

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 011 307**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2013 PCT/EP2013/053650**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13124474**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2013 E 13709791 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 2817625**

(54) Título: **Aislamiento cromatográfico de células y otros materiales biológicos complejos**

(30) Prioridad:

23.02.2012 US 201261602150 P

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

07.04.2025

(73) Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS GMBH (100.00%)
Grillparzerstrasse 10
81675 Munich, DE**

(72) Inventor/es:

STADLER, HERBERT

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 011 307 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

Aislamiento cromatográfico de células y otros materiales biológicos complejos

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/602.150 "Chromatographic Isolation Of Cells And Other Complex Biological Materials" presentada ante la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el 23 de febrero de 2012.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al aislamiento cromatográfico de una célula diana o de un material biológico diferente (complejo), en particular mediante cromatografía en columna, tal como cromatografía de afinidad o cromatografía de permeación en gel. La invención emplea un reactivo de unión a receptores que se une a una molécula receptora que está localizada en la superficie de una célula diana. El método divulgado en el presente documento también puede describirse como tecnología de cromatografía de afinidad celular (sin trazas) (CATCH). La invención en general proporciona métodos novedosos para el aislamiento sin trazas de materiales biológicos tales como células, orgánulos celulares, virus y similares. Se divulga, pero no se reivindica, un aparato para el aislamiento de células y otros materiales biológicos complejos.

15 **Antecedentes de la invención**

25 El aislamiento de poblaciones celulares puras y funcionales de un tipo celular deseado es un requisito previo en diversas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y biotecnológicas.

Bonnafous *et al.*, J. Immunol. Methods. 1983 Mar 11;58 (1-2):93-107 describen una cromatografía de afinidad celular con ligandos inmovilizados mediante enlaces mercurio-azufre escindibles, es decir, ligandos inmovilizados mediante enlaces covalentes. En este método, Bonnafous *et al.* conjugan el mersalilo organomercurial con perlas de trisacriilo que llevan grupos amino primarios. Según Bonnafous *et al.*, los ligandos tiolados pueden inmovilizarse covalentemente en esta matriz mediante enlaces Hg-S escindibles. Bonnafous *et al.* presentan dos estudios modelo de separación celular: (i) concanavalina A tiolada con N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato e inmovilizada sobre mersalil-trisacriilo; los timocitos de ratón unidos a Con A-mersalil-trisacriilo se eluyeron del soporte mediante un breve tratamiento con tiol que preservó la viabilidad celular; (ii) anticuerpos anti-dinitrofenilo modificados con anhídrido S-acetil-mercaptosuccínico e inmovilizados en mersalil-trisacriilo; eritrocitos de oveja, previamente marcados con ácido trinitrobenceno sulfónico, se unieron a este soporte y se recuperaron mediante tratamiento con tiol sin hemólisis.

En este contexto, cabe señalar que la cromatografía es una técnica bien establecida para la separación de moléculas de bajo y alto peso molecular, incluyendo proteínas. Esta técnica también se ha aplicado a la separación de células, 40 en particular en forma de cromatografía de afinidad utilizando ligandos inmovilizados específicos de un tipo celular deseado, tales como inmunoligandos. A modo de ejemplo, se han separado diferentes subconjuntos de linfocitos T marcándolos con inmunoglobulinas monoclonales y cargándolos en una columna con perlas de poliacrilamida, al la que se unió covalentemente IgG de conejo anti-ratón (Braun, R., *et al.*, Journal of Immunological Methods (1982) 54, 251-258). Como ejemplo adicional, se ha usado cromatografía en columna de afinidad con lectina, utilizando Sepharose 6MB conjugada covalentemente con aglutinina de Dolichos biflorus, para separar las células leucémicas de los leucocitos sanos (Ohba, H., *et al.*, Cancer Letters (2002) 184, 207-214).

Como las células suelen ser magnitudes mayores que las proteínas, apenas entran, a diferencia de las proteínas, los poros de las perlas de los sorbentes cromatográficos convencionales. El uso de sorbentes con poros grandes no supera significativamente este fenómeno de separación debido a las limitaciones difusionales. Por otra parte, la superficie dentro de los poros sólo accesible para las proteínas suele superar ampliamente la superficie accesible tanto para las proteínas como para las células. Por lo tanto, el uso de sorbentes de cromatografía convencionales para la inmovilización de ligandos de unión a proteínas u otros receptores para la generación de una matriz de afinidad para las células suele requerir el uso de un gran exceso de ligandos de unión a receptores que se desperdicia, ya que la mayoría de ellos se inmovilizan en poros o cavidades a los que las células no pueden acceder. Los reactivos de unión a receptores específicos suelen ser caros y difíciles de producir a las escalas deseadas, por lo que este aspecto es objeto de seria consideración. Por ello, se ha sugerido el uso de sorbentes monolíticos en forma de criogel como técnica alternativa en la cromatografía de afinidad de células (véase, por ejemplo, Dainiak, M.B., *et al.*, Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol. (2007), 106, 101-127). Sin embargo, los sorbentes monolíticos son escasos, de modo que un sorbente deseado puede no estar disponible comercialmente en forma de columna monolítica. Adicionalmente, en caso de cromatografía de afinidad, en general, sigue siendo necesario eliminar de estas células un compuesto competidor utilizado para eluir las células deseadas. Así pues, las ventajas potenciales de los sorbentes monolíticos en términos de viabilidad celular pueden verse anuladas por los procedimientos adicionales necesarios para eliminar el compuesto utilizado para eluir las células de la columna de cromatografía de afinidad.

65 Los métodos de aislamiento celular más importantes utilizados actualmente son la clasificación celular asistida por

imán (MACS) y la clasificación celular asistida por fluorescencia (FACS™). La clasificación celular por citometría de flujo, donde normalmente se usan fluoróforos, acoplados a anticuerpos, para marcar células, analiza las células individualmente. Las células se separan a gran velocidad bajo presiones muy elevadas utilizando un aparato de clasificación celular. La tecnología FACS™ permite aislar células definidas por un conjunto de marcadores en una sola etapa aplicando un conjunto correspondiente de anticuerpos con diferentes fluoróforos. Por tanto, el método es fiable, pero requiere mucho tiempo, dinero y trabajo. Especialmente para la selección de diversas poblaciones celulares, muy grandes, por ejemplo, los productos de aféresis que contienen 1×10^{10} células los tiempos de clasificación muy largos de los citómetros de flujo son inaceptables para un proceso de selección adecuado. Otro inconveniente de la FACS™ es que los citómetros de flujo complejos y propensos a interferencias difícilmente pueden adaptarse a un entorno GMP necesario para aislar productos celulares terapéuticos. Por otra parte, las presiones aplicadas durante el procedimiento de selección celular pueden comprometer la función de los efectores celulares.

El aislamiento de células asistido por imanes es un sistema ampliamente utilizado para la investigación y la aplicación terapéutica. Aunque el rendimiento y la pureza de las células aisladas son moderados en comparación con la tecnología FACS™, el procedimiento de selección es robusto y no requiere una automatización sofisticada. Los principales inconvenientes del aislamiento asistido por imán son los reactivos de tinción restantes, incluidas las perlas magnéticas, en las células aisladas, que pueden comprometer la función efectora de las poblaciones celulares aisladas. Además, no es posible realizar procesos de selección positiva en serie debido a que estos reactivos magnéticos permanecen en las células aisladas. Los procedimientos de selección positiva en serie son obligatorios para seleccionar poblaciones celulares definidas por un conjunto de marcadores. Sin dejar de utilizar un marcador magnético o fluorescente, un avance significativo en el aislamiento de células es la tecnología "Streptamer®" que, por ejemplo, se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO 02/054065 y en la Patente de EE.UU. 7.776.562 y en el que se utiliza un reactivo de unión a receptores que muestra una unión de baja afinidad a un receptor situado en una superficie celular para la tinción reversible y el aislamiento de células. A diferencia de la selección positiva única combinada con la selección negativa magnética que se utiliza actualmente (cuyo objetivo es eliminar todas las poblaciones celulares excepto la de interés), la selección positiva en serie que utiliza la tecnología Streptamer® con eliminación del reactivo de unión al receptor de baja afinidad después de cada selección genera poblaciones celulares de muy alta pureza y rendimiento.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método que supere los inconvenientes de la tecnología conocida para el aislamiento de células, por ejemplo, tecnología FACS™ y MACS como se ha descrito. Por ejemplo, la presente invención tiene por objetivo proporcionar un procedimiento de selección celular eficiente y suave que permite especialmente selecciones celulares positivas en serie para aislar poblaciones celulares complejas, tales como linfocitos T reguladores o linfocitos T de memoria centrales para fines de investigación, diagnósticos y, sobre todo, terapéuticos. Idealmente, este nuevo método también debería ser adecuado para el aislamiento de otros materiales biológicos complejos distintos de las células.

Este problema se resuelve con la materia objeto de las reivindicaciones independientes, entre otros, los métodos, usos y disposiciones tal como se cita en las reivindicaciones independientes.

ANITA SCHMITT ET AL, TRANSFUSION, vol. 51, no. 3, 6 de diciembre de 2010 (2010-12-06), páginas 591-599 describen la transferencia adoptiva y la reconstitución selectiva de linfocitos T CD8+ específicos de citomegalovirus seleccionados por estreptómeros que conducen a la eliminación del virus en pacientes tras un trasplante alogénico de células madre de sangre periférica.

TIM SCHROEDER, 30 de junio de 2010 (30-06-2010), páginas 28-37, describen la transferencia adaptativa de linfocitos T CD8+ específicos del citomegalovirus.

MILTENYI SET AL, CYTOMETRY, ALAN LISS, NUEVA YORK, EE. UU., (19900101), vol. 11, n.º 11, páginas 231 - 238 describen la separación de células magnéticas de alto gradiente con MACS.

KUMAR AS HOK ET AL, NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, Reino Unido, vol. 5, n.º 11, 1 de noviembre de 2010 (01-11-2010), páginas 1737-1747, describen la separación de células mediante cromatografía de afinidad basada en criogelos.

Qiagen (2007-04-01) proporciona un manual de purificación de proteínas marcadas con estreptococos para expresar, purificar y detectar proteínas portadoras de un marcador Strep-tag II o 6xHis.

Xinchao Wang ET AL, EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 38, no. 11, 1 de noviembre de 2010 (2010-11-01), páginas 1066-1073 describen la selección basada en estreptómeros de linfocitos T CDS+ específicas de WT1 para infusiones de linfocitos de donantes específicos.

El documento US 6 103 493 A (SKERRA ARNE ET AL) describe mutéinas de estreptavidina para el aislamiento, purificación y determinación de proteínas recombinantes.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

- 5 La invención proporciona un método para aislar una célula diana, en donde la célula diana tiene una molécula receptoría en la superficie de la célula diana, comprendiendo el método:
- proporcionar una muestra, comprendiendo la muestra la célula diana, en donde la célula diana es un linfocito T,
 - proporcionar un reactivo de unión a receptores que comprende un sitio de unión monovalente B y un compañero de unión C,
- 10 en donde el reactivo de unión al receptor es un fragmento de anticuerpo monovalente, en donde el sitio de unión monovalente B comprendido en el reactivo de unión al receptor es capaz de unirse específicamente a la molécula receptoría en la superficie de la célula diana,
- 15 en donde la constante de disociación (K_D) para la unión entre el reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptoría es de baja afinidad, en donde la interacción de baja afinidad entre el reactivo de unión al receptor y la molécula receptoría tiene una K_D en el intervalo de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-7} M, determinado por titulación de fluorescencia, diálisis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25°C),
- 20 o en donde la constante de velocidad de disociación (k_{off}) para la unión entre el reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptoría tiene un valor de aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o superior, determinado por titulación de fluorescencia, diálisis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25°C),
- 25 en donde el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión a receptor es capaz de unirse de forma reversible a un sitio de unión Z de un reactivo de afinidad,
- en donde el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión al receptor comprende uno de biotina, un análogo de biotina, un péptido de unión a estreptavidina y un péptido de unión a avidina, y
- en donde el reactivo de afinidad comprende estreptavidina, una muteína estreptavidina, avidina, una muteína avidina o una mezcla de las mismas,
- 30 - exponer la muestra a cromatografía en columna sobre una fase estacionaria adecuada, en donde la fase estacionaria es un material no magnético o no magnetizable, en donde la fase estacionaria tiene inmovilizado el reactivo de afinidad, en donde el reactivo de afinidad comprende dos o más sitios de unión Z, en donde dichos sitios de unión Z forman un enlace reversible con el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión al receptor, en donde la unión reversible entre el compañero de unión C del reactivo de unión al receptor y el sitio de unión Z del reactivo de afinidad tiene una K_D en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} a aproximadamente 10^{-13} M, determinado por titulación de fluorescencia, diálisis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25°C), y en donde el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor se une a una molécula receptoría de la superficie de la célula diana, inmovilizando así de forma reversible la célula diana en la fase estacionaria, en donde el reactivo de unión al receptor se inmoviliza en la fase estacionaria antes de aplicar la muestra que comprende la célula diana a la fase estacionaria;
- 35 - cargar en la fase estacionaria un reactivo de competición, en donde el agente de competición es capaz de interrumpir la unión del compañero de unión C del reactivo de unión al receptor al sitio de unión Z del reactivo de afinidad, desplazando así al agente de unión al receptor; y
- 40 - eluir las células diana de la matriz cromatográfica.
- 45 En algunas realizaciones, la muestra es o comprende un fluido, preferiblemente un fluido corporal, en donde el fluido corporal es preferentemente sangre o un componente sanguíneo.
- 50 En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fv o un Fv monocatenario (scFv).
- En algunas realizaciones, la unión entre el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor y la molécula receptoría tiene una velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior o aproximadamente $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior.
- 55 En algunas realizaciones, la unión entre el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor y la molécula receptoría tiene una velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior o aproximadamente $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior.
- 60 En algunas realizaciones, el compañero de unión C incluido en el reactivo de unión al receptor comprende un péptido de unión a estreptavidina Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys y el reactivo de afinidad comprende la muteína estreptavidina Val44-Thr45-Ala46-Arg47 o la muteína estreptavidina Ile44-Gly45-Ala46-Arg47.
- 65 En algunas realizaciones, la exposición de la muestra a la cromatografía en columna comprende permitir que la muestra pase a través de la fase estacionaria de la columna cromatográfica y lavar la fase estacionaria con una fase móvil fluida, en donde la fase móvil fluida está al menos esencialmente vacía del reactivo de unión al receptor.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La invención se comprenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considere conjuntamente con los ejemplos no limitativos y los dibujos adjuntos. Las figuras ilustran realizaciones de métodos de la invención. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, las figuras incluyen conclusiones sobre el mecanismo de separación subyacente. Las conclusiones se dan a título ilustrativo únicamente y sólo sirven para visualizar la sorprendente separación que puede conseguirse a nivel molecular.
- 10 La **figura 1** representa una realización de un método de aislamiento de una célula diana (2) que tiene una molécula receptora (4) en la superficie de la célula diana (lo que significa que la célula diana se define por la presencia de al menos una molécula receptora específica común (4)). La muestra que contiene la célula diana también puede contener células adicionales (22) que están desprovistas de la molécula receptora (4) pero que, en cambio, tienen moléculas receptoras diferentes (44) en su superficie. Se proporciona un reactivo de unión a receptores (1), por ejemplo en la muestra que contiene la célula diana. El reactivo de unión al receptor (1) tiene un sitio de unión B (3), que se une específicamente a la molécula receptora (4). El reactivo de unión a receptor (1) también incluye un compañero de unión C (5), que puede unirse específica y de forma reversible a un sitio de unión Z (6) de un reactivo de afinidad (8). En algunas realizaciones, el reactivo de unión al receptor puede tener un sitio de unión monovalente B y puede ser un fragmento de anticuerpo monovalente (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fv de cadena simple o un fragmento Fv) o una molécula de unión proteínica con funciones similares a las inmunoglobulinas, un aptámero o una molécula MHC. En este contexto, cabe señalar que el reactivo de afinidad utilizado en la presente invención también puede tener dos o más sitios de unión Z que pueden estar unidos por el compañero de unión C, proporcionando así una multimerización del reactivo de unión al receptor. Este reactivo de afinidad utilizado en el presente documento también puede ser un reactivo de multimerización. El reactivo de afinidad puede ser, por ejemplo, estreptavidina, una muteína estreptavidina, avidina, una avidina muteína o una mezcla de las mismas. Además, diferentes matrices cromatográficas acopladas a diferentes reactivos de afinidad pueden estratificarse en una columna formando un sistema multicomponente para la separación. La muestra, que incluye el reactivo de unión al receptor (1) y la célula diana (2) se pone en contacto con una matriz de cromatografía (19), sobre la que se inmoviliza el reactivo de afinidad (8). El reactivo de afinidad (8) tiene una pluralidad de sitios de unión Z (6), que se unen específicamente al compañero de unión C (5), que está comprendido en el reactivo de unión al receptor (1). El reactivo de unión a receptor (1) se une a través del compañero de unión C a un sitio de unión Z (6) en el reactivo de afinidad (8), inmovilizando así la célula diana (2) a través del complejo que se forma por los uno o más sitios de unión Z del reactivo de afinidad y el sitio de unión Z del reactivo de unión a receptor en la matriz de cromatografía (19). Como resultado, la muestra se vacía de la célula diana (2), separándose así la célula diana (2) de los demás componentes de la muestra, incluido el reactivo de unión al receptor (1). En este contexto, cabe señalar que el reactivo de unión al receptor (1) puede incluirse en la muestra que contiene la célula diana que se va a aislar, o bien el reactivo de unión al receptor (1) puede añadirse a la matriz cromatográfica (19) para que se una al reactivo de multimerización (8) inmovilizado en ella antes de añadir la muestra que contiene la célula diana (véase también la Sección Experimental a este respecto). Cuando un cartucho se llena con una matriz de cromatografía de afinidad de este tipo (19) y se utiliza para el aislamiento de una célula diana, mediante una cromatografía de afinidad, este cartucho también se denomina en el presente documento "cartucho de selección". A este respecto, cabe señalar que este método cromatográfico puede llevarse a cabo como cromatografía en columna o cromatografía plana.
- 45 La **Figura 2** representa otra realización de un método de aislamiento de una célula diana (2) con moléculas receptoras (4) en la superficie de la célula diana. El método ilustrado en la **Figura 1** puede llevarse a cabo solo o en combinación con el método ilustrado en la **Figura 2** (en este último caso, el método de la Figura 2 se lleva a cabo después del método representado en la Figura 1). Una muestra utilizada en el método de la **Figura 2** incluye la célula diana (2), un reactivo de unión al receptor (1) y un reactivo de competición (7). El reactivo de unión al receptor (1) tiene un sitio de unión B (3) que puede unirse específicamente a la molécula receptora (4). El reactivo de unión a receptor (1) también incluye un compañero de unión C (5) que puede unirse específicamente a un sitio de unión Z (6) en un reactivo de afinidad (8) (el reactivo de afinidad (8) puede ser idéntico al reactivo de afinidad/multimerización (8) mostrado en la **Figura 1**). El reactivo de afinidad (8) tiene una pluralidad de sitios de unión Z (6), que se unen específicamente al compañero de unión C (5), que está incluido en el reactivo de unión al receptor (1). Asimismo, el reactivo de competición (7) tiene un sitio de unión (9) que es capaz de unirse al sitio de unión (6) en el reactivo de afinidad (8). También puede darse el caso de que todo el reactivo de competición (7) forme el sitio de unión (9). Como ejemplo para el caso de que todo el reactivo de competición forme el sitio de unión (9), el reactivo de competición (7) puede ser biotina o un derivado de biotina que tenga afinidad por la estreptavidina o la muteína de estreptavidina, mientras que el compañero de unión C (5) del reactivo de unión a receptor (1) puede ser un péptido de unión a estreptavidina fusionado al reactivo de unión a receptor (1). Tanto el reactivo de competición (7) como el reactivo de unión al receptor (1) se unen a un sitio de unión (6) de la pluralidad de sitios de unión Z (6) que están incluidos en el reactivo de afinidad (8). De este modo, el reactivo de competición (7) y el reactivo de unión al receptor (1) se inmovilizan en la matriz cromatográfica (19). Como resultado, la muestra que contiene la célula de muestra se vacía del reactivo de competición (7) y del reactivo de unión al receptor (1). Dado que tanto el reactivo de competición (7) como el reactivo de unión al receptor (1) se unen al reactivo de afinidad que está comprendido en la matriz cromatográfica (19), la célula diana (2) no está unida a la matriz

5 cromatográfica y, por ejemplo, pasará a través de una columna en la que la matriz cromatográfica se utiliza como fase estacionaria. Cuando un cartucho se llena con una matriz de cromatografía de este tipo (19) y se utiliza para el agotamiento/eliminación de reactivos de una muestra que contiene (una población de) células diana, este cartucho también se denomina en el presente documento "cartucho de extracción". A este respecto, cabe señalar que este método cromatográfico puede llevarse a cabo como cromatografía en columna o cromatografía plana.

