



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 714**

51 Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04733792 .8**

86 Fecha de presentación : **19.05.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1625212**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Órgano de inmunidad artificial.**

30 Prioridad: **19.05.2003 EP 03011338**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es: **ProBioGen AG.**
Goethestrasse 54
13086 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Bushnaq-Josting, Hikmat;**
Riedel, Marco;
Marx, Uwe y
Giese, Christoph

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Órgano de inmunidad artificial.

5 La invención se relaciona con los dispositivos para la modelación fiel de las funciones de los órganos *in vitro*.

Antecedentes de la invención

10 El cultivo de células de mamíferos primarias es complicado en principio debido a su alta sensibilidad, proliferación relativamente baja, procesos de diferenciación complejos y la esterilidad absoluta como una condición básica.

15 En décadas recientes, los cultivos de tejidos *ex vivo* han sido descritos de manera extensa (Freshney). Los cultivos con altas densidades de células o como estructuras de tipo tejido requieren la separación del volumen de suministro y el espacio del cultivo, por ejemplo, mediante membranas semipermeables. En adición, este principio de suministro debe realizar soluciones efectivas para el suministro de oxígeno y otros nutrientes esenciales. Esto ha sido garantizado por membranas especiales, transportadores de oxígeno en solución, etc. En adición, debe ser posible someter el cultivo a tensiones mecánicas para poder introducir las estructuras y funciones fisiológicas específicas (por ejemplo la formación de cartílago funcional).

20 En el sistema birreactor más efectivo, la inducción de la *de novo* auto-organización pudiera ser mostrado *in vitro* en la literatura científica (hígado, cartílago, huesos, piel, etc.)

25 En los sistemas descritos, las células son usualmente inmovilizadas en espacios de cultivo de células muy bien suministrados y pueden ser removidas o trasplantadas como un todo (por ejemplo células islotes encapsuladas) desde allí para la aplicación terapéutica. En sistemas más complejos, tal como los sistemas de sustitución del hígado, el co-cultivo de tipos diferentes de tejidos y células puede también ser realizada. Sin embargo, de acuerdo con las aplicaciones respectivas de los sistemas de cultivo descritos, ninguno de ellos proporciona la posibilidad de garantizar la perfusión dimensionable/regulable continua de los tejidos inmovilizados con al menos un tipo de tejido móvil/población de células simultáneamente en adición a la *de novo* organización de las estructuras de tejidos y células primarias en un estado inmovilizado estacionario (sin movimiento).

30 En particular, el proceso de auto organización de las estructuras de tipo tejido es inducido por la migración de las células, la interacción célula-célula, la activación y la diferenciación debido al microambiente local. Para la formación de interacciones multicelulares en un cultivo de larga duración (por ejemplo algunas semanas) debe realizarse un balance definido entre el suministro mínimo pero adecuado de nutrientes, la remoción de los metabolitos inhibitorios y el soporte máximo de los micro-gradientes locales intrínsecos. Las citoquinas y los factores de crecimiento segregados por la fase inmóvil de células deben ser mantenidos en su lugar para que sean atractivos a las células migratorias o suspendidas de la fase móvil.

35 La inmunización *in vitro* de células humanas inmunocompetentes representa en última instancia la estimulación de una función de un órgano *ex vivo* y de esta forma se incrementa la demanda sobre el cultivo de células a un nivel aún más alto. Varios sistemas de cultivo de células están disponibles. En adición a los sistemas de dos dimensiones convencionales en los cuales las células son cultivadas sobre una superficie plana, la mayoría en el fondo del recipiente de cultivo, existen sistemas tridimensionales para el cultivo de células. Debido a la posibilidad del cultivo de células incluso en la tercera dimensión, este último ofrece un cultivo de células de tipo tejido el cual es de esta forma más cercano a las condiciones naturales.

Sistemas de cultivo de tejidos y células apropiados son descritos a continuación:

40 WO 99/43788 describe un sistema modelo *in vitro* para infección viral y para respuesta inmune el cual está compuesto de un bloque tisular a partir de un ganglio linfático o amígdala soportado sobre una matriz porosa y flexible, donde el bloque tisular es cultivado en un medio cuya superficie es congruente con la interfase bloque tisular/matriz. El sistema de cultivo puede ser usado para seleccionar drogas antivirales, para monitorear el curso de las enfermedades virales, y para monitorear una respuesta inmune a la estimulación de antígenos.

55 WO 89/11529 describe un birreactor que consiste de dos cámaras, una cámara de alimentación y una cámara de descarga, y una cámara para células separada por una membrana de ultrafiltración selectivamente permeable. Dentro de la cámara para células, una matriz tridimensional biocompatible atrapa las células animales. Debido a la presencia de esta matriz biocompatible, la cámara para células tiene una fase de gel, es decir, la matriz biocompatible y las células y una fase líquida contienen una solución concentrada del producto celular que puede ser aislado.

60 La patente US 5,416,022 describe un dispositivo para el cultivo de células ensamblado de manera fácil y compacta que tiene al menos un compartimiento para el cultivo de células cuyo interior representa el espacio de cultivo de las células.

65 WO 01/04262 se relaciona con un birreactor y un método para cultivar material orgánico, especialmente células, usando un medio de nutrientes. El cultivo del material orgánico es efectuado bajo un flujo constante de nutrientes.

ES 2 290 714 T3

DE-C-4230194 y EP-A-0 590 341 describe un reactor para el cultivo de células el cual es atravesado por dos sistemas de membrana de fibra hueca discretos y en los cuales el cultivo de células es efectuado en la red formada por las fibras huecas. El reactor es vendido bajo la denominación de "Tecnomouse®". El birreactor Tecnomouse® es un bioreactor de perfusión miniaturizado que permite los cultivos de células tridimensionales con circulación continua del medio y suministro de O₂. Cinco módulos diferentes de fibras huecas dispuestos en la parte superior uno del otro pueden funcionar allí de manera simultánea. Los módulos individuales son suministrados con un medio de nutrientes y una mezcla de aire/CO₂ cada uno mediante el dispositivo básico. El suministro del medio de nutrientes es realizado por una cabeza de bomba que permite un suministro variable del medio de entre 15 y 150 ml/h con cinco segmentos. Para el suministro de gas, el aire ambiental es pasado por medio de una bomba de membranas desde el incubador a través de una torre de gas hacia el módulo de fibras huecas respectivo. A través de membranas de silicona, las cuales limitan el módulo de fibras huecas correspondiente en la parte superior y la parte inferior del mismo, la mezcla de gas llega directamente al espacio de cultivo de células. Las fibras huecas dispuestas en paralelo en mallas estrechas forman el espacio intercapilar, garantizando el suministro de nutrientes y la eliminación de los productos finales del metabolismo. Las membranas de fibras huecas de Cuprophane empleadas permiten el paso de las moléculas hasta un tamaño de 10 kDa. En el espacio extracapilar que rodea las fibras huecas, las células son cultivadas. Dos puertos permiten la inoculación con las células y el medio así como con la cosecha de las células. El volumen del espacio extracapilar de un módulo de fibras huecas es de alrededor de 4.3 ml. El reactor Tecnomouse® fue primero establecido para la preparación de anticuerpos monoclonales como un método alternativo a los exámenes de animales. El desarrollo de la operación de sistemas limpios en términos de la tecnología de cultivo y el cálculo del volumen y las proporciones de tamaños fueron los objetos de estudios paralelos, en adición a los estudios para la caracterización de la incorporación de oxígeno (Maier y Nagel, tesis de diploma TU Berlín 1993; Wiesmann y otros, J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 531-536 (1994)).

Finalmente, EP-B-0 584 170 describe un proceso de cultivo y un dispositivo correspondiente en los cuales las células de mamíferos son cultivadas de manera simultánea en varios recipientes de cultivo separados en un circuito de suministro común, el circuito de suministro estando separado del recipiente de cultivo mediante una membrana de retención de células.

La patente US 5,290,700 también describe un reactor en el cual al menos dos circuitos de suministro diferentes están presentes.

El reactor de acuerdo a DE 3409501 y DE 4209501 tiene dos cámaras, una cámara para el cultivo de células y una cámara de suministro, las cuales están separadas por una membrana. DE-A-4229334 describe un recipiente correspondiente para el cultivo en forma de jarra con dos cámaras.

La patente US 4,242,460 describe un dispositivo para el cultivo de células en forma de serpentín en el cual el circuito de suministro está enrollado alrededor de la bobina del reactor como una bobina semipermeable. EP-A-0 365 313 describe un birreactor cilíndrico en el cual el suministro es garantizado por varios sistemas de tubería.

Las patentes US 4,220,725 y 4,647,539 y DE 3805414 describe un reactor el cual está atravesado por un manojo de capilares semipermeables.

WO 93/18133 describe un dispositivo para el tratamiento de cultivos de células en soportes de cultivo de células de antígenos tipo placa el cual es al menos parcialmente permeable al gas y sobre el cual un recubrimiento de colágeno es aplicado con el cultivo de células que va a ser cultivado. DE-A-4,322,746 propone fibras huecas como los soportes correspondientes de cultivo de células.

EP 0690125 se relaciona con un proceso para el cultivo por inducción de linfocitos T citotóxicos que tienen actividad asesina contra las células tumorales el cual comprende el paso de co-cultivar un tejido de un tumor que contiene dicha célula tumoral y un linfocito específico. El tejido del tumor puede ser inmovilizado.

La patente US 5,677,139 describe la expansión de células T hematopoiéticas. La expresión ocurre conjuntamente en cultivos con células estromales las cuales pueden estar presentes como una monocapa.

La patente US 6,479,064 se relaciona con un proceso para el establecimiento de un órgano artificial que utiliza un andamio tridimensional el cual esta cubierto por una capa de una capa de tejido endotelial y es puesto en contacto con una segunda población de células de cultivo.

La patente US 6,251,672 se relaciona con un proceso para cultivar células de mamíferos donde una primera célula de mamífero es puesta en contacto con una segunda célula de mamífero la cual está inmovilizada sobre un soporte sólido.

Todos los dispositivos y métodos de cultivo tridimensionales mencionados anteriormente no se aproximan aún al sistema natural en términos de eficiencia. En particular, no se garantiza un crecimiento controlado de las células y un suministro controlado del material celular que va a ser cultivado con factores/agentes regulatorios, especialmente otros tipos de células (en adición al suministro constante de nutrientes).

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que el cultivo de células/tejido en una fase estacionaria mediante contacto con una fase móvil que contiene células de un tipo diferente de células es esencial para la formación de tejidos funcionales, y es de vital importancia para tipos de tejidos particulares. De esta forma, la invención se relaciona con un dispositivo para el cultivo de células y/o tejido que comprende al menos un espacio de cultivo (2) que contiene la(s) matriz(ces) (8) apropiado para asentar las células y/o el tejido y al menos dos medios de entrega de fluido (14, 16; 27, 38) para entregar diferentes fluidos al espacio (2) o la matriz (8), donde al menos un gas de suministro o líquido de suministro libre de células (4) y al menos una fase móvil de células (6) es suministrado, donde

(i) dicha al menos fase móvil de células (6) fluye a través de la matriz (8) en un flujo atravesado; y

(ii) la matriz preferiblemente horizontal (8) es mantenida en una cámara hueca (20a, 20b) a través de la cual dicha al menos una fase móvil de células (6) fluye en un flujo atravesado.

El dispositivo anterior es apropiado para ejecutar un método para el cultivo de células y/o tejido que comprende el paso de cultivar las células inmovilizadas en uno o más espacios de cultivo en contacto con

(a) al menos una mezcla de gas definida o un líquido de suministro libre de células y

(b) al menos una fase móvil que contiene células de un tipo de células diferentes de aquella de las células inmovilizadas.

Las células y los tejidos son obtenidos mediante tal método.

El dispositivo de acuerdo a la invención es apropiado, inter alia, para la obtención bien encaminada de anticuerpos humanos y células humanas inmunocompetentes contra antígenos seleccionados (antígenos dianas).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una primera realización del dispositivo de acuerdo a la invención.

La Figura 2 muestra una segunda realización del dispositivo de acuerdo a la invención.

Las Figura 3 y 4 muestran una vista detallada y una vista atravesada, respectivamente, del dispositivo representado en la Figura 2.

La Figura 5 muestra el panel de marcadores de superficie típicamente usado para la caracterización de DC. Las barras muestran partes de las células que expresan cada marcador comparadas con todas las células detectadas positivas para el CD45, un marcador pan de linfocitos antes (■) y después (12 h; □) del proceso de diferenciación.

La Figura 6 muestra la cuantificación de fagocitosis mediante citometría de flujo. Los leucocitos, por ejemplo las DC pueden ser discriminados de las bacterias mediante tinte con ácido nucleico (PI sobre FL-2, A), las células que contienen bacterias marcadas con FITC pueden ser cuantificadas usando una estadística de cuadrantes (FL-1, B-D), la fagocitosis puede ser discriminada de la adsorción por incubación sobre hielo (C y D).

La Figura 7 muestra las DC formando una red dendrítica. Las células T entran en estrecho contacto con los dendritos y son activadas para la proliferación, las células T migran hacia los dendritos de las DC (A), las células T entran en estrecho contacto con las DC (flecha en B), las células T comienzan a proliferarse en contacto con las DC (flecha en C), las células T están formando clusters de proliferación flotantes (flecha en D).

La Figura 8 es un esquema de líneas de soporte para un dispositivo de la invención.

La Figura 9 muestra una tercera realización del dispositivo de acuerdo a la invención.

La Figura 10 muestra una cuarta realización del dispositivo de acuerdo a la invención.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo a la presente invención, “cultivo de tejidos y células inmovilizadas” significa un cultivo dentro del dispositivo en el cual las células son retenidas dentro de un compartimiento (espacio de cultivo) del dispositivo mediante la adherencia a las superficies o por medio de otros mecanismos fisiológicos o mecánicos.

“Fase móvil de células” o “fase móvil que contiene células” significa todas aquellas células dentro del dispositivo las cuales son movidas a través del dispositivo en un periodo particular de tiempo mediante un proceso bioquímico, biofísico o físico directo. Por ejemplo flujos de líquidos, campos electromagnéticos, gradientes atrayentes y presiones directas.

ES 2 290 714 T3

Un "líquido de suministro libre de células" está relacionado con cualquier tipo de medio de cultivo apropiado para el cultivo de células de mamíferos. Los medios de cultivos apropiados están en el ámbito de la persona experta. Un "mezcla de gas definida" de acuerdo a la invención está adaptada para garantizar la oxigenación de 80-100% del volumen del cultivo a 37°C comparado con una saturación de aire estándar una mezcla de gas es provista conteniendo 20-95% de O₂ (v/v). En caso de un medio de cultivo tamponado con carbonato debe ser proporcionada una concentración de dióxido de carbono del 5% (v/v) para asegurar un pH estable a 7.4 en el volumen del cultivo. Nitrógeno es suplementado hasta 75% (v/v).

En el método realizado con el dispositivo de acuerdo a la invención como fue descrito anteriormente, un co-cultivo de células apropiadas, por ejemplo, de células humanas inmunocompetentes primarias, es garantizado durante un periodo de varios meses. La funcionalidad dentro del co-cultivo es garantizada por poblaciones de células apropiadas (componentes celulares; sistema celular) las cuales son introducidas dentro de un espacio de cultivo apropiado usando una matriz de soporte. Un sistema de suministro continuo (tal como aquel del dispositivo de acuerdo a la realización (2) de la invención) debe asegurar las condiciones de cultivo constantes durante el periodo de cultivo completo. Las poblaciones de células empleadas forman unidades funcionales por auto-organización dentro de la matriz soporte.

El tejido y/o las células cultivadas (también brevemente referidos como "sistema celular" a continuación) están caracterizados porque las estructuras celulares y las funciones inmunológicas son allí imitadas que corresponden a aquellas de los tejidos inmunológicamente activos en forma de centros germinales de un ganglio linfático humano o del bazo humano.

La formación de la organización celular y la microestructura de un centro germinal esta garantizada por una concurrencia directa de diferentes tipos de células. Las funciones a ser imitadas *in vitro* incluyen la expresión de anticuerpos y la proliferación directa de células inducidas por antígenos y la formación de una memoria inmunológica sustentable.

La concurrencia de células que presentan antígenos, regulatorias y al final que expresan anticuerpos es necesaria para la producción selectiva de una respuesta inmune.

La distribución espacial ideal de las células inmovilizadas y la proporción óptima del mezclado de las células movilizadas (por ejemplo DC, linfocitos T, linfocitos B, etc.) de acuerdo al método ejecutado con el dispositivo de la invención garantiza interacciones óptimas de célula-célula.

En una realización preferida, las células dendríticas (DC, APC) que presentan el antígeno diana son primeramente introducidas en la matriz que ha sido preparada y equilibrada para el cultivo, y el cultivo es iniciado. Conjuntamente con la matriz, los DC adherentes representan la así llamada fase "estacionaria" en el sistema de cultivo. A esta fase estacionaria, son añadidos de manera apropiada los linfocitos T los cuales son inculcados en la matriz, migran allí dentro de manera direccional, se asocian con las DC de una manera antígeno específica y son así activados (cebados). En un paso subsiguiente o simultáneamente, los linfocitos B son inculcados los cuales a su vez se asocian con el complejo de las DC que presentan antígenos y las células T activadas correspondientemente y son también activados de una manera antígeno específica.

Comenzando a partir de estos complejos de APC y linfocitos T y B activados, las estructuras celulares son formadas las cuales se corresponden a la formación *in vivo* de un centro germinal (GC) o un centro germinal extrafolicular (efGC).

Las DC y efGC *in vitro* están caracterizadas por una proliferación masiva de células así como finalmente por la expresión de los anticuerpos. De esta forma ellos aumentan el tamaño y la masa celular. Para la interacción inicial de las APC con los linfocitos móviles que migran, la matriz empleada juega un papel crítico: por una parte, garantiza la accesibilidad de las DC por los linfocitos, y por otra parte, estabiliza un sistema de micro-gradientes de mensajeros secretores (citoquinas) en los alrededores inmediatos a la célula, lo que es de vital importancia para la interacción célula-célula. En adición, la matriz circundante es desplazada de manera incrementada de acuerdo con la expansión de los centros germinales. Al principio, los anticuerpos IgM son expresados y presentados en la superficie de la célula por los linfocitos B activados dentro de los centros germinales. Durante un periodo de varios días, ocurre un cambio para los anticuerpos de la subclase IgG, los cuales son finalmente expresados y presentados en la superficie celular de las células del plasma. Paralelo al cambio de las subclases, ocurre una maduración de la afinidad del anticuerpo con respecto al antígeno diana en el centro germinal *in vitro* por medio de una permutación somática. Esto ocurre a través de una proliferación preferencial de los linfocitos B antígeno específicos cuyos anticuerpos tienen una mayor afinidad por el antígeno y por lo tanto tienen un contacto prolongado célula-célula con las APC en comparación con otros linfocitos B que compiten (también dentro de los linfocitos T). De esta forma, su proporción en la expresión total de los anticuerpos antígeno específicos se incrementa (expansión clonal) y finalmente domina en el cultivo.

El número de células de memoria T y B específicas (para la inducción de una respuesta inmune secundaria) o linfocitos T y B naive (para la inducción de una respuesta inmune primaria) se hace corresponder con las APC disponibles en el co-cultivo. Mediante una proporción adecuada de los linfocitos T y B con respecto uno al otro y con las APC, la proximidad apropiada de las células que interactúan (para una migración y asociación exitosa) y la combinación de una masa celular total ideal del co-cultivo, la formación y la funcionalidad directa de los centros germinales en forma de producción de anticuerpos inducidos y proliferación de células están garantizadas.

Como células que presentan antígenos (APC), las células dendríticas portan el antígeno procesado sobre la superficie de la célula y de esta forma son capaces de activar las células helper T4 antígeno específicas (naive o T de memoria) las cuales están en una proximidad inmediata. La activación provoca la secreción de las citoquinas (IL-2, IFN γ) y la expansión clonal. La presentación del antígeno es efectuada a través de los receptores MHC de clase 2 unidos a membranas de las DC. Para una presentación apropiada, el antígeno es previamente unido a micropartículas y ofrecido a los APC para el procesamiento del antígeno y la fagocitosis. La adición del antígeno es efectuada tanto antes como durante el co-cultivo.

Las células dendríticas funcionales son obtenidas a partir de las preparaciones de sangre y diferenciadas *in vitro*. Los linfocitos son preparados a partir de los mismos o diferentes donantes. Ellos pueden ser preparados al mismo tiempo y crio-preservados durante el periodo de diferenciación de las DC o preparados en una fecha posterior. Un concepto autólogo es preferido para evitar efectos inmunogénicos entre las poblaciones de células involucradas. Para el co-cultivo, los linfocitos T autólogos o alogénicos son proporcionados en cantidades suficientes y a su debido tiempo tan pronto como la diferenciación de las DC y la presentación del antígeno son completadas. Dentro del alcance de la interacción célula-célula, los efectos regulatorios de los linfocitos T son utilizados. Para la inducción de una respuesta inmune existente, estos son células T de memoria (respuesta inmune secundaria) mientras que para la *de novo* generación selectiva de una respuesta inmune, los linfocitos T naive son empleados (respuesta inmune primaria). El suministro de una masa celular suficiente con una alta viabilidad de las células y la extensión del tiempo de vida de la población de células preparada es efectuado por medio de la expansión selectiva de células T.

También, linfocitos B autólogos son proporcionados en una cantidad suficiente y a su debido tiempo a los co-cultivos. En este caso también, las células B naive o células de memoria pueden ser empleadas, dependiendo de si una respuesta inmune primaria o secundaria va a ser inducida. La masa celular con alta viabilidad de las células puede ser obtenida mediante la revitalización de las muestras crio-preservadas en un tiempo asignado.

Las células T, las cuales son empleadas de manera predominante para los propósitos regulatorios, pueden activar células B específicas (naive o B de memoria) a través de los contactos célula-célula y la secreción de citoquinas y las inducen a la secreción de citoquinas y la expansión clonal. En adición, la expresión de la inmunoglobulina de célula específica está primero en forma de IgM (naive; respuesta inmune primaria) o en forma de IgG (células B de memoria, respuesta inmune secundaria, reacción de asistencia inmunológica) las cuales son móviles y migran por quimotaxis, atraídas por las APC. Las interacciones celulares son manifestadas en forma de una migración de células directa, la formación de contactos células-células, la secreción selectiva mutuamente estimulada de citoquinas con efectos autocrino y paracrino, la proliferación de células directa y la maduración de la afinidad accionada por antígeno de los anticuerpos formados (armado de anticuerpos).

Por lo tanto, las funciones importantes de los centros germinales formados *in vitro* consisten en una formación directa comprehensiva de células B antígeno específicas, la expresión de anticuerpos antígeno específicos, el cambio directo de subclases y la maduración de la afinidad de anticuerpos específicos para el antígeno diana.

La matriz extracelular de soporte y la manipulación del cultivo adicionalmente garantizan el auto-condicionamiento y la auto-organización de tipo tejido celular necesarias de manera crítica dentro del co-cultivo. Esto debe permitir la movilidad de las células así como la adhesión, la migración, la asociación y la proliferación. En adición, la matriz soporta el crecimiento de los cultivos germinales durante periodos de cultivo de varios meses. Para este propósito, las propiedades de difusión óptimas para los productos de desechos y sustratos del metabolismo de las células están garantizadas sin perturbar el microambiente local de los gradientes de citoquina. En adición, un desplazamiento o degradación controlada de la matriz de acuerdo con la expansión de formar centros germinales está garantizado.

En el dispositivo de acuerdo a la invención es preferido que la matriz del espacio de cultivo tenga una porosidad que permita un suficiente flujo por la fase móvil, la migración de las células dentro de la matriz y la formación de gradientes de flujo locales (microambientes) y preferiblemente tiene una porosidad de más de 30 μ m. Es preferido adicionalmente que los espacios huecos de la matriz tengan diámetros de al menos el doble del diámetro de las células de la fase móvil. Finalmente es preferido que la matriz sea seleccionada de geles, materiales porosos, tales como espumas de poros abiertos, textiles tejidos y textiles no tejidos.

El cultivo de larga duración de los centros germinales formados es asegurado mediante el suministro de manera continua del espacio de cultivo (por ejemplo, con líquido(s) de suministro libre de células). El sistema de suministro, el espacio de cultivo y la matriz pueden ser esterilizados y exhiben suficiente estabilidad del proceso durante meses para los cultivo de larga duración.

El suministro continuo garantiza un suministro consistente y suficiente de sustratos y la remoción de los productos finales limitadores del metabolismo. Un volumen del medio circula a través del sistema de cultivo y es subsiguientemente regenerado (equilibrado) a condiciones ideales de cultivo con respecto a la concentración de oxígeno y el valor del pH del medio. En adición, una parte del medio de cultivo circulante es cambiada de manera constante con una proporción de dilución selectivamente ajustable. Esto garantiza un suministro constante de células cultivadas con los sustratos relevantes del metabolismo y la eliminación de los metabolitos limitadores del crecimiento incluso durante periodos largos de cultivo.

ES 2 290 714 T3

En adición, el estado fisiológico del cultivo (consumo de sustrato, regresión de la citoquina, producción de anticuerpos) puede ser monitoreado por el muestreo de manera periódica del medio de cultivo circulante.

El espacio de cultivo está dimensionado para garantizar que una cantidad suficiente de células pueda interactuar y de esta forma una respuesta inmune contra cualquier antígeno deseado pueda ser inducida dentro del alcance de un co-cultivo autólogo.

El propio espacio de cultivo es llenado con una matriz que soporta el crecimiento y está atravesado por superficies de membranas microporosas, lo que garantiza el suministro de células con sustratos importantes y la eliminación de los productos finales deseados y críticos en una extensión suficiente sin perturbar el microambiente formado por la célula (gradientes de factores que tienen efectos autocrino y paracrino).

El transporte suficiente de sustancias desde el sistema digestivo a través de las superficies de las membranas hacia la matriz y finalmente hacia las células metabólicamente activas es controlado por:

1. el material y la apariencia micro estructural de las superficies de las membranas;
2. el arreglo mutuo geométrico de las superficies de las membranas;
3. pedazos de difusión limitada dentro del espacio de cultivo;
4. propiedades de transporte suficiente de la matriz en forma de buenas propiedades hidráulicas y difusión; y
5. suficiente biodisponibilidad de las sustancias disueltas dentro del volumen llenado con la matriz.

En particular, la administración y/o remoción de oxígeno y/o dióxido de carbono y/o sustratos mediante el gas o líquido de suministro libre de células es proporcionada por membranas microporosas de diferentes tamaños de poros: Una fibra hueca con un diámetro interior (ID) de 100 a 600 μm , un diámetro exterior (OD) de 200 a 1000 μm , un grosor de la pared (WT) de 25 a 200 μm , un tamaño del poro de 0.05 a 0.2. Una fibra hueca apropiada como membrana de difusión, cuando se usa gas es por ejemplo una de ID = 200 μm , OD = 300 μm , polipropileno (PP) y un tamaño de poro de 0.2 mm (Accurel, Membrana GMBH, Alemania); y una fibra hueca apropiada como membrana de filtración cuando se usa un medio líquido (permeable para los sustratos y los metabolitos por ejemplo glucosa, lactato) es por ejemplo una de ID = 500 μm , OD = 700 μm , polietersulfona (PESF) y un tamaño de poro de 0.2 - 5 μm (GKSS, Alemania).

Por otra parte, una perfusión periódica o constante del volumen del cultivo mediante un medio de cultivo libre de células líquido y/o suspensión de células es proporcionada por membranas microporosas de diferentes tamaños de poros para la perfusión de las células suspendidas (fase móvil de células), para la interacción con la fase estacionaria de células fija en el espacio de cultivo asistido por la matriz, para el suministro de sustratos y/o la remoción de metabolitos, para el suministro de oxígeno y/o dióxido de carbono y/o gas o líquido de suministro libre de células, por ejemplo una membrana plana que tiene un tamaño de poro de 10 a 150 μm y un grosor de 0.1 a 2 mm. Membranas apropiadas son una membrana de teflón plana permeable para las células con tamaño de poro de 80 μm (poros isoporosos definidos) de 1 mm de grosor, y una rejilla de teflón mecánicamente estabilizada, permeable para las células con tamaño de malla de 80 μm (Bohlender, Alemania).

El sistema de suministro y el espacio de cultivo permiten un muestreo continuo y también periódico del medio de cultivo y la cosecha de las células y de los productos celulares, tales como los anticuerpos secretados.

A la misma concentración de células, el contenido en por ciento de linfocitos en la población inicial debe de ser incrementado. Esto significaría una aproximación a la situación en la sangre humana (M. Classen y otros, Urban & Schwarzenberg, Munich, Viena, Baltimore (1991)) y a la fórmula propuesta por Borrebaeck y Danielsson de acuerdo a la cual una proporción de células T con respecto a las células B de 2 : 1 : 0.25 es estimada como una proporción óptima (C.A.K. Borrebaeck, 1989; L. Danielsson y otros, Immunology 61 (1987), 51-55). Para una comparación, la proporción de las células mencionadas en la población inicial de las MNC fue 2.7 : 1 : 1 o 0.8 : 0.25 : 0.25 y en el día 34 7 : 1 : 41 o 0.04 : 0.006 : 0.25. La separación de las células, especialmente el agotamiento de la población de monocitos, tiene un efecto desfavorable en el curso del cultivo.

Con respecto a la composición del medio de cultivo (y del(los) líquido(s) de suministro), una adición mayor de suero humano ha demostrado ser favorