos del 64%.

Ejemplo 12: Selección de CD304

10 En la sangre periférica, CD304 (BDCA-4, Neurofilina-1) se expresa en células dendríticas plasmacitoides humanas (PDC). Las PDC son las células productoras más potentes del Interferón Tipo I (Dzionek et al., 2002). El CD304 puede usarse directamente para enriquecer o aislar células dendríticas de sangre periférica sin un periodo de cultivo (como para MoDC).

15 El enriquecimiento o el aislamiento de células diana CD304 positivas requiere etapas prolongadas de lavado que tardan mucho mediante el uso del procedimiento de preparación de muestras CliniMACS en una centrifuga de bolsa de sangre. El procesamiento automatizado de muestras facilitará el uso de células CD304 aisladas en ensayos de vacunación.

20 Se aislaron o se enriquecieron células CD304 positivas a partir de la recogida de dos leucaferesis mediante el uso de la presente invención y el reactivo CD304 de CliniMACS. Las PDC se enriquecieron de 0,29% a 34,4% con un rendimiento de 30% y de 0,43% a 80,5% con un rendimiento del 39%.

Las Células Dendríticas Plasmacitoides del segundo procedimiento se cultivaron durante 24 horas con CPG C (ODN2395) e IL-3 o solamente con IL-3 para inducir la maduración. Las células cultivadas se analizaron para determinar los marcadores de maduración CD40 y CD80 y el perfil del marcador fue idéntico a las PDC CD304 positivas aisladas mediante el uso del sistema CliniMACS para CD304 tras el cultivo.

25 Ejemplo 13: Selección de células CD4 positivas

CD4 es una molécula accesoria en el reconocimiento de antígenos extraños por las células T en asociación con los antígenos del MHC clase II. Las células T auxiliaoras y, en un menor grado, los monocitos y las células dendríticas expresan CD4.

30 Para ciertos contextos oncológicos, los datos preliminares sugieren que las células T en un injerto o como infusión de linfocitos donantes pueden ser beneficiosas (Falkenburg et al., 1999). En estos contextos, puede desearse una selección de CD4 o reducción de CD8 (ver el ejemplo 5) en el ajuste del trasplante alogénico. Las células T auxiliaoras pueden ser capaces de generar respuestas antitumorales, reducir el riesgo de Enfermedad Injerto contra Huésped (Alyea et al. 1998), y reconstituir el sistema inmune del receptor (Bellucci et al., 2002).

35 Las células T auxiliaoras CD4 positivas desempeñan, además, un papel significativo en la infección y progresión del HIV. Las células T auxiliaoras seleccionadas (potencialmente después de una modificación genética) pueden desearse para el tratamiento de las complicaciones del HIV.

40 Se aislaron o se enriquecieron células CD4 positivas a partir de tres productos de capa leucocitaria de sangre entera humana mediante el uso de la presente invención y el Reactivo CD4 de CliniMACS. Las células T auxiliaoras se enriquecieron de 27%/8,6%/15,9% a 90%/80%/81,3% de pureza con un rendimiento de 93%/98%/51%. Estos resultados están muy dentro del intervalo de los resultados que se obtienen mediante el uso del Sistema CliniMACS para CD4.

Ejemplo 14: Reducción de Células CD8 Positivas

El antígeno CD8, un correceptor para las moléculas del MHC de clase I, se expresa en células T citotóxicas y débilmente en un subgrupo de las células NK.

45 En el contexto de trasplantes alogénicos, las células T CD8 pueden eliminarse de una infusión de linfocitos de injerto o donante con el objetivo de prevenir la Enfermedad Injerto contra Huésped a la vez que se mantienen los efectos del Injerto contra la Leucemia (Meyer et al. 2007).

50 Las células T citotóxicas CD8 positivas se redujeron de tres productos de capa leucocitaria mediante el uso de la presente invención y el Reactivo CD8 de CliniMACS. Las células T citotóxicas se redujeron de 11,5%/8%/12% a 0,005%/0,004%/0,002%, respectivamente. Esto representa una reducción de > 99,97% (> 3,5 log) de células no deseadas. Las células diana CD8 negativas se recuperaron casi completamente (85,1%/90,9%/94,4%).

Ejemplo 15: Preparación de células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación con gradiente de densidad

5 El Ficoll-Paque™ es un medio de densidad estéril para el aislamiento de células mononucleares a partir de medula ósea, sangre periférica y sangre del cordón. Es una solución acuosa de densidad 1,077 g/ml, que consiste en Ficoll PM400 (un polisacárido altamente ramificado, de alta masa, hidrófilo), diatrizoato de sodio y EDTA disódico de calcio. Los eritrocitos y los granulocitos tienen una densidad mayor que 1,077 g/ml, mientras que los linfocitos y los monocitos tienen una densidad más baja. Cuando la sangre humana se estratifica en la parte superior del Ficoll-Paque, los linfocitos y monocitos pueden separarse de los eritrocitos y granulocitos bajo la fuerza centrífuga.

10 El presente ejemplo se ha usado para la preparación de células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidades. La capa leucocitaria de sangre entera humana se estratificó sobre un anillo de Ficoll-Paque al mismo tiempo que la cámara de centrifugación giraba. La velocidad de rotación se ajustó a 2.900 giros por minuto y se mantuvo durante 20 minutos. Pudo detectarse un anillo externo de eritrocitos y granulocitos, un anillo de Ficoll-Paque, un anillo de células diana (células mononucleares de sangre periférica, es decir, linfocitos y monocitos) y un anillo interno de plasma sanguíneo que contenía plaquetas y tampón PBS. Las diferentes capas se eliminaron de la cámara de centrifugación de la presente invención a través de los puertos luer y se analizaron para determinar el contenido de las diferentes células. Se recuperó el 70% de las PBMC del producto sanguíneo original a partir de la capa de PBMC. Esta suspensión celular contenía solamente el 1,1% de los glóbulos rojos originales de la sangre. Por tanto, el presente aspecto puede usarse para la preparación automatizada de células mononucleares de sangre periférica (segundo anillo) o plasma rico en plaquetas (anillo interno).

20 Ejemplo 16: Cultivo de Células

La cámara de centrifugación de la presente invención puede usarse para el cultivo de células, de manera similar a los frascos o bolsas de cultivo de células. A una cámara de centrifugación se aplicaron células de la línea de células humanas K562 3,2E5/ml, en un volumen de 30 ml de medio de cultivo celular RPMI1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. La cámara se colocó en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiraron alícuotas del contenido de la cámara para el recuento celular y la evaluación de la viabilidad después de 24, 48 y 70 horas. Las células sembradas se expandieron a 4,1 E5/ml, 6,4E5/ml y 9,2E5/ml de células viables a 80%, 95% y 95% de viabilidad.

Ejemplo 17: Método para la separación de células CD133+ mediante el uso de un sistema de la presente invención.

El procedimiento completo de separación de células CD133+ comprende diversas etapas con las siguientes tareas:

- 30
1. Cebiar el conjunto de tubos con tampón
  2. Transferir la muestra de medula ósea a la cámara de centrifugación
  3. Preparar la muestra de medula ósea en la cámara de centrifugación.
  4. Realizar la separación magnética de las células CD133+
  5. Reducir el volumen final

35 A continuación, se describirán en detalle diversas etapas:

1. Cebiar el conjunto de tubos con tampón

En una primera etapa, el conjunto de tubos se ceba con PEB (solución salina tamponada con fosfato suplementada con EDTA 2 mmol/l, HSA al 0,5%).

2. Transferir la muestra de medula ósea a la cámara de centrifugación

40 Después de cebiar el conjunto de tubos, la muestra de medula ósea se transfiere desde la bolsa de muestras 312 a la cámara de centrifugación 332.

3. Preparar la muestra de medula ósea en la cámara de centrifugación.

45 La preparación de la muestra en la cámara de centrifugación incluye varias etapas donde el sobrenadante se elimina de la cámara. Durante la eliminación del sobrenadante solo debe transferirse el sobrenadante libre de células o el sobrenadante con plaquetas, en el caso del lavado de plaquetas. El objetivo de esto es evitar que los glóbulos blancos de la sangre (WBC), y por tanto las CD133+, se eliminen junto con el sobrenadante. La preparación de la muestra incluye las siguientes etapas:

- generar del plasma
- reducir las plaquetas

- incubar con Microperlas CD133 (Miltenyi Biotec, Alemania)

- eliminar lo que no se une a las Microperlas CD133

Generar el plasma:

5 El plasma que se genera al comienzo del procedimiento de preparación de la muestra cumple las dos funciones siguientes:

1. Actuar como un reactivo de bloqueo que bloquea los receptores Fc de monocitos e impide que la porción Fc de los anticuerpos anti CD133 unidos a las microperlas se unan a los monocitos. Esto conducirla a una reducción de la pureza del producto del procedimiento de separación inmunomagnética por monocitos, y

10 2. Actuar como un suplemento para el tampón en el que se suspende el producto celular final. Esto proporciona un entorno más fisiológico para el producto celular que el tampón usado solo. Para la generación y recolección de plasma, la muestra se centrifuga hasta que la mayoría de los componentes celulares del material, como eritrocitos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y plaquetas sedimentan y forman una bolilla. El sobrenadante libre de células es el que se transfiere a un recipiente (303) que actúa como un depósito.

15 Para la generación de plasma, el material celular se centrifugó a 2000 rpm en la cámara de centrifugación hasta que todos los componentes celulares del material como WBC, RBC y las plaquetas sedimentan y forman una bolilla. La generación de plasma requiere una centrifugación que conduce a un sobrenadante con tan bajas concentraciones celulares como sea posible y, por tanto, una sedimentación casi completa de todos los componentes celulares de la sangre. El tiempo de sedimentación depende del volumen de la muestra que se determina automáticamente durante la transferencia de la muestra a la cámara de centrifugación. El tiempo de sedimentación para diferentes volúmenes de muestra se muestra en la tabla 2:

Tabla 2:

Tiempo de sedimentación para diferentes volúmenes de suspensión en el procedimiento de generación de plasma			
Intervalo de volúmenes	Volumen Máximo	Radio de la capa límite aire/líquido	Tiempo de sedimentación
≤100 ml	100 ml	5,21 cm	8,01 min ≈ 8 min
100 ml < V ≤ 125 ml	125 ml	4,99 cm	11,82 min ≈ 12 min
125 ml < V ≤ 150 ml	150 ml	4,77 cm	15,98 min ≈ 16 min
150 ml < V ≤ 175 ml	175 ml	4,53 cm	20,57 min ≈ 21 min
175 ml < V ≤ 200 ml	200 ml	4,28 cm	25,69 min ≈ 26 min

25 Después de la centrifugación a 2000 rpm, la velocidad de rotación se redujo suavemente a 1000 rpm con una velocidad de desaceleración de 632 rpm/min. Después se retiró el plasma con una velocidad de la bomba de 6 ml/min hasta que se bombeaba el aire fuera de la cámara. A continuación, el sobrenadante libre de células se transfirió a un recipiente que actúa como un depósito. Posteriormente, el plasma puede transferirse desde el recipiente al sitio en el procedimiento en el que se usa el flujo a través de un filtro con 0,2 μm para eliminar todas las células residuales que no se eliminaron durante la centrifugación.

Reducción de plaquetas:

30 Como la generación de plasma elimina el sobrenadante completo en la cámara, un volumen residual de 70 ml está en la cámara. Se añaden 150 ml de PEB para diluir la suspensión lo que resulta en un volumen total de 220 ml. Después, el tambor se acelera hasta 2000 rpm y la sedimentación se realiza durante 100 segundos para sedimentar los RBC y WBC antes de que el tambor se desacelere a 1000 rpm con una velocidad de desaceleración de 632 rpm/min. Dentro de este tiempo de sedimentación, solo una pequeña porción de las plaquetas alcanza la bolilla cuando comienza la desaceleración de la cámara. A continuación, se elimina el sobrenadante completo a una velocidad de 6 ml/min. El análisis de la muestra y del sobrenadante eliminado mostró una eliminación plaquetaria determinada experimentalmente del 50,8 %. Las plaquetas restantes se eliminan mediante el uso de un filtro (310).

Incubación con Microperlas CD133

40 Las microperlas CD133 se proporcionan en recipientes de vidrio que tienen un tabique. Para asegurar condiciones asépticas, se integra un filtro con tamaño de poro de 0,2 μm (306) dentro de la rama del conjunto de tubos conectados al recipiente. El recipiente se conecta al conjunto de tubos mediante un adaptador de recipiente ventilado (305). Cuando el reactivo se bombea a la cámara, se controla la presión dentro de la parte del conjunto de

5 tubos situada delante del tambor. Cuando el recipiente funciona vacío, el aire se mueve al filtro. Como el filtro se humedece por el reactivo, los poros aun están llenos de líquido cuando el aire se mueve dentro del filtro. Debido a las fuerzas capilares el aire no puede pasar la membrana del filtro. Como la bomba continúa su funcionamiento, la caída de presión se detecta por el sensor de presión (329) y el programa detiene la bomba. De este modo combinado con una etapa de aclarado para eliminar el reactivo residual, el reactivo se transfiere automáticamente a la suspensión celular en la cámara.

10 Después de la transferencia de plasma para los propósitos de bloqueo, el volumen se ajusta a un volumen de marcado de 95 ml y comienza la incubación. En el procedimiento de preparación de muestras convencional, la bolsa de preparación de muestras tiene que colocarse en un agitador orbital e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente. El procedimiento de incubación con el sistema de la presente invención se realiza como sigue:

1. El tambor se acelera a una velocidad de 300 rpm. Esto hace que el líquido se mueva a la pared de la cámara.
2. Se realiza la centrifugación durante 10 segundos.
3. Después de esto, el tambor se detiene. El líquido retrocede y tiene una superficie alineada horizontalmente.
4. La cámara continúa hasta detenerse durante 50 segundos.
- 15 5. Las etapas 1 - 4 se repiten hasta que transcurre el tiempo de incubación de 30 minutos.

Este procedimiento conduce a una mezcla eficaz del líquido en la cámara.

Eliminación de las microperlas anti-CD133 no unidas:

El lavado de las microperlas se realiza para eliminar el reactivo no unido después del marcado e incubación. En el procedimiento de lavado se repiten las siguientes etapas tres veces:

- 20 1. Transferir PEB a la centrífuga para diluir la suspensión, lo que resulta en un volumen total de 230 ml
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 140 segundos para sedimentar las RBC y WBC
3. Reducir la velocidad de cámara de 2000 rpm a 1000 rpm
4. Eliminar el sobrenadante completamente a una velocidad de 20 ml/min

25 El procedimiento de lavado de las perlas consistirá en tres etapas de lavado y se eliminará al menos el 97,2 % del reactivo no unido.

4. Realizar la separación magnética de las células CD133+

30 Después del procedimiento de lavado de las perlas, las células CD133+ se separan mediante el uso de una columna de separación magnética (columna CliniMACS, Miltenyi Biotec GmbH, Alemania). Consiguientemente, la suspensión celular se transfiere a la columna de separación con una velocidad de carga de 5 ml/min. Las células marcadas magnéticamente se retienen en la columna magnetizada y se separan de las células no marcadas mediante el aclarado de la columna con PEB. Las células CD133+ retenidas se eluyen mediante la eliminación del campo magnético de la columna. Las células CD133+ se bombean en un bucle del conjunto de tubos y se vuelven a cargar en la columna de separación. Este procedimiento se repite una vez más y después del tercer procedimiento de recarga, las células CD133+ se eluyen finalmente en 20 ml de tampón de elución (ver la tabla 3 y la Figura 26). La velocidad de elución es 600 ml/min.

- 35 5. Reducir el volumen final

40 Para la terapia cardíaca con células madre, las células CD133+ deben disponerse en un pequeño volumen final de 6 ml como máximo. Normalmente, las células CD133+ se eluyen finalmente de la columna CliniMACS en 20 ml de tampón de elución. Para la reducción del volumen final, son posibles tres métodos: El volumen final de células CD133+ aisladas o enriquecidas puede reducirse mediante

1. eluir la columna en un pequeño volumen,
2. filtrar después de la separación magnética, o
3. usar la columna AutoMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).

Elución de la columna en un pequeño volumen:

45 En lugar de la elución en 20 ml de tampón de elución, las células CD133+ pueden eluirse de la columna CliniMACS en 6 ml de tampón de elución. La velocidad de elución es de 600 ml/min. Este método se probó mediante el

enriquecimiento de células CD133+ a partir de la medula ósea. Las células enriquecidas se determinaron mediante análisis de FACS (ver la tabla 4 y Fig. 27).

Filtración después de la separación magnética

- 5 Después de la elución de la columna de separación CliniMACS en 20 ml de tampón de elución, las células CD133+ pueden transferirse sobre un filtro (Pall IV-5, 0,2 µm o RoweFil 24, 1,2 µm) a una velocidad de 4 ml/min. Posteriormente, las células se eluyen del filtro en 2 ml. Este método se probó mediante el enriquecimiento de células CD133+ a partir de la medula ósea. Las células enriquecidas se determinaron por análisis de FACS (ver la tabla 5 y la Fig. 28).

Reducción de volumen final mediante el uso de la columna AutoMACS

- 10 Después de la elución de la columna CliniMACS, las células CD133+ pueden cargarse en una columna autoMACS a una velocidad de 4 ml/min. Posteriormente, las células CD133+ retenidas se eluyen en 4 ml de la columna autoMACS. Este método se probó mediante el enriquecimiento de células CD133+ a partir de la medula ósea. Las muestras enriquecidas se determinaron mediante análisis de FACS (ver la tabla 6 y la Fig. 29).

Tabla 3: Elución directa de las células CD133+ en 20 ml.

Volumen inicial [ml]	Frecuencia inicial de CD133+	Pureza final de CD133+	reducción logarítmica de CD133-	Número final de células CD133+	Rendimiento* de CD133+
91	0,39%	82,95%	3,4	2,89E6	49,57%
86	0,67%	66,99%	2,8	5,72E6	56,67%
129	0,31%	82,6%	3,4	4,11E6	43,42%
57	0,76%	59,18%	2,3	5,1E6	72,24%
61	0,14%	74,72%	3,2	4,25E5	84,32%
114	0,37%	88,19%	3,4	1,79E6	50,08%
77	0,74%	83,5%	3	2,12E6	58,56%

15

Tabla 4: Elución directa de células CD133+ en 6 ml.

Volumen inicial [ml]	Frecuencia inicial de CD133+	Pureza final de CD133+	reducción logarítmica de CD133-	Número final de células CD133+	Rendimiento* de CD133+
87	0,67%	62,79%	2,7	2,78E6	51,22%
129	0,31%	81,12%	3,6	1,25E6	33,6%
128	0,66%	57,25%	2,6	2,31E6	26,86%

Tabla 5: Concentración de células CD133+ mediante filtración después de la separación magnética.

Volumen inicial/Volumen final [ml]	Frecuencia inicial de CD133+	Pureza final de CD133+	Reducción logarítmica de CD133-	Número final de células CD133+	Rendimiento* de CD133+
91/3,79	0,39%	66,08%	1,2	6,27E5	25,3%
86/3,67	0,67%	60,1%	1,5	1,29E6	31,6%
129/3,66	0,31%	76,04%	1,2	8,18E5	26,6%

20

Tabla 6: Concentración de las células CD133+ mediante el uso de la columna AutoMACS.

Volumen inicial/Volumen final [ml]	Frecuencia inicial CD133+	Pureza final de CD133+	Reducción logarítmica de CD133-	Número final de células CD133+	Rendimiento* de CD133+
57/2,78	0,76%	71,3%	0,9	2,35E6	25,3%
61/5,68	0,14%	82,84%	0,4	1,73E5	31,6%
114/5,64	0,37%	93,57%	0,7	8,51E5	26,6%
(* calculado en relación a las células CD133+ recuperadas en todas las bolsas).					

**REIVINDICACIONES**

1. Una cámara de centrifugación para procedimientos de separación que se puede utilizar para cultivar células, que comprende:
- Una capa para el crecimiento de células sobre ésta, y
- 5        - Un medio para detectar el progreso de una separación,
- en donde los medios para detectar el progreso de la separación en el recipiente giratorio es una ventana, un prisma o un espejo, y
- en donde la ventana, el prisma o el espejo se coloca para cubrir un canal formado en una tapa o un fondo del recipiente giratorio en el que el canal está configurado de manera que al menos una parte de la muestra pueda fluir hacia el canal durante la centrifugación.
- 10        2. La cámara de centrifugación según la reivindicación 1, en donde la capa se puede colocar perpendicular a un eje giratorio de la cámara de centrifugación.
3. La cámara de centrifugación según la reivindicación 1 o 2, que comprende una pluralidad de capas para cultivar células sobre éstas.
- 15        4. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cámara incluye una pluralidad de estructuras en capas para proporcionar cultivo celular y/o en el que las capas en la cámara son de un material sólido o poroso.
5. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cámara está configurada para girar alrededor de un eje para aplicar una fuerza centrífuga a una muestra dispuesta en la cámara, separándose así al menos dos componentes de la muestra.
- 20        6. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 5, en donde los medios para detectar el progreso de la separación se ubican de manera que la luz de una fuente de luz pueda penetrar al menos parcialmente a través de al menos una parte de la muestra que se está separando, y la luz al pasar a través de al menos una parte de la muestra se pueda detectar mediante un detector de luz.
- 25        7. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 6, en donde los medios para detectar el progreso de la separación se encuentran en el recipiente giratorio, esencialmente perpendicular a un eje de rotación del recipiente giratorio.
8. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 7, en donde la separación de la muestra se detecta a través de una ventana en la tapa o el fondo de la cámara giratoria.
- 30        9. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 8, en donde un área de enfoque del microscopio se puede colocar en el fondo de la cámara de centrifugación.
10. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 9, en donde la cámara tiene forma cilíndrica o en la que la cámara de centrifugación está limitada en su lado superior por la tapa.
- 35        11. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cámara de centrifugación se fabrica en una forma desechable o en el que el recipiente giratorio es esterilizable.
12. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 11, en donde la cámara de centrifugación comprende o está hecha de un material elegido del grupo que consiste en: plásticos, poliestireno, cloruro de polivinilo, policarbonato, vidrio, poliacrilato, poliácridamida, polimetilmetacrilato, polietilentereftal, politetrafluoretileno, poliuretano termoplástico, silicona, polietileno, colágeno, quitina, alginato, derivados del ácido hialurónico, poliácido, poliglicólido y sus copolímeros, cerámica, materiales de vidrio, como hidroxilapatita y fosfato de calcio, y composiciones que comprenden uno o más de los materiales mencionados anteriormente.
- 40        13. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 12, en donde el fondo de la cámara posee una o más aberturas o en el que la cámara posee un sistema de canales para el flujo de gas.
- 45        14. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cámara de centrifugación es calentable y refrigerable para proporcionar una temperatura apropiada para la muestra a centrifugar.
15. La cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 13, en donde la temperatura de la muestra en la cámara se puede medir usando cristales líquidos que se colocan en la cámara de modo que su posición se pueda detectar con una cámara de microscopio desde el exterior.
- 50        16. Uso de una cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 15 para cultivar células y/o para separar una composición en al menos dos componentes.

17. El uso de la reivindicación 16 para la fabricación de productos celulares para:
- ingeniería de injertos;
  - trasplante de órganos;
  - 5 - tratamiento contra el cáncer que incluye leucemia, que incluye leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y tumores sólidos tales como carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma, cáncer pancreático;
  - tratamiento de enfermedades autoinmunes refractarias tales como lupus eritematoso sistémico o esclerodermia sistémica, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple;
  - terapia celular que incluye la utilización directa de células efectoras;
  - 10 - tratamiento de enfermedades infecciosas;
  - regeneración de tejidos incluyendo infarto de miocardio, daño hepático o enfermedades neurodegenerativas;
  - inducción de tolerancia incluyendo trasplante o enfermedad autoinmune; o
  - una preparación automatizada de células mononucleares de sangre periférica o plasma rico en plaquetas.
18. Un método para cultivar células y/o para separar una composición en al menos dos componentes, que comprende el uso de una cámara de centrifugación según las reivindicaciones 1 a 15.
- 15 19. El método de la reivindicación 18, que comprende una etapa tomada de un grupo que consta de las siguientes etapas:
- la etapa de fabricar células madre e injertos progenitores;
  - la etapa de fabricar células dendríticas sanguíneas mDC y pDC;
  - 20 la etapa de fabricar células T específicas de antígeno;
  - la etapa de fabricar células asesinas naturales activadas;
  - la etapa de fabricar células asesinas naturales expansivas;
  - la etapa de fabricar células T colaboradoras expandidas;
  - la etapa de seleccionar células madre positivas para CD133;
  - 25 la etapa de seleccionar células positivas para CD304;
  - la etapa de seleccionar células positivas para CD04;
  - la etapa de agotar las células CD08 positivas;
  - la etapa de separar las células de sangre periférica;
  - la etapa de preparar células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad; y
  - 30 la etapa de procesar la médula ósea.

Figura 1

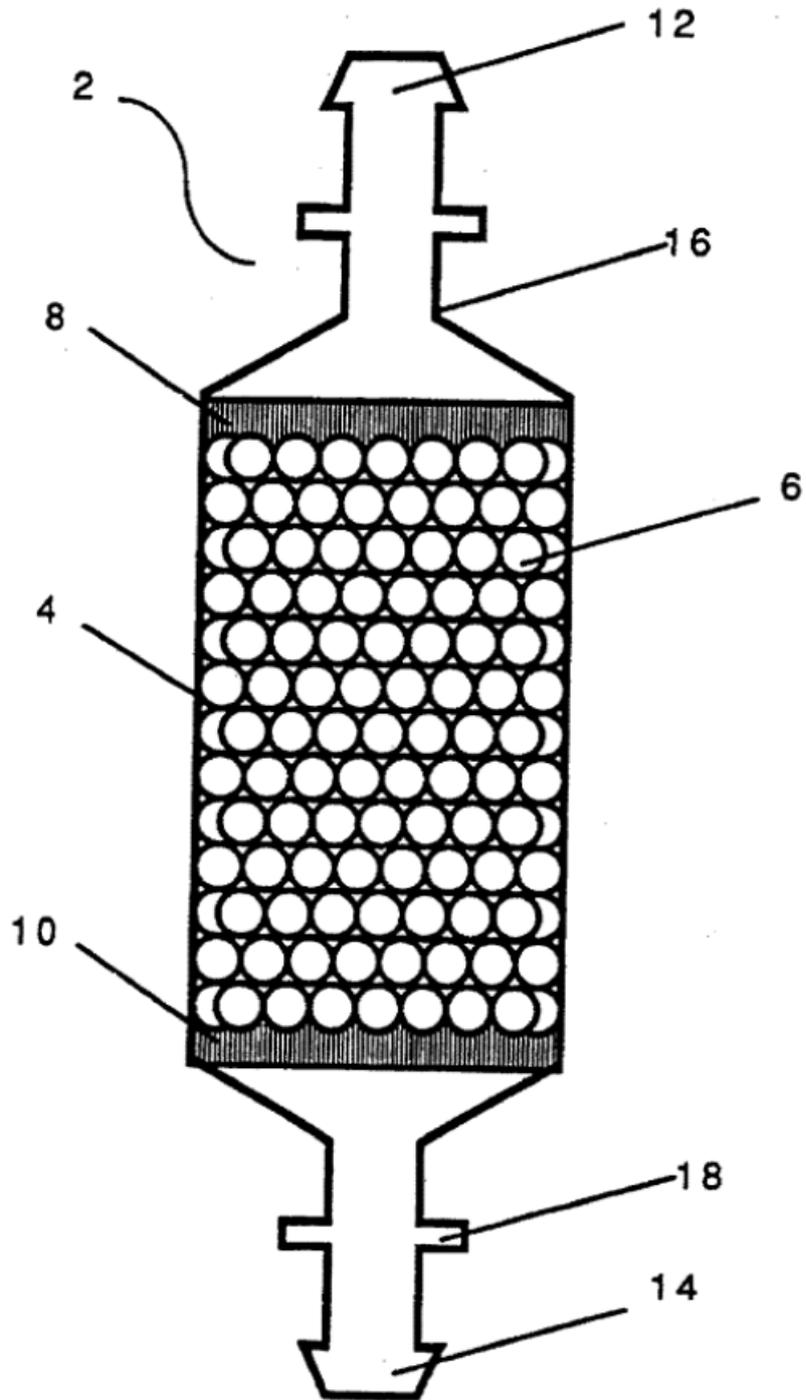


Figura 2

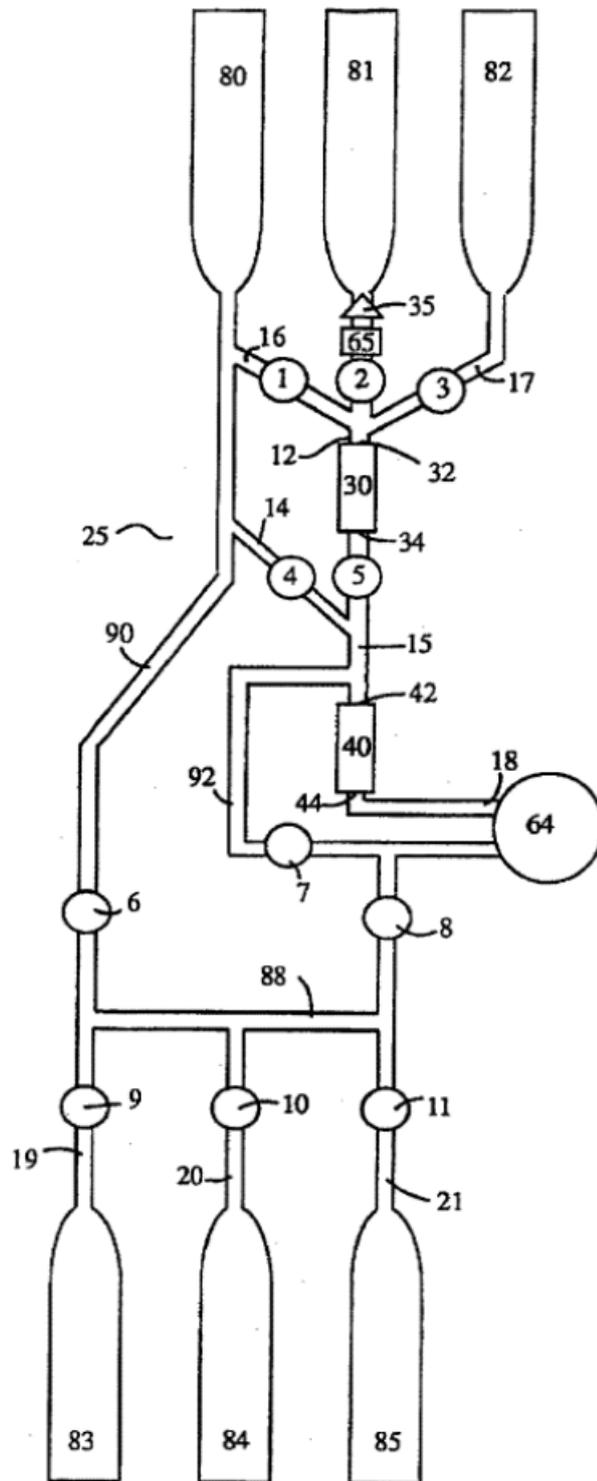


Figura 3

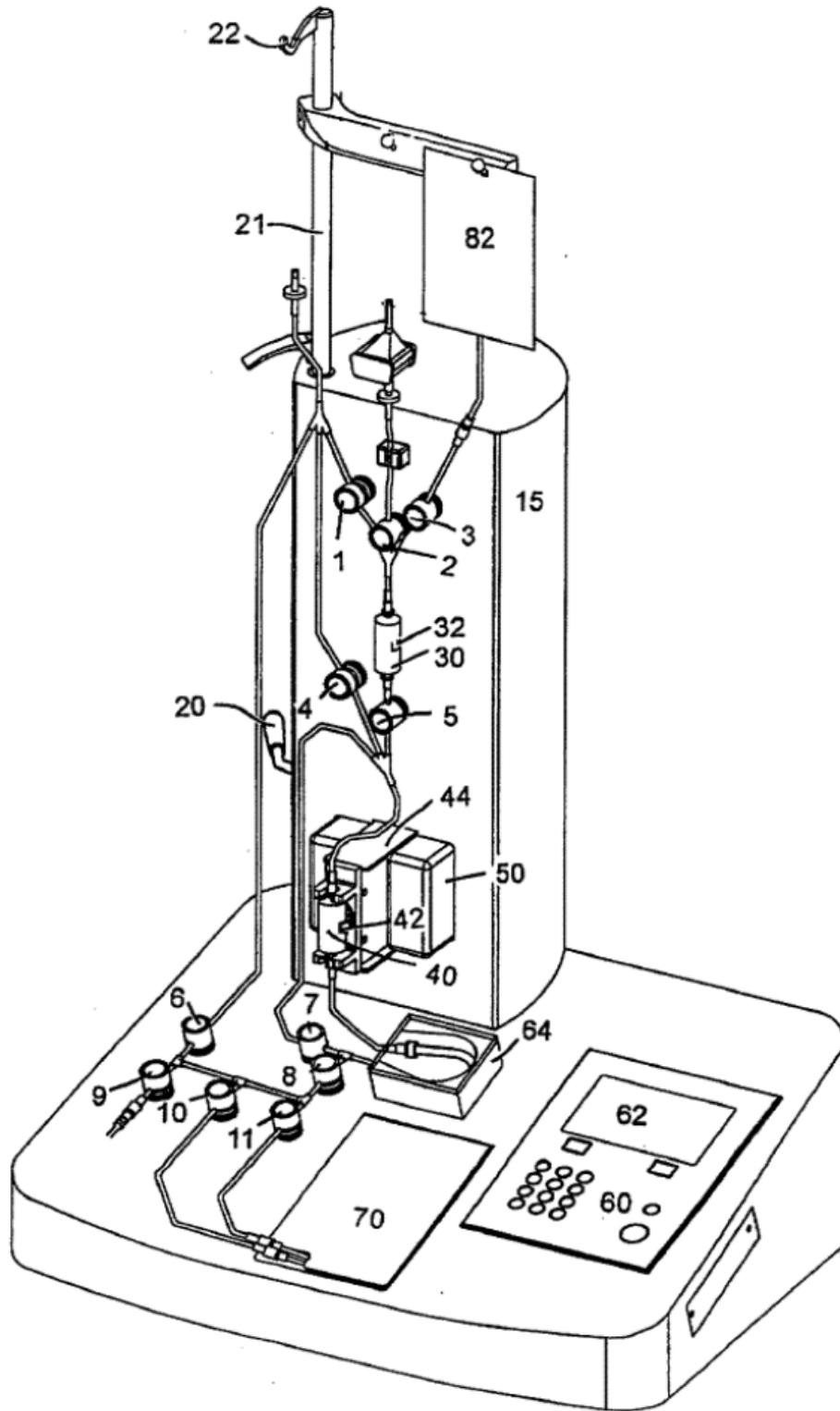


Figura 4

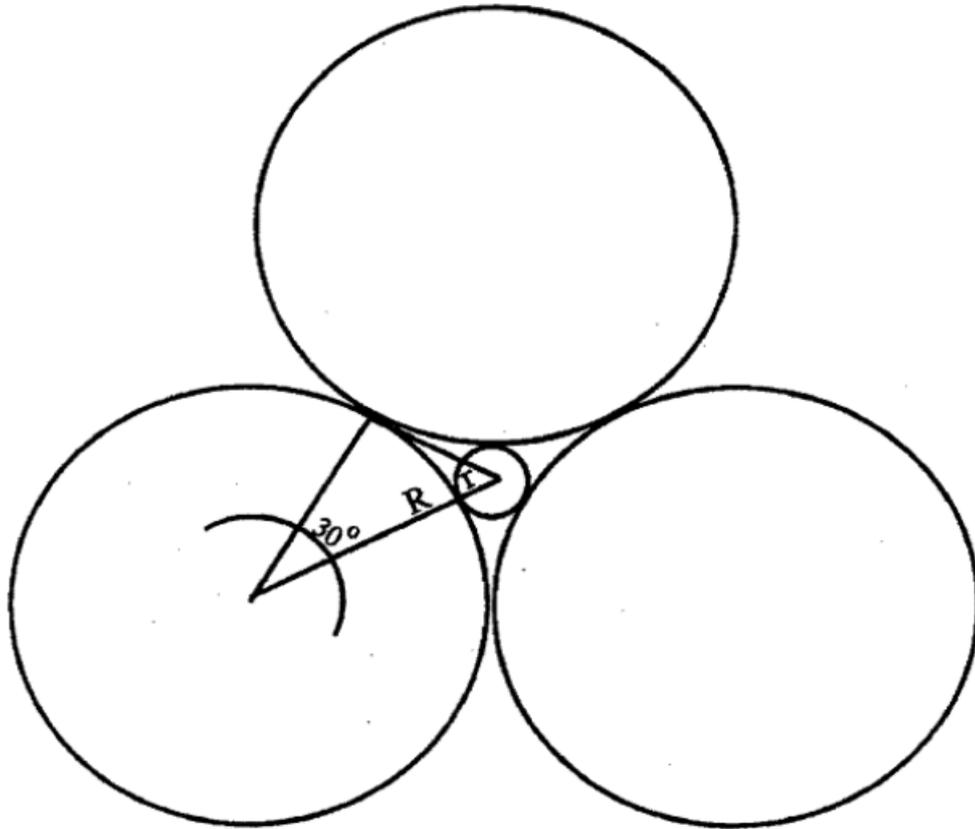
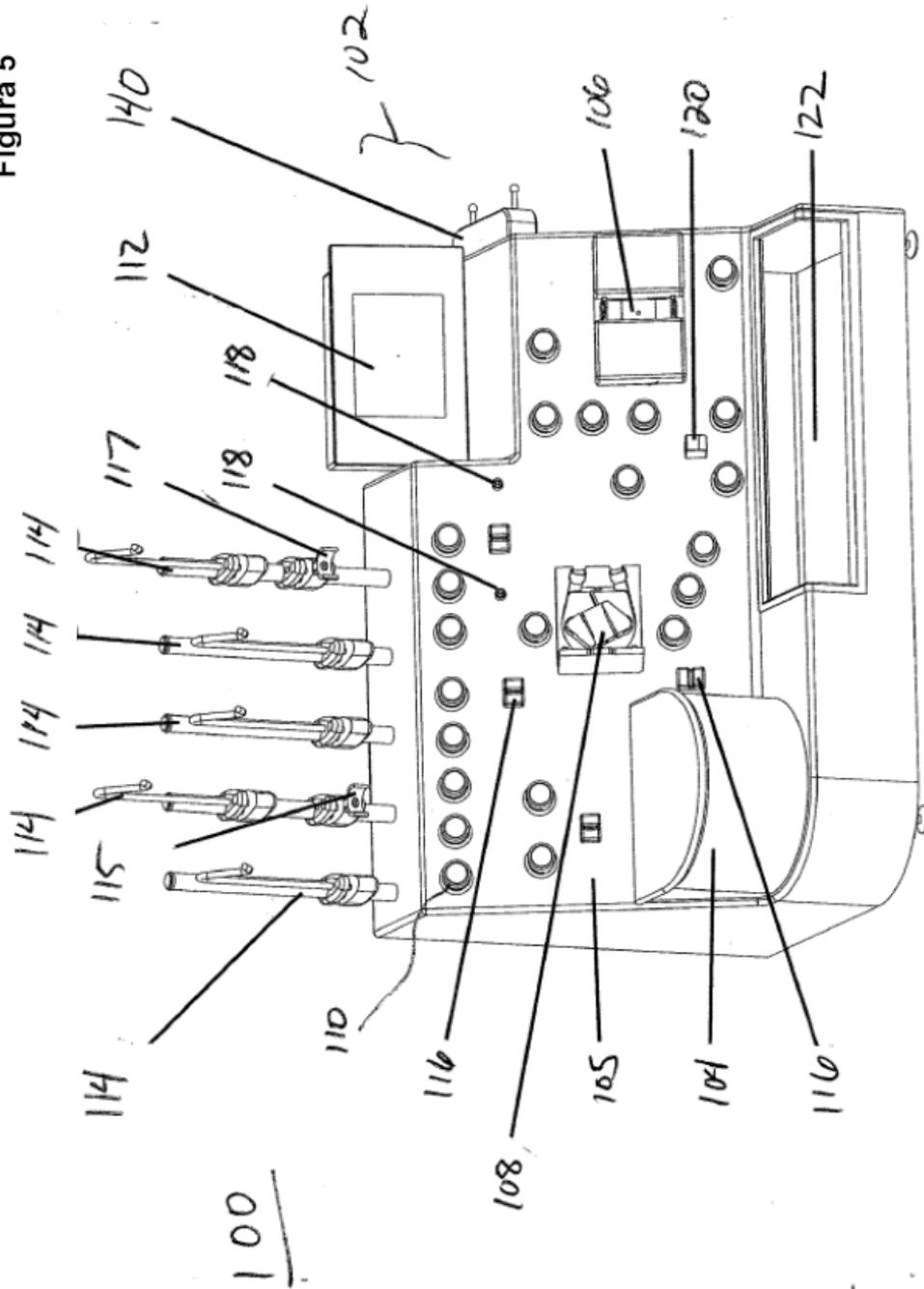


Figura 5



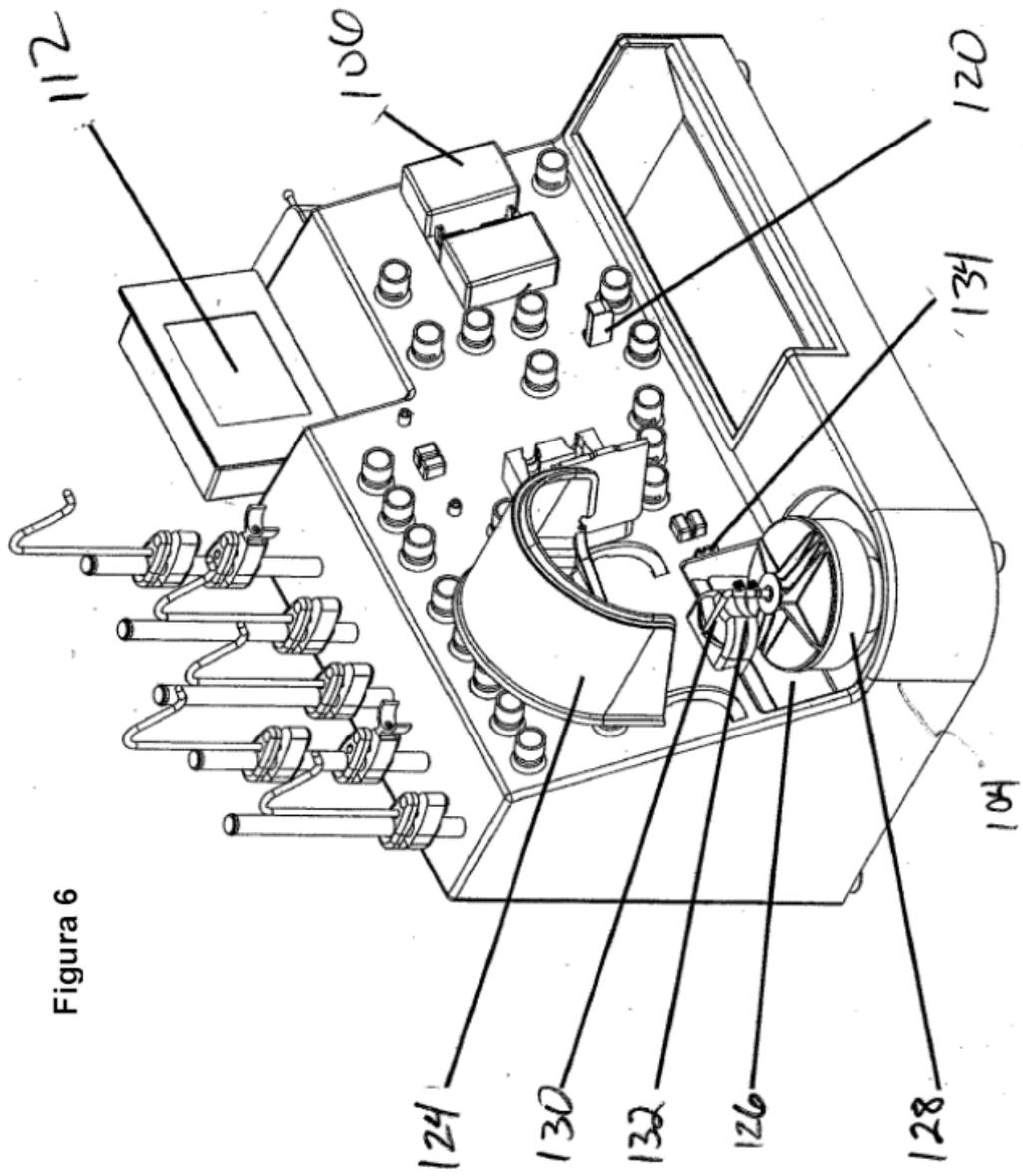


Figura 6

Figura 7

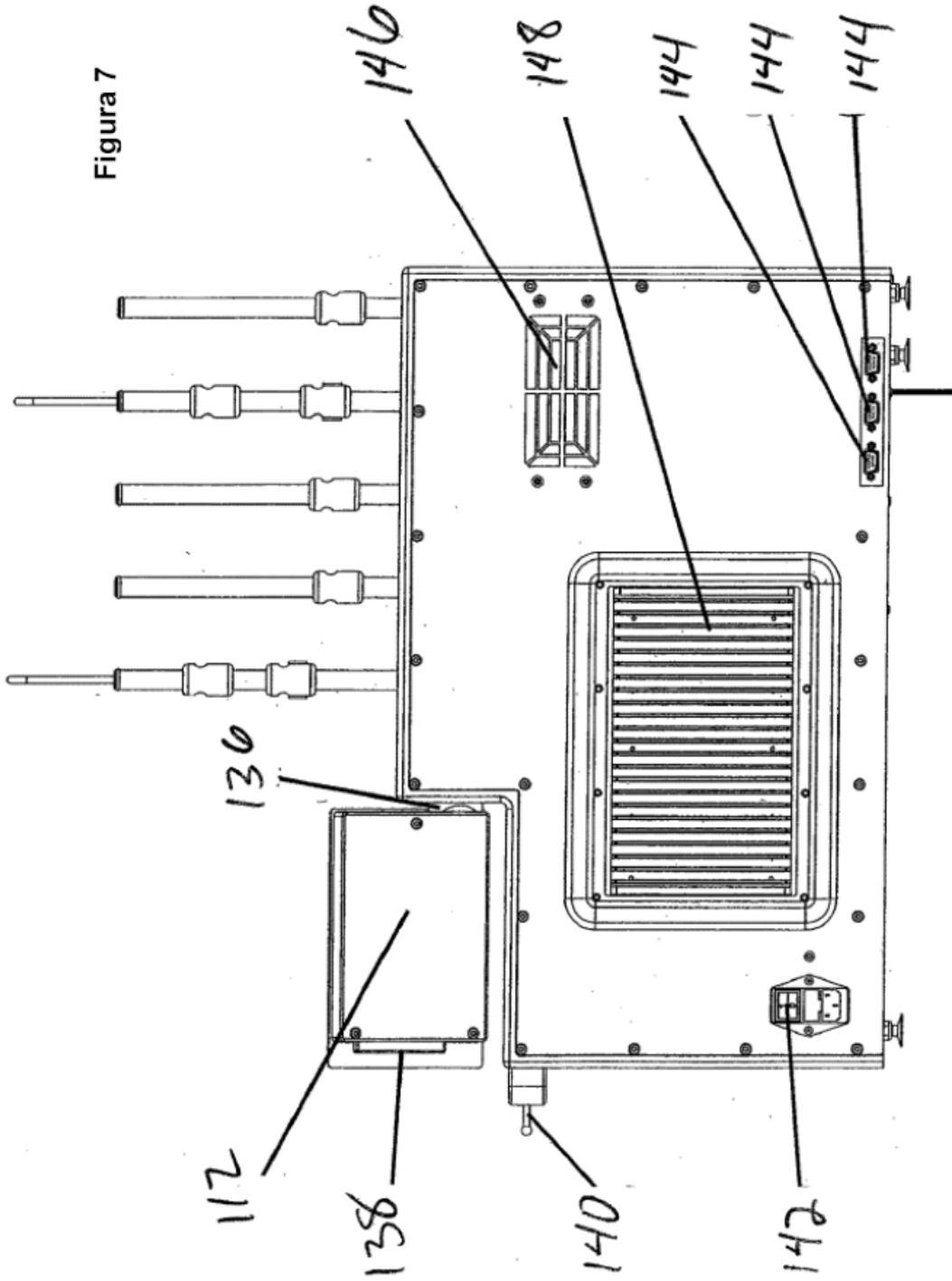


Figura 8

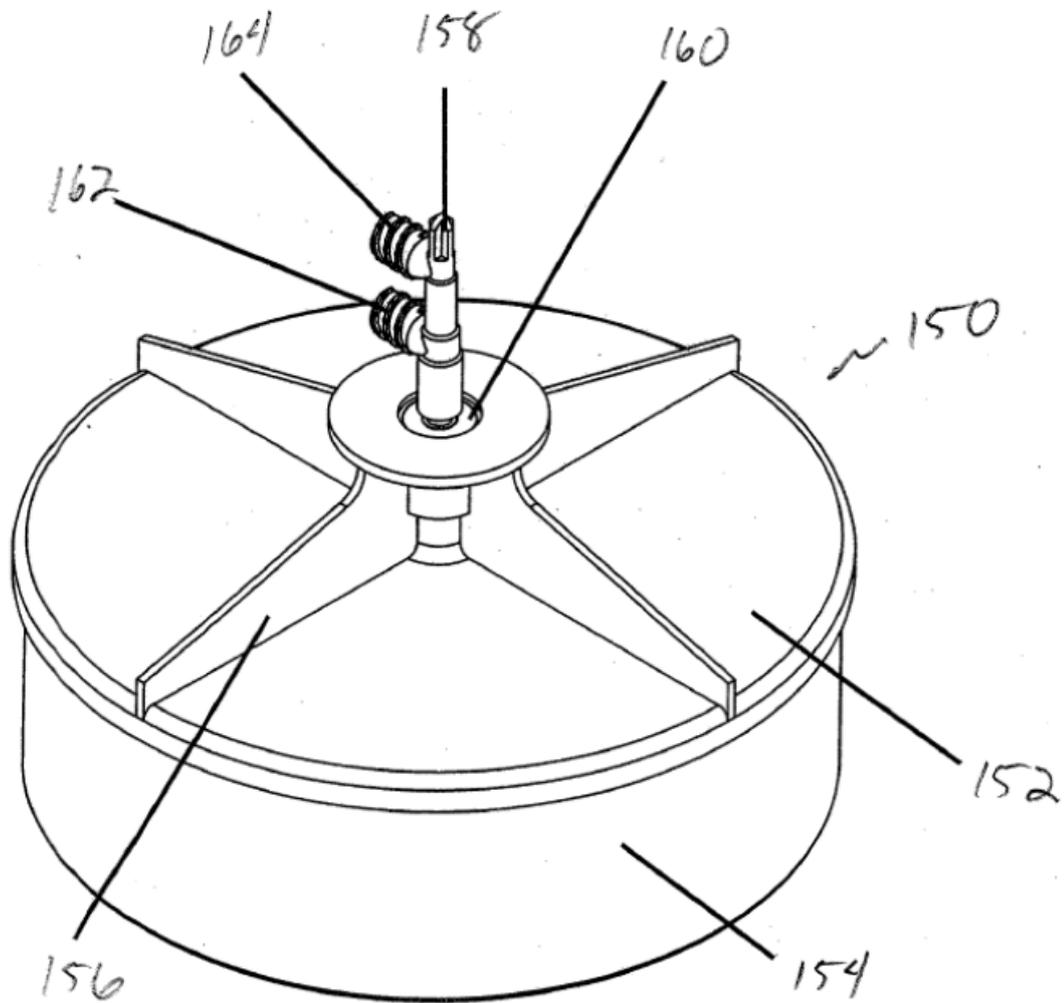


Figura 9

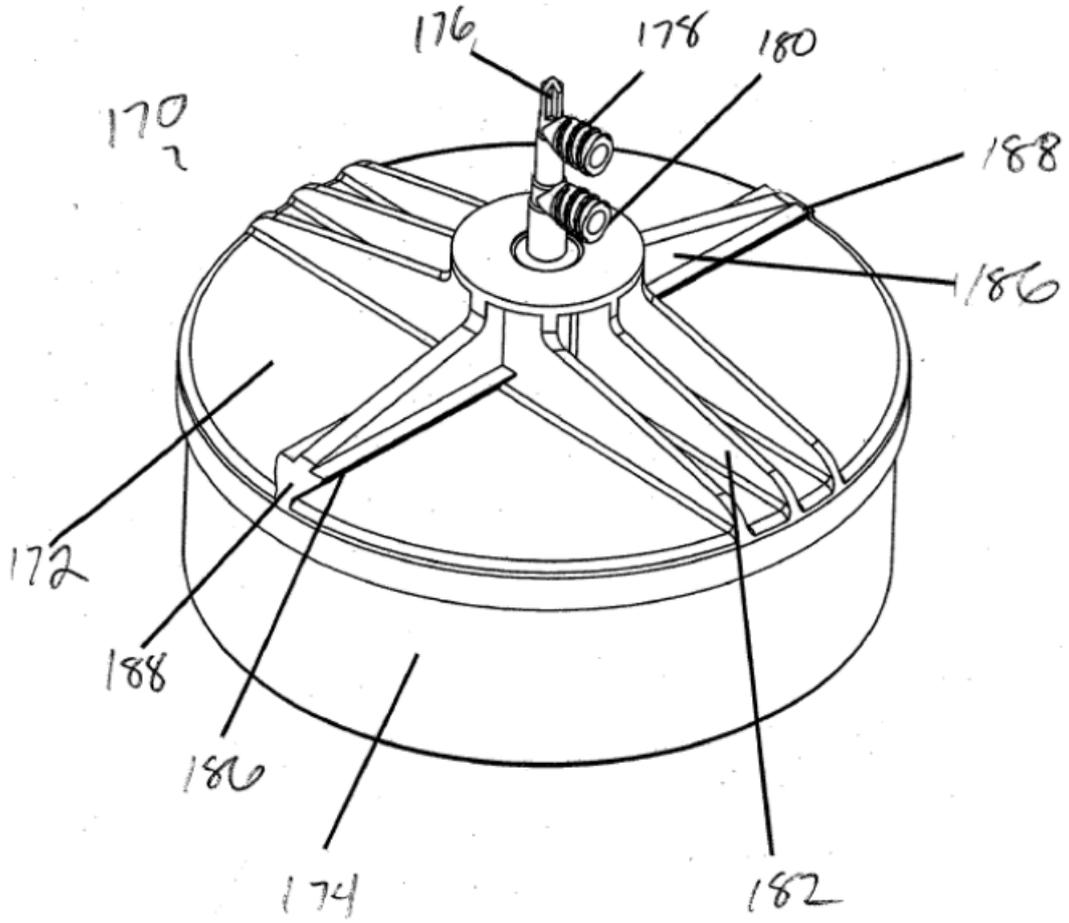


Figura 9A

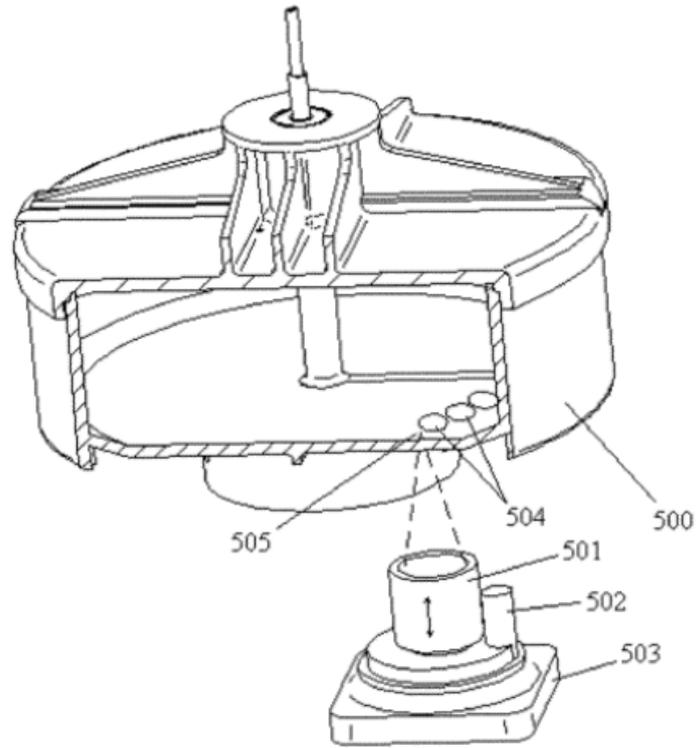


Figura 10

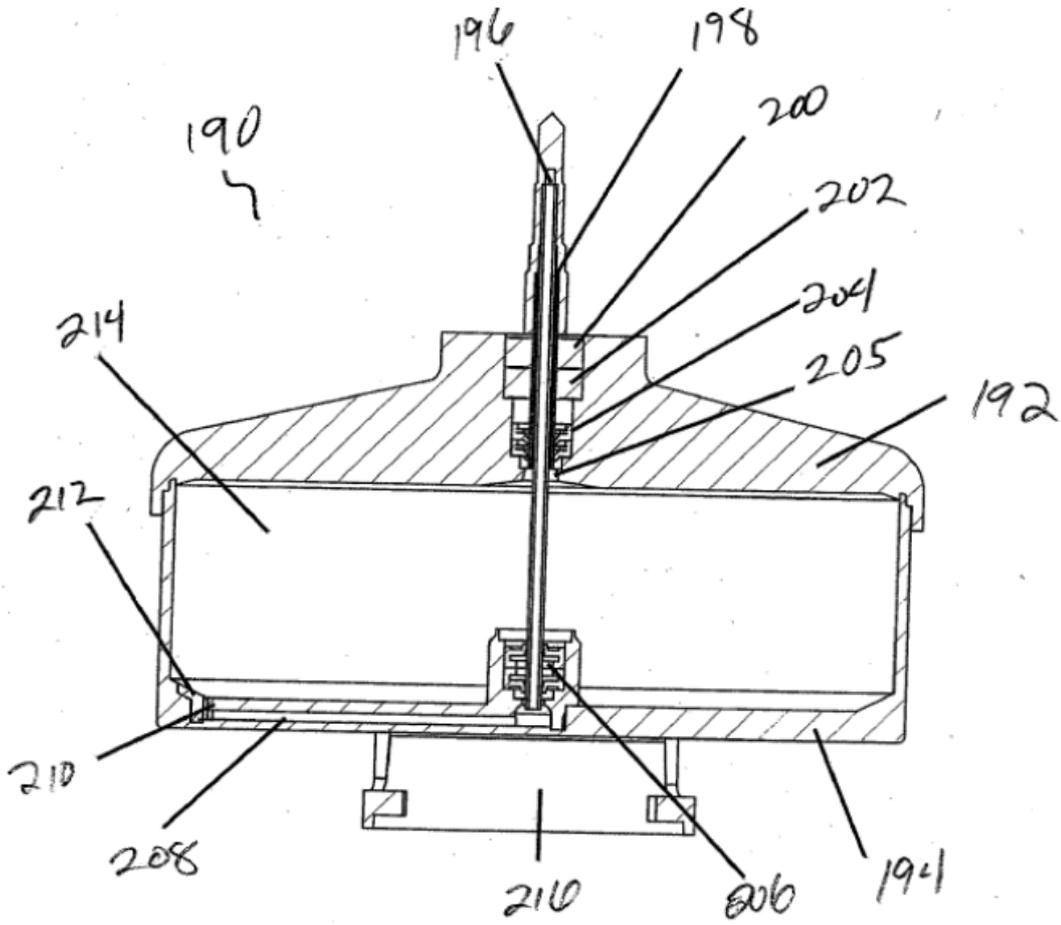


Figura 10A

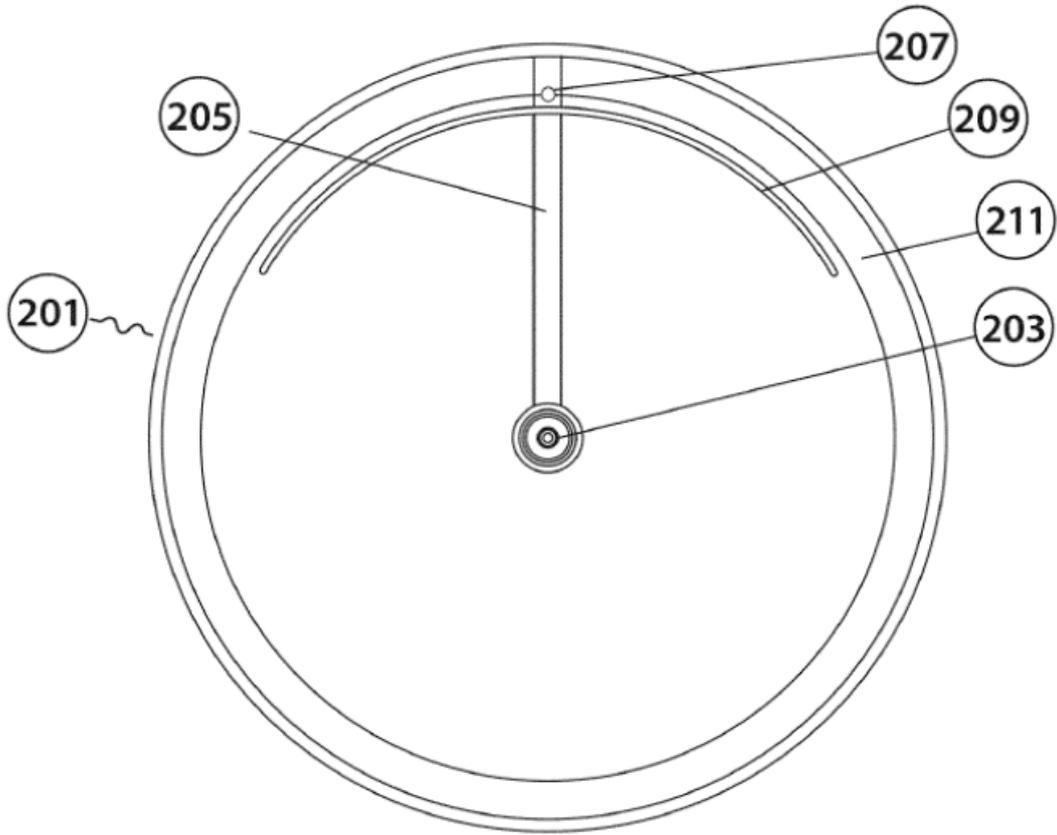
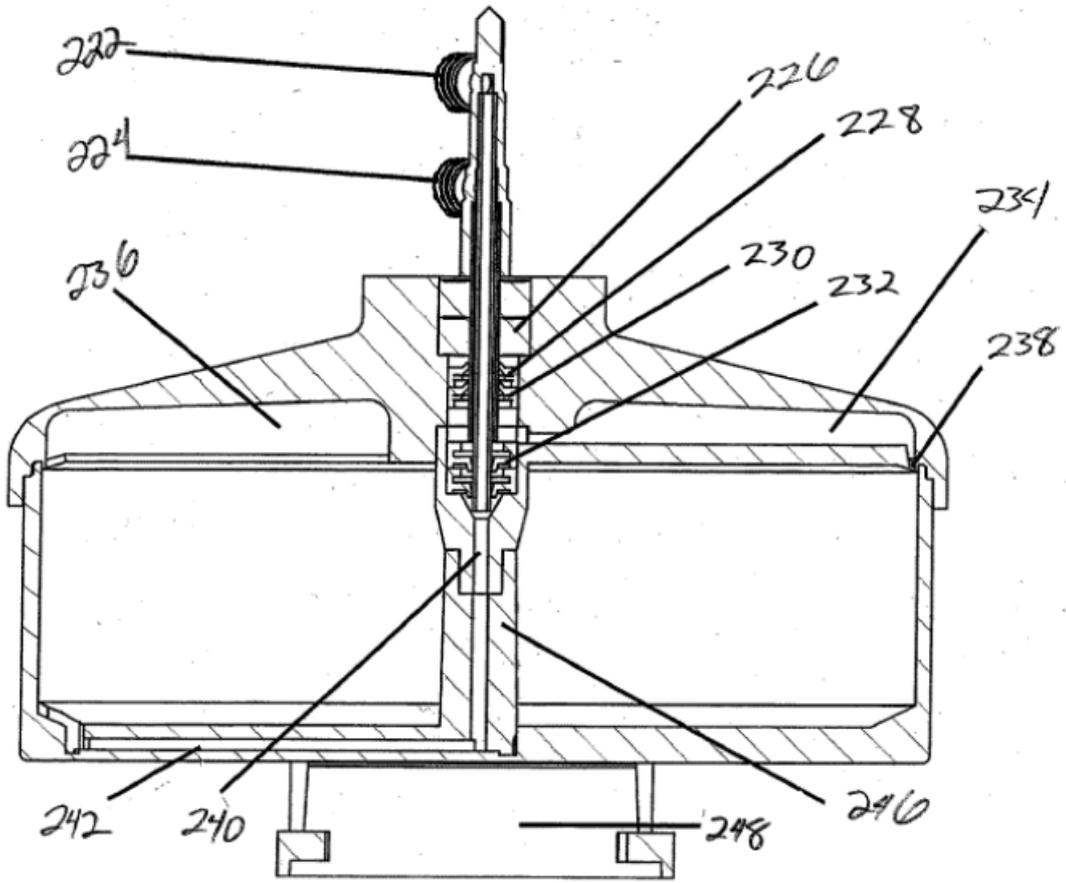


Figura 11



220

Figura 11A

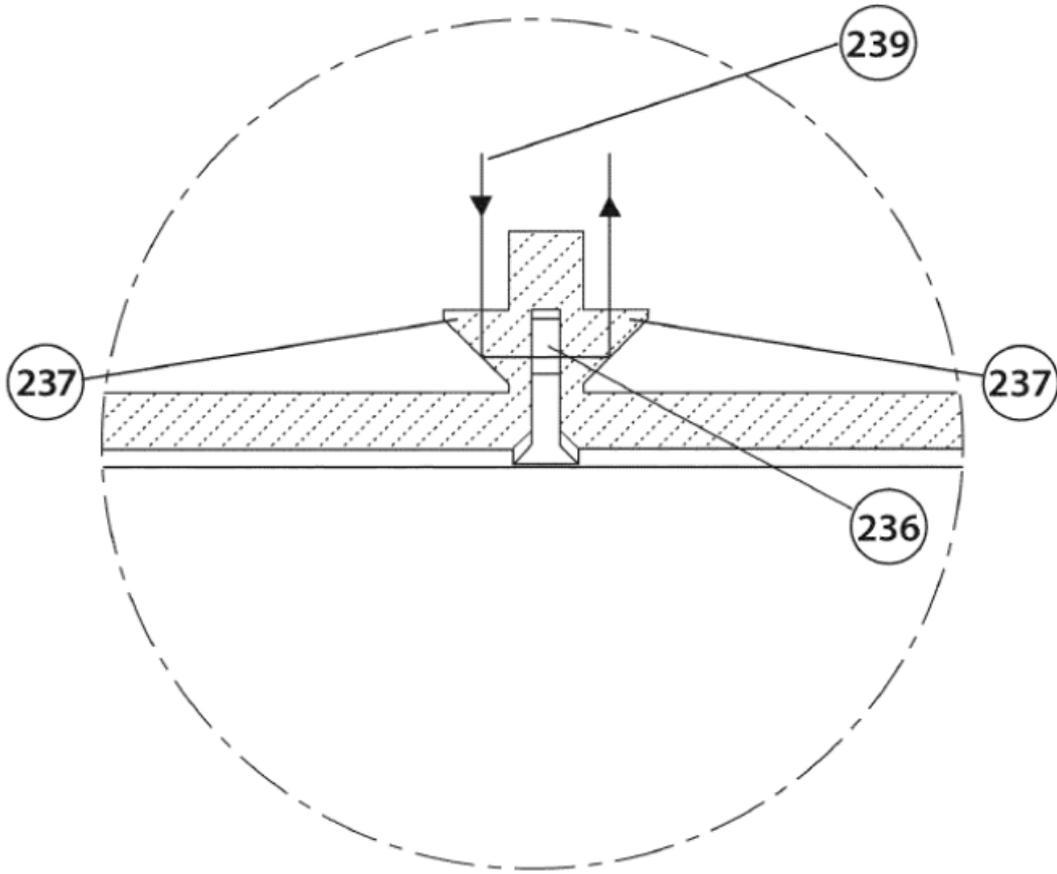


Figura 11B

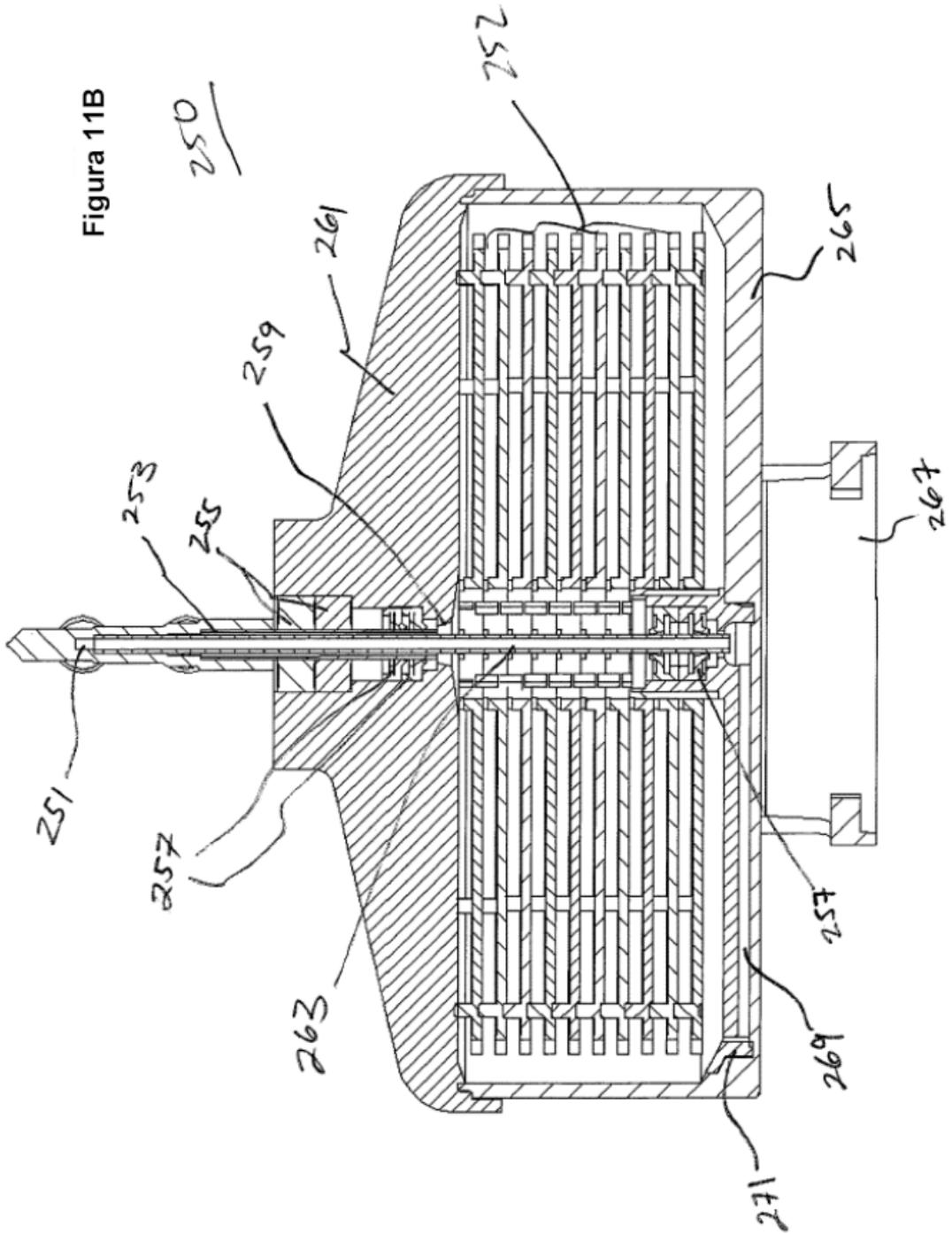


Figura 12A

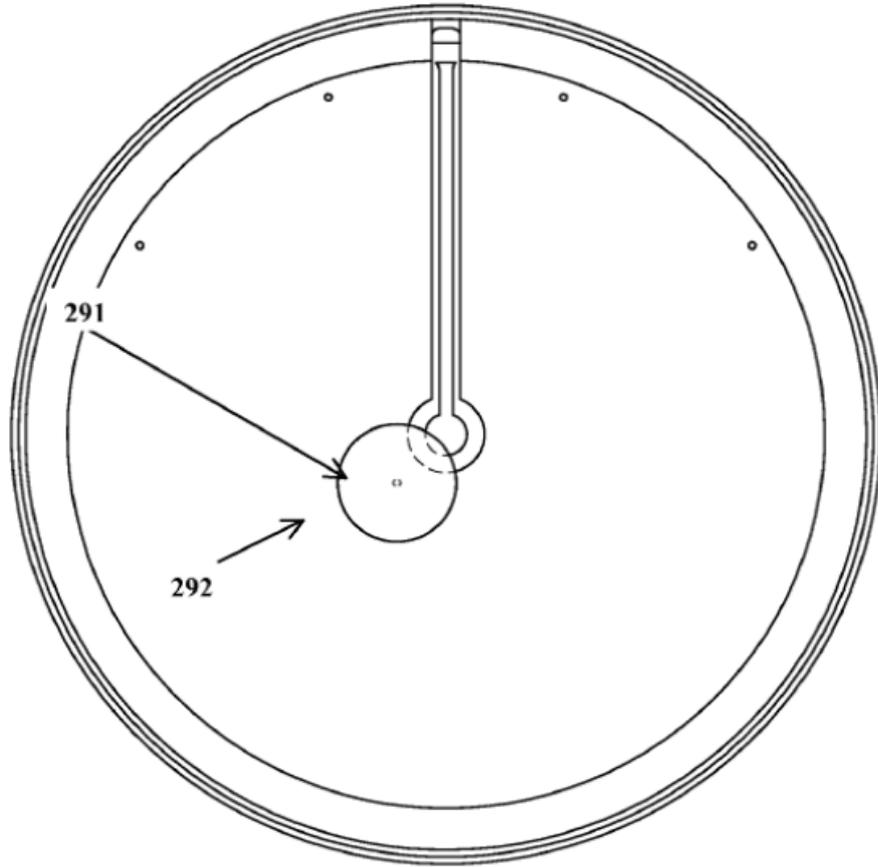


Figura 12B

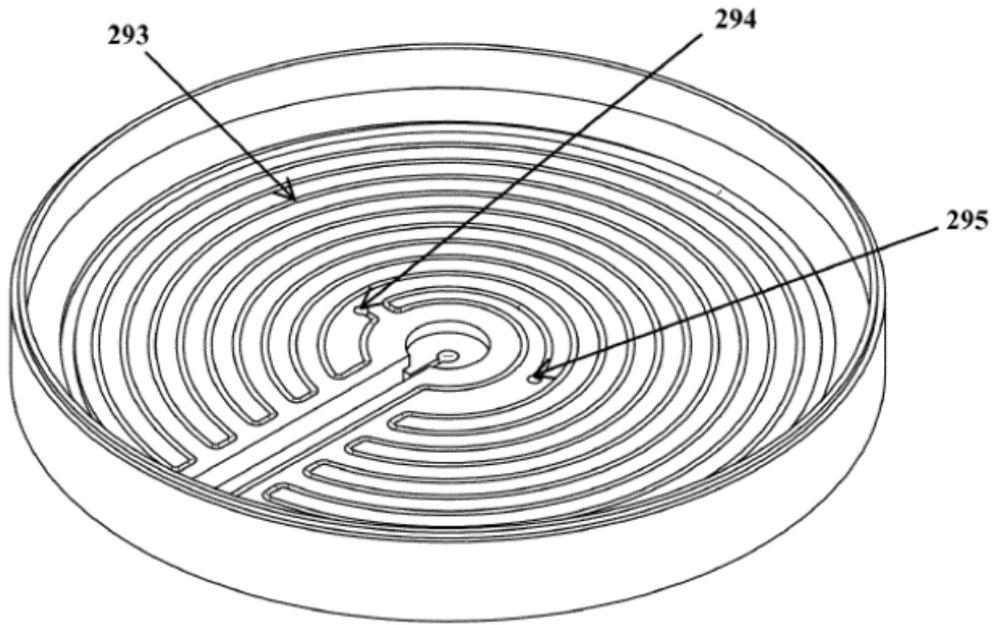


Figura 13

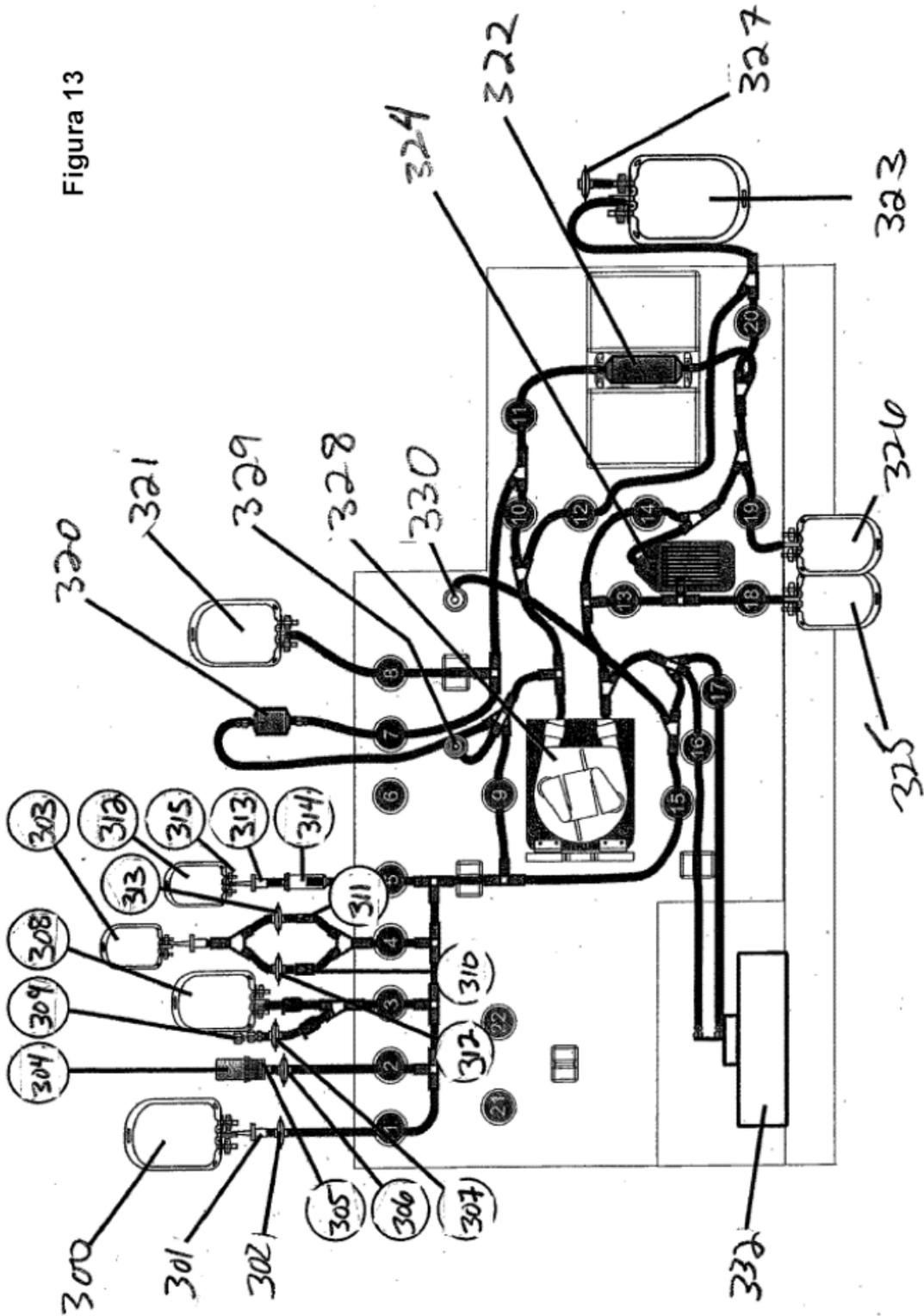


Figura 14A

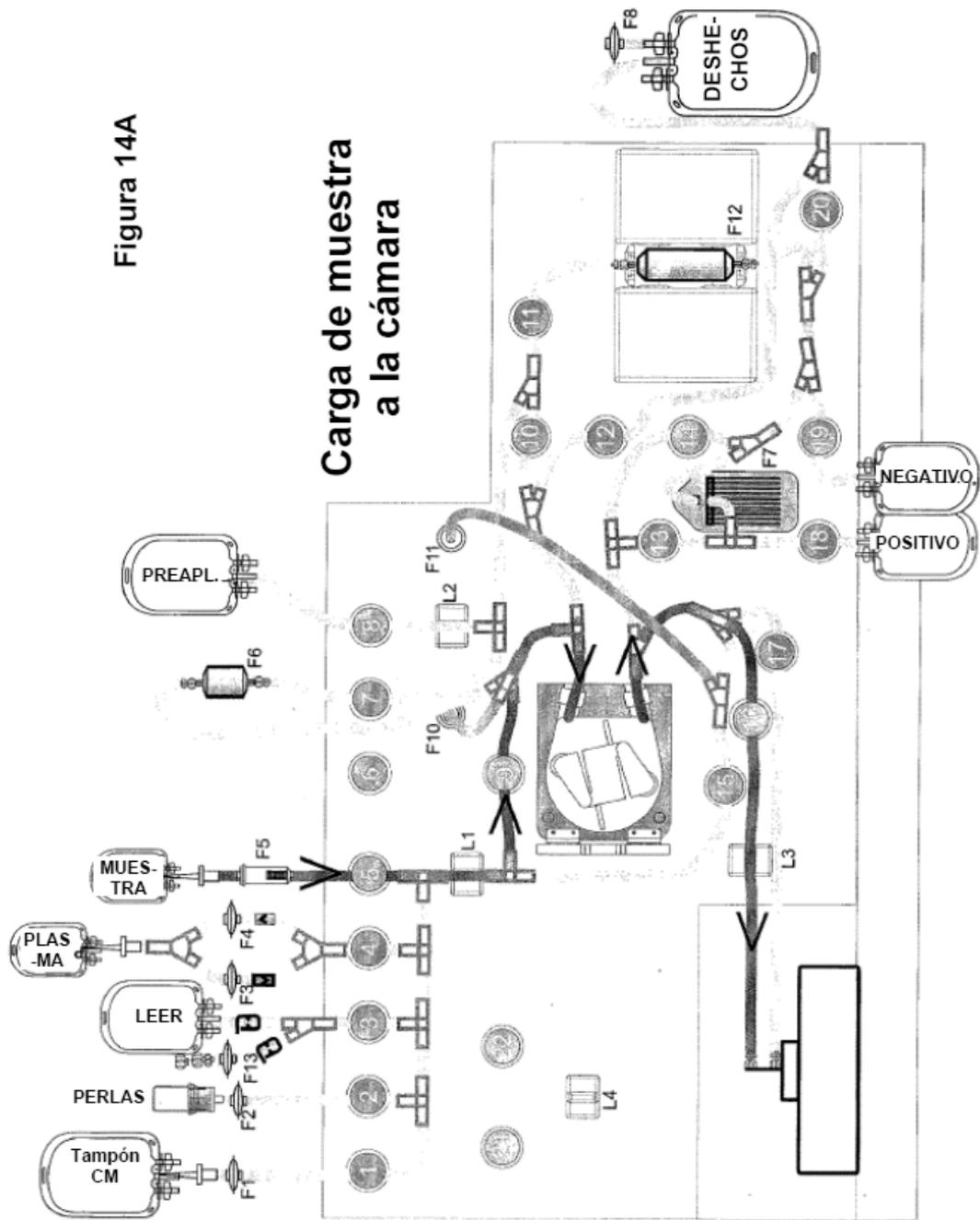


Figura 14B

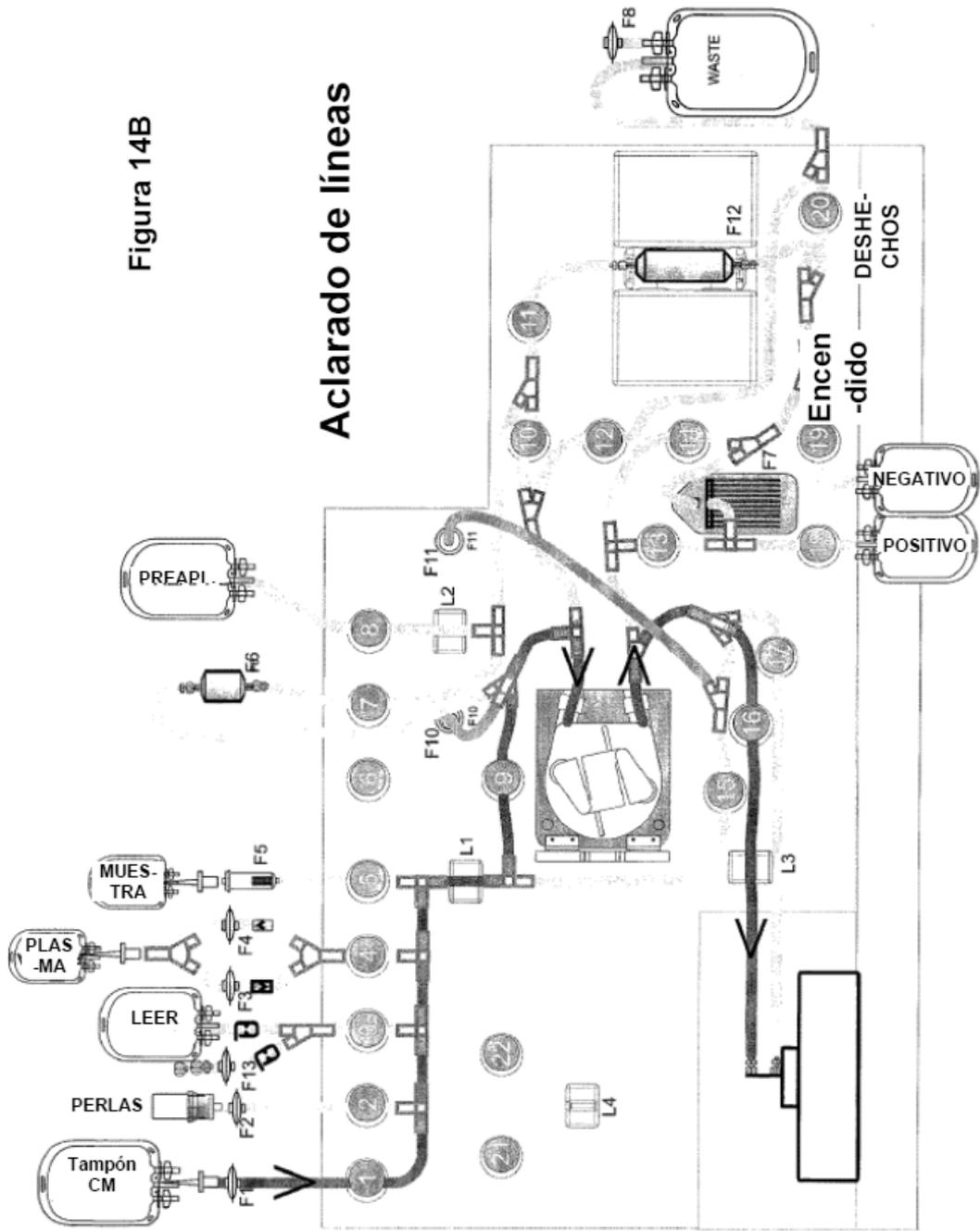


Figura 14C

### Reducción de glóbulos rojos

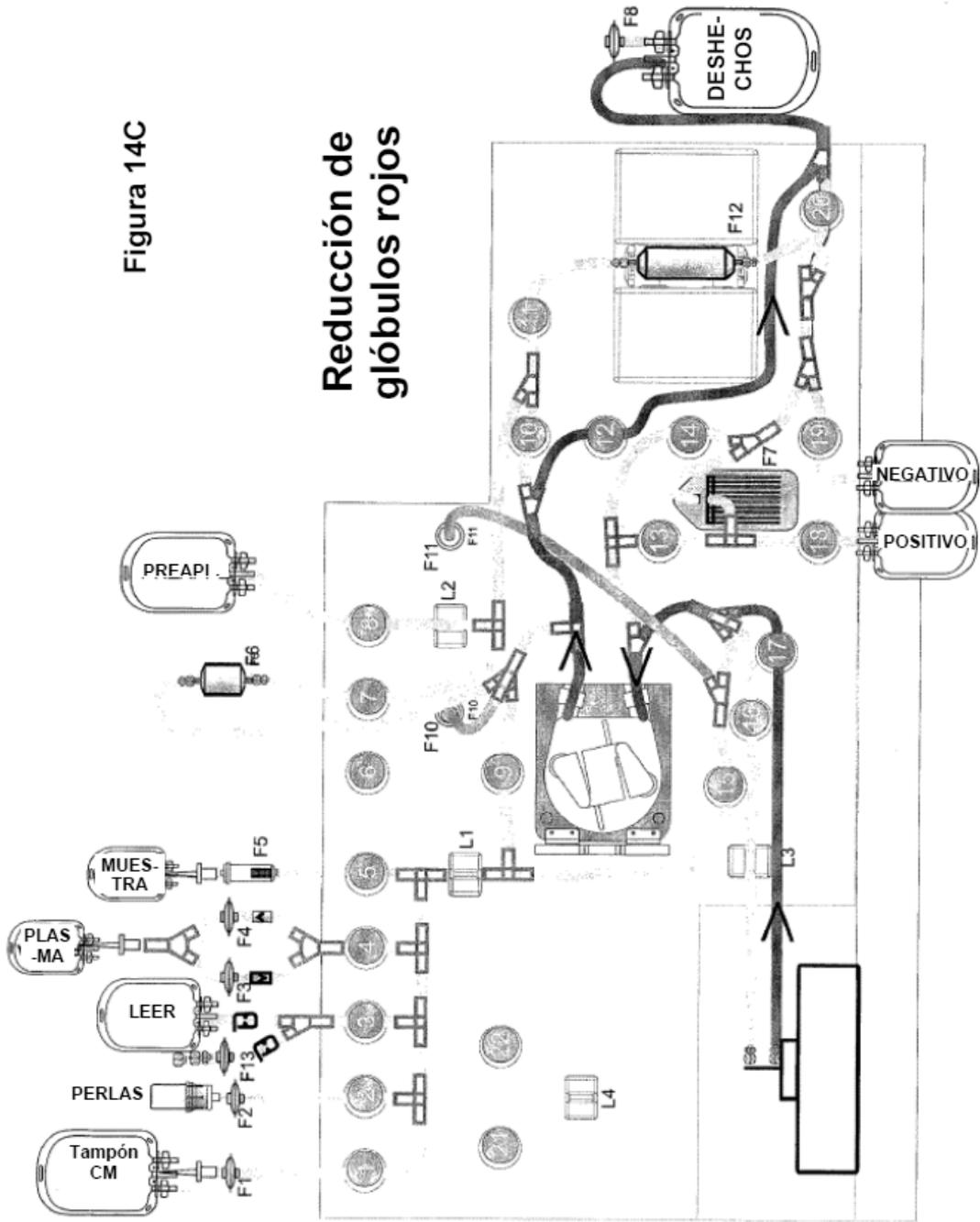


Figura 14D

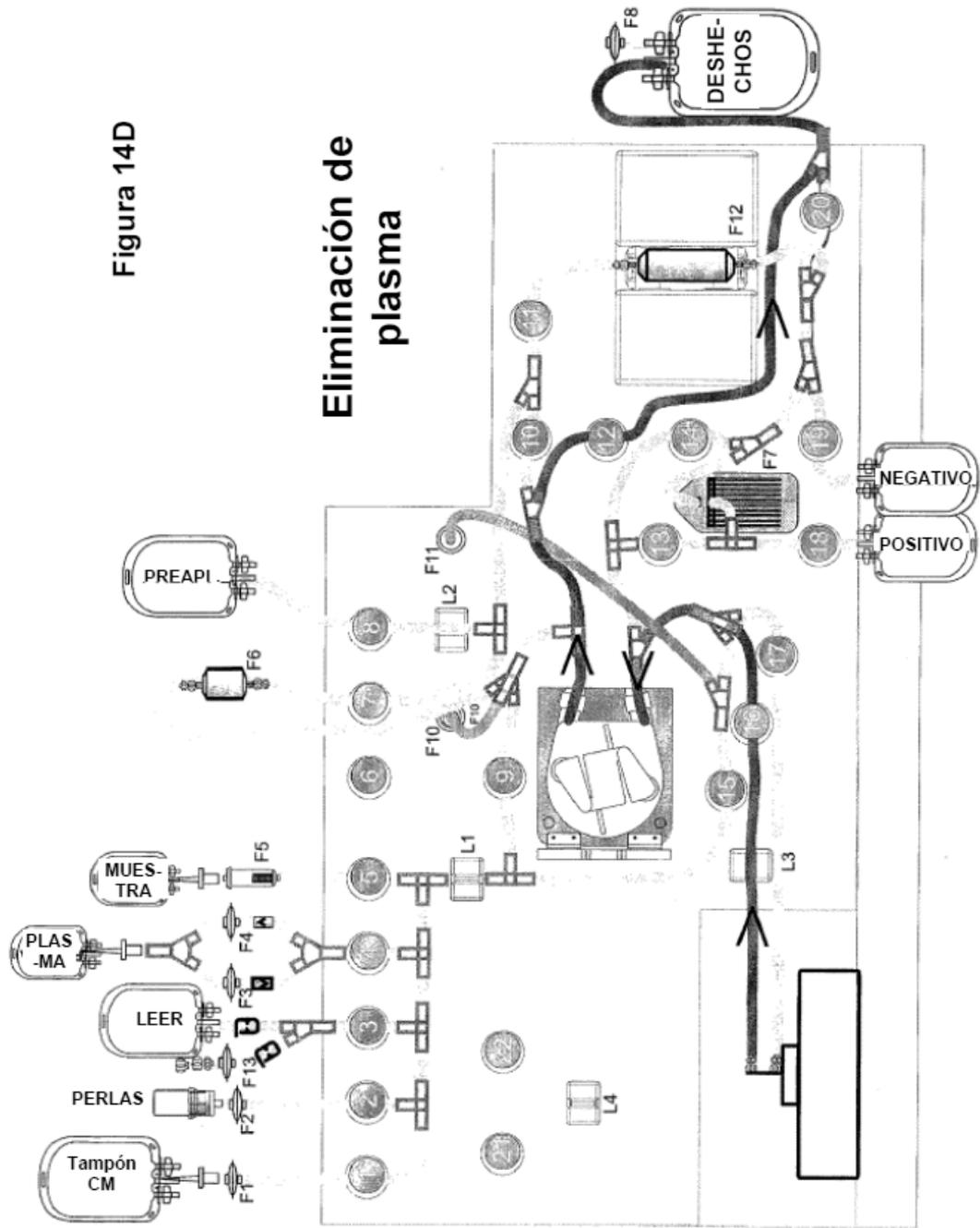


Figura 14E

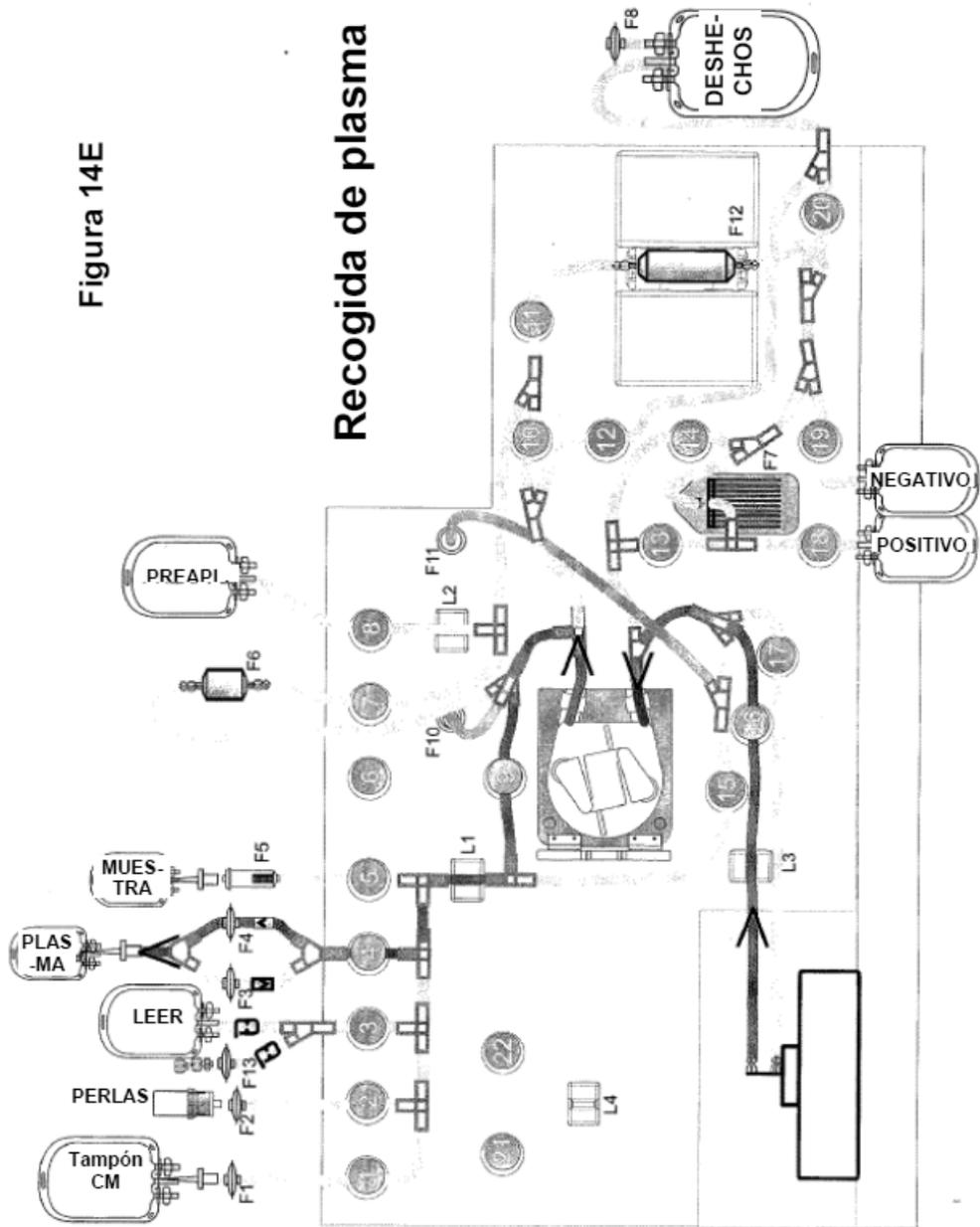


Figura 14F

### Carga de reactivo en la cámara

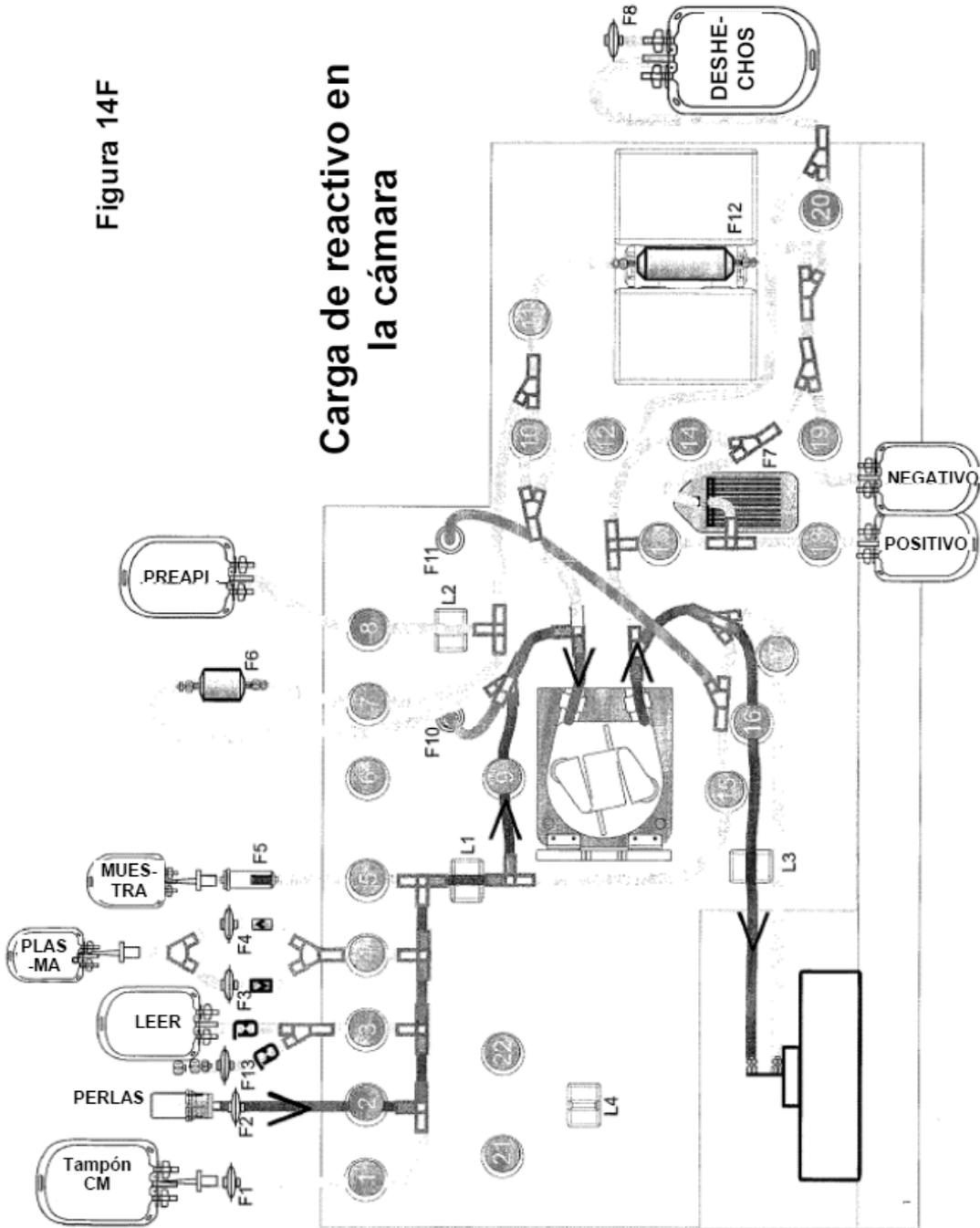


Figura 14G

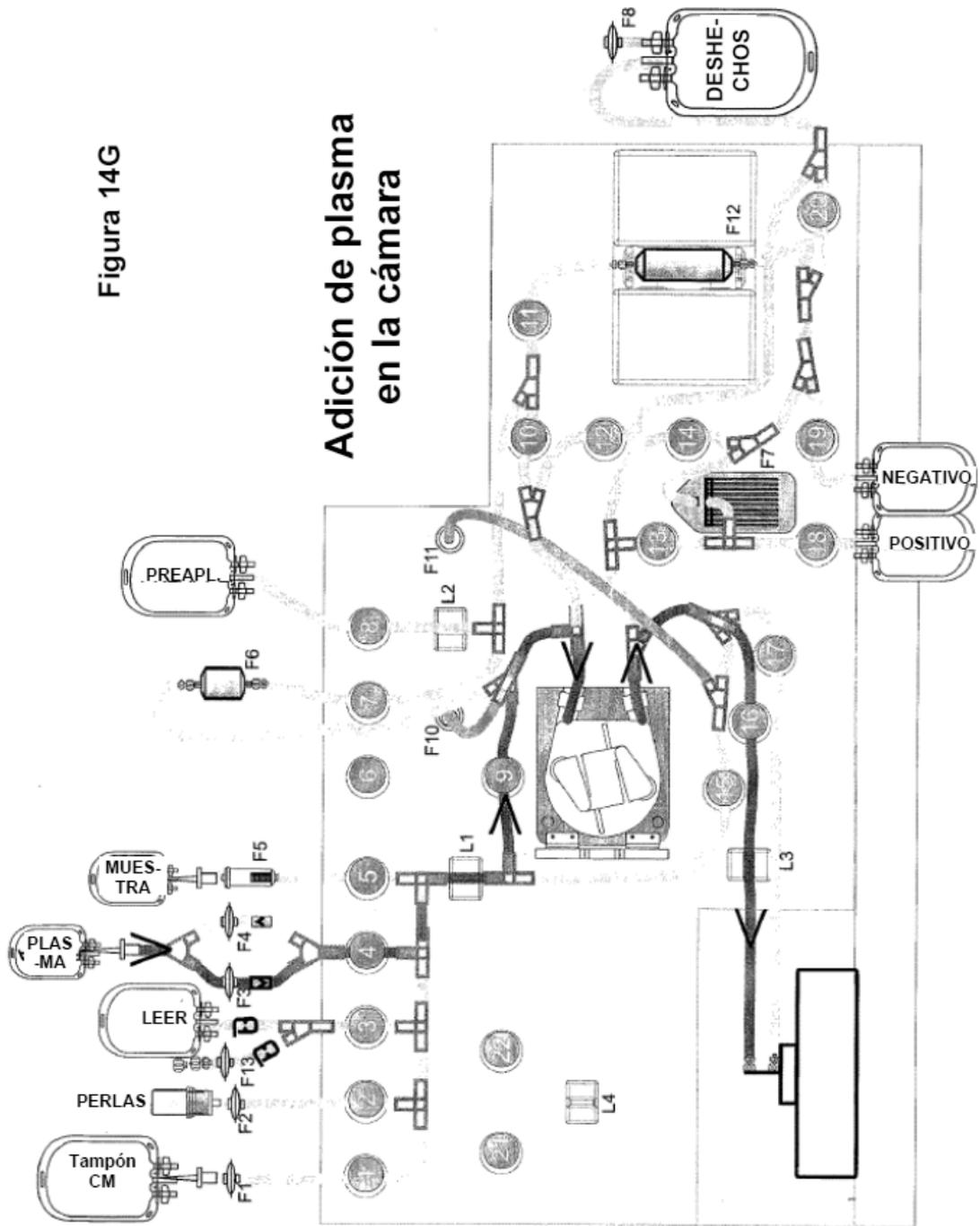


Figura 14H

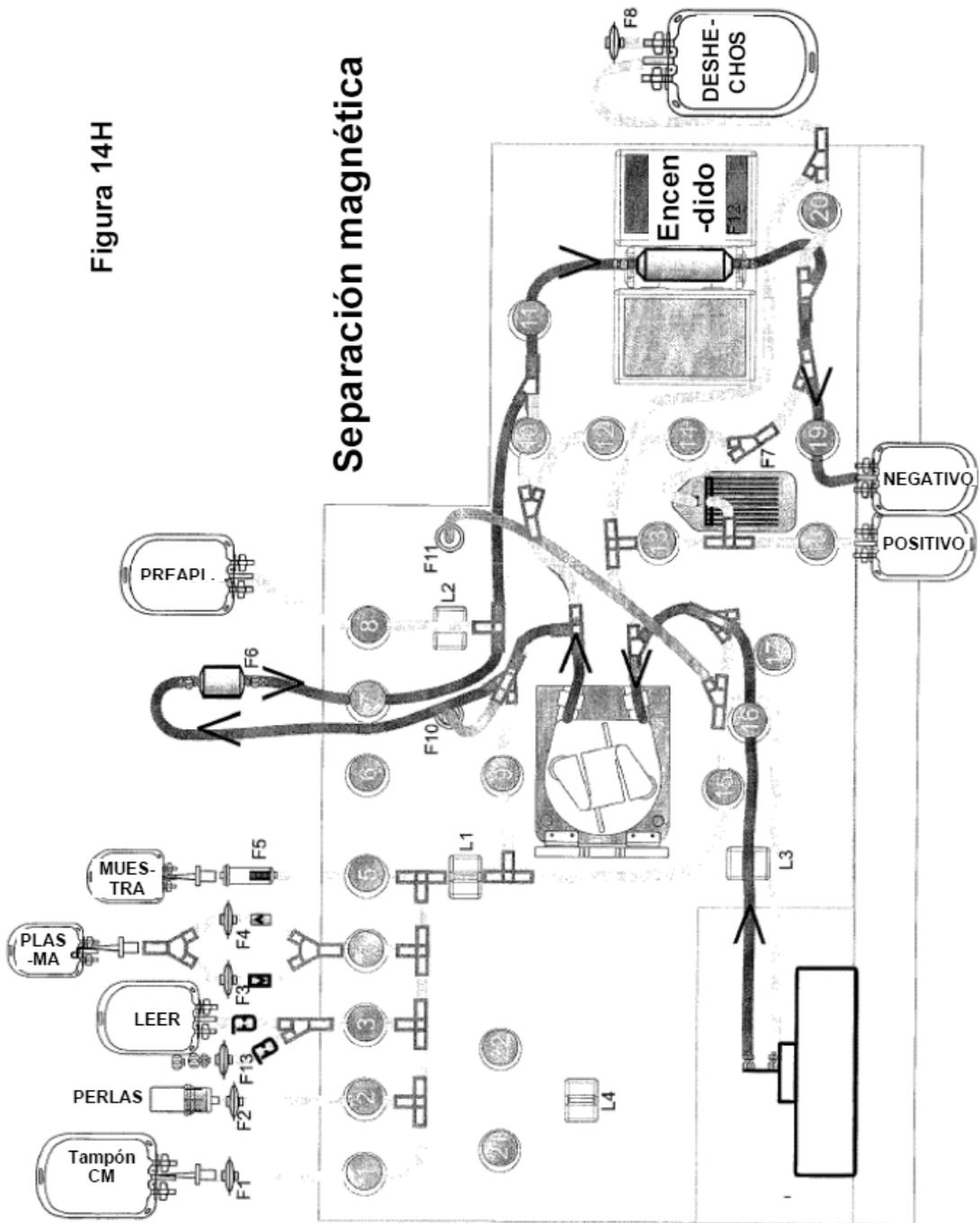


Figura 14I

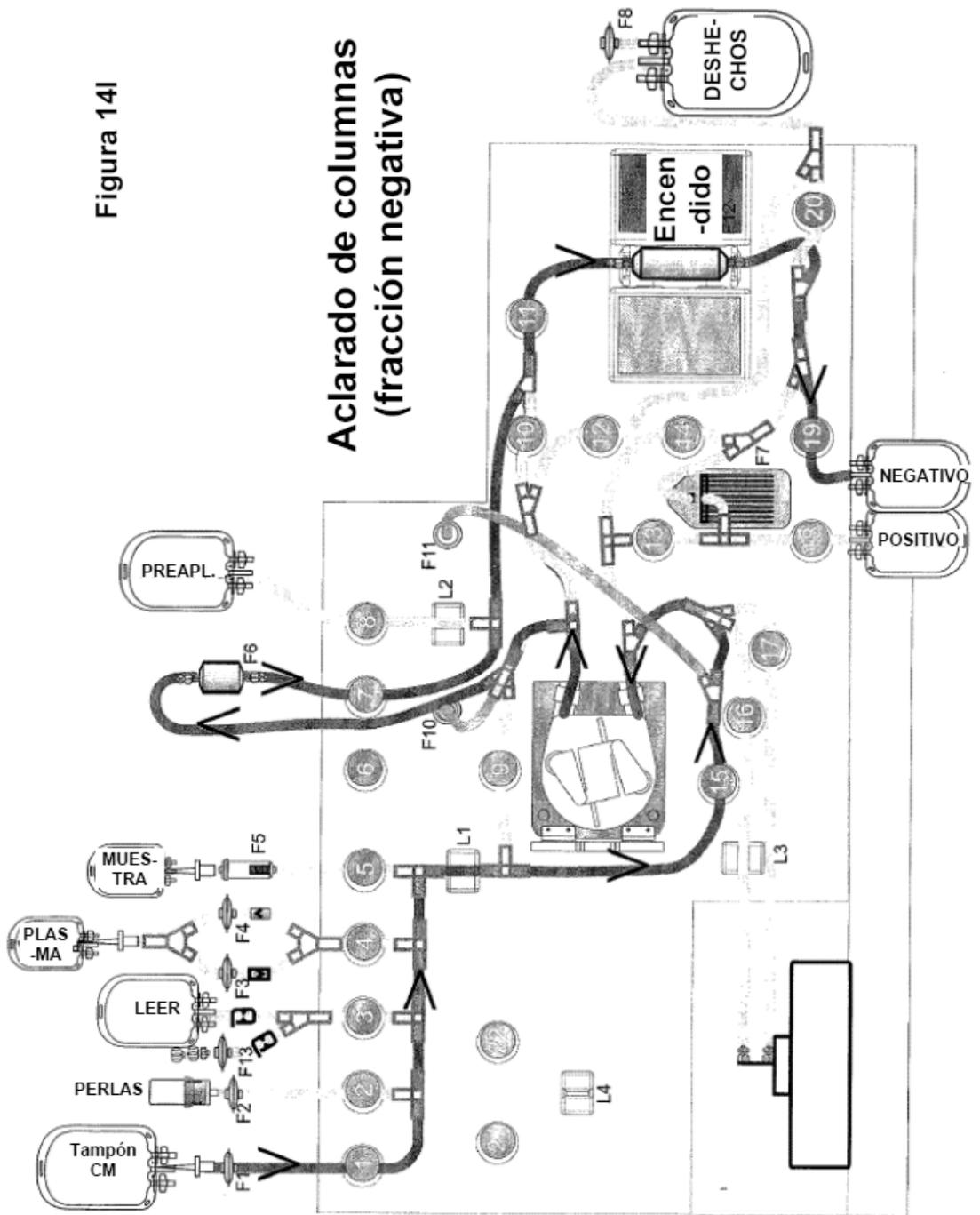


Figura 14J

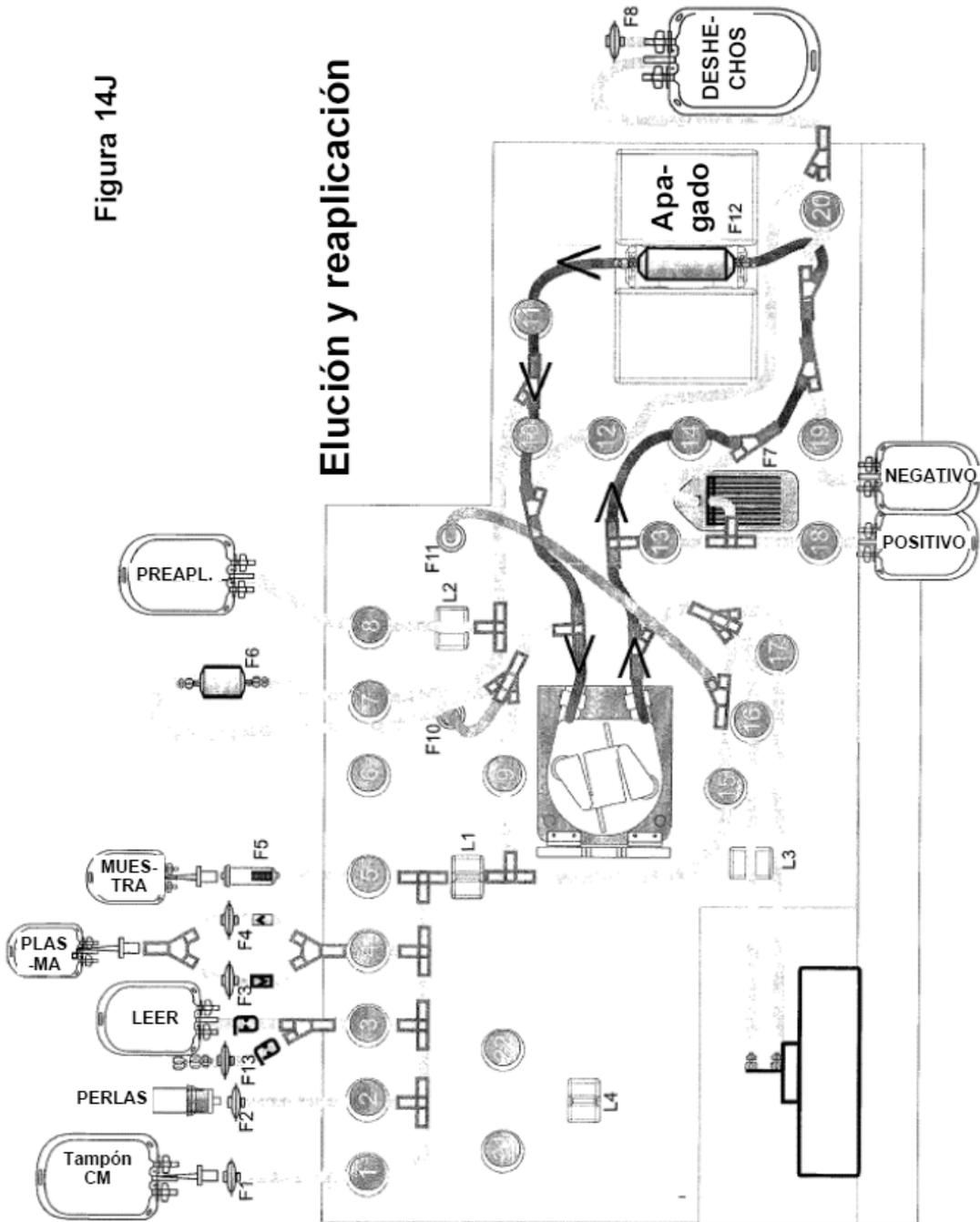




Figura 14L

Lavado de columna en la bolsa de reapiación

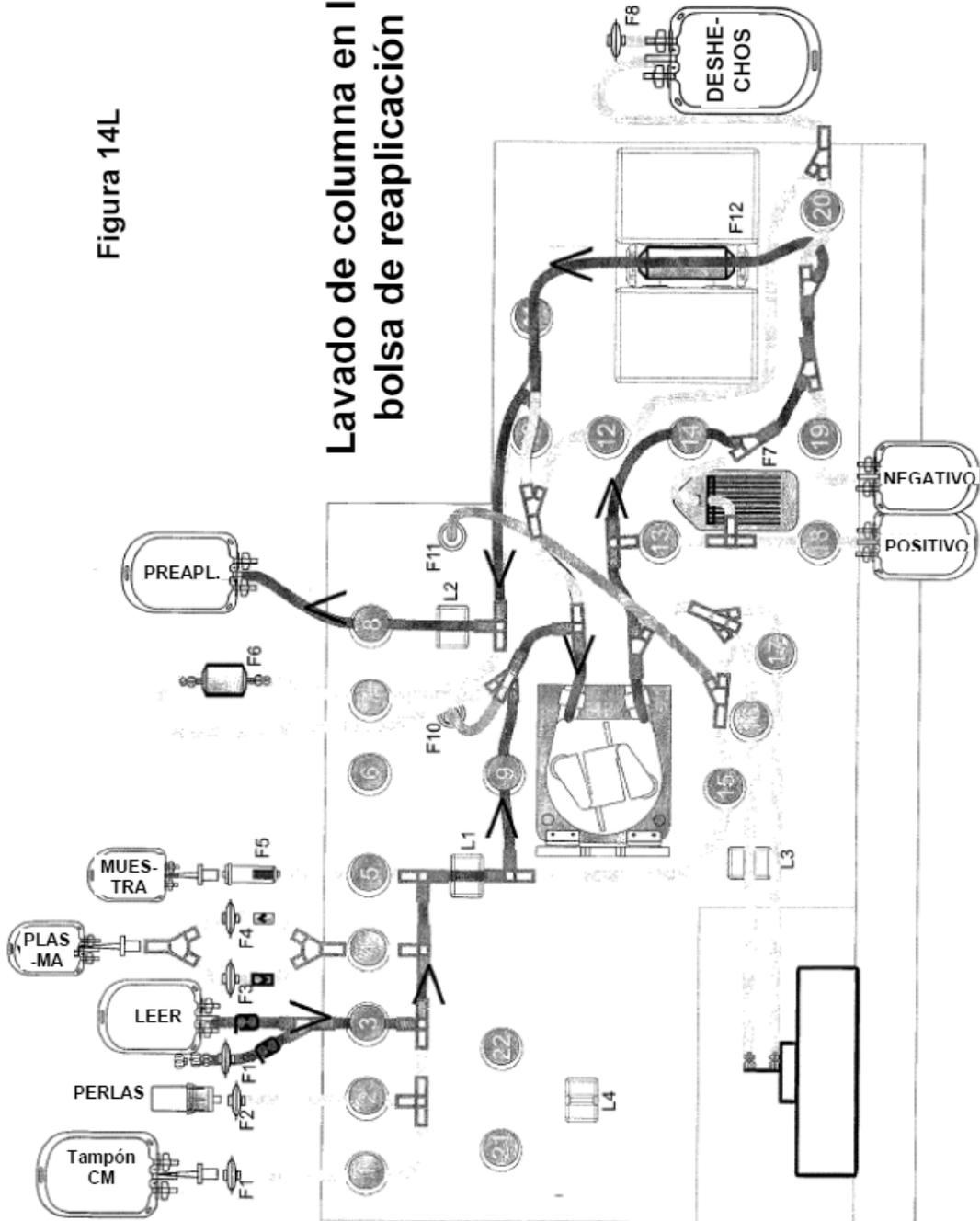


Figura 14N

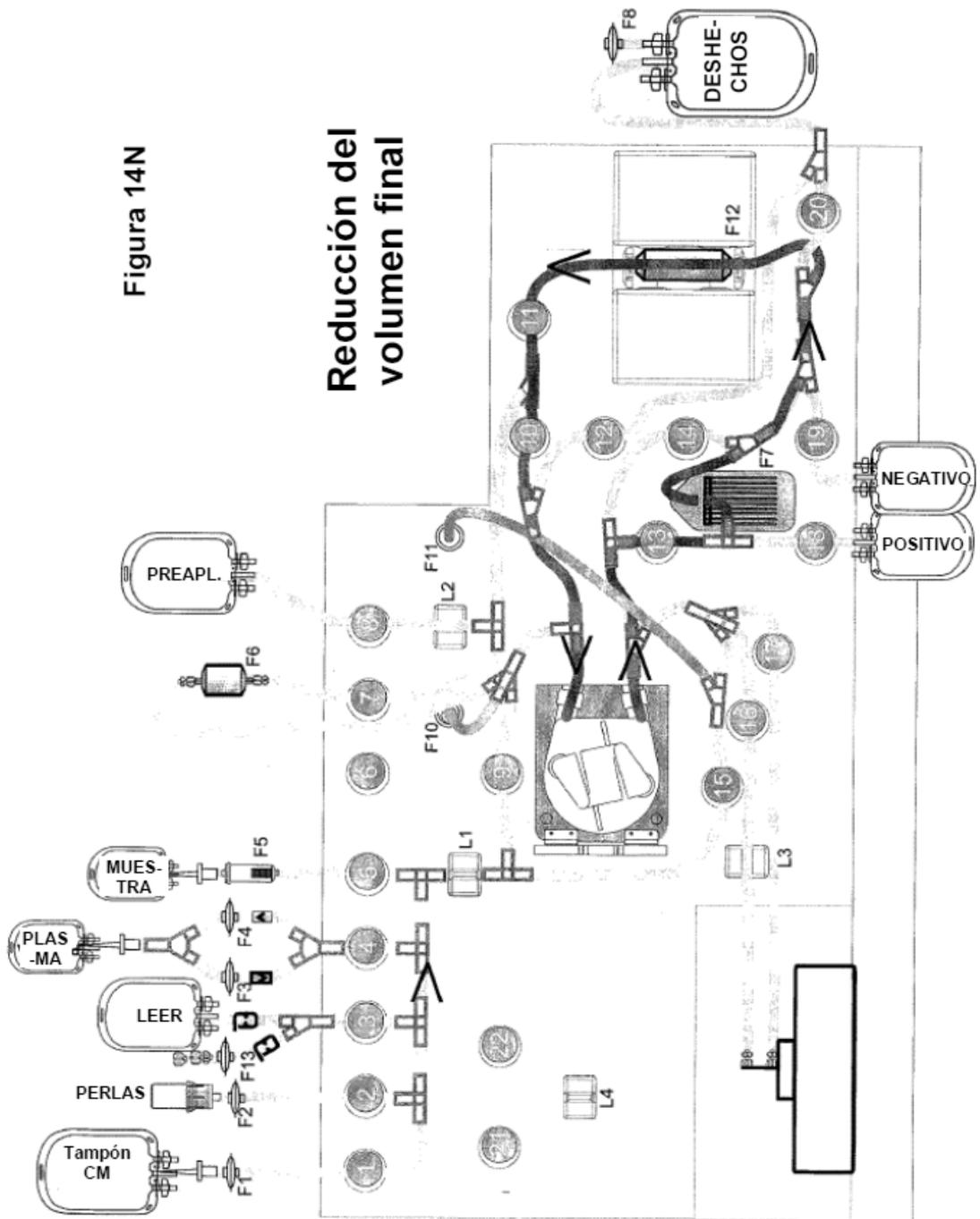


Figura 14N

Elución final en el recipiente producto

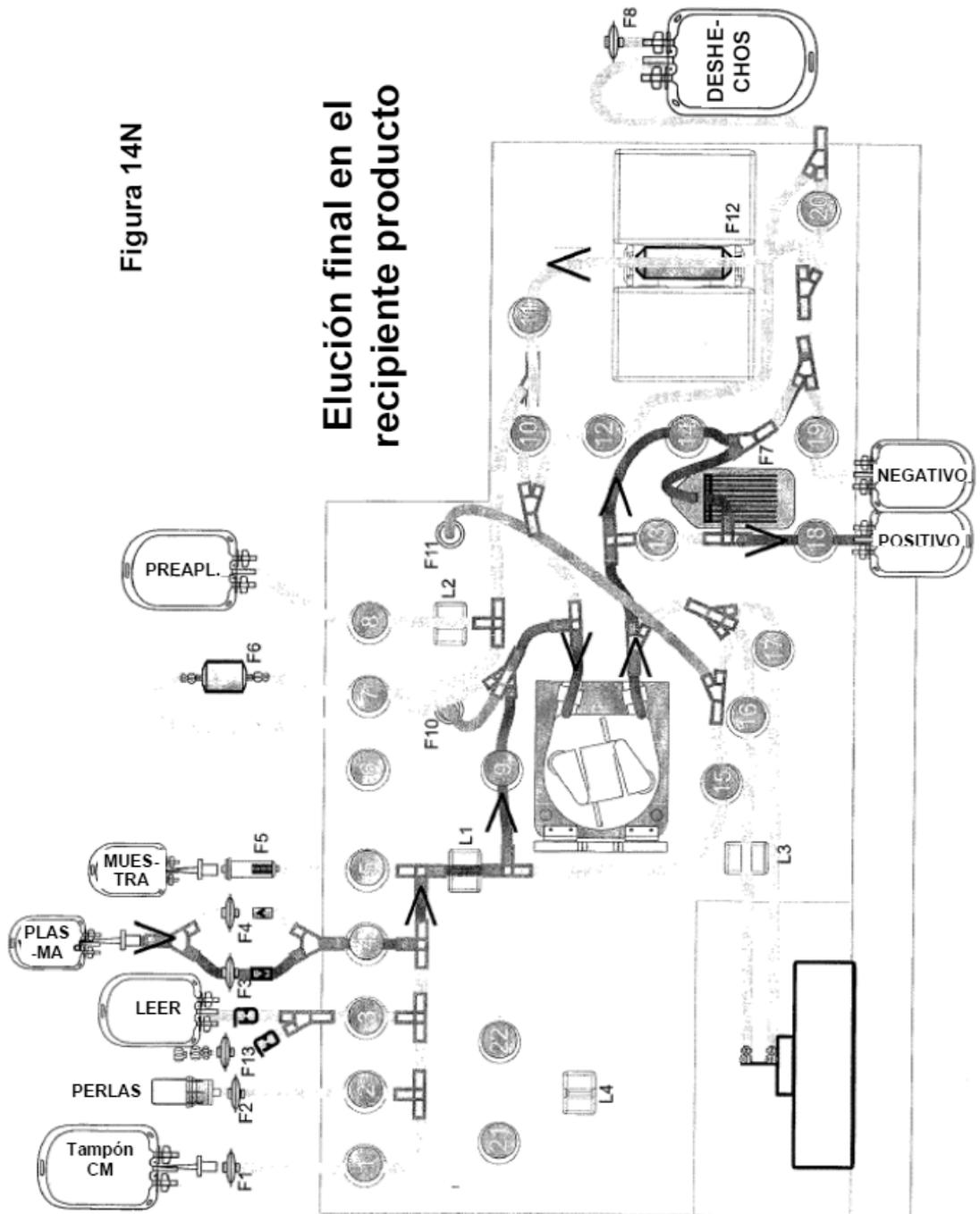


Figura 15

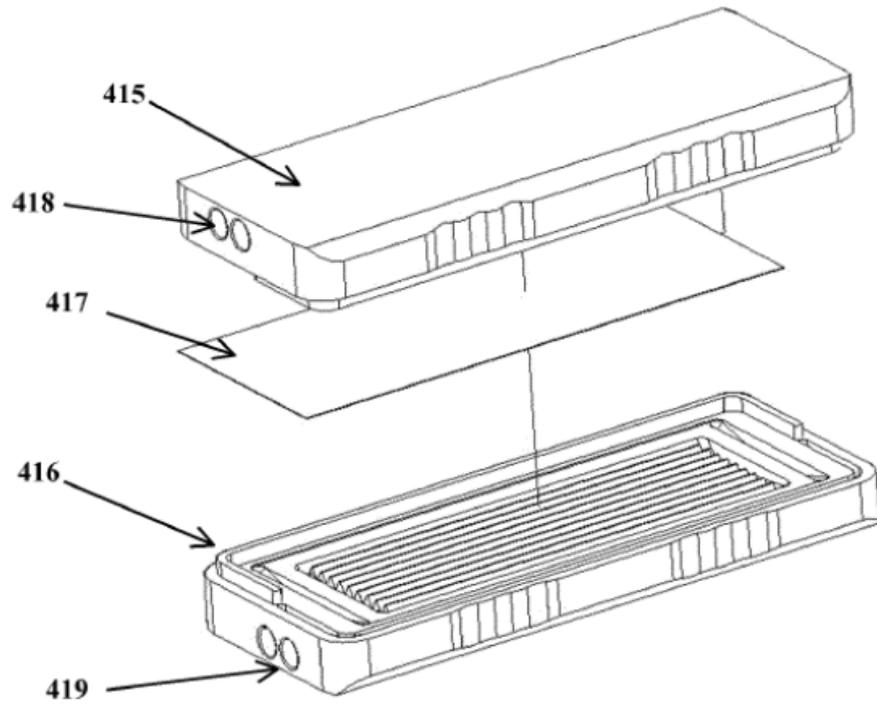


Figura 16A

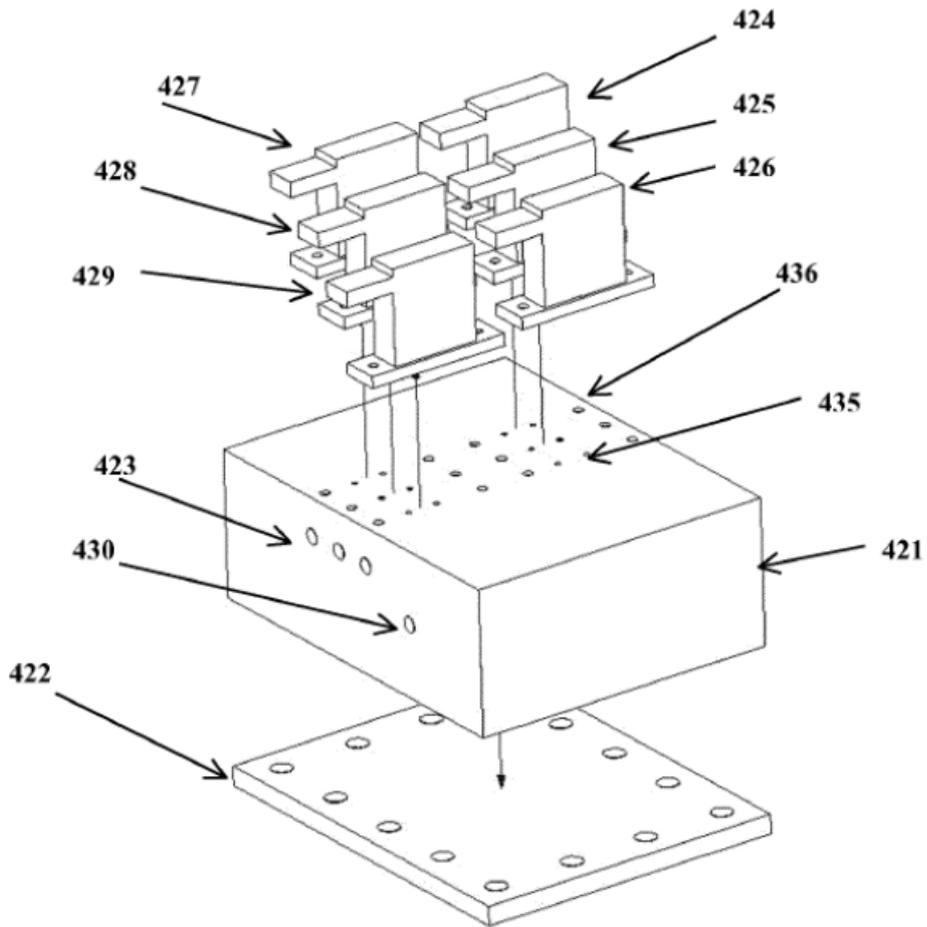


Figura 16B

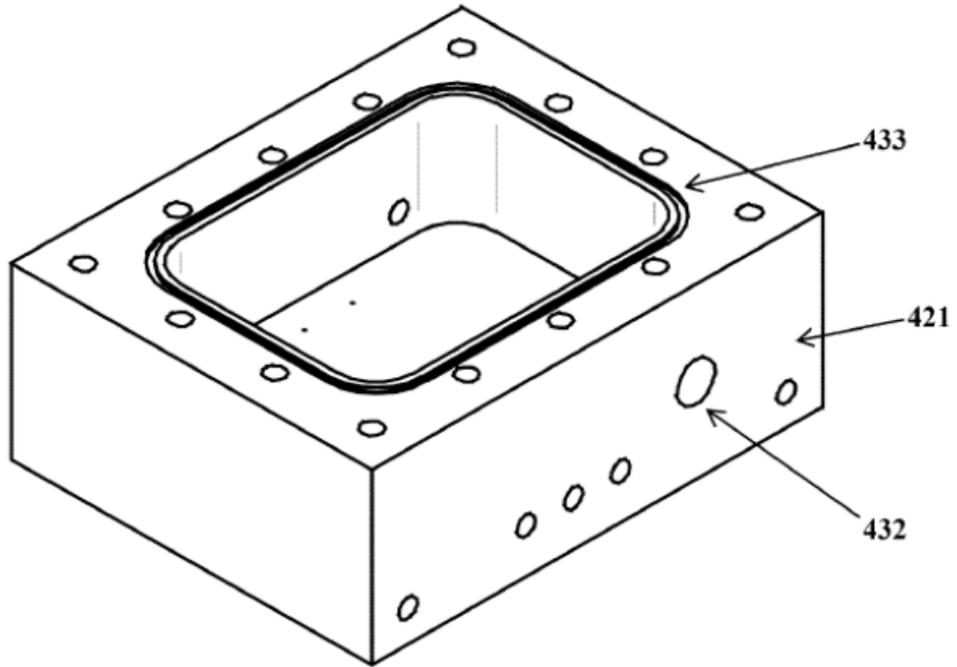
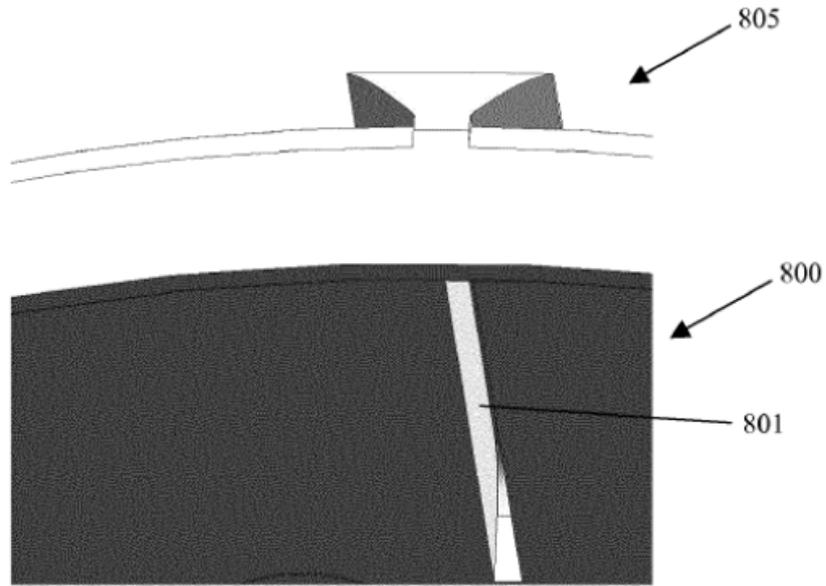


Figura 17



**Figura 18**

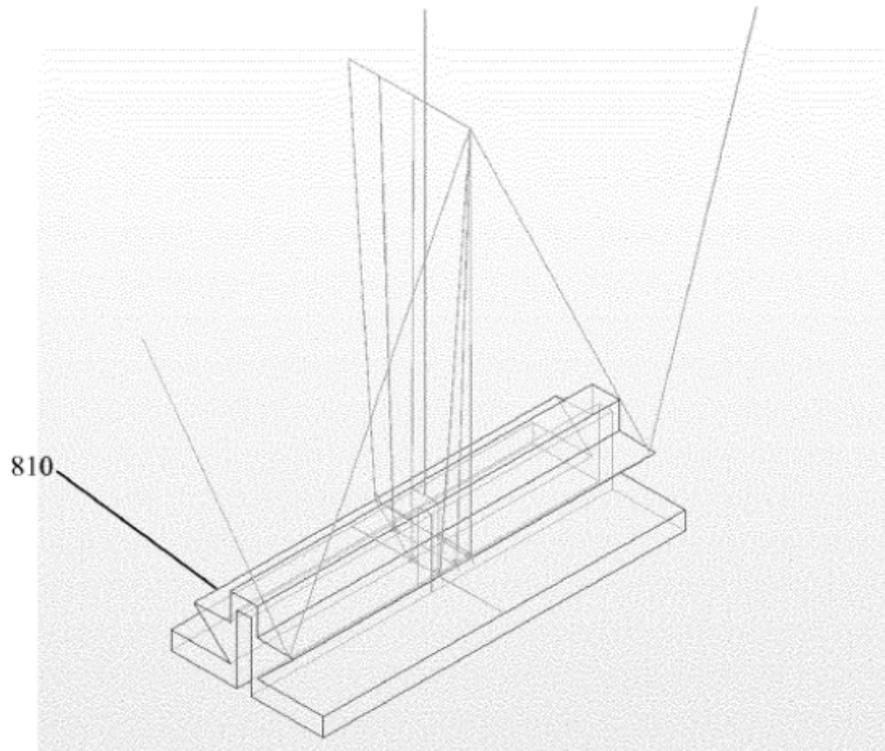


Figura 19

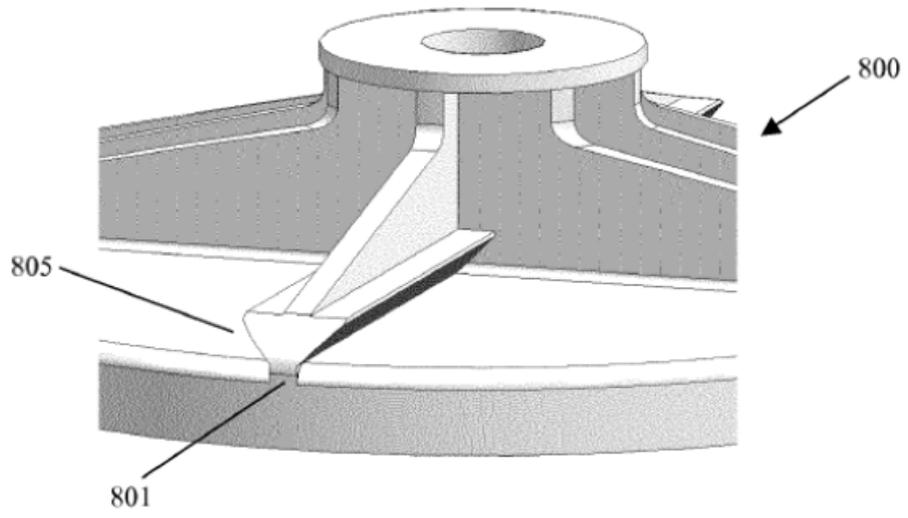


Figura 20

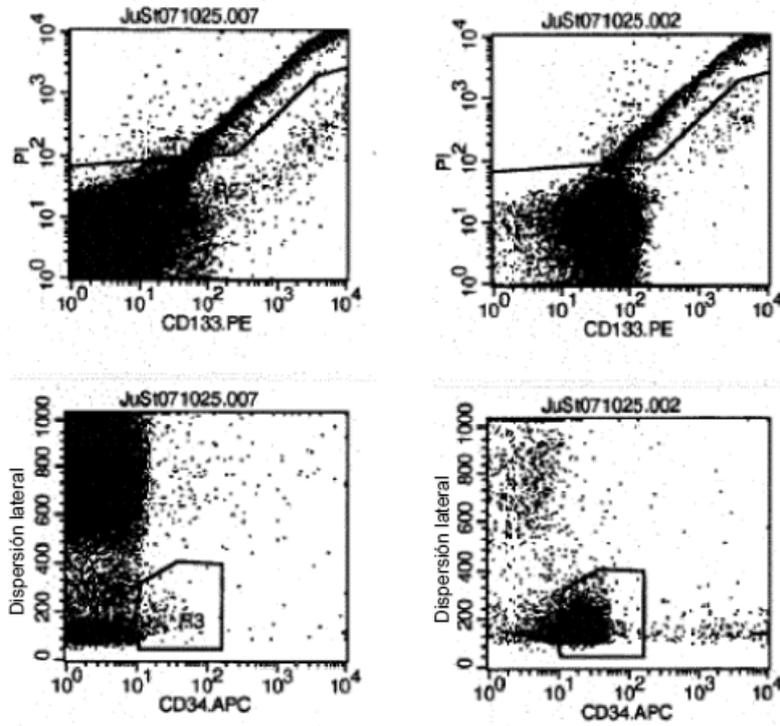


Figura 21

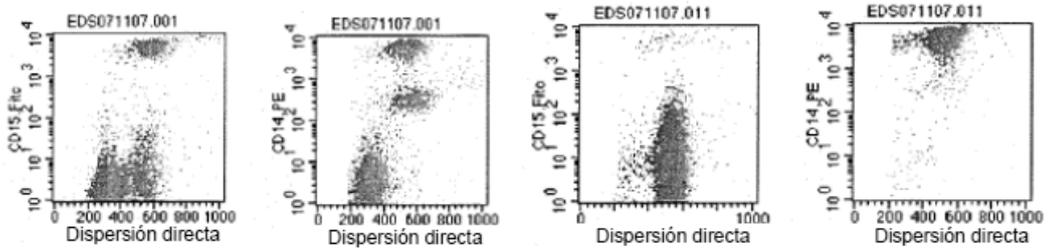


Figura 22

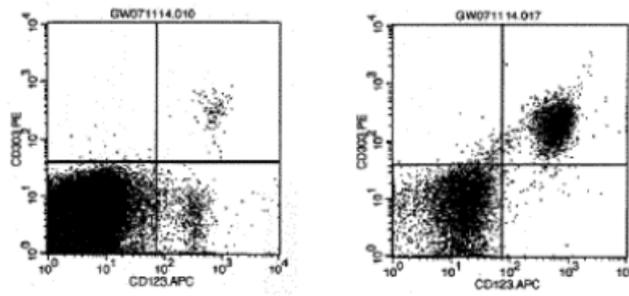


Figura 23

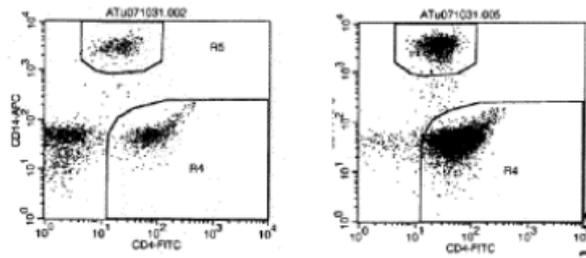


Figura 24

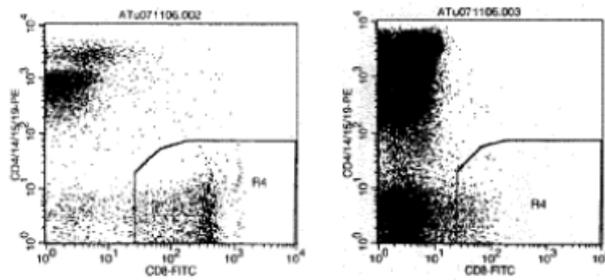


Figura 25

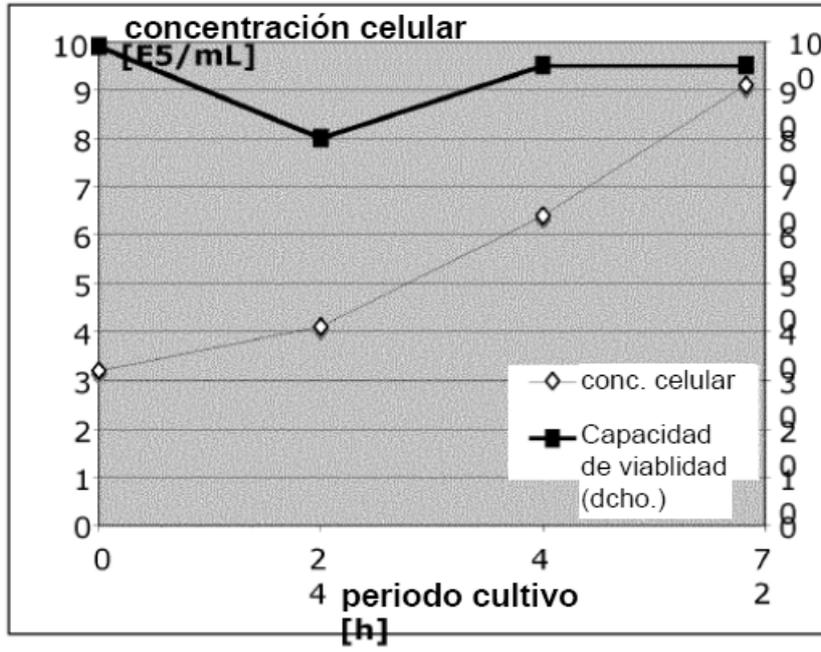


Figura 26

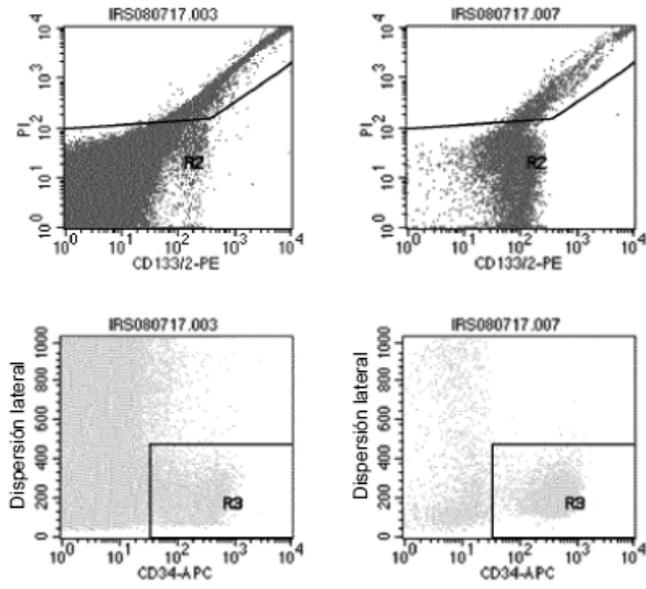


Figura 27

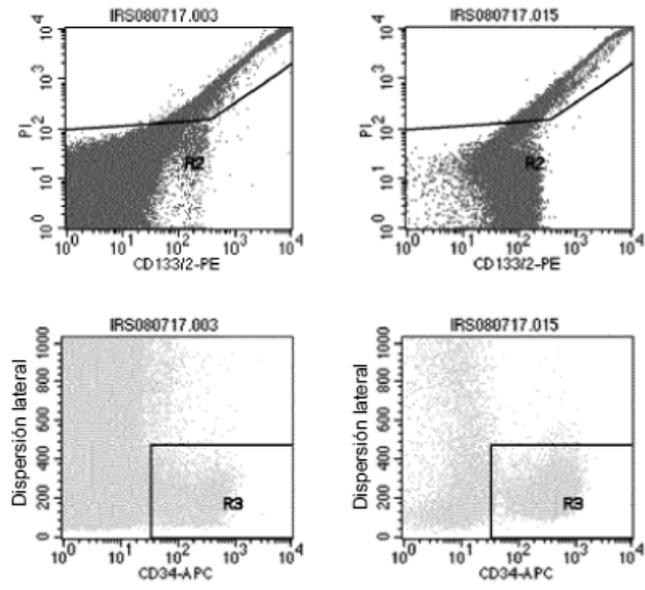


Figura 28

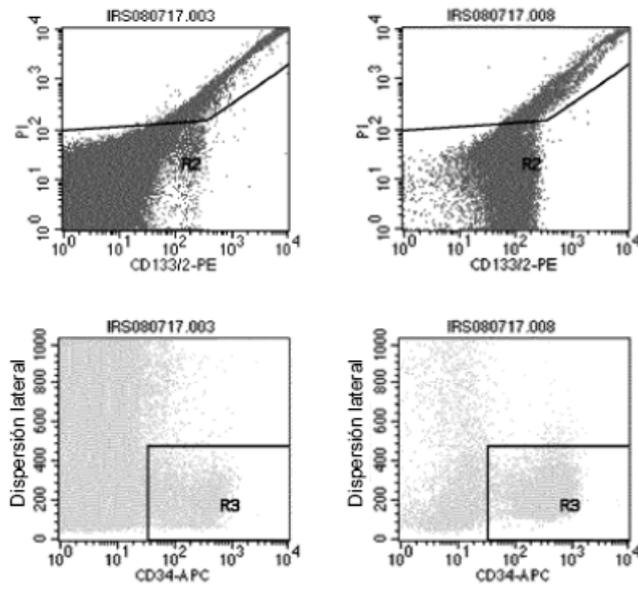


Figura 29