10 La **figura 3** muestra una realización de un método de separación/aislamiento de una célula diana que contiene un núcleo (2). Se proporciona una muestra que incluye la célula diana (2), y opcionalmente por ejemplo, un reactivo de unión al receptor (1) y un reactivo de competición (7). La muestra se carga en una columna cromatográfica, que incluye una matriz de filtración en gel (19) seleccionada entre una matriz que utiliza una matriz de cromatografía seleccionada entre el grupo que consiste en un gel de polisacáridos, un gel de poliacrilamida, un gel de agarosa, sílice injertada con polisacáridos, sílice injertada con polivinilpirrolidona, sílice injertada con óxido de polietileno, polí(2-hidroxietilaspartamida) sílice, sílice injertada con polí(N-isopropilacrilamida), un gel de estireno-divinilbenceno, un copolímero de un acrilato o una acrilamida y un diol, un copolímero de un polisacárido y N,N'-metilenbisacrilamida y una combinación de dos o más de ellos. Al dejar pasar la muestra a través de la matriz de filtración en gel (19), el reactivo de unión al receptor (1) y el reactivo de competición (7) permanecen más tiempo en la columna. Estos reactivos pueden, por ejemplo, entrar en los poros de la matriz de filtración en gel y la célula diana (2) eluye antes de la columna cromatográfica y puede recogerse para su uso posterior.

15 20 La **figura 4** representa otra realización de un método de aislamiento de una célula diana (2) que se define por la presencia de al menos una molécula receptora específica común (4) en la superficie de la célula diana. En este método se emplean una primera columna cromatográfica (un cartucho de selección) y una segunda columna cromatográfica (un cartucho de extracción). Se proporciona una muestra que incluye, entre otras, la célula diana (2) con moléculas receptoras (4) y otra célula (22) con diferentes moléculas receptoras (44) en su superficie. La muestra también incluye un reactivo de unión al receptor (1), que tiene un sitio de unión B (3) que se une específicamente a la molécula receptora (4). El reactivo de unión a receptor (1) también incluye un compañero de unión C (5) que se une específicamente a un sitio de unión Z (6) en un reactivo de afinidad (8). La muestra se carga en la primera columna cromatográfica, que tiene una fase estacionaria adecuada en forma de matriz de cromatografía de afinidad (29), en la que la matriz de cromatografía de afinidad (29) tiene inmovilizado el reactivo de afinidad (8). Se forma un complejo reversible no covalente entre una pluralidad del reactivo de unión al receptor (1), el reactivo de afinidad (multimerización) (8) y la célula diana (2), pero no la célula adicional (22). La célula adicional pasará a través de la primera columna cromatográfica espontáneamente o después de lavar la columna cromatográfica (el paso de lavado opcional no se muestra en la **Figura 4**). A continuación, se carga un reactivo de competición (7) en la columna cromatográfica. El reactivo de competición (7) tiene un sitio de unión (9) (o constituye un sitio de unión) que es capaz de unirse al sitio de unión Z (6) del reactivo de afinidad (8). Una pluralidad del reactivo de competición (7) está presente y una porción del mismo forma un complejo con el reactivo de afinidad (8), quedando así inmovilizado en la matriz cromatográfica (29). Como resultado de esta unión competitiva, se interrumpe la unión del compañero de unión C (5), incluido en el reactivo de unión al receptor (1), al sitio de unión Z. Haciéndolo así, el reactivo de unión al receptor se libera de la matriz cromatográfica (29) y, por tanto, también se desintegra el complejo reversible no covalente formado entre el reactivo de unión al receptor (1), el reactivo de afinidad (8) y la célula diana (2). Una muestra de elución de la fracción eluida de la primera columna cromatográfica, que incluye la célula diana (2), el reactivo de competición (7) y el reactivo de unión al receptor (1). La muestra de elución se carga en la segunda columna cromatográfica, que tiene una fase estacionaria adecuada que es a la vez una matriz de cromatografía de afinidad (19) y, al mismo tiempo, puede actuar como matriz de permeación del gel. La matriz de cromatografía de afinidad (19) tiene un reactivo de afinidad (8) inmovilizado en ella. El reactivo de afinidad (8) puede ser, por ejemplo, estreptavidina, una mutéína estreptavidina, avidina, una avidina mutéína o una mezcla de las mismas. El reactivo de unión al receptor (1) y el reactivo de competición (7) se unen a un sitio de unión Z (6) en el reactivo de afinidad (8), quedando así inmovilizados en la matriz cromatográfica (19). Como resultado, la muestra de elución que contiene las células diana aisladas se vacía del reactivo de unión al receptor (1) y del reactivo de competición (7). Las células diana, habiendo sido liberadas o cualquier reactivo, están ahora en condiciones de seguir utilizándose, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, clasificación FACS™ adicional) o para cualquier aplicación terapéutica basada en células.

55 60 La **figura 5** muestra los resultados de un experimento de enriquecimiento de linfocitos CD8+ a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Este experimento se realizó en dos columnas que contenían resina Sephadex-50 acoplada con Strep-tactin® como reactivo de afinidad y utilizando un fragmento Fab de unión a CD8 como reactivo de unión a receptor monovalente que llevaba un péptido de unión a estreptavidina como compañero de unión C. Los diagramas B-D muestran los resultados de un aislamiento según un método de la invención, mientras que los diagramas E-G muestran el resultado para un control negativo.

65 65 La **Figura 6a** y la **Figura 6b** son ambas dibujos esquemáticos de una realización de un aparato de la invención para el aislamiento de células utilizando al menos una disposición secuencial de un cartucho de selección y un cartucho de extracción. El aparato 10 de la **Figura 6a** contiene una bomba peristáltica 102 y diversas válvulas (por ejemplo, válvulas magnéticas) que controlan el flujo de las fases líquidas (tampón de muestra, tampón de lavado, eluyente) que se utilizan en el aislamiento cromatográfico de las células diana. La bomba peristáltica y las válvulas están controladas por un micróprocesador (no mostrado). Los depósitos y cartuchos individuales del aparato 10

están conectados fluidamente entre sí a través de los tubos 400. El aparato 10 contiene un depósito tampón 114 que está conectado de forma fluida a través de una entrada de muestra, como un tubo 400, a un depósito de muestra 116 que contiene una muestra (por ejemplo, sangre u otras células corporales) que incluye células diana que se van a purificar. La muestra celular contenida en un tampón adecuado se aplica entonces al primer cartucho de selección 104 que contiene una fase estacionaria adecuada como se explica en la Figura 3 en forma de una matriz de cromatografía de afinidad con un reactivo de afinidad inmovilizado en ella. En el cartucho de selección, las células diana portadoras de un primer tipo de molécula receptora común específica se inmovilizan mediante un reactivo de unión al receptor que une específicamente el primer tipo de moléculas receptoras. Las células que no transportan el primer tipo de molécula receptora fluyen a través de la columna y se desechan a través de un depósito de residuos 112. A continuación, se aplica sobre la columna un eluyente (un agente de competición como se explica en el presente documento) almacenado en un depósito 110 de tampón de elución, provocando la ruptura del enlace reversible formado entre el reactivo de afinidad y el reactivo de unión al receptor y, por tanto, también la elución de las células diana. A continuación, la fracción eluida que contiene las células diana se aplica a un cartucho de extracción 106 que contiene, como se explica en la Figura 3, una segunda fase estacionaria en la que está presente un reactivo de afinidad. Mientras que el reactivo de afinidad captura/inmoviliza el reactivo de unión al receptor y el reactivo de competición, las células diana purificadas pasan a través de esta columna y se dirigen a una segunda disposición de un cartucho de selección 204 y un cartucho de extracción 206. Las células diana se purifican en esta segunda disposición mediante un segundo tipo de molécula receptora específica común, como se ha explicado anteriormente, con células que no portan el segundo tipo de molécula receptora en su superficie que fluyen a través del cartucho de selección y se desechan a través de un segundo depósito de residuos 212. En la **Figura 6a** el depósito de tampón de elución 110 que está conectado de forma fluida al cartucho de selección 204 de la segunda disposición secuencial de cartucho de selección y cartucho de extracción, se representa como un depósito adicional al conectado al cartucho de selección 104. Sin embargo, en caso de que se utilice el mismo reactivo de competición, el aparato 10 puede comprender un único depósito de tampón de elución que está conectado de forma fluida al cartucho de selección de cada una de la pluralidad de "disposiciones de cartuchos". Por último, el cartucho de extracción 206 está conectado de forma fluida a una salida de muestra 214 para la recogida de las células diana aisladas. El aparato de la **Figura 6b** tiene un diseño similar con tres "disposiciones de cartuchos" conectados en serie, cada uno de los cuales consta de un cartucho de selección y un cartucho de extracción. El aparato de la Figura 6b también incluye un elemento de control de temperatura para mantener una temperatura constante, tal como 4 °C, 15 °C o 25 °C.

Las **figuras 7a a 7c** muestran los resultados de otro experimento para enriquecer linfocitos CD8+ humanos a partir de linfocitos CD8+ de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mostrando la **Figura 7a** la muestra inicial de las PBMC, mostrando la **Figura 7b** la fracción de lavado de linfocitos CD8+ negativos y mostrando la Figura 7c que muestra la fracción eluida de linfocitos CD8+ positivos.

Las **Figuras 8a a 8c** muestran los resultados de un experimento de enriquecimiento de linfocitos CD8+ humanos a partir de sangre total, mostrando la **Figura 8a** la muestra de sangre total inicial, mostrando la **Figura 8b** la fracción de lavado de linfocitos CD8+ negativos y mostrando la Figura 8c que muestra la fracción eluida de linfocitos CD8+ positivos.

Las **Figuras 9a a 9c** muestran los resultados de un experimento de enriquecimiento de linfocitos CD4+ murinos a partir de esplenocitos, mostrando la **Figura 9a** la muestra inicial de los esplenocitos, mostrando la **Figura 9b** la fracción de lavado de linfocitos CD4+ negativos y mostrando la Figura 9c que muestra la fracción eluida de linfocitos CD4+ positivos.

Las **Figuras 10a a 10c** muestran los resultados de un experimento de enriquecimiento de linfocitos CD4+ humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mostrando la **Figura 10a** la muestra inicial de las PBMC, mostrando la **Figura 10b** la fracción de lavado de linfocitos CD4+ negativos y mostrando la Figura 10c que muestra la fracción eluida de linfocitos CD4+ positivos.

Las **figuras 11a a 11c** muestran los resultados de un experimento de enriquecimiento de linfocitos CD4+ humanos de sangre total, mostrando la **Figura 11a** la muestra de sangre total inicial, mostrando la **Figura 11b** la fracción de lavado de linfocitos CD4+ negativos y mostrando la Figura 11c que muestra la fracción eluida de linfocitos CD4+ positivos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para realizar una separación cromatográfica de fluidos de células y otras entidades biológicas tales como orgánulos celulares, virus, liposomas y similares (la referencia a las células diana a continuación incluye también una referencia a todas las demás entidades biológicas). Una célula diana o una población de células diana se aísla a partir de una muestra que, por ejemplo, puede incluir diversas células o poblaciones celulares diferentes. Prácticamente cualquier célula diana que tenga al menos una molécula receptora común en su superficie puede separarse de otros componentes contenidos en una muestra. Para conseguir un efecto de avidez, como se analiza a continuación, para la cromatografía de afinidad como se describe en el presente documento, la molécula receptora suele estar presente en dos o más copias en la superficie de la célula diana. El término "célula

(diana)", tal como se utiliza en el presente documento, engloba todas las entidades/vesículas biológicas en las que una membrana (que también puede ser una bicapa lipídica) separa el interior del entorno exterior (ambiente) y que comprenden uno o más tipos de molécula(s) receptora(s) específica(s) en la superficie de la entidad/vesícula biológica. Esto significa que la célula/entidad biológica/vesícula diana o la población de células diana se define por la presencia de al menos una molécula receptora específica común en la superficie. "Aislamiento", tal como se utiliza en el presente documento, significa que la célula diana se enriquece en una muestra que se obtiene como resultado de un método de la invención en comparación con el contenido (concentración) de la muestra que era para el aislamiento de la célula diana. Esto significa que la célula diana puede estar enriquecida en una muestra, por ejemplo, desde un contenido de aproximadamente el 0,1 % de la cantidad total de células de una muestra hasta aproximadamente el 10 % o más o el 5 20 % o más, el 30 % o más, el 40 % o más, en una muestra recogida de un método de la invención. "Aislada" también significa que la muestra obtenida contiene la célula diana como esencialmente único tipo de célula (población celular), por ejemplo, las células diana representan más del 75 % o más del 80 % o más del 85 % o más del 90 % o más del 10 15 95 % o más del 97 % o más del 99 % de las células presentes en una muestra. "Aislado" también incluye que una muestra que contiene la célula diana está desprovista de reactivos (por ejemplo, reactivos de unión a receptores o reactivos de competición como se definen en el presente documento) después de haber sido sometida a un método de aislamiento/purificación de la invención. El término "aislamiento" también incluye la detección de la presencia o no de células diana en una muestra. En consecuencia, el aislamiento de células diana de puede utilizarse con fines analíticos o preparatorios (por ejemplo, para detectar la presencia de una población de células diana, pero también para cuantificar las células presentes en una muestra o para aislar células a gran escala para una terapia basada en 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 células). Los fines analíticos incluyen aplicaciones de diagnóstico, así como aplicaciones en investigación básica en las que, por ejemplo, un método de aislamiento de la invención se utiliza con fines de cribado, por ejemplo, si una determinada molécula receptora, por ejemplo, un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o cualquier otro receptor fisiológicamente relevante (por ejemplo, el receptor de insulina) se expresa de forma recombinante en una célula huésped elegida (véase también más adelante).

En el método reivindicado, la célula diana es un linfocito T. Los linfocitos T incluyen un linfocito T CD8+ específico del CMV, un linfocito T citotóxico a, un linfocito T de memoria (un ejemplo ilustrativo de linfocitos T de memoria son las linfocitos T de memoria centrales específicos CD62L⁺CD8⁺) o un linfocito T regulador (un ejemplo ilustrativo de linfocitos Treg son los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺), un linfocito T colaborador, por ejemplo, un linfocito T colaborador CD4⁺, por mencionar sólo algunos ejemplos ilustrativos.

El hecho de que la población celular diana o, como se ha mencionado anteriormente, cualquier otra población de una entidad biológica en la que una membrana (que también puede ser una bicapa lipídica) separa el interior del entorno exterior y que se caracteriza además por comprender una molécula receptora específica común en la superficie pueda purificarse mediante los métodos de la invención bajo eliminación posterior de cualquier reactivo de purificación utilizado (reactivo de unión al receptor; reactivo de competición, reactivo de afinidad/multimerización) ofrece, más allá de la ventaja que, si el objetivo es una célula o un órgano, no se altera el estado fisiológico, la ventaja reglamentaria de que los reactivos de purificación no se administran al paciente durante el uso de dichas entidades biológicas purificadas como medicamentos. En dichos casos, las autoridades reguladoras como la FDA (EE.UU.) o la EMEA (Europa) exigen restricciones menos costosas con respecto a los procesos de producción de dichos reactivos de purificación que en los casos en que el reactivo de purificación se administra junto con el medicamento que es una célula o un liposoma. Por lo tanto, también existe una clara ventaja técnica con respecto a los métodos de la invención para la purificación de entidades cuyo estado fisiológico no puede manipularse, como en el caso de los liposomas, por ejemplo, si dichos liposomas deben purificarse y se utilizan como medicamentos.

Los linfocitos T pueden ser células de mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, una rata, un ratón, un conejo, una cobaya, una ardilla, un hámster, un erizo, un gato, un ornitorrinco, una pika americana, un armadillo, un perro, un lémur, una cabra, un cerdo, una zorrigüeya, un caballo, un elefante, un murciélagos, una marmota, un orangután, un mono rhesus, un mono lanudo, un macaco, un chimpancé, un tamarino (*Saguinus oedipus*), un tití y un ser humano. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre.

Una muestra de la que se va a aislar la célula diana puede ser de cualquier origen. Puede, por ejemplo, pero sin limitación, proceder de seres humanos o animales. En consecuencia, cualquiera de las siguientes muestras seleccionadas entre, pero sin limitación, el grupo formado por una muestra de sangre (incluida la sangre entera), una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina, una muestra de heces, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de lavado nasofaringeo, una muestra de esputo, una muestra de exudado bucal, una muestra de exudado faríngeo, una muestra de exudado nasal, una muestra de lavado broncoalveolar, una muestra de secreción bronquial, una muestra de leche, una muestra de líquido amniótico, una muestra de biopsia, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejido, una muestra celular, una muestra de cultivo celular, una muestra de lisado celular, una muestra de cultivo de virus, una muestra de uñas, una muestra de pelo, una muestra de piel, una muestra forense, una muestra de infección, una muestra de infección nosocomial, una muestra espacial o cualquier combinación de ellas. Cuando se deseé, una muestra respectiva puede haber sido preprocesada en cualquier grado. Como un ejemplo ilustrativo, una muestra de tejido puede haber sido digerida, homogeneizada o centrifugada antes de ser utilizada en un método según la presente invención. En otro ejemplo ilustrativo, una muestra de un fluido corporal como la sangre podría obtenerse mediante el aislamiento estándar de las células sanguíneas. Si un método de aislamiento descrito en el presente documento se

utiliza en investigación básica, la muestra podrían ser células de experimentos de cultivo celular *in vitro*. La muestra se habrá preparado normalmente en forma de fluido, tal como una solución o una dispersión.

Generalmente, un método cromatográfico según la invención es una cromatografía de fluidos, normalmente una cromatografía de líquidos. La cromatografía puede realizarse en un modo de flujo continuo en el que se aplica una muestra de fluido que contiene las células que han de aislarse, por ejemplo, por flujo gravitatorio o mediante una bomba en un extremo de una columna que contiene la matriz cromatográfica y en la que la muestra de fluido sale de la columna por el otro extremo de la misma (véanse también los Ejemplos 1 a 7 a este respecto). Además, la cromatografía puede realizarse en modo "arriba y abajo" en el que se aplica una muestra de fluido que contiene las células que han de aislarse, por ejemplo, mediante una pipeta en un extremo de una columna que contiene la matriz cromatográfica empaquetada dentro de una punta de pipeta y en la que la muestra de fluido entra y sale de la matriz cromatográfica/punta de pipeta en el otro extremo de la columna (véanse los Ejemplos 8 a 10 a este respecto). Como alternativa, la cromatografía también puede realizarse en un modo discontinuo, en el que el material cromatográfico (fase estacionaria) se incuba con la muestra que contiene las células, por ejemplo, con agitación, rotación o contacto repetido y extracción de la muestra de fluido, por ejemplo, por medio de una pipeta. Cualquier material puede emplearse como matriz cromatográfica en el contexto de la invención, siempre que el material sea adecuado para el aislamiento cromatográfico de células y la matriz (fase estacionaria) sea un material no magnético o no magnetizable. Un material cromatográfico adecuado es, como mínimo, esencialmente inocuo, es decir, no perjudicial para la viabilidad celular (o la viabilidad o estabilidad de la entidad biológica), cuando se utiliza en una columna de cromatografía empaquetada en las condiciones deseadas para el aislamiento y/o la separación celular. Una matriz de cromatografía como la utilizada en la presente invención permanece en un lugar predefinido, normalmente en una posición predefinida, considerando la localización de la muestra a separar y de los componentes incluidos en ella, se están alterando. Por lo tanto, la matriz cromatográfica es una "fase estacionaria", de acuerdo con la comprensión habitual del experto en la materia de que la fase estacionaria es la parte de un sistema cromatográfico a través de la cual fluye la fase móvil (ya sea por flujo o en modo discontinuo) y en la que se produce la distribución de los componentes contenidos en la fase líquida (disueltos o dispersos) entre las fases. Las expresiones "matriz cromatográfica" y "fase estacionaria" se utilizan en el presente documento indistintamente. En este sentido, se observa que partículas tales como perlas magnéticas de movimiento libre que se añaden a una muestra líquida, mezclados con la muestra y, a continuación, se extraen de la muestra, por ejemplo, desechar el sobrenadante (líquido) mientras se mantienen las perlas temporalmente en su lugar (por ejemplo, mediante un imán externo o por centrifugación) no son una fase estacionaria tal como se utiliza en el presente documento. Por lo tanto, un método en el que dichas perlas (magnéticas) se añaden a una muestra que contiene las células diana para inmovilizarlas (mediante un complejo formado entre las células diana, el reactivo de unión al receptor y el reactivo de afinidad/multimerización) en dichas perlas, y las perlas se separan entonces de la muestra, por ejemplo, sujetando temporalmente las perlas, desechar el sobrenadante, no es un método de la invención.

Normalmente, la matriz cromatográfica respectiva tiene la forma de una fase sólida o semisólida, mientras que la muestra que contiene la célula diana a aislar/separar es una fase fluida. La fase móvil utilizada para lograr la separación cromatográfica es igualmente una fase fluida. La matriz cromatográfica puede ser un material particulado (de cualquier tamaño y forma adecuados) o un material cromatográfico monolítico, incluido un sustrato de papel o una membrana (véase la sección de ejemplos). Por lo tanto, la cromatografía puede ser tanto cromatografía en columna como cromatografía plana. Además de las columnas cromatográficas estándar, se pueden usar columnas que permiten un flujo bidireccional como las columnas PhyTip® disponibles en PhyNexus, Inc. San José, CA, U.S.A. o puntas de pipeta pueden utilizarse para la separación cromatográfica de células basada en el modo columna/flujo a través, tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, las puntas de pipeta o las columnas que permiten un flujo bidireccional también se engloban en la expresión "columnas de cromatografía" utilizada en el presente documento. Si se utiliza un material de matriz particulada, el material de la matriz de partículas puede, por ejemplo, tener un tamaño medio de partícula de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 200 µm, o de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 400 µm, o de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 600 µm. Como se explica detalladamente a continuación, la matriz cromatográfica puede, por ejemplo, ser o incluir una resina polimérica o un óxido metálico o un óxido metaloide. Si se utiliza cromatografía plana, el material de la matriz puede ser cualquier material adecuado para la cromatografía plana, tal como las membranas convencionales a base de celulosa o de polímeros orgánicos (por ejemplo, una membrana de papel, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)) o placas de vidrio recubiertas de sílice. En la presente invención, la matriz cromatográfica/fase estacionaria es un material no magnético o no magnetizable.

Las fases estacionarias cromatográficas no magnéticas o no magnetizables que se utilizan en la técnica y que también son adecuadas para la presente invención, incluyen sílice derivatizada o un gel reticulado. Un gel reticulado (que suele fabricarse en forma de perlas) puede basarse en un polímero natural, es decir, en una clase de polímero que se da en la naturaleza. Por ejemplo, un polímero natural en el que se basa una fase estacionaria de cromatografía es un polisacárido. Un polisacárido respectivo está generalmente reticulado. Un ejemplo de matriz de polisacáridos es un gel de agarosa (por ejemplo, Superflow™ agarosa o un material Sepharose® como Superflow™ Sepharose® que están disponibles comercialmente en diferentes tamaños de perlas y poros) o un gel de dextrano(s) reticulado(s). Otro ejemplo ilustrativo es una matriz de agarosa reticulada en partículas, a la que está unido covalentemente el dextrano, que está disponible comercialmente (en varios tamaños de perlas y con varios tamaños de poro) como Sephadex® o Superdex®, ambos disponibles en GE Healthcare. Otro ejemplo ilustrativo de dicho material de cromatografía es

Sephacyrl®, que también está disponible en diferentes tamaños de perlas y poros en GE Healthcare.

Un gel reticulado también puede basarse en un polímero sintético, es decir, en una clase de polímero que no se da en la naturaleza. Por lo general, dicho polímero sintético en el que se basa una fase estacionaria de cromatografía para la separación celular es un polímero que tiene unidades monoméricas polares y que, por lo tanto, es en sí mismo polar. Dicho polímero polar es hidrofílico. Las moléculas hidrofílicas ("amantes del agua"), también denominadas lipofóbicas ("que odian la grasa"), contienen fracciones que pueden formar interacciones dipolo-dipolo con moléculas de agua. Las moléculas hidrofóbicas ("que odian el agua"), también denominadas lipofílicas, tienen tendencia a separarse del agua.

Ejemplos ilustrativos de polímeros sintéticos adecuados son la(s) poliacrilamida(s), un gel de estireno-divinilbenceno y un copolímero de un acrilato y un diol o de una acrilamida y un diol. Un ejemplo ilustrativo es un gel de polimetacrilato, disponible comercialmente como Fractogel®. Otro ejemplo es un copolímero de etilenglicol y metacrilato, disponible comercialmente como Toyopearl®. En algunas realizaciones, una fase estacionaria de cromatografía también puede incluir componentes poliméricos naturales y sintéticos, tal como una matriz compuesta o un compuesto o un copolímero de un polisacárido y agarosa, por ejemplo, un compuesto de poliacrilamida/agarosa, o de un polisacárido y N,N'-metilenbisacrilamida. Un ejemplo ilustrativo de un copolímero de un dextrano y N,N'-metilenbisacrilamida es el material de la serie Sephacyrl® antes mencionado. Una sílice derivatizada puede incluir partículas de sílice acopladas a un polímero sintético o natural. Los ejemplos de dichas realizaciones incluyen, pero sin limitación, sílice injertada con polisacáridos, sílice injertada con polivinilpirrolidona, sílice injertada con óxido de polietileno, sílice de poli(2-hidroxietilaspartamida) y sílice injertada de poli(N-isopropilacrilamida).

Una matriz de cromatografía empleada en la presente invención es, en algunas realizaciones, una matriz de filtración en gel (también conocida como matriz de exclusión por tamaño), por ejemplo, cuando se utiliza en un cartucho de extracción como el descrito en el presente documento. Una filtración en gel se puede caracterizar por la propiedad para la que está diseñada, al menos en esencia, sin interacción con las células a separar. Por tanto, una matriz de filtración en gel permite la separación de células u otras entidades biológicas, tal como se definen en el presente documento, en gran medida en función de su tamaño. Una matriz de cromatografía respectiva es típicamente un material poroso en partículas como el mencionado anteriormente. La matriz cromatográfica puede tener un cierto límite de exclusión, que suele definirse en términos de un peso molecular por encima del cual las moléculas quedan totalmente excluidas de entrar en los poros. El peso molecular respectivo que define el límite de exclusión por tamaño puede seleccionarse para que sea inferior al peso correspondiente al peso de una célula diana (o entidad biológica) que vaya a aislarse. En una realización de este tipo, se impide que la célula diana penetre en los poros de la matriz cromatográfica de exclusión por tamaño. De manera análoga, una fase estacionaria que es una matriz de cromatografía de afinidad puede tener poros de un tamaño inferior al tamaño de una célula diana elegida. En realizaciones ilustrativas, la matriz de cromatografía de afinidad y/o la matriz de filtración en gel tienen un tamaño de poro medio de 0 a 500 nm aproximadamente.

Otros componentes presentes en una muestra, como las moléculas de unión a receptores o un reactivo de competición, pueden tener un tamaño inferior al límite de exclusión de los poros y esto puede entrar en los poros de la matriz de cromatografía de exclusión por tamaño. De tales componentes que son capaces de entrar parcial o totalmente en el volumen de los poros, las moléculas más grandes, con menor acceso al volumen de poros eluirán normalmente primero, mientras que las moléculas más pequeñas eluyen en último lugar. En algunas realizaciones, el límite de exclusión de la matriz de cromatografía de exclusión por tamaño se selecciona para que sea inferior a la anchura máxima de la célula diana. Por tanto, los componentes que tienen acceso al volumen de poros normalmente permanecerán más tiempo en/sobre la matriz de cromatografía de exclusión por tamaño que la célula diana. Por lo tanto, las células diana pueden recogerse en la fracción eluida de una columna cromatográfica separadas de otras materias/componentes de una muestra. Por tanto, los componentes, tales como un reactivo de unión a receptores, o cuando sea aplicable, un reactivo de competición, eluyen en un momento posterior de una matriz de filtración en gel que la célula diana. Este efecto de separación aumentará aún más, si la matriz de permeación en gel comprende un reactivo de afinidad (normalmente unido covalentemente al mismo) que comprende sitios de unión, por ejemplo, sitios de unión Z que son capaces de unir reactivos tales como un reactivo de unión a receptor y/o un reactivo de competición presente en una muestra. El reactivo de unión al receptor y/o el reactivo de competición se unirán a los sitios de unión Z del reactivo de afinidad y, por tanto, se inmovilizarán en la matriz de permeación en gel. Este método se lleva a cabo normalmente en un cartucho de extracción como el utilizado en la presente invención y en algunas realizaciones un método según la invención incluye y/o emplea una matriz de filtración de gel de este tipo. En un método respectivo, las células se separan en función de su tamaño.

En la presente invención, una matriz de cromatografía está desprovista de cualquier materia atraible magnéticamente. En algunas realizaciones de un método de aislamiento de una célula diana, se emplea una matriz de cromatografía como matriz de cromatografía de afinidad. Una matriz de cromatografía de afinidad en sí misma incluye moléculas permanentemente unidas (normalmente unidas covalentemente) que son capaces de unirse específicamente a una diana seleccionada. Por ejemplo, una matriz de cromatografía de afinidad convencional puede incluir un anticuerpo que se une a una diana determinada en particular. Como alternativa, una matriz cromatográfica que se utiliza para la cromatografía de afinidad con quelato metálico inmovilizado (IMAC) se modifica con un agente ligando quelante como

el ácido iminodiacético tridentado para poder formar enlaces de coordinación entre los iones metálicos y determinadas cadenas laterales expuestas de una proteína o con marcadores de oligohistidina, por ejemplo. Por lo tanto, en la técnica, una matriz de cromatografía de afinidad se diseña generalmente de forma que sea capaz de unirse específicamente al analito o diana que se desea aislar. En la presente invención, en la que se utiliza la matriz cromatográfica, tampoco, por ejemplo, en un "cartucho de selección", como se explica con más detalle a continuación, la propia matriz de cromatografía de afinidad no está diseñada para ser capaz de unirse específicamente a la célula diana que se desea aislar. En lugar de ello, en tales realizaciones la matriz de cromatografía de afinidad (fase estacionaria) utilizada en la presente invención comprende un reactivo de afinidad que tiene dos o más sitios de unión Z que son capaces de unirse específicamente a un reactivo de unión a receptor que también se emplea en la presente invención.

Cuando el reactivo de unión al receptor se pone en contacto con el reactivo de afinidad/multimerización, se forma un complejo reversible a través del compañero de unión C del reactivo de unión al receptor y el uno o más sitios de unión Z del reactivo de afinidad/multimerización. Por lo tanto, esta formación de complejos se basa en interacciones no covalentes entre un ligando y su respectivo compañero de unión y, por lo tanto, es fundamentalmente diferente del uso de enlaces covalentes escindibles como se describe en Bonnafous et al., citado anteriormente. En la presente invención, el reactivo de afinidad comprende dos o más sitios de unión Z para el compañero de unión C. En el complejo de unión entonces no covalente formado, dos o más reactivos de unión a receptores se inmovilizan en la matriz de cromatografía de afinidad dispuestos estrechamente entre sí, de forma que pueda producirse un efecto de avidez si en la muestra está presente una célula diana que tenga (al menos dos copias de) una molécula receptora, se pone en contacto con el reactivo de unión al receptor que tiene uno o más sitios de unión B siendo capaz de unirse a la molécula receptora particular. Por lo tanto, en estas realizaciones, un efecto de avidez (multimerización) similar al descrito en la patente de Estados Unidos 7,776,562, la patente de Estados Unidos 8.298.782 o la solicitud de patente internacional WO02/054065 pueden tener lugar para permitir una inmovilización reversible de las células diana en la matriz de cromatografía de afinidad. Dado que la unión entre los sitios de unión Z del reactivo de afinidad (que entonces también puede actuar como agente de multimerización) y el compañero de unión C del reactivo de unión al receptor puede interrumpirse mediante la adición de un agente de competencia, las células diana pueden eluirse posteriormente en condiciones suaves en las que el reactivo de unión al receptor se disocia completamente de la célula diana, evitando así que el reactivo de unión al receptor afecte al estado funcional de la célula diana. Así pues, el aislamiento de las células diana mediante este método de cromatografía de afinidad no sólo tiene la ventaja de que permite aislar/purificar la población de células diana (o cualquier otra entidad biológica descrita en el presente documento) sin alterar el estado funcional de la población de células diana definida por una molécula receptora específica común. En lugar de ello, este método también tiene la ventaja añadida de que suprime por completo la necesidad de utilizar perlas magnéticas para la purificación celular y, por tanto, simplifica cualquier manipulación posterior de la célula y abre el camino a la automatización del aislamiento de las células diana, como también se describe en el presente documento.

En el método según la invención se utiliza una matriz de cromatografía que tiene un reactivo de afinidad inmovilizado en ella. El reactivo de afinidad es capaz de unirse a un compañero de unión C que está incluido en un reactivo de unión a receptor (véase más adelante). Dicha matriz cromatográfica puede ser una matriz cromatográfica de afinidad. También puede ser una matriz de filtración de gel, a la que se ha acoplado el reactivo de afinidad. La matriz cromatográfica se incluye en una columna cromatográfica, por ejemplo, empaquetada en ella. Mediante el reactivo de afinidad inmovilizado, la matriz cromatográfica puede agotar una fase móvil del reactivo de unión al receptor. Una muestra que entra en contacto con la matriz cromatográfica, por ejemplo, cargada en una columna cargada con él, también puede estar empobrecida en el reactivo de unión al receptor. En un método según la invención, el reactivo de unión al receptor se incluye en una muestra que se pone en contacto con una fase estacionaria respectiva, es decir, la matriz cromatográfica.

Después de aplicar la muestra que contiene la célula diana, la matriz cromatográfica (independientemente de que se utilice para cromatografía de afinidad o para permeación en gel) puede lavarse posteriormente con una fase móvil, tal como un medio acuoso, por ejemplo, un tampón, para eliminar cualquier materia que no se haya inmovilizado en la matriz cromatográfica. A continuación se puede inducir la disociación del complejo no covalente descrito anteriormente, cuya formación inmoviliza la célula diana en la matriz de cromatografía de afinidad, por ejemplo, por un cambio en las condiciones. En el método reivindicado se emplea un reactivo de competición para inducir la disociación del complejo no covalente reversible entre el receptor, reactivo de unión a receptor y reactivo de afinidad. El reactivo de competición es capaz de asociarse al reactivo de afinidad ocupando o bloqueando el sitio de unión del reactivo de afinidad para el compañero de unión incluido en el reactivo de unión al receptor. Mediante el uso de un reactivo de competición con una afinidad particularmente alta por el reactivo de afinidad o mediante el uso de un exceso del reactivo de competición en relación con al menos una de las células diana y el reactivo de unión al receptor (en este caso, el reactivo de competición también podría tener una afinidad menor por el sitio de unión Z del reactivo de afinidad que el compañero de unión C del reactivo de unión al receptor), puede interrumpirse la unión no covalente entre el reactivo de unión al receptor y el reactivo de multimerización. Se deja que la célula diana eluya de la matriz cromatográfica, por ejemplo, de la columna en la que se empaqueta la matriz cromatográfica. La fracción eluida se recoge y, con él, la célula diana.

En algunas realizaciones se utiliza una muestra fuente, que incluye o se sospecha que incluye la célula diana, y a la que se añade el reactivo de unión al receptor para permitir la formación del complejo no covalente descrito anteriormente que implica a la célula diana y al reactivo de afinidad en la matriz de cromatografía de afinidad. Como un ejemplo ilustrativo, una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra de sangre entera) o una muestra linfática

pueden definir una muestra fuente de este tipo (véase la sección de ejemplos). Puede seleccionarse un reactivo de unión a receptor que tenga un sitio de unión para una célula diana deseada, que está presente en la sangre o la linfa, respectivamente. El reactivo de unión al receptor, opcionalmente también algún tampón, puede añadirse a la muestra de sangre o a la muestra linfática. El tampón utilizado puede ser al menos esencialmente idéntico a un tampón utilizado para equilibrar la matriz cromatográfica y utilizado para el lavado posterior. Posteriormente, la muestra puede cargarse en la columna cromatográfica. Esta columna cromatográfica tiene un reactivo de afinidad inmovilizado en su matriz, que puede unirse al reactivo de unión al receptor. Como alternativa, el reactivo de unión al receptor puede estar ya inmovilizado en la matriz de cromatografía de afinidad antes de que la muestra de la célula diana se aplique a la matriz de cromatografía de afinidad. Después de la muestra, por ejemplo, una muestra de sangre o linfa, opcionalmente con el reactivo de unión al receptor se ha cargado por completo en la columna cromatográfica, la matriz cromatográfica puede lavarse con una fase móvil. Un reactivo de competición, que puede incluirse en un tampón utilizado para el lavado de la matriz cromatográfica, puede cargarse en la columna cromatográfica. Posteriormente, la matriz cromatográfica puede lavarse con una fase móvil. La elución de la célula diana puede controlarse mediante técnicas de detección estándar, como un dispositivo de detección óptica. A continuación, puede recogerse la célula diana. Así pues, dicha fracción eluida puede incluir un reactivo de unión al receptor y/o un reactivo de competición.

Para poder purificar aún más dicho eluido de células diana, una matriz de cromatografía (por ejemplo, una matriz de cromatografía de exclusión por tamaño) puede incluir un reactivo de afinidad, por ejemplo, una molécula inmovilizada en la matriz cromatográfica, que tiene sitios de unión Z que son capaces de unirse específicamente al compañero de unión B que está incluido en el reactivo de unión al receptor y/o al reactivo de competición.

Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, una matriz de cromatografía de exclusión por tamaño utilizada en el presente documento puede tener un reactivo de afinidad inmovilizado en ella. Dado que una matriz cromatográfica respectiva también es capaz de separar la materia en función de su tamaño y/o forma, puede abordarse como una matriz de cromatografía de modo mixto. Por lo tanto, en las realizaciones en las que el reactivo de afinidad inmovilizado en dicha matriz de cromatografía de exclusión por tamaño no coincide con un reactivo de unión al receptor en que el reactivo de afinidad tiene un sitio de unión, que no puede formar un complejo con el reactivo de unión al receptor seleccionado, la matriz de cromatografía de modo mixto puede seguir empleándose como matriz de cromatografía de exclusión por tamaño. En las realizaciones en las que el reactivo de afinidad inmovilizado tiene un sitio de unión, que sí tiene la capacidad de formar un complejo con el reactivo de unión al receptor seleccionado, el reactivo de afinidad puede servir para inmovilizar de forma reversible la célula diana en la matriz cromatográfica.

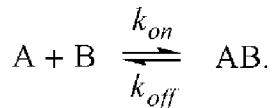
La fase fluida utilizada como fase móvil en la cromatografía puede ser cualquier fluido adecuado para preservar la actividad biológica de la célula diana. Normalmente, el fluido es un líquido. En algunas realizaciones, el líquido respectivo es o incluye agua, por ejemplo, en forma de una solución acuosa. Pueden incluirse otros componentes en una solución acuosa respectiva, por ejemplo disueltos o suspendidos en ella. Como ejemplo ilustrativo, una solución acuosa puede incluir uno o más compuestos tampón. En la técnica se utilizan numerosos compuestos tampón que pueden emplearse para llevar a cabo los diversos procesos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tampones incluyen, pero sin limitación, soluciones de sales de fosfato tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), carbonato, succinato, carbonato, citrato, acetato, formiato, barbitúrico, oxalato, lactato, fthalato, maleato, cacodilato, borato, N-(2-acetamido)-2-amino-etanosulfonato (también llamado (ACES), ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (también llamado HEPES), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-propanosulfónico (también llamado HEPPS), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (también denominada PIPES), (ácido 2-[Tris(hidroximetil)-metilamino]-1-etansulfónico (también llamado TES), ácido 2-ciclohexilaminoetanosulfónico (también llamado CHES) y N-(2-acetamido)-iminodiacetato (también llamado ADA). En estas sales puede utilizarse cualquier contríon; amonio, sodio y potasio pueden servir como ejemplos ilustrativos. Otros ejemplos de tampones son, pero sin limitación, trietanolamina, dietanolamina, tampones zwitteriónicos tales como betaina, etilamina, trietilamina, glicina, gliciglicina, histidina, tris-(hidroximetil)aminometano (también llamado TRIS), bis-(2-hidroxietil)-imino-tris(hidroximetil)-metano (también llamado BIS-TRIS) y N-[Tris(hidroximetil)-metil]-glicina (también llamado TRICINA), por nombrar solo algunos. El tampón puede incluir además componentes que estabilicen la célula diana a aislar, por ejemplo, proteínas tales como albúmina (sérica), factores de crecimiento, oligoelementos y similares. La elección de la fase móvil adecuada está dentro de los conocimientos de la persona medianamente experta en la materia y puede llevarse a cabo empíricamente.

En consonancia con la solicitud internacional de patente pendiente con la presente PCT/EP2012/063969, publicada como documento WO 2013/011011, la fuerza de la unión entre el reactivo de unión al receptor y una molécula receptora en una célula diana puede no ser esencial para la reversibilidad de la unión de la célula diana al reactivo de afinidad a través del reactivo de unión al receptor. En lugar de ello, independientemente de la fuerza de la unión, que significa si la constante de disociación (K_d) para la unión entre el reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptora es de baja afinidad, por ejemplo, en el intervalo de una K_d de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-7} M, o de alta afinidad, por ejemplo, en el intervalo de una K_d de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 1×10^{-10} M, una célula diana puede teñirse de forma reversible siempre que la disociación de la unión del reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptora se produzca con suficiente rapidez. A este respecto, la constante de velocidad de disociación (k_{off}) para la unión entre el reactivo de unión a receptores a través del sitio de unión B y la molécula receptora tiene un valor de aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o mayor (esta constante de velocidad de disociación es la constante que caracteriza la reacción de disociación del complejo

formado entre el sitio de unión B del reactivo de unión del receptor y la molécula receptora en la superficie de la célula diana). La constante de velocidad de asociación (k_{on}) para la reacción de asociación entre el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor y la molécula receptora en la superficie de la célula diana puede tener cualquier valor. Para asegurar una unión suficientemente reversible entre la molécula receptora y el reactivo de unión al receptor es ventajoso seleccionar el valor de k_{off} del equilibrio de unión para que tenga un valor de aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o mayor, de aproximadamente $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o superior, tal como aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $7,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $7,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o aproximadamente $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior. El término "aproximadamente" se utiliza en el presente documento en relación con la constante k_{off} , la constante k_{on} o la K_D (véase más adelante) debe incluir un margen de error de $\pm 20,0\%$, incluido de $\pm 15,0\%$, $\pm 10,0\%$, $\pm 8,0\%$, $\pm 9,0\%$, $\pm 7,0\%$, $\pm 6,0\%$, $\pm 5,0\%$, $\pm 4,5\%$, $\pm 4,0\%$, $\pm 3,5\%$, $\pm 3,0\%$, $\pm 2,8\%$, $\pm 2,6\%$, $\pm 2,4\%$, $\pm 2,2\%$, $\pm 2,0\%$, $\pm 1,8\%$, $\pm 1,6\%$, $\pm 1,4\%$, $\pm 1,2\%$, $\pm 1,0\%$, $\pm 0,9\%$, $\pm 0,8\%$, $\pm 0,7\%$, $\pm 0,6\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,4\%$, $\pm 0,3\%$, $\pm 0,2\%$, $\pm 0,1\%$ o $\pm 0,01\%$. Cabe señalar aquí que los valores de las constantes cinéticas y termodinámicas utilizados en el presente documento, se refieren a condiciones de presión atmosférica, es decir, 0,1013 MPa (1,013 bar), y temperatura ambiente, es decir, 25 °C.

Si el reactivo de unión al receptor se simboliza con "A", el receptor en la superficie de la célula diana se simboliza con "B", y un complejo entre el reactivo de unión al receptor y el receptor se simboliza con "AB", una interacción bimolecular entre el reactivo de unión al receptor y el receptor puede describirse mediante un proceso de dos estados señalado

25



La correspondiente constante de disociación K_d del proceso se define como

30

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}.$$

En estas ecuaciones [A], [B], y [AB] son las concentraciones molares de equilibrio del receptor, el reactivo de unión al receptor (ligando) y el complejo respectivo a una temperatura y una presión determinadas. La constante de disociación K_d también puede expresarse como la relación entre la constante de la velocidad de activación (k_{on}) y la velocidad de asociación/formación, también llamada constante de velocidad de asociación, del complejo y la constante de la constante de disociación (k_{off}) para la disociación del complejo, también llamada constante de velocidad de disociación, con

40

A este respecto, cabe señalar que la constante de disociación K_d define un estado en el que se ha alcanzado un equilibrio. No puede haber equilibrio, sin embargo, formarse en condiciones de separación cromatográfica. Esto puede explicar por qué en algunas realizaciones es la constante de la velocidad de disociación (k_{off}) en lugar de la constante de disociación K_d que puede determinar que la unión reversible sea igual o mayor que, es decir, en términos numéricos (s^{-1}), al menos tan alta como de $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ en el contexto de la invención.

En la presente invención, el reactivo de unión al receptor tiene un único sitio de unión B (monovalente) capaz de unirse específicamente a la molécula receptora. En esta realización, la unión de la molécula receptora a través del sitio de unión B tiene un valor de k_{off} de aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o superior. En la presente invención, el reactivo de unión al receptor es un fragmento de anticuerpo monovalente. En la presente invención se forma un complejo entre los dos o más sitios de unión Z del reactivo de afinidad y el compañero de unión C de al menos dos reactivos de unión a receptores, lo que permite una inmovilización reversible y la posterior elución de las células diana de la matriz de cromatografía de afinidad (mediante la adición del agente competidor que interrumpirá la unión (complejo) formada entre el compañero de unión C y los sitios de unión Z, lo que a su vez conduce a la disociación del reactivo de unión a receptores de la célula diana. Como se ha mencionado anteriormente, dicha baja afinidad de unión puede caracterizarse por una constante de disociación (K_D) en el intervalo de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ para la unión del reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptora en la superficie de la célula diana.

60 Un método según la presente invención puede utilizarse en algunas realizaciones para agotar una muestra de

reactivos que se han utilizado previamente en la separación celular. El reactivo de unión al receptor y un agente de competición pueden, por ejemplo, estar presentes incluidos en la fracción eluida de un método de cromatografía de afinidad en un cartucho de selección como el descrito anteriormente. Usando un método según la invención tales reactivos pueden ser por lo menos esencialmente, incluida la eliminación total de una muestra, por ejemplo, de una población celular. Como un ejemplo ilustrativo, un reactivo de unión a receptores como se ha definido anteriormente puede agotarse de una muestra hasta niveles inferiores al límite de detección de, por ejemplo, FACS o Western Blot. Puede haberse utilizado un reactivo de competición para eluir la célula diana de un medio de purificación por afinidad, tal como una perla de cromatografía de afinidad. Este reactivo de competición tiene un sitio de unión capaz de unirse específicamente al sitio de unión Z del reactivo de afinidad. En tal realización, el método respectivo de la invención puede servir para agotar el reactivo de unión al receptor y el reactivo de competición, incluida la eliminación de la misma.

La molécula receptora que se localiza en la superficie de la célula diana (o en una superficie accesible de una entidad biológica) puede ser cualquier molécula siempre que permanezca unida de forma covalente o no covalente a la superficie celular durante un proceso de separación cromatográfica en un método según la invención. La molécula receptora es una molécula contra la que puede dirigirse un reactivo de unión al receptor. En algunas realizaciones, el receptor es un péptido o una proteína, tal como una proteína receptora de membrana. En algunas realizaciones, el receptor es un lípido, un polisacárido o un ácido nucleico. Un receptor que es una proteína puede ser una proteína de membrana periférica o una proteína de membrana integral. En algunas realizaciones puede tener uno o más dominios que abarcan la membrana. Algunos ejemplos ilustrativos, una proteína de membrana con un dominio transmembrana puede ser un receptor acoplado a proteína G, tal como receptores de olores, un receptor de rodopsina, un receptor de feromonas de rodopsina, un receptor hormonal peptídico, un receptor gustativo, un receptor DE GABA, un receptor de opióceos, un receptor de serotonina, un receptor de Ca^{2+} , melanopsina, un receptor neurotransmisor, tal como un receptor controlado lípido, controlado por voltaje o controlado mecánicamente, incluida el de acetilcolina, el nicotínico, el adrenérgico, la norepinefrina, las catecolaminas, la L-DOPA-, un receptor de neuropéptidos de dopamina y serotonina (amina biogénica, endorfina/encefalina), un receptor quinasa tal como la serina/treonina quinasa, una tirosina quinasa, una porina/canal como un canal de cloruro, un canal de potasio, un canal de sodio, una proteína OMP, un transportador ABC (ATP-casete de unión-Transportador) tal como el transportador de aminoácidos, el transportador de Na-glucosa, el transportador de Na^+ /yoduro, un transportador de iones como Light Harvesting Complex, citocromo C oxidasa, ATPasa Na/K, H/K, Ca, un receptor de adhesión celular, tal como metaloproteasa, una integrina o una caterina.

En algunas realizaciones, la molécula receptora puede ser un antígeno que define una población o subpoblación celular deseada, por ejemplo, una población o subpoblación de linfocitos T, por ejemplo linfocitos T colaboradores, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ colaboradores o células madre, por ejemplo, células madre periféricas CD34 positivas o células madre que expresen Nanog u Oct-4. Ejemplos de linfocitos T incluyen células tales como linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T de memoria y linfocitos T reguladores (Treg). Un ejemplo ilustrativo de Treg son las células Treg CD4⁺CD25⁺CD45RA y un ejemplo ilustrativo de linfocitos T de memoria son los linfocitos T de memoria centrales específicos CD62L⁺CD8+. El receptor también puede ser un marcador de una célula tumoral.

Como se ha indicado anteriormente, el reactivo de unión al receptor tiene, además del sitio de unión B que es capaz de unirse a la molécula receptora, un compañero de unión C. Este compañero de unión C es capaz de unirse a un sitio de unión Z del reactivo de afinidad, en donde el reactivo de multimerización tiene dos o más sitios de unión para el compañero de unión C. La constante de disociación (K_D) de la unión entre el compañero de unión C que está incluido en el reactivo de unión al receptor y el sitio de unión Z del reactivo de afinidad tiene un valor en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-13} M o de aproximadamente 10^{-3} M a aproximadamente 10^{-12} M o de aproximadamente 10^{-4} M a aproximadamente 10^{-11} M o de aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 10^{-10} M. La K_D de este enlace así como la K_D , la velocidad k_{off} y k_{on} del enlace formado entre el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor y la molécula receptora puede determinarse mediante valoración por fluorescencia, diálisis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial. El reactivo de unión a moléculas receptoras puede incluir al menos uno, incluyendo dos, tres o más, segundos compañeros de unión C y el reactivo de afinidad pueden incluir al menos dos, tal como tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más sitios de unión para el compañero de unión que está incluido en el reactivo de unión de la molécula receptora. Como se describe en la patente de Estados Unidos 7.776.562, la patente de Estados Unidos 8.298.782 o la solicitud de patente internacional WO 2002/054065 puede elegirse cualquier combinación de un compañero de unión C y un agente de afinidad con uno o más sitios de unión Z correspondientes, siempre que el compañero de unión C y el sitio de unión Z del agente de afinidad sean capaces de unirse de forma reversible o de multimerizarse en un complejo (multivalente) para causar un efecto de avidez.

El compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye biotina y el reactivo de afinidad incluye un análogo de estreptavidina o un análogo de avidina que se une de forma reversible a la biotina. En algunas realizaciones, el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye un análogo de biotina que se une de forma reversible a estreptavidina o avidina, y el reactivo de afinidad incluye estreptavidina, avidina, un análogo de estreptavidina o un análogo de avidina que se une de forma reversible al análogo de biotina respectivo. En algunas realizaciones, el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye un péptido de unión a estreptavidina o avidina y el reactivo de afinidad incluye estreptavidina, avidina, un análogo de la

estreptavidina o de la avidina que se une de forma reversible al péptido de unión de la estreptavidina o de la avidina respectivo.

En algunas realizaciones, el compañero de unión que se incluye en el reactivo de unión al receptor puede incluir un péptido de unión a estreptavidina Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys y el reactivo de afinidad puede incluir mureína de estreptavidina (análogo) Va144-Thr45-Ala46-Arg47 o mureína de estreptavidina (análogo) Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, ambos descritos en la patente de Estados Unidos 6.103.493, por ejemplo, y están disponibles comercialmente como la marca Strep-Tactin®. Los péptidos de unión a estreptavidina podrían, por ejemplo, ser péptidos únicos tales "Strep-tag®" descritos en la patente de Estados Unidos 5.506.121, por ejemplo, o péptidos de unión a estreptavidina con una disposición secuencial de dos o más módulos de unión individuales, tal como se describe en la publicación de patente internacional WO 02/077018 o en la patente de Estados Unidos 7.981.632.

En algunos métodos divulgados pero no reivindicados, el compañero de unión C del reactivo de unión al receptor incluye una fracción conocida por el experto tal como un marcador de afinidad. En tal caso, el reactivo de afinidad incluye un compañero de unión correspondiente, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que se sabe que se unen al marcador de afinidad. Como algunos ejemplos ilustrativos de marcadores de afinidad conocidos, el compañero de unión que se incluye en el reactivo de unión al receptor puede incluir dinitrofenol o digoxigenina, oligohistidina, polihistidina, un dominio de inmunoglobulina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP) o tiorredoxina, péptido de unión a calmodulina (CBP), FLAG'-péptido, el marcador HA (secuencia: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala), el marcador VSV-G (secuencia: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys), el marcador HSV (secuencia: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp), el epítopo T7 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Met-Gly), proteína de unión a maltosa (MBP), el epítopo HSV de la secuencia Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp de la glicoproteína D del virus del herpes simple, el epítopo "myc" del factor de transcripción c-myc de la secuencia Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu, el marcador V5 (secuencia: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr), o glutatión-S-transferasa (GST). En tal caso, el complejo formado entre los uno o más sitios de unión del reactivo de afinidad, en este caso, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y el antígeno puede ser alterados de competitiva añadiendo el antígeno libre, es decir, el péptido libre (marcador epítópico) o la proteína libre (tal como MBP o CBP). El marcador de afinidad también puede ser un marcador oligonucleotídico. Dicho marcador oligonucleotídico puede, por ejemplo, utilizarse para hibridar con un oligonucleótido con una secuencia complementaria, unido al reactivo de afinidad o incluido en él.

Se divultan, pero no se reivindican, otros ejemplos de un compañero de unión adecuado, entre los que se incluyen, pero sin limitación, una lectina, proteína A, proteína G, un metal, un ion metálico, derivados del ácido nitrilo triacético (NTA), motivos RGD, un dextrano, polietilenimina (PEI), un polímero redox, a glicoproteínas, un aptámero, un colorante, amilosa, maltosa, celulosa, quitina, glutatión, calmodulina, gelatina, polimixina, heparina, NAD, NADP, lisina, arginina, benzamidina, poli U u oligo-dT. Se sabe que las lectinas, tales como concavalina A, se unen a polisacáridos y proteínas glicosiladas. Un ejemplo ilustrativo de un colorante es un colorante de triazina tal como azul Cibacron F3G-A (CB) o rojo HE-3B, que se unen específicamente a las enzimas dependientes de NADH. El verde A se une a las proteínas CoA, seroalbúmina humana y deshidrogenasas. Los colorantes 7-aminoactinomicina D y 4',6-diamidino-2-fenilindol se unen al ADN. Los cationes de metales tales como Ni, Cd, Zn, Co o Cu, se utilizan normalmente para unir marcadores de afinidad como una secuencia que contiene oligohistidina, incluyendo la hexahistidina o el marcador His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Cys (etiqueta MAT), y el éster metílico de N-metacriloil-(L)-cisteína.

En algunas realizaciones, la unión entre el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor y uno o más sitios de unión del reactivo de afinidad se produce en presencia de un catión divalente, trivalente o tetravalente. A este respecto, en algunas realizaciones el reactivo de afinidad/multimerización incluye un catión divalente, trivalente o tetravalente, normalmente soportado, por ejemplo, en forma de complejo, mediante un quelante adecuado. El compañero de unión que se incluye en el reactivo de unión al receptor puede incluir en dicha realización una fracción que incluya, por ejemplo, en forma de complejo, un catión divalente, trivalente o tetravalente. Ejemplos de un quelante de metal respectivo, incluyen, pero sin limitación, etilendiamina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), N,N-bis(carboximetil)glicina (también llamado ácido nitrilotriacético, NTA), ácido 1,2-bis (o-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), 2,3-dimercapto-1-propanol (dimercaprol), porfina y hemo. A modo de ejemplo, el EDTA forma un complejo con la mayoría de los iones metálicos monovalentes, divalentes, trivalentes y tetravalentes, tales como, por ejemplo, plata (Ag^+), calcio (Ca^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), cobre (Cu^{2+}), hierro (Fe^{2+}), cobalto (Co^{3+}) y circonio (Zr^{4+}), mientras que BAPTA es específico para el Ca^{2+} . Como un ejemplo ilustrativo, un método estándar utilizado en la técnica es la formación de un complejo entre un marcador de oligohistidina y cobre (Cu^{2+}), níquel (Ni^{2+}), cobalto (Co^{2+}) o iones de zinc (Zn^{2+}), que se presentan mediante el quelante ácido nitrilotriacético (NTA).

En algunas realizaciones que se divultan pero no se reivindican, el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye un péptido de unión a calmodulina y el reactivo de afinidad incluye calmodulina multimérica como se describe en la patente de Estados Unidos 5.985.658, por ejemplo. En algunas realizaciones, el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye un péptido FLAG y el reactivo de afinidad incluye un anticuerpo que se une al péptido FLAG, por ejemplo, el péptido FLAG, que se une al anticuerpo monoclonal 4E11 descrito en la patente de Estados Unidos 4.851.341. En una realización, el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor incluye un marcador de oligohistidina y el reactivo de afinidad incluye un anticuerpo o

un ion de metal de transición que une al marcador de oligohistidina. La alteración de todos estos complejos de unión puede lograrse mediante la quelación de iones metálicos, por ejemplo, quelación del calcio, por ejemplo añadiendo EDTA o EGTA (anteriormente). La calmodulina, anticuerpos tales como 4E11 o iones metálicos quelados o quelantes libres pueden ser multimerizados por métodos convencionales, por ejemplo, mediante biotinilación y formación de complejos con estreptavidina o avidina o sus multímeros, o mediante la introducción de restos carboxílicos en un polisacárido, por ejemplo, dextrano, esencialmente como se describe en Noguchi, A, *et al.* Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137 en una primera etapa y uniendo calmodulina o anticuerpos o iones metálicos quelados o quelantes libres mediante grupos amino primarios a los grupos carboxilo en la estructura del polisacárido, por ejemplo, dextrano, utilizando la química carbodiimida convencional en una segundo etapa. En tales realizaciones, la unión entre el compañero de unión C que se incluye en el reactivo de unión al receptor y el uno o más sitios de unión Z del reactivo de multimerización puede interrumpirse mediante quelación de iones metálicos. La quelación de metales puede, por ejemplo, realizarse mediante la adición de EGTA o EDTA.

En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad es un oligómero o un polímero de estreptavidina o avidina o de cualquier análogo de estreptavidina o avidina. El sitio de unión Z es la unión natural a biotina de avidina o estreptavidina. El oligómero o polímero respectivo puede estar reticulado por un polisacárido. En una realización, los oligómeros o polímeros de estreptavidina o de avidina o de análogos de estreptavidina o de avidina se preparan mediante la introducción de restos carboxílicos en un polisacárido, por ejemplo, dextrano, esencialmente como se describe en Noguchi, A, *et al.*, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137 en una primera etapa. A continuación, la estreptavidina o la avidina o sus análogos pueden unirse mediante grupos amino primarios del residuo interno de lisina y/o el extremo N libre a los grupos carboxilo del esqueleto de dextrano utilizando la química carbodiimida convencional en una segunda etapa. Sin embargo, los oligómeros o polímeros reticulados de estreptavidina o avidina o de cualquier análogo de estreptavidina o avidina también pueden obtenerse por reticulación mediante moléculas bifuncionales, que sirve de enlazador, tal como glutardialdehído o mediante otros métodos descritos en la técnica.

En la presente invención, el reactivo de unión de la molécula receptora es monovalente, a saber, un fragmento de anticuerpo monovalente. Una molécula de unión proteinácea con propiedades de unión similares a las de los anticuerpos o una molécula MHC son ejemplos de reactivos de unión a receptores monovalentes que se incluyen con fines informativos pero no se reivindican. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo monovalente incluyen, pero sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena única (scFv), incluyendo un fragmento Fv monocatenario divalente.

Como se ha mencionado anteriormente, un ejemplo de molécula de unión proteínica con funciones similares a las de los anticuerpos, que se divulga pero no se reivindica, es una muteína basada en un polipéptido de la familia de las lipocalinas (véase, por ejemplo, el documento WO 03/029462, Beste *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903). Las lipocalinas, tal como la proteína de unión a bilina, la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos humana, la apolipoproteína D humana o la lipocalina lagrimal humana poseen sitios naturales de unión a ligandos que pueden modificarse para que se unan a una diana determinada. Otros ejemplos de una molécula de unión proteinácea con propiedades de unión similares a las de los anticuerpos que se divultan pero no se reivindican, y que pueden utilizarse como reactivo de unión a receptores que se une específicamente a la molécula receptora incluyen, pero sin limitación, los denominados glucuerpos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 96/23879), proteínas basadas en el armazón de anquirina (Mosavi, L.K., *et al.*, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448) o armazón cristalino (por ejemplo, solicitud de patente internacional WO 01/04144) las proteínas descritas en Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187, AdNectins, tetranectins and avimers. Los avímeros, incluyendo proteínas aviméricas multivalentes producidas mediante barajado de exones de una familia de dominios de receptor humano, contienen los denominados dominios A, que se presentan como cadenas de múltiples dominios en varios receptores de la superficie celular (Silverman, J., *et al.*, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561). Las adnectinas, derivadas de un dominio de la fibronectina humana, contienen tres bucles que pueden diseñarse para que se unan a las dianas de forma similar a las inmunoglobulinas (Gill, D.S. y Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658). Las tetranectinas, derivadas de la proteína homotrimérica humana respectiva, también contienen regiones de bucle en un dominio de lectina de tipo C que puede diseñarse para la unión deseada (*ibid.*). Los peptoides, que pueden actuar como ligandos de proteínas, son oligo(N-alquil) glicinas que difieren de los péptidos en que la cadena lateral está conectada al nitrógeno de la amida en lugar de al átomo de carbono α . Los peptoides suelen ser resistentes a las proteasas y otras enzimas modificadoras y pueden tener una permeabilidad celular mucho mayor que los péptidos (véase, por ejemplo, Kwon, Y-U. y Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509).

Otros ejemplos más de moléculas de unión proteinácea adecuadas que se divultan pero no se reivindican son un dominio de tipo EGF, un dominio Kringle, un dominio de fibronectina de tipo I, un dominio de fibronectina de tipo II, un dominio de fibronectina de tipo III, un dominio PAN, un dominio G1a, un dominio SRCR, un dominio inhibidor de tripsina pancreática bovina/de Kunitz, tendamistat, un dominio inhibidor de la serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio de factor de von Willebrand de tipo C, un dominio de tipo anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición de tiroglobulina de tipo I, dominio de receptor de LDL de clase A, un dominio Sushi, un dominio de enlace, un dominio de trombospondina de tipo I, un dominio de inmunoglobulina o un dominio de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos de dominio o anticuerpos de cadena pesada de camello), un dominio de lectina de tipo C, un dominio MAM, un dominio de factor de von Willebrand de tipo A, un dominio de somatomedina B, un dominio de cuatro núcleos disulfuro de tipo WAP, un dominio F5/8 de tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio SH2, un dominio

- SH3, un dominio de tipo EGF de tipo laminina, un dominio C2, "Kappabodies" (véase III. *et al.*, Protein Eng (1997) 10, 949-57, un llamado "minicuerpo" (Martin *et al.*, EMBO J (1994) 13, 5303-5309), un diacuerpo (véase Holliger *et al.*, PNAS USA (1993) 90, 6444-6448), un llamado "Janusis" (véase Traunecker *et al.*, EMBO J (1991) 10, 3655-3659, o Traunecker *et al.*, Int J Cancer (1992) Suppl 7, 51-52), un nanocuerpo, un microcuerpo, una afilina, un aficuerpo, una knotina, ubiquitina, una proteína de dedo de cinc, una proteína autofluorescente o una proteína de repetición rica en leucina. Un ejemplo de molécula de ácido nucleico con funciones similares a las de los anticuerpos es un aptámero. Un aptámero se pliega en un motivo tridimensional definido y muestra una gran afinidad por una estructura diana determinada.
- 5 La expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier ácido nucleico en cualquier configuración posible, tal como monocatenaria, bicatenaria o una combinación de ellas. Los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN, moléculas de ARN, análogos del ADN o ARN generados mediante análogos de nucleótidos o mediante química de ácidos nucleicos, moléculas de ácido nucleico bloqueado (moléculas de LNA), moléculas de PNA (citadas anteriormente) y moléculas de tecto-ARN (por ejemplo, Liu, B., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2004) 126, 4076-4077). Una molécula de PNA es un análogo sintético del ácido nucleico con una estructura pseudopeptídica en la que la espina dorsal fosfodiéster presente en, por ejemplo, el ADN o el ARN, se sustituye por unidades repetitivas de moléculas alifáticas cortas con un extremo amino y un extremo carboxílico, formando un enlace amida en el oligómero o polímero. Una molécula de LNA tiene una estructura de ARN modificado con un puente de metileno entre C4' y O2', que bloquea el anillo de furanosa en una configuración de tipo N, proporcionando a la molécula respectiva una mayor estabilidad dúplex y resistencia a las nucleasas. A diferencia de una molécula de PNA, una molécula de LNA tiene una estructura cargada. El ADN o ARN puede ser de origen genómico o sintético y puede ser mono o bicatenario. Dicho ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ARNm, ARNc, ARN sintético, ADN genómico, ADN sintético de ADNc, un copolímero de ADN y ARN, oligonucleótidos, etc. Un ácido nucleico respectivo puede contener además análogos de nucleótidos no naturales y/o estar unido a un marcador de afinidad o a otro marcador.

Un método según la presente invención puede llevarse a cabo a cualquier temperatura a la que la viabilidad de la célula diana esté al menos esencialmente no comprometida. Cuando en el presente documento se hace referencia a condiciones que, al menos en esencia, no son dañinas, perjudiciales o, al menos, que no comprometan esencialmente la viabilidad, se hace referencia a condiciones bajo las cuales el porcentaje de células diana que se puede recuperar con plena viabilidad, es de al menos el 70 %, incluyendo al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 92 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 %. En algunas realizaciones, un método según la invención se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 °C o inferior, tal como de aproximadamente 14 °C o menos, de aproximadamente 9 °C o menos o de aproximadamente 6 °C o menos. Dependiendo de la célula diana que se va a aislar, un intervalo de temperatura adecuado puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C, incluyendo de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 35 °C o de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C si se utiliza un medio acuoso para englobar la célula diana. En algunas realizaciones, un método según la invención se lleva a cabo a un valor de temperatura constante o a un valor de temperatura seleccionado ± aproximadamente 5 °C, ± aproximadamente 4 °C, ± aproximadamente 3 °C, ± aproximadamente 2 °C, ± aproximadamente 1 °C o ± aproximadamente 0,5 °C. La temperatura puede, por ejemplo, seleccionarse para que tenga un valor de aproximadamente 5 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 15 °C, aproximadamente 20 °C o aproximadamente 25 °C. En algunas realizaciones, la temperatura se altera, es decir, se aumenta, se disminuye o se varía mediante combinaciones de las mismas, durante un método según la presente invención. La temperatura puede, por ejemplo, modificarse dentro de un intervalo como el definido anteriormente, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C o en el intervalo de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 35 °C. El experto en la materia puede determinar empíricamente una temperatura adecuada, teniendo en cuenta la naturaleza de las células y las condiciones de aislamiento. Por ejemplo, las células insensibles a la temperatura, tales como las células cancerosas, podrían aislarse a temperatura ambiente o incluso a temperatura elevada, tal como 37 °C.

Se divulga, pero no se reivindica, un kit de piezas, por ejemplo, diseñado para llevar a cabo un método como el detallado anteriormente. El kit puede incluir un reactivo de unión al receptor como el definido anteriormente. El kit puede incluir, por ejemplo, un recipiente lleno del reactivo de unión al receptor, por ejemplo, en solución. El kit también puede incluir una matriz cromatográfica como la definida anteriormente, que puede (pre)empaquetarse en una columna, tal como un cartucho. Asociado con dicha matriz cromatográfica y/o recipiente(s) se proporciona en algunas realizaciones un aviso en forma de instrucciones sobre cómo utilizar el kit para llevar a cabo un método según la presente invención.

60 Se divulga, pero no se reivindica, el uso de estreptavidina, una muteína de estreptavidina (análogo), avidina, una avidina muteína (análogo) o una mezcla de las mismas para el aislamiento de una célula diana mediante cromatografía, en donde la cromatografía es una cromatografía de filtración en gel. Con este fin, realización, estreptavidina, una muteína estreptavidina, avidina, una avidina muteína o una mezcla de cualquiera de ellas, por ejemplo, una mezcla de estreptavidina y una muteína de estreptavidina, se inmovilizan como reactivo de afinidad en una fase estacionaria de un "cartucho de extracción" según se divulga en el presente documento. El término "estreptavidina" utilizado en el presente documento incluye estreptavidina de tipo salvaje, muteínas de estreptavidina

y polipéptidos similares a la estreptavidina. De manera análoga, el término "avidina", tal como se utiliza en el presente documento, incluye avidina de tipo salvaje, así como las muteínas de avidina, tales como neutravidina, una avidina desglicosilada con argininas modificadas que presenta un pI más neutro y está disponible como alternativa a la avidina nativa. Las formas neutras, desglicosiladas, de avidina incluyen las formas comercializadas, tales como "Extravidina", disponible a través de Sigma-Aldrich, o "NeutrAvidina" disponible en Thermo Scientific o Invitrogen, por ejemplo.

5 Con estreptavidina de tipo salvaje (estreptavidina sv), se hace referencia a la secuencia de aminoácidos divulgada por Argarana *et al.*, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882. Las muteínas de estreptavidina son polipéptidos que se distinguen de la secuencia de estreptavidina de tipo salvaje por una o más sustituciones, delecciones o adiciones de

10 aminoácidos y que conservan las propiedades de unión de estreptavidina sv. Los polipéptidos similares a estreptavidina y las muteínas de estreptavidina son polipéptidos que, esencialmente, son inmunológicamente equivalentes a la estreptavidina de tipo salvaje y, en particular, son capaces de unir biotina, derivados de biotina o análogos de biotina con la misma o diferente afinidad que la estreptavidina sv. Los polipéptidos similares a la estreptavidina o las muteínas de estreptavidina pueden contener aminoácidos que no forman parte de la estreptavidina

15 de tipo salvaje o pueden incluir sólo una parte de la estreptavidina de tipo salvaje. Los polipéptidos similares a la estreptavidina son también polipéptidos que no son idénticos a la estreptavidina de tipo salvaje, ya que el huésped no dispone de las enzimas necesarias para transformar el polipéptido producido por el huésped en la estructura de la estreptavidina de tipo salvaje. El término "estreptavidina" también incluye los tetrámeros de estreptavidina y los dímeros de estreptavidina, en particular homotetrámeros de estreptavidina, homodímeros de estreptavidina,

20 heterotetrámeros de estreptavidina y heterodímeros de estreptavidina. Cada subunidad tiene normalmente un sitio de unión para biotina o análogos de biotina o para péptidos de unión a estreptavidina. Se mencionan ejemplos de estreptavidinas o muteínas de estreptavidina, por ejemplo, en los documentos WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6022951, WO 98/40396 o WO 96/24606.

25 Se divultan, pero no se reivindican, muteínas de estreptavidina que se utilizan para el aislamiento de una célula diana mediante cromatografía, en donde la cromatografía es una cromatografía de filtración en gel son aquellas muteínas de estreptavidina que se describen en la patente de Estados Unidos 6,103,493 y también en el documento DE 196 41 876.3. Estas muteínas de estreptavidina tienen al menos una mutación dentro de la región de las posiciones de aminoácidos 44 a 53, basada en la secuencia de aminoácidos de la estreptavidina de tipo salvaje. Se da preferencia

30 a las muteínas de una estreptavidina mínima, que comienzan N-terminalmente en la región de los aminoácidos 10 a 16 de la estreptavidina de tipo salvaje y terminan C-terminalmente en la región de los aminoácidos 133 a 142 de la estreptavidina de tipo salvaje. Ejemplos de tales muteínas de estreptavidina preferidas tienen un aminoácido alifático hidrófobo en lugar de Glu en la posición 44, cualquier aminoácido en la posición 45, un aminoácido alifático hidrofóbico en la posición 46 o/y un aminoácido básico en lugar de Val en la posición 47. La muteína de estreptavidina puede ser

35 la muteína Va144-Thr45-A1a46-Arg47 o la muteína de estreptavidina (análoga) Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, ambos descritos en la patente de Estados Unidos 6.103.493, por ejemplo, y que están disponibles comercialmente con la marca Strep-Tactin®.

40 Se divulga, pero no se reivindica, un aparato para la purificación de células diana, en donde el aparato comprende al menos una disposición de una primera y una segunda fase estacionaria para cromatografía como se ha explicado anteriormente, es decir, una columna cromatográfica para la selección de las células (un cartucho de selección) y una segunda columna cromatográfica (un cartucho de extracción) para la eliminación de los reactivos del aislamiento o la tinción de las células diana. Mediante este procedimiento de aislamiento en dos etapas se obtienen células diana que pueden someterse directamente al siguiente ciclo de aplicación o selección deseado. A diferencia de las selecciones

45 mediante FACS y MACS, en el método de selección cromatográfica de la invención no son necesarios otros procedimientos como el lavado y la centrifugación entre dos ciclos de selección y las células no se ven funcionalmente comprometidos por reactivos de aislamiento unidos como reactivos de unión a receptores o perlas magnéticas. Por lo tanto, la invención proporciona por primera vez un aparato fiable fácil de construir y, sin embargo, eficaz para la purificación de células diana.

50 De acuerdo con lo anterior, se divulga pero no se reivindica un aparato que puede comprender una pluralidad de disposiciones de primera y segunda fases estacionarias (columnas cromatográficas) conectadas fluidamente en serie. El aparato puede comprender una entrada de muestra conectada fluidamente a la primera fase estacionaria de la primera disposición de una primera y una segunda fases estacionarias para cromatografía. El aparato también puede comprender una salida de muestra para las células diana purificadas, la salida de la muestra está conectada fluidamente a la segunda fase estacionaria de la última de las al menos una disposición de una primera y segunda fases estacionarias para cromatografía. El aparato también puede comprender un recipiente de reactivo de competición que está conectado fluidamente a al menos una de las primeras fases estacionarias de las disposiciones de una primera y segunda fases estacionarias para cromatografía.

60 Como apreciará fácilmente un experto en la materia a partir de la divulgación de la presente invención, otras composiciones de la materia, medios, usos, procedimientos o etapas, que existen actualmente o que se desarrollarán más tarde que realizan sustancialmente la misma función o logran sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en el presente documento pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos experimentales

- En los presentes ejemplos se utilizan fragmentos Fab de producción recombinante dirigidos contra marcadores de la superficie celular como reactivo de unión al receptor. Los fragmentos Fab se expresan de forma recombinante en *E. coli* u otros huéspedes y contienen un péptido de unión a estreptavidina como compañero de unión C. La estreptavidina tetramérica o las muteínas de estreptavidina tetraméricas proporcionan el sitio o sitios de unión Z. Los fragmentos Fab se unen a estreptavidina, que a su vez está unida covalentemente a perlas. Estas perlas se utilizan para la cromatografía en columna de afinidad de suspensiones celulares con una subpoblación de células que tienen una proteína extracelular (molécula receptora) capaz de unirse a los fragmentos Fab. Las células no unidas se lavan en este "cartucho de selección", mientras que las unidas se eluyen posteriormente con un tampón que contiene biotina, lo que interrumpe la unión de la muteína de estreptavidina con el péptido de unión a estreptavidina del fragmento Fab (que actúa como reactivo de unión al receptor). Como consecuencia, el fragmento Fab con la célula unida a él se libera de la columna y, debido al efecto de avidez perdido, los fragmentos Fab se disocian de las células diana. La suspensión puede ahora purificarse de los fragmentos Fab restantes y la biotina mediante una segunda cromatografía en columna (el cartucho de extracción) utilizando otra matriz de gel (cromatografía) con estreptavidina unida covalentemente, mediante la cual las células eluyen en el volumen vacío y los fragmentos Fab y la biotina se unen cuantitativamente en la matriz de cromatografía. A continuación, las células pueden someterse a otro ciclo de purificación utilizando un fragmento Fab diferente o cualquier otro reactivo de unión a receptores de forma similar. Las columnas con fragmentos Fab (cartucho de selección) y una columna posterior para la eliminación de Fab y biotina (cartucho de extracción) pueden combinarse de forma seriada simplemente disponiendo las columnas linealmente una tras otra. Haciéndolo así, la presente invención puede proporcionar un sistema automatizado de purificación celular como el que se muestra en la Figura 6, que carece de perlas magnéticas o de cualquier interferencia manual y que permite una purificación rápida, fácil y rentable de las células diana.
- Este procedimiento permite, por ejemplo, la purificación en serie de linfocitos T, comenzando con la purificación CD4+ seguida de la purificación CD25+ a partir de la fracción CD8+, dando como resultado una fracción altamente enriquecida de linfocitos T reguladores, como se muestra a continuación. Por supuesto, son posibles otros ciclos de purificación utilizando diferentes fragmentos Fab.

30 **Aislamiento de linfocitos T CD8+ a partir de sangre humana (purificación típica en una sola etapa) Material y métodos**

Se utilizó sangre humana para aislar PCMB siguiendo un procedimiento estándar.

35 **Ejemplo 1: purificación en una sola etapa de linfocitos CD8+ mediante cromatografía en columna**

Se utilizó Sephadex G50 (Sigma) como fase estacionaria y se acopló covalentemente con Strep-tactin® (una variante de estreptavidina recombinante, IBA GmbH, Alemania) utilizando el método CNBr. Una suspensión al 50 % de Sephadex G50 contenía 70 microgramos de Strep-tactin®/ml de la suspensión de perlas acopladas covalentemente. Strep-tactin® sirvió como reactivo de afinidad que se inmovilizó en la matriz de afinidad antes de añadir el reactivo de unión al receptor y la muestra que contenía las células diana. Un fragmento Fab de unión a CD8+ cuya cadena pesada se fusionó carboxi-terminalmente con una disposición secuencial de dos módulos de unión a estreptavidina (SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK,), disponible en el mercado (número de catálogo: 6-8003) de IBA GmbH, Göttingen, Alemania) se usó como reactivo de unión al receptor (monovalente), sirviendo como compañero de unión C el péptido de unión a estreptavidina.

Se incubaron 2 ml de la suspensión de Sephadex G50 con Strep-tactin® con 10 microgramos del fragmento Fab de unión a CD8+ durante 20 minutos a 4 °C para permitir la unión del fragmento Fab a las células diana CD8+. A continuación, la suspensión se introdujo en una minicolumna de plástico (Mobitec, Göttingen, Alemania) con una frita de 90 micrómetros en el fondo. Esta columna actúa así como cartucho de selección, tal como se define en el presente documento. La columna se equilibró con PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía 0,5 % de seroalbúmina bovina (tampón PBSA) para obtener un volumen de lecho de 1 ml. A continuación, se cargaron en la columna 5 millones de células de los PCMB en 1 ml de PBSA para que la muestra penetrara en la matriz de cromatografía de afinidad. A continuación, se lavó la columna con 12 ml de PBSA. Se recogió el tampón de lavado y se centrifugó a 3000 g durante 6 minutos para precipitar las células lavadas de la columna (precipitado 1). Despues de esto, se añadieron a la columna 6 ml de PBSA que contenían Biotina 0,1 milimolar (Sigma) como reactivo de competición para eluir las linfocitos CD8+ que se inmovilizaron de forma reversible en la columna mediante el agente de unión y multimerización del receptor. Se recogió la fracción que contenía biotina y se centrifugó como se ha indicado anteriormente para sedimentar las células (sedimento 2).

Los sedimentos de ambas fracciones se resuspendieron en 1 ml de tampón PBSA para su análisis.

El sedimento 1 contenía aproximadamente 3,9 millones de células, el sedimento 2 contenía 0,7 millones de células.

El análisis FACS (datos no mostrados) mostró que el material de partida, en comparación con el sedimento 1, estaba fuertemente empobrecido en linfocitos CD8+ (aproximadamente el 70 %), el sedimento 2 muestra linfocitos CD8+ con

una pureza del 68 %. Por lo tanto, las células diana CD8+ pueden aislararse mediante inmovilización reversible/cromatografía de afinidad.

Este resultado se confirmó mediante el siguiente experimento de enriquecimiento de linfocitos CD8+ a partir de PBMC cuyos resultados se muestran en la **Figura 5**. El enriquecimiento se realizó en dos columnas que contenían resina Sephadex-50 acoplada con Strep-Tactin®, como se ha explicado anteriormente. La primera columna (cartucho de selección) (diagramas B-D) se cargó con el fragmento Fab de unión a CD8 comercializado por IBA GmbH descrito anteriormente. La segunda columna (diagramas E-G) sirvió como control negativo de este cartucho de selección (y no debe confundirse con el cartucho de extracción, que es la "segunda columna" dispuesta después del cartucho de selección) y no se cargó con este fragmento Fab de unión a CD8. Por lo tanto, la primera columna debería mostrar un enriquecimiento específico de linfocitos CD8-Fab, mientras que la segunda columna (control negativo) no debería mostrarlo. Para medir el enriquecimiento se determinó la población celular de linfocitos T CD8+ dentro de las PBMC antes de iniciar el procedimiento de selección (Figura 5, diagrama A, linfocitos T CD8+ 18,4 %, cuadrante superior derecho). Tras someter la fracción de PBMC a la primera columna, se mide el flujo de células no retardadas (diagrama B, linfocitos T CD8+ 6,3 %). El 12,1 % (18,4 % - 6,3 %) o el 66 % de los linfocitos T CD8+ se unieron a la columna. A continuación, estas células pudieron eluirse específicamente mediante la adición de un tampón de biotina que interrumpía la interacción Strep-tag/Strep-tactin® y una etapa de lavado posterior (diagrama C + D, linfocitos T CD8+ 47 % y 62,2 %). En cambio, en la segunda columna (diagrama D-E-F-G) no se observó ningún enriquecimiento de linfocitos T CD8+, ya que la población de linfocitos T CD8+ en la fracción de paso (diagrama E, linfocitos T CD8+ 17,0 %) y en las fracciones de elución (diagramas F y G) no difiere significativamente de la medida antes del procedimiento de selección (diagrama A). Las diferencias de app. El 1 % de las células aplicadas corresponden a células unidas de forma inespecífica a la columna, lo que demuestra que el 95 % de las PBMC sometidas pasan a través de la columna.

25 **Ejemplo 2: Eliminación de biotina y Fab de los linfocitos C8+.**

Los linfocitos CD8+ se aislaron como se ha descrito anteriormente, excepto que las células después de la elución de biotina (tampón de 6 ml) se pasaron directamente a través de una columna de perlas de Superflow™ Sepharose® (volumen del lecho de 6 ml) que tenía Strep-Tactin® (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) unidas covalentemente a la misma con una capacidad de unión de 300 nanomol biotina/ml. Mientras que las perlas de Superflow™ Sepharose® sirvieron como matriz de permeación en gel para el aislamiento/enriquecimiento de las células diana, la Strep-Tactin® inmovilizada en las perlas tiene afinidad de unión tanto para los fragmentos CD8+ Fab que están equipados con el péptido de unión a la estreptavidina como para la biotina. Por lo tanto, Strep-Tactin® sirvió como reactivo de afinidad/remoción para la biotina y los fragmentos Fab CD8+. Se recogió la fracción eluida (6 ml) de esta segunda columna (que actuó como cartucho de extracción) lleno de perlas Superflow.

Los fragmentos de biotina y Fab no fueron detectables en la fracción eluida que contenía las células diana mediante un ensayo de biotina y un ensayo de fragmentos Fab mediante Western blotting (resultados no mostrados). Se realizó un experimento similar utilizando biotina marcada con FITC (Sigma) y CD8+ Fab marcado con fluorescencia (IBA GmbH). El hecho de que tampoco este eluido final contuviera fragmentos Fab o biotina se confirmó cuando se midió con un fluorímetro sensible. Por lo tanto, se descubrió, que mientras que la biotina y el Fab se eliminaron por completo, la fracción eluida tras la cromatografía Superflow™/ Strep-Tactin® contenía entre el 95 % y el 100 % de las linfocitos CD8+, sin pérdida evidente de células.

45 **Ejemplo 3: purificación en serie en cromatografía de "flujo lineal**

Dado que la fracción final descrita en el experimento 2 no contenía biotina ni Fab (ambos interferirían con un procedimiento de purificación posterior al bloquear los sitios de unión de Fab en Strep-Tactin®), los linfocitos CD8+ purificados pueden pasar a otro ciclo de purificación utilizando, por ejemplo, un fragmento Fab CD25+ (o cualquier otra molécula receptora que esté presente en la superficie de las células diana CD8+ aisladas). Dicha purificación en serie de linfocitos T puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando el aparato representado en la **Figura 6a o Figura 6b**.

55 **Ejemplo 4: Purificación de células mediante cromatografía en una matriz plana (membrana de nitrocelulosa recubierta de Strep-Tactin®)**

En este experimento, la matriz de cromatografía en columna ("tridimensional") (perlas recubiertas con Strep-Tactin®) utilizada para la purificación de células en los Ejemplos 1 y 2 se sustituyó por una matriz plana recubierta con Strep-Tactin®.

60 Procedimiento experimental:

1) Fijación no covalente de Strep-Tactin® a una membrana de nitrocelulosa y purificación de linfocitos T CD8+

65 Para la fijación no covalente de Strep-Tactin® en la membrana, un trozo de membrana de nitrocelulosa (24 cm², Whatman, Reino Unido) se colocó en una placa de Petri y se incubó con 4 mg de Strep-tactin® (IBA GmbH) en 10 ml

de PBS durante 10 minutos y, a continuación, se lavó 5 veces con 20 ml de PBS. A continuación, se añadieron 5 microgramos de fragmento Fab CD8+ (número de catálogo: 6-8003-005, IBA GmbH, Göttingen, citado anteriormente) en 5 ml de PBS y se incubaron durante 5 min a 4 °C. A continuación se añadieron 5 millones de células (PBMC) en tampón FACS (0,5 % BSA (p/v) en PBS pH 7,4) y se incubaron a 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se lavó la membrana cinco veces en 10 ml de tampón FACS y se recogieron las fracciones de lavado para el análisis FACS. A continuación, la membrana se incubó durante 5 minutos en 10 ml de tampón FACS con 1 mmol de biotina. La fracción resultante se recogió para el análisis FACS.

El análisis FACS mostró que la fracción que contenía biotina tenía una pureza del 99,1 % con respecto a los linfocitos T CD8+. El rendimiento de linfocitos CD8+ fue de aproximadamente el 1,5 % en comparación con el material de partida. Por lo tanto, este experimento demuestra que las células diana pueden aislarse eficazmente mediante cromatografía plana de forma "discontinua".

Ejemplo 5: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD8+ humanos mediante cromatografía en columna con Superflow™ Agarosa

Se cargaron 3 ml de Superflow Strep-Tactin® (300 nanomol de biotina), IBA GmbH, Göttingen, Alemania) en una minicolumna (Mobitec, Göttingen, Alemania). La columna se equilibró con tampón (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina, "tampón FACS") y, a continuación, PBMC de sangre humana (10 millones de células en 0,2 ml de tampón FACS) que previamente se habían incubado con 12 microgramos de Fab dirigido contra CD8 (número de catálogo: 6-8003, IBA GmbH, Göttingen) (como ya se ha dicho, la cadena pesada del fragmento Fab se fusionó carboxi-terminalmente con una disposición secuencial de dos módulos de unión a estreptavidina SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK). Esta columna actúa como cartucho de selección, tal como se define en el presente documento. La columna se lavó con 12 ml de tampón FACS por flujo de gravedad y después se realizó la elución con 12 ml de tampón FACS que contenía biotina 1 mM.

La fracción de lavado (12 ml) del tampón FACS contenía sólo un 1,77 % de linfocitos CD8+ en comparación con la fracción inicial (A), que contenía un 7,98 % de linfocitos CD8+, por tanto, el 77,8 % de los linfocitos CD8+ se retrasaron en la columna. La elución con la fracción tampón que contiene biotina (B, 12 ml) dio como resultado aproximadamente el 65 % de los linfocitos CD8+ unidos con una pureza del 98,5 %. Asimismo, este experimento demuestra que las células diana CD8+ pueden aislarse mediante cromatografía de inmovilización/afinidad reversible, tal como se describe en el presente documento, utilizando matrices cromatográficas disponibles en el mercado.

Ejemplo 6: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD8+ humanos mediante cromatografía en columna

Los linfocitos CD8+ humanos se purificaron a partir de PBMC purificadas en gradiente de densidad (Ficoll) mediante el uso de una columna preparada con 500 µl de agarosa Strep-Tactin® (la agarosa reticulada se obtuvo de Agarose Beads Technologies, Madrid, España con un tamaño de exclusión reducido en comparación con resina de perlas Superflow™ Agarosa) funcionalizada con 10 µg de fragmentos Fab anti-CD8 (número de catálogo: 6-8003, IBA GmbH, Göttingen). Con este fin, el fragmento Fab que lleva la disposición secuencial de los dos módulos de unión a estreptavidina SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK en el extremo C-terminal de la cadena pesada se cargó (inmovilizó) en la matriz de agarosa Strep-Tactin® bombeando 1000 µl de Fab que contenían tampón de lavado (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina) sobre la columna a una velocidad de 300 µl/min antes de la purificación celular. Para la purificación de las células diana se cargaron automáticamente en la columna 1×10⁸ PBMC recién preparadas (en 2 ml de tampón de lavado) a un caudal de 300 µl/min con una bomba peristáltica. Las células no unidas (CD8 negativas) se eliminaron posteriormente de la columna mediante ciclos de lavado repetidos (4x) con un total de 7 ml de tampón de lavado a una velocidad de 2 ml/min. Por último, las células diana CD8+ se eluyeron de la columna eliminando las células unidas de la matriz de afinidad mediante la adición de 5 ml de solución de D-biotina 100 µM (V=600 µl/min) y elución con 5 ml de tampón de lavado a 2 ml/min. Las fracciones CD8 positivas y negativas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Las células diana CD8+ se purificaron con un rendimiento del 80 % y una pureza del 88 %. En la **Figura 7** se muestran gráficos de puntos de las respectivas fracciones de partida, negativas y positivas, así como la pureza y el rendimiento correspondientes de una selección representativa.

Ejemplo 7: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD8+ humanos mediante cromatografía en columna a partir de sangre entera

Los linfocitos CD8+ humanos se purificaron a partir de sangre entera mediante el uso de una columna preparada con 1200 µl de agarosa Strep-Tactin® (la agarosa reticulada se obtuvo de Agarose Beads Technologies Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducido en comparación con resina de perlas Superflow™ Agarosa) funcionalizada con 30 µg de fragmentos Fab anti-CD8 (número de catálogo: 6-8003, IBA GmbH, Göttingen). Con este fin, el fragmento Fab que lleva la disposición secuencial de los dos módulos de unión a estreptavidina SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK en el extremo C-terminal de la cadena pesada se inmovilizó en la matriz de agarosa Strep-Tactin® bombeando 1500 µl de Fab que contenían tampón de lavado (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina) sobre la columna a una velocidad de 300 µl/min antes de la purificación celular. Para la purificación de las células diana se cargaron automáticamente en la columna 10 ml de sangre entera recién extraída (diluida 1:1 con tampón de lavado) a un caudal de 300 µl/min con una bomba peristáltica. Las células no unidas (CD8

negativas) se eliminaron posteriormente de la columna mediante ciclos de lavado repetidos (4x) con un total de 13ml de tampón de lavado a una velocidad de 2 ml/min. Por último, las células diana CD8+ se eluyeron de la columna eliminando las células unidas de la matriz de afinidad mediante la adición de 10ml de solución de D-biotina 100 μ M ($V=600 \mu$ l/min) y elución con 10ml de tampón de lavado a 2 ml/min. Las fracciones CD8 positivas y negativas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Las células diana CD8+ se purificaron con un rendimiento del 80 % y una pureza del 88 %. En la Figura 8 se muestran gráficos de puntos de las respectivas fracciones de partida, negativas y positivas, así como la pureza y el rendimiento correspondientes de una selección representativa.

Ejemplo 8: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD4+ murinos a partir de esplenocitos mediante una pipeta

Los linfocitos CD4+ se aislaron de los esplenocitos utilizando una punta de pipeta cargada con 80 μ l de resina de perlas de agarosa Strep-Tactin® (la agarosa reticulada se obtuvo de Agarose Beads Technologies, Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducido en comparación con Superflow™ Agarosa) funcionalizada con 2 μ g de fragmentos Fab anti-CD4. Las puntas de pipeta fueron cargadas con el material de agarosa por Phynexus Inc, EE.UU. El fragmento Fab utilizado comprendía los dominios variables de tipo salvaje del anticuerpo de unión a CD4 GK1.5 (Dialynas DP *et al.*, Immunol Rev. 1983;74:29-56, Entrada GenBank cadena ligera kappa: entrada en GenBank M84148.1 de cadena pesada: M84149.1) que lleva la disposición secuencial de los dos módulos de unión a estreptavidina SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHSPQFEK en el extremo C-terminal de la cadena pesada). La carga/inmovilización del fragmento Fab en la matriz de agarosa Streptactin® se consiguió pipeteando con una pipeta eléctrica manual 400 μ l de fragmento Fab que contenían tampón de lavado (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina) a una velocidad de 300 μ l/min sobre la matriz de cromatografía de agarosa antes de la purificación celular. Para la purificación de las células diana se aplicaron 1×10^7 esplenocitos murinos (en 0,5 ml de tampón de lavado) sobre la matriz de cromatografía presente en la punta mediante 3x ciclos repetidos de subida y bajada de la muestra utilizando una pipeta a una velocidad de 300 μ l/min. Este procedimiento de cromatografía "discontinua" con un movimiento ascendente y descendente del tampón que contiene las células equivale a utilizar un método basado en el flujo para inmovilizar las células en la matriz de cromatografía. Las células no unidas (CD4 negativas) se eliminaron posteriormente de la punta mediante triple lavado repetido (pipeteando el tampón de lavado arriba y abajo) con 1 ml de tampón de lavado a una velocidad de 2 ml/min. Por último, las células diana CD4+ se eluyeron de la punta eliminando las células unidas de la matriz de afinidad mediante la adición de 1 ml de solución de D-biotina 100 μ M ($V=600 \mu$ l/min) y elución con 2 ml de tampón de lavado (2x1 ml) lavado a caudal de 2 ml/min. Las fracciones CD4 positivas y negativas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Las células diana CD8+ se purificaron con un rendimiento del 95 % y una pureza del 85 %. En la Figura 9 se muestran gráficos de puntos de las respectivas fracciones de partida, negativas y positivas, así como la pureza y el rendimiento correspondientes de una selección representativa.

Ejemplo 9: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD4+ humanos mediante cromatografía en columna

Los linfocitos CD4+ humanos se purificaron a partir de PBMC purificadas en gradiente de densidad (Ficoll) mediante el uso de una punta de pipeta cargada con 80 μ l de agarosa Strep-Tactin® (la agarosa reticulada se obtuvo de Agarose Beads Technologies, Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducido en comparación con resina de perlas Superflow™ Agarosa) funcionalizada con 2 μ g de fragmentos Fab anti-CD4. El fragmento Fab CD4 utilizado era un mutante del fragmento Fab 13B8.2 descrito en la Patente de Estados Unidos 7,482,000 y Bes, C., *et al.* J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)). El fragmento Fab mutante denominado "m13B8.2" lleva el dominio variable del anticuerpo murino de unión a CD4 13B8.2 y un dominio constante consistente en el dominio CH1 humano constante de tipo gamma1 para la cadena pesada y el dominio de cadena ligera humano constante de tipo kappa, como se describe en la patente de los EE.UU. 7.482.000. En comparación con los dominios variables del fragmento Fab 13B8.2, en m13B8.2 el resto His en la posición 91 de la cadena ligera (posición 93 en la SEQ ID NO: 2) está mutado a Ala y el resto Arg en la posición 53 de la cadena pesada (posición 55 en la SEQ ID NO: 1) está mutado a Ala. Además, el fragmento Fab m13B8.2 lleva una disposición secuencial de los dos módulos de unión a estreptavidina SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHSPQFEK en el extremo C-terminal de la cadena pesada. El fragmento Fab se inmovilizó en la matriz de agarosa Strep-Tactin® con una pipeta eléctrica manual pipeteando 200 μ l de fragmento Fab que contenía tampón de lavado a una velocidad de 300 μ l/min antes de la purificación celular. Para la selección de las células diana se aplicaron automáticamente 1×10^7 de PBMC recién preparadas (en 0,5 ml de tampón de lavado) (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina) sobre la matriz de cromatografía presente en la punta mediante 3x ciclos repetidos de subida y bajada de la muestra utilizando una pipeta a una velocidad de 300 μ l/min. Las células no unidas (CD4 negativas) se eliminaron posteriormente de la punta mediante triple lavado repetido (pipeteando el tampón de lavado arriba y abajo) con 1 ml de tampón de lavado a una velocidad de 2 ml/min. Por último, las células diana CD4+ se eluyeron de la punta eliminando las células unidas de la matriz de afinidad mediante la adición de 1 ml de solución de D-biotina 100 μ M ($V=600 \mu$ l/min) y elución con 2 ml de tampón de lavado (2x1 ml) a un caudal de 2 ml/min. Las fracciones CD4 positivas y negativas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Las células diana CD4+ se purificaron con un rendimiento del 90 % y una pureza del 99 %. En la Figura 10 se muestran gráficos de puntos de las respectivas fracciones de partida, negativas y positivas, así como la pureza y el rendimiento correspondientes de una selección representativa.

Ejemplo 10: Purificación en una sola etapa de linfocitos CD4+ humanos a partir de sangre entera con una

pipeta

- Los linfocitos CD4+ se aislaron de sangre entera mediante el uso de una punta de pipeta cargada con 80 µl de agarosa Strep-Tactin® (la agarosa reticulada se obtuvo de Agarose Beads Technologies, Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducido en comparación con resina de perlas Superflow™ Agarosa) funcionalizada con 0,5µg de fragmentos Fab anti-CD4. El fragmento Fab de unión a CD4 m13B8.2 utilizado en el Ejemplo 9 también se utilizó en el Ejemplo 10. El fragmento Fab se inmovilizó en la matriz de agarosa Strep-Tactin® con una pipeta eléctrica manual pipeteando 200 µl de Fab que contenía tampón de lavado a una velocidad de 300 µl/min antes del aislamiento celular. Para el aislamiento de las células diana se aplicaron automáticamente 2 ml de sangre entera recién extraída (diluida 1:1 con 5
tampón de lavado) (PBS más 0,5 % de seroalbúmina bovina) sobre la matriz de cromatografía presente en la punta mediante 3x ciclos repetidos de subida y bajada utilizando una pipeta a una velocidad de 300 µl/min. Las células no unidas (CD4 negativas) se eliminaron posteriormente de la punta mediante cinco veces de lavado repetido (pipeteando 10
el tampón de lavado arriba y abajo) con 1 ml de tampón de lavado a una velocidad de 2 ml/min. Por último, las células diana CD4+ se eluyeron de la punta eliminando las células unidas de la matriz de afinidad mediante la adición de 1 ml 15
de solución de D-biotina 100 µM (V=600 µl/min) y elución con 2 ml de tampón de lavado (2x1 ml) a 2 ml/min. Las fracciones CD4 positivas y negativas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo. Las células diana CD4+ se purificaron con un rendimiento del 88 % y una pureza del 70 %. En la Figura 11 se muestran gráficos de puntos de una
selección representativa.
- 20 En este contexto, cabe señalar que la purificación posterior o el uso posterior de las células diana obtenidas en los Ejemplos 4 a 11, la biotina como eluyente y el fragmento Fab como reactivo de unión al receptor respectivo pueden eliminarse de la muestra de células diana mediante el "cartucho de extracción" descrito en el Ejemplo 2.
- 25 La indicación o discusión de un documento publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe considerarse necesariamente una aceptación de que el documento forma parte del estado de la técnica o es del conocimiento común general.
- 30 La invención se ha descrito en sentido amplio y genérico en el presente documento. También forman parte de la invención cada una de las especies y agrupamientos subgenéricos más restringidos que están dentro de la divulgación genérica. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia objeto, independientemente de si el material escindido se menciona específicamente en el presente documento.
- 35 Dentro de las siguientes reivindicaciones se incluyen otras realizaciones. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de una célula diana, en donde la célula diana tiene una molécula receptora en la superficie de la célula diana, comprendiendo el método:

- 5 - proporcionar una muestra, comprendiendo la muestra la célula diana, en donde la célula diana es un linfocito T,
 - proporcionar un reactivo de unión a receptores que comprende un sitio de unión monovalente B y un compañero de unión C,
 - 10 en donde el reactivo de unión al receptor es un fragmento de anticuerpo monovalente, en donde el sitio de unión monovalente B comprendido en el reactivo de unión al receptor es capaz de unirse específicamente a la molécula receptora en la superficie de la célula diana,
 - 15 en donde la constante de disociación (K_D) para la unión entre el reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptora es de baja afinidad, en donde la interacción de baja afinidad entre el reactivo de unión al receptor y la molécula receptora tiene una K_D en el intervalo de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-7} M, determinado por titulación de fluorescencia, diálsis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25 °C),
 - 20 o en donde la constante de velocidad de disociación (k_{off}) para la unión entre el reactivo de unión al receptor a través del sitio de unión B y la molécula receptora tiene un valor de aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o superior, determinado por titulación de fluorescencia, diálsis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25 °C),
 - 25 en donde el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión a receptor es capaz de unirse de forma reversible a un sitio de unión Z de un reactivo de afinidad,
 - en donde el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión al receptor comprende uno de biotina, un análogo de biotina, un péptido de unión a estreptavidina y un péptido de unión a avidina, y
 - en donde el reactivo de afinidad comprende estreptavidina, una muteína estreptavidina, avidina, una muteína avidina o una mezcla de las mismas,
 - 30 - exponer la muestra a cromatografía en columna sobre una fase estacionaria adecuada, en donde la fase estacionaria es un material no magnético o no magnetizable, en donde la fase estacionaria tiene inmovilizado el reactivo de afinidad, en donde el reactivo de afinidad comprende dos o más sitios de unión Z, en donde dichos sitios de unión Z forman un enlace reversible con el compañero de unión C comprendido en el reactivo de unión al receptor en donde el enlace reversible entre el compañero de unión C del reactivo de unión al receptor y el sitio de unión Z del reactivo de afinidad tiene una K_D en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} a aproximadamente 10^{-13} M, determinado por titulación de fluorescencia, diálsis de equilibrio o resonancia de plasmón superficial en condiciones de presión atmosférica (0,1013 MPa (1,013 bar)) y temperatura ambiente (25 °C), y en donde el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor se une a una molécula receptora de la superficie de la célula diana, inmovilizando así de forma reversible la célula diana en la fase estacionaria, en donde el reactivo de unión al receptor se inmoviliza en la fase estacionaria antes de aplicar la muestra que comprende la célula diana a la fase estacionaria;
 - cargar en la fase estacionaria un reactivo de competición, en donde el agente de competición es capaz de interrumpir la unión del compañero de unión C del reactivo de unión al receptor al sitio de unión Z del reactivo de afinidad, desplazando así al agente de unión al receptor; y
 - 45 - eluir las células diana de la matriz cromatográfica.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es o comprende un fluido, preferiblemente un fluido corporal, en donde el fluido corporal es preferentemente sangre o un componente sanguíneo.
- 50 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el fragmento de anticuerpo monovalente es un fragmento Fab, un fragmento Fv o un Fv monocatenario (scFv).
- 55 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la unión entre el sitio de unión B del reactivo de unión al receptor y la molécula receptora tiene una velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior, aproximadamente $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior o aproximadamente $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior.
- 60 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fase estacionaria comprende o consiste en un gel de polisacárido, un gel de poliacrilamida, un gel de agarosa, sílice injertada con polisacáridos, sílice injertada con polivinilpirrolidona, sílice injertada con óxido de polietileno, poli(2-hidroxietilaspartamida) sílice, sílice injertada con polí(N-isopropilacrilamida), un gel de estireno-divinilbenceno, un copolímero de un acrilato o una acrilamida y un diol, un copolímero de un polisacárido y N,N'-metilenbisacrilamida y una combinación de dos o más de ellos.
- 65 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el compañero de unión C incluido en el reactivo de

unión al receptor comprende un péptido de unión a estreptavidina Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys y el reactivo de afinidad comprende la muteína estreptavidina Val44-Thr45-Ala46-Arg47 o la muteína estreptavidina Ile44-Gly45-Ala46-Arg47.

- 5 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la exposición de la muestra a la cromatografía en columna comprende permitir que la muestra pase a través de la fase estacionaria de la columna cromatográfica y lavar la fase estacionaria con una fase móvil fluida, en donde la fase móvil fluida está al menos esencialmente vacía del reactivo de unión al receptor.

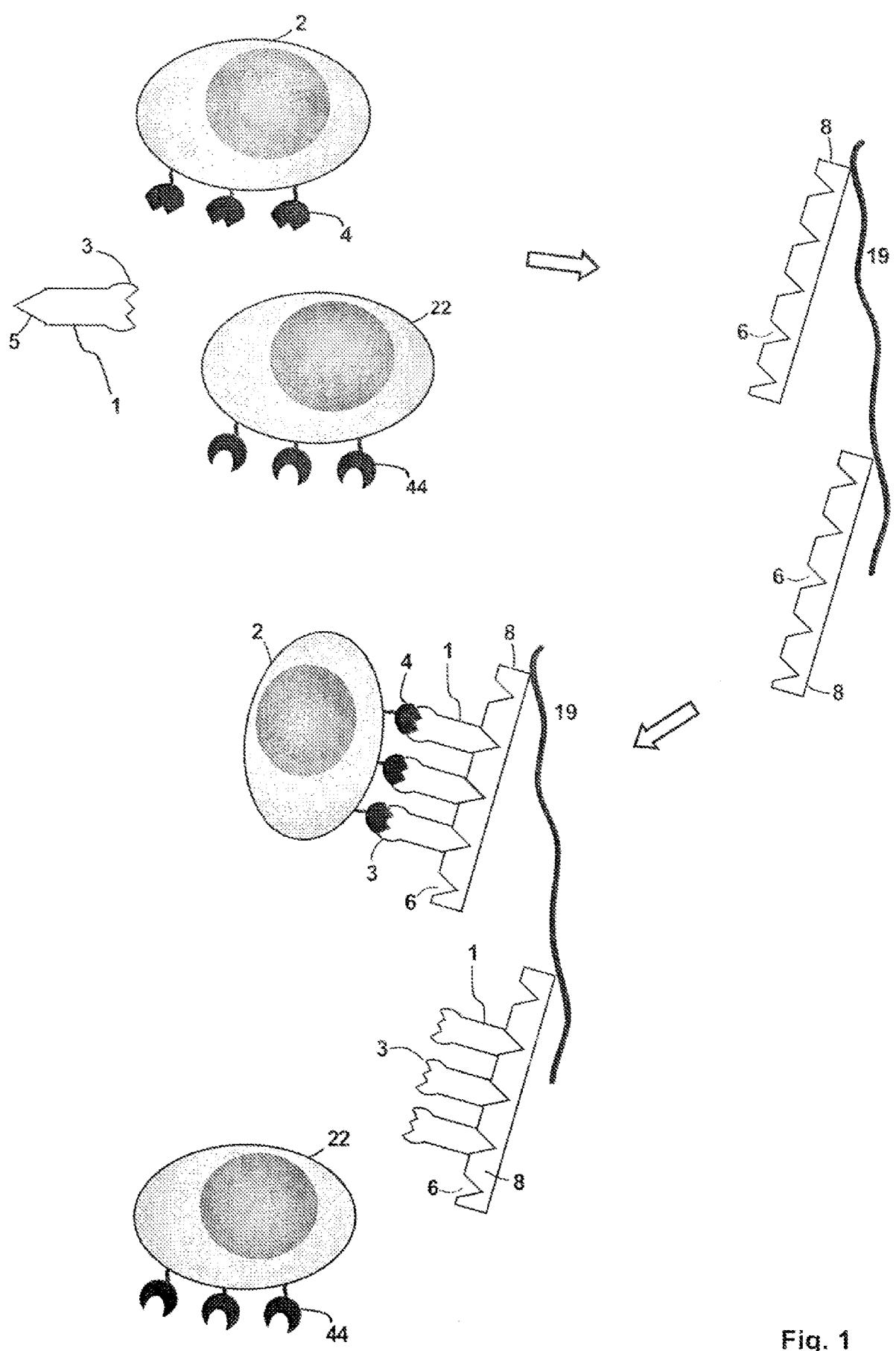
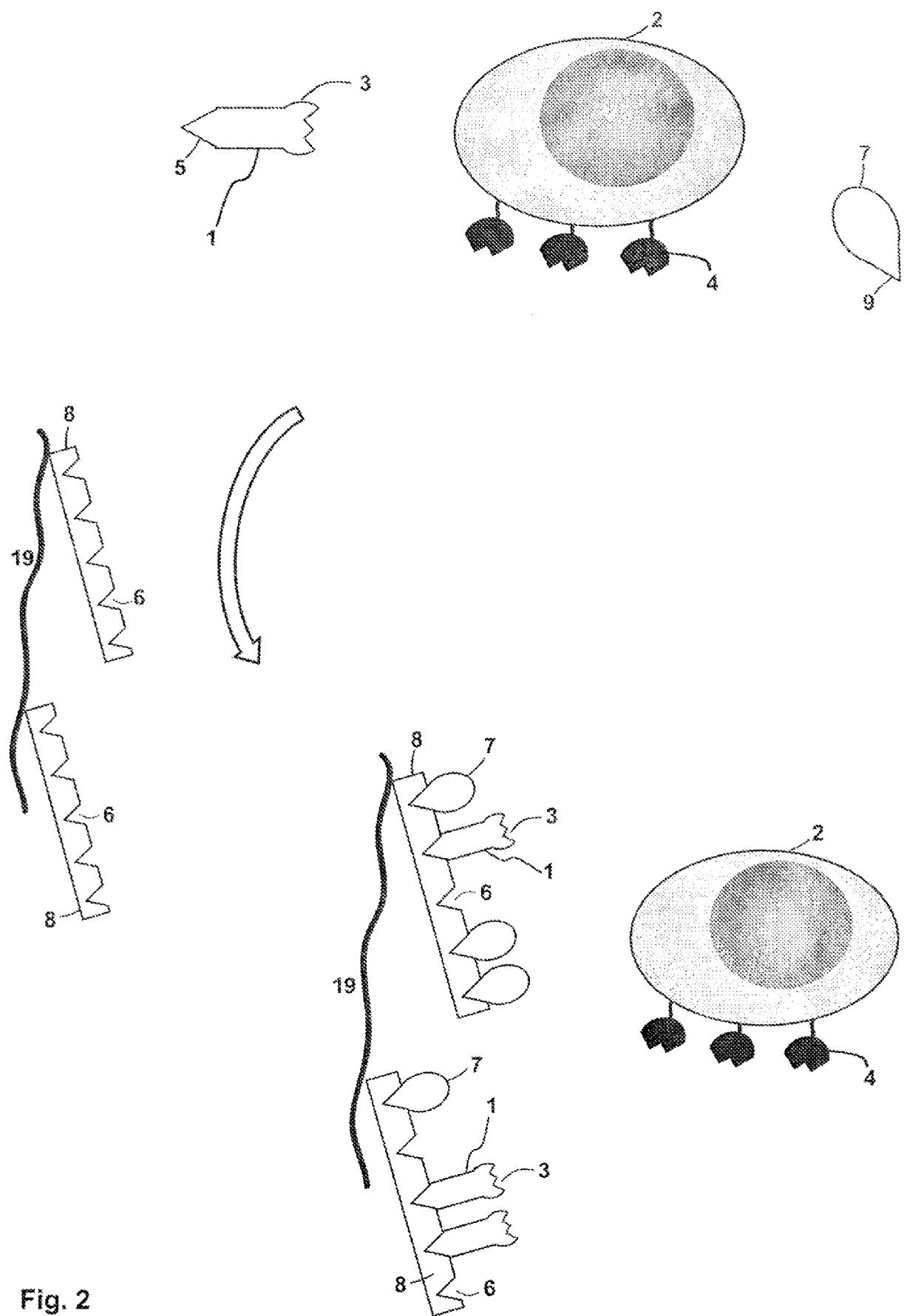


Fig. 1



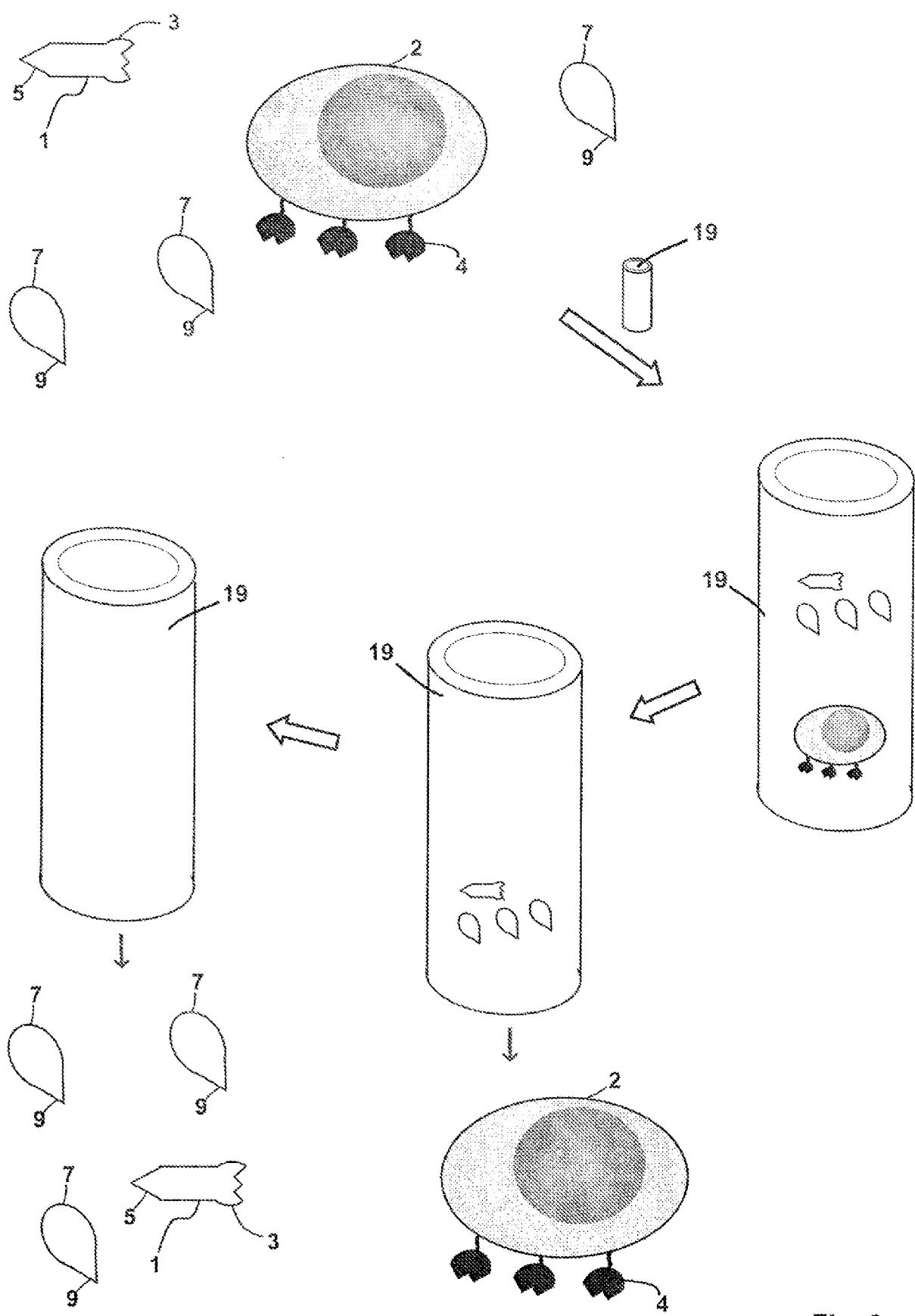


Fig. 3

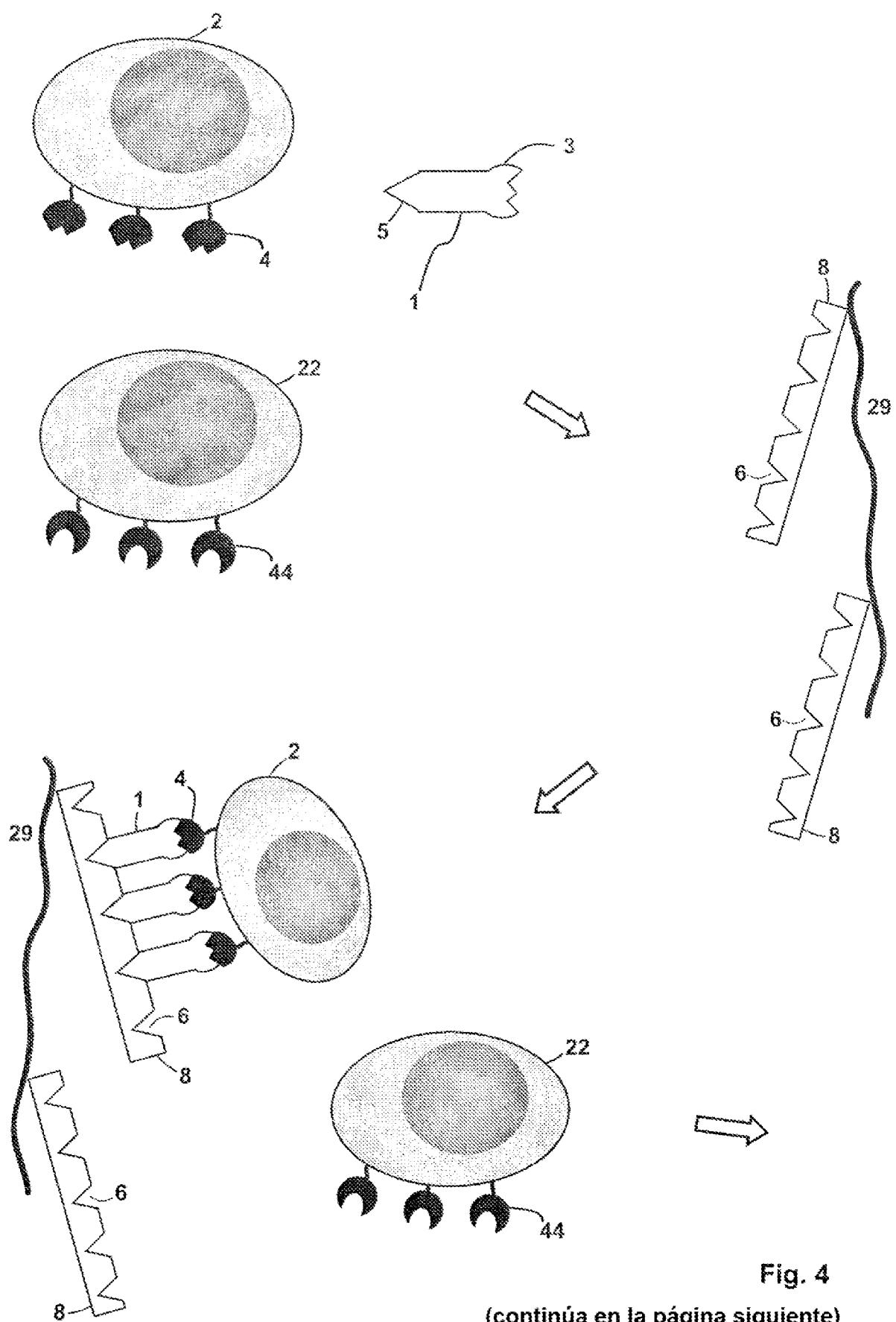


Fig. 4
(continúa en la página siguiente)

(continuación de la página anterior)

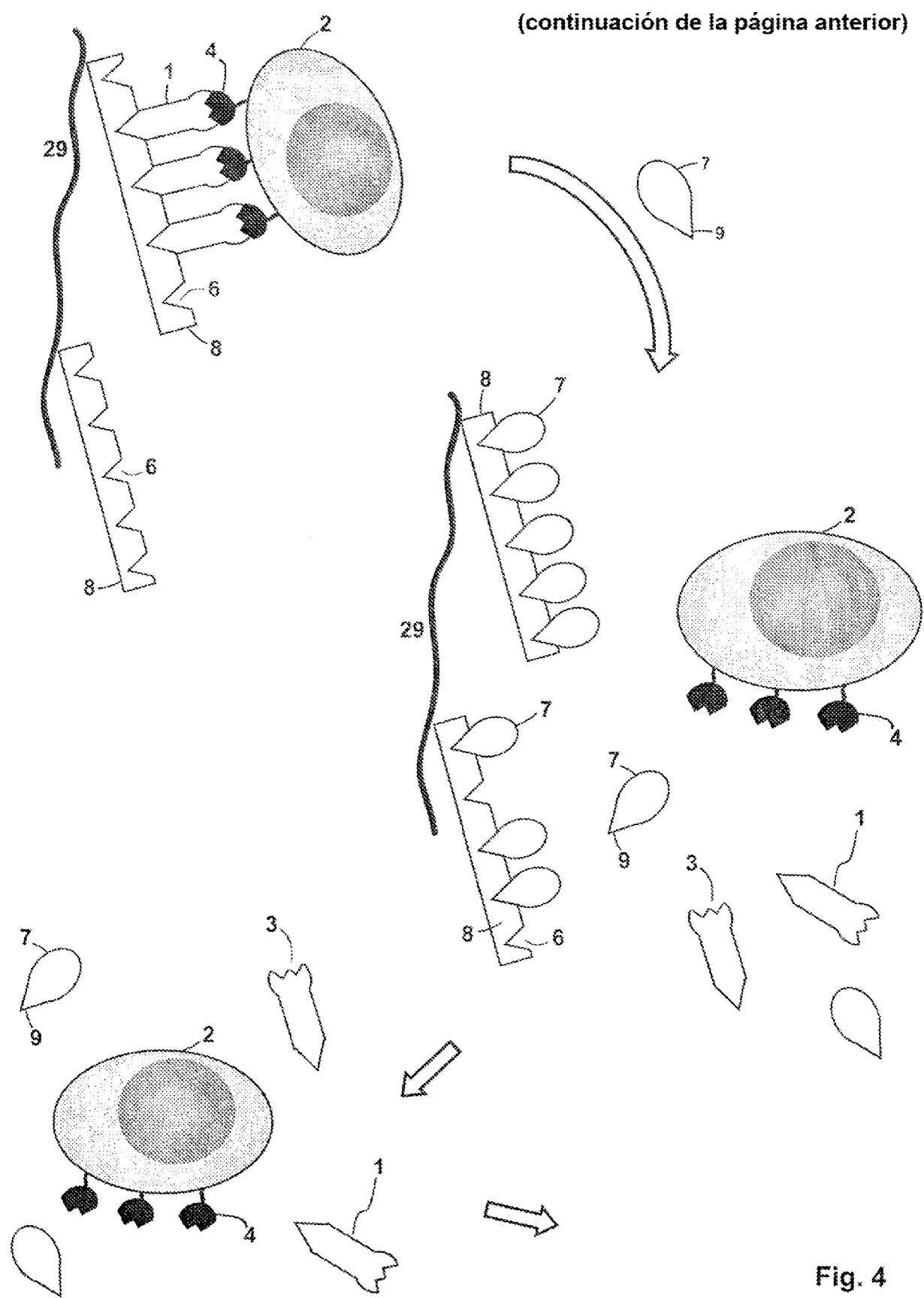


Fig. 4
(continúa en la página siguiente)

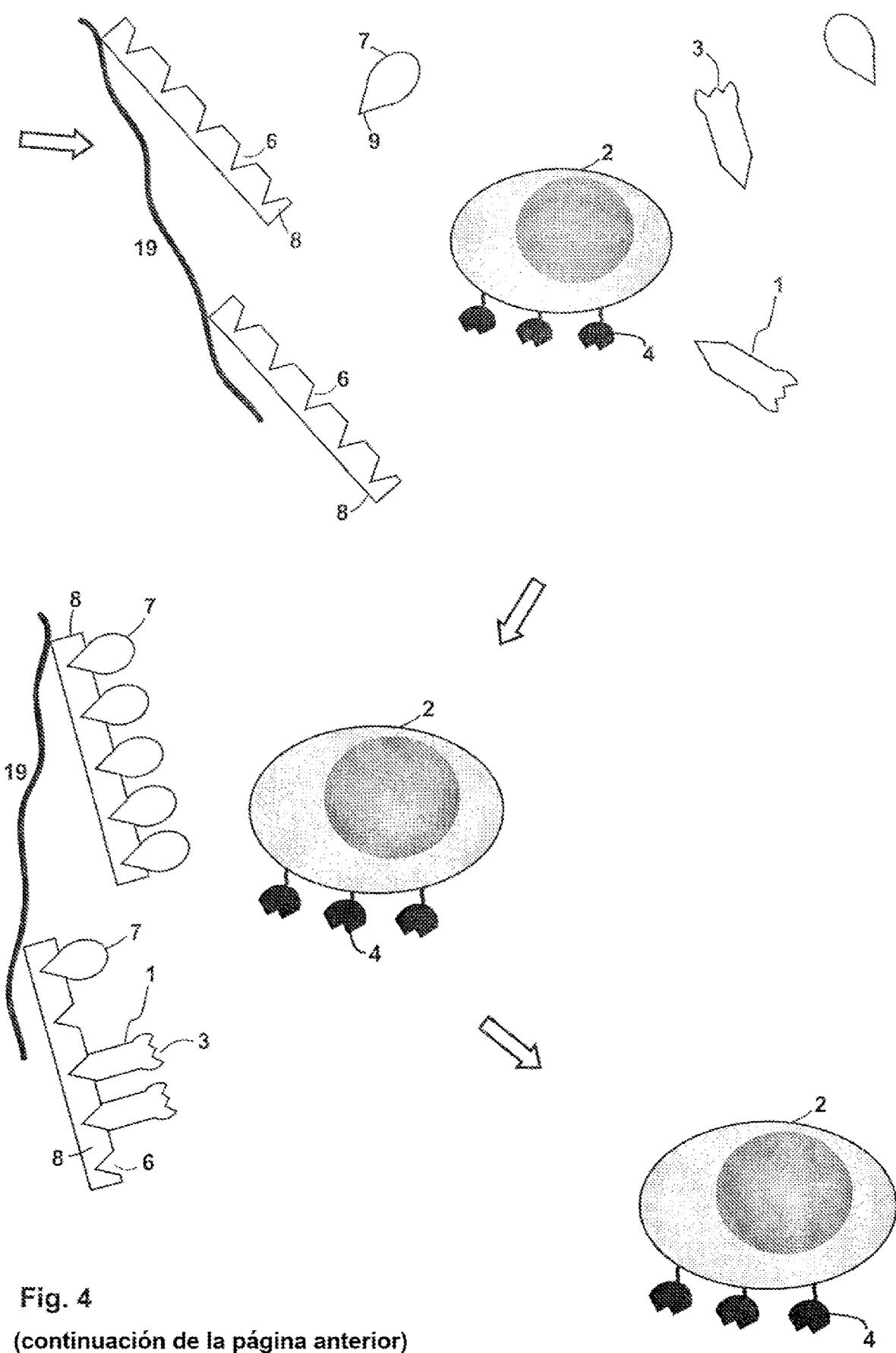
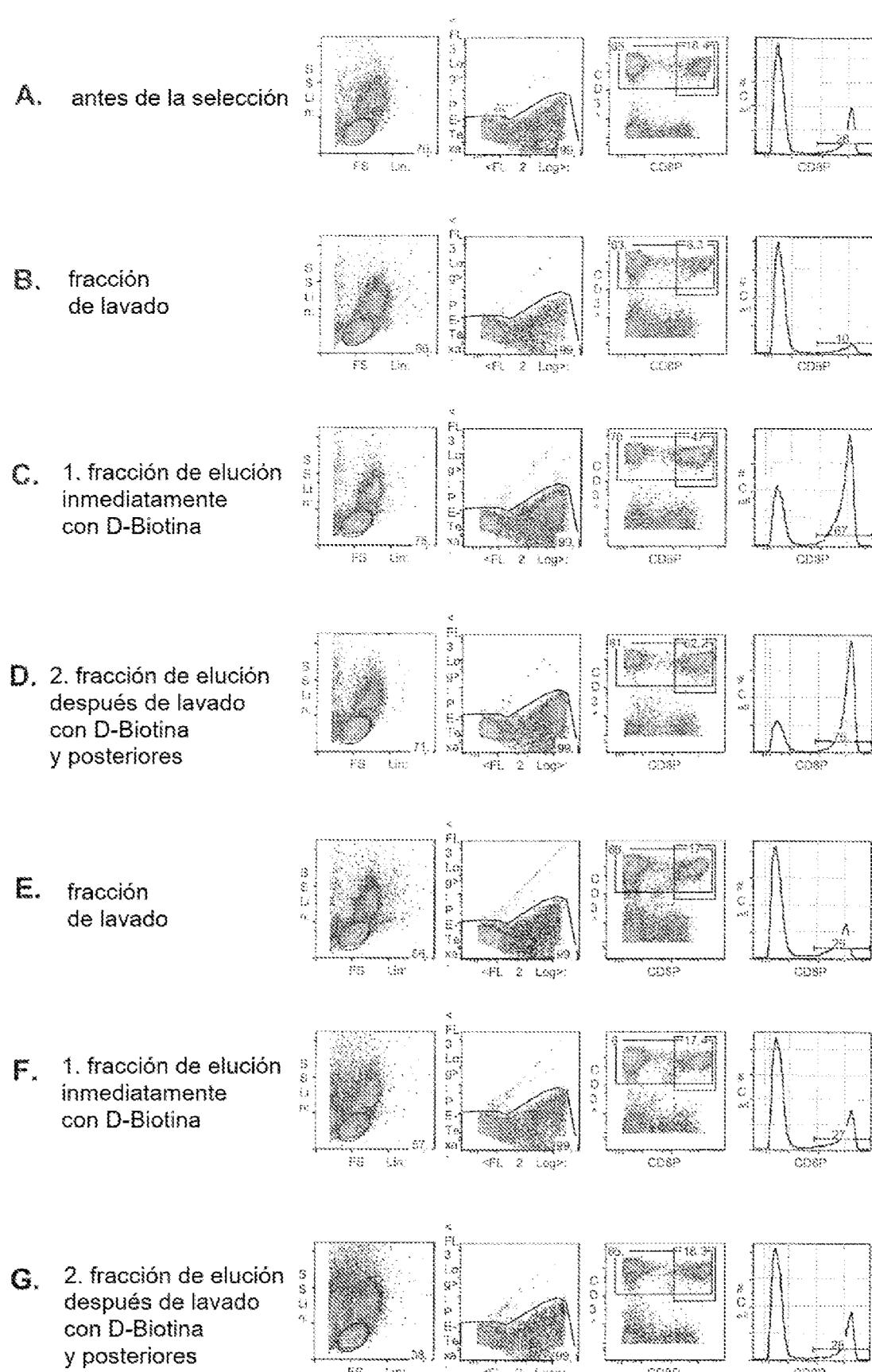


Fig. 4

(continuación de la página anterior)

**Fig. 5**

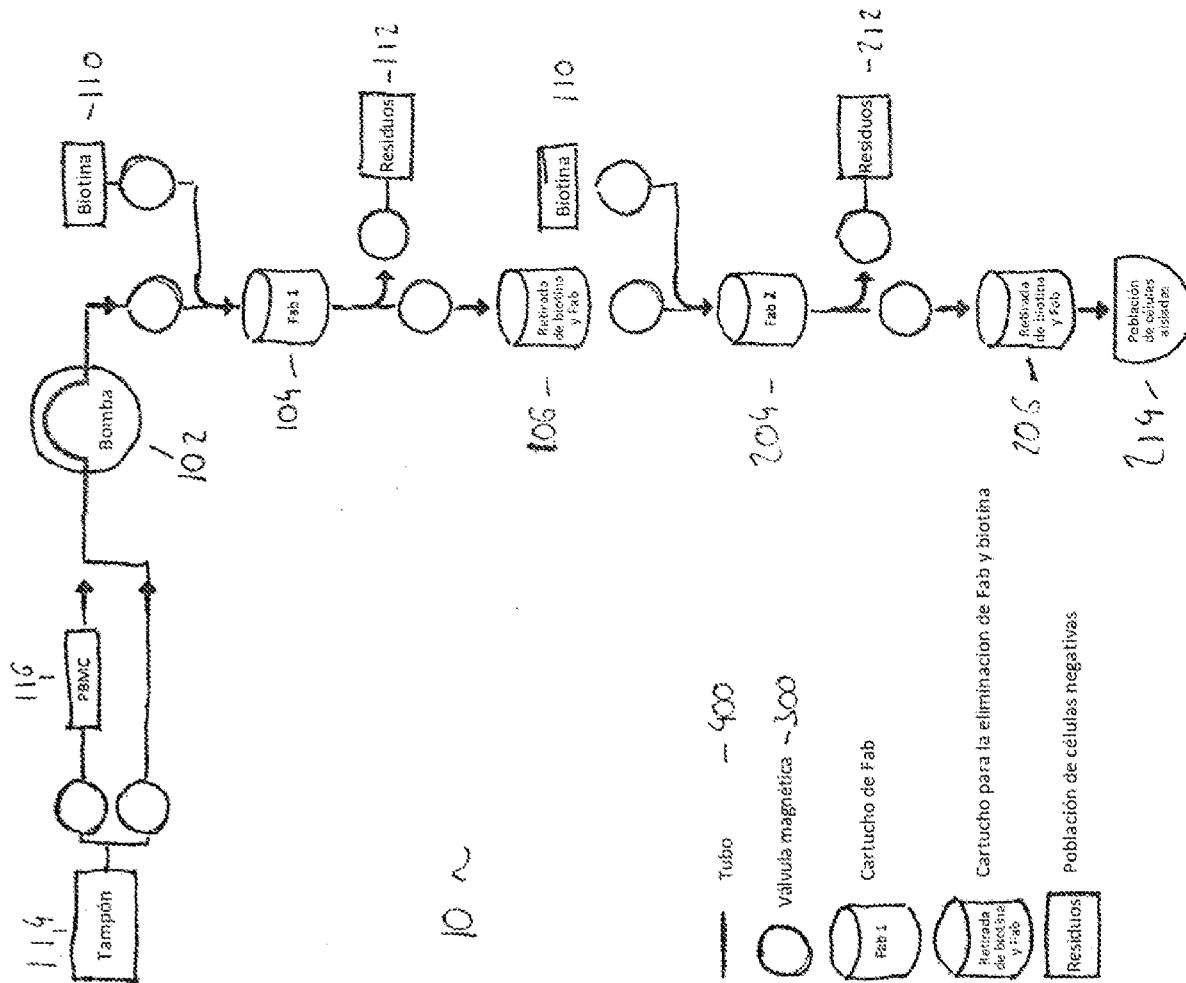


Fig. 6a

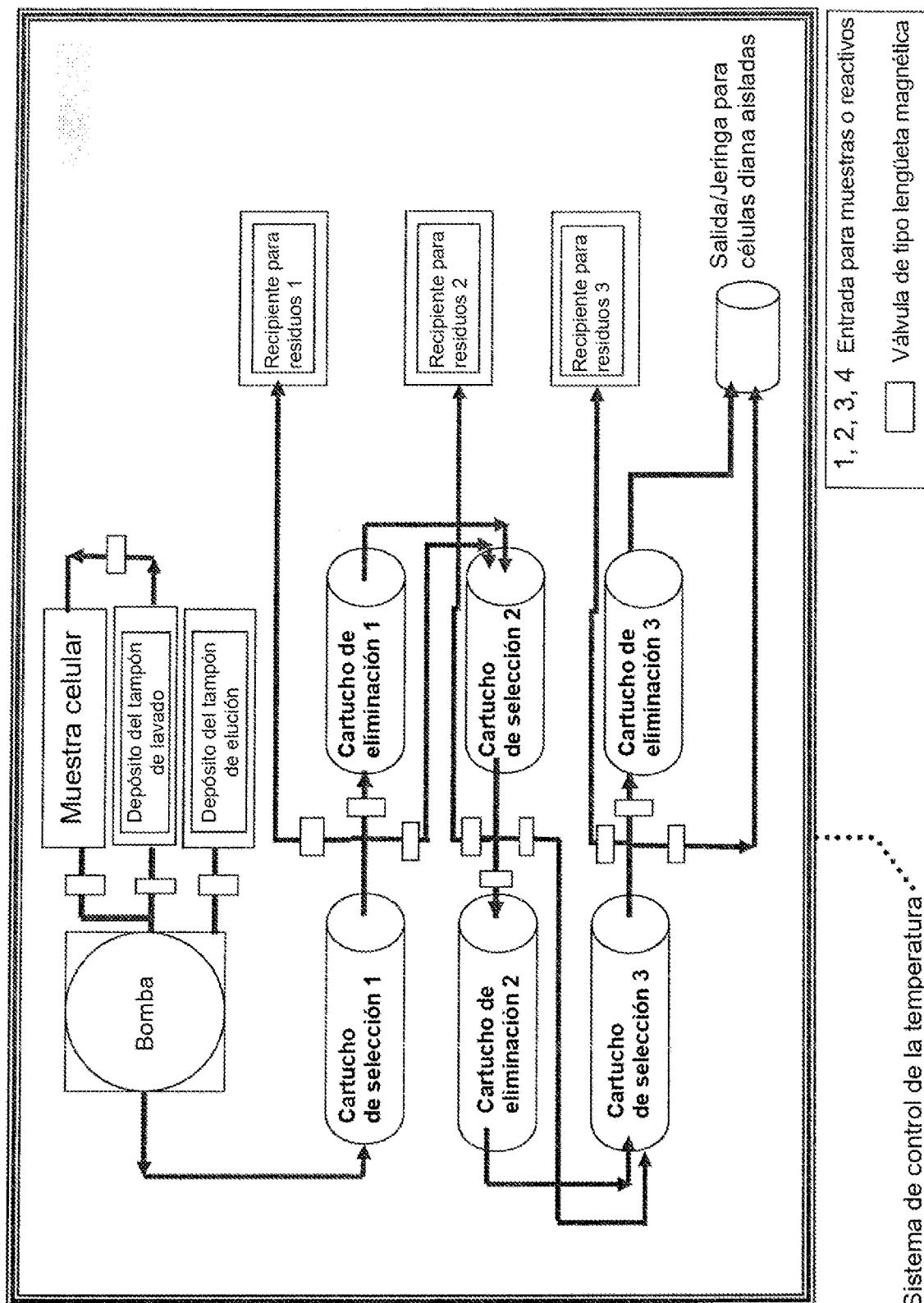


Fig.6b

ES 3 011 307 T3

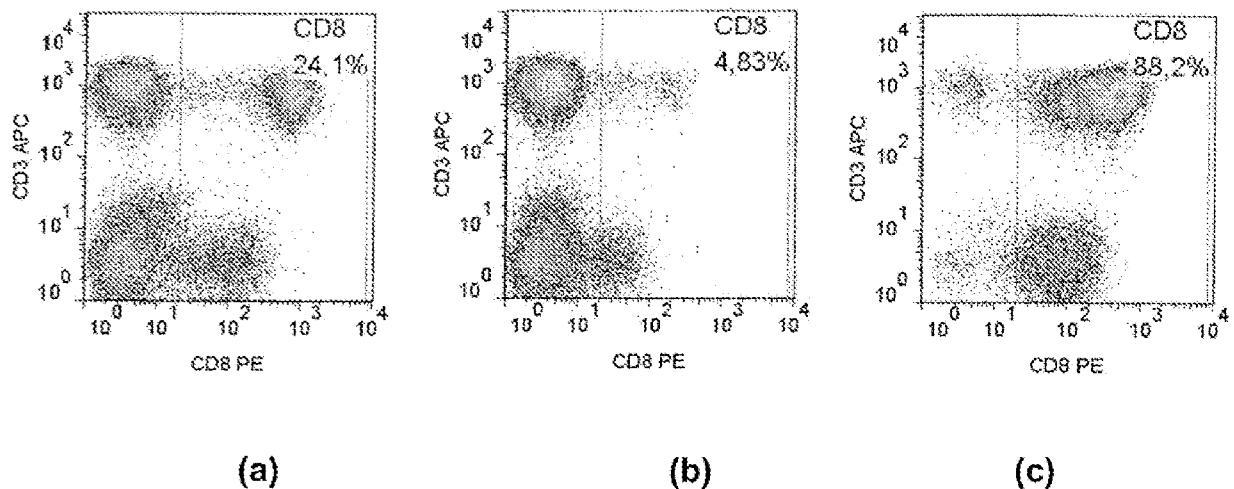


Fig. 7

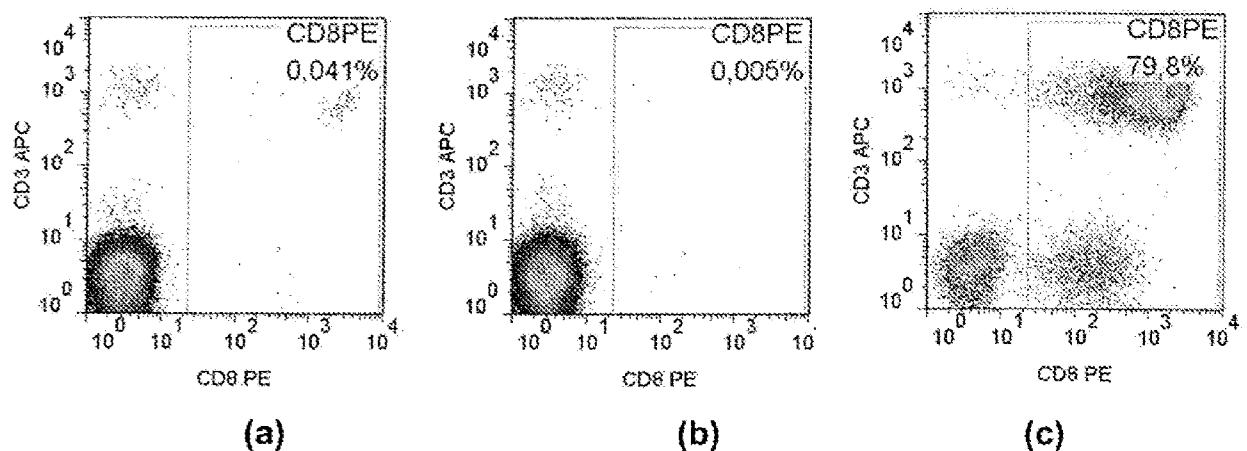


Fig. 8

ES 3 011 307 T3

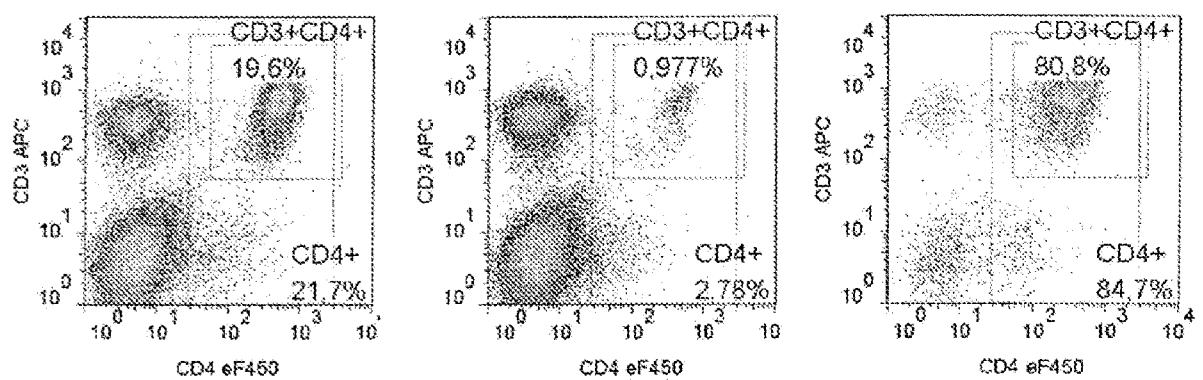
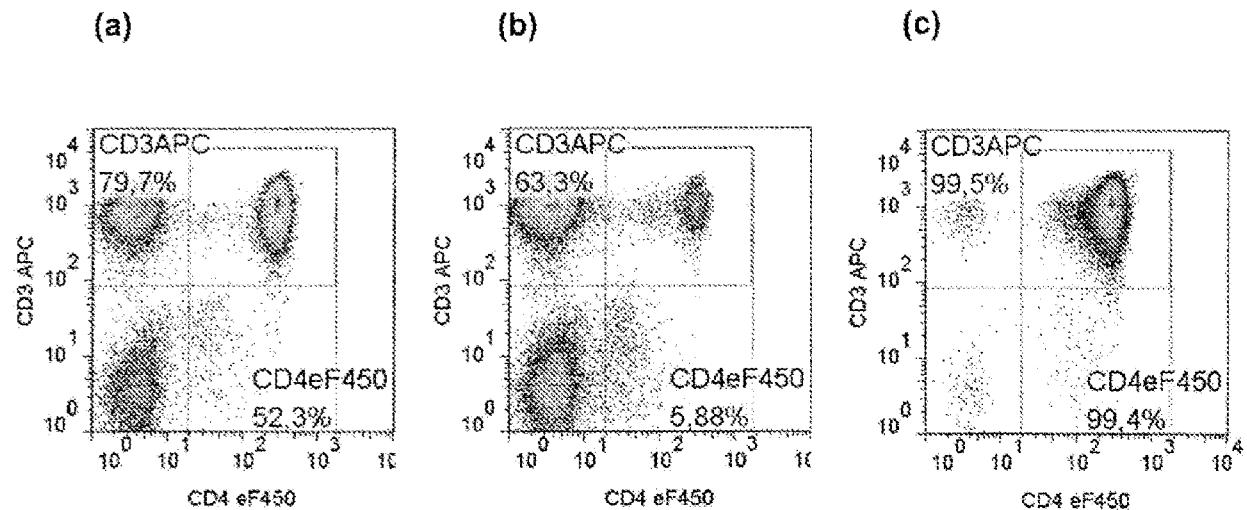


Fig. 9



(a)

(b)

(c)

Fig. 10

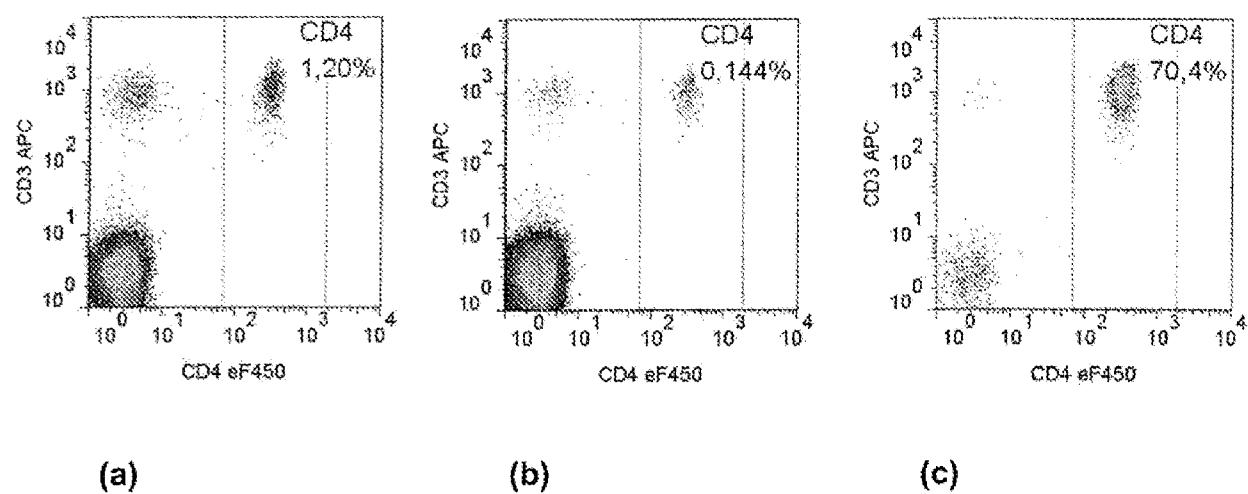


Fig. 11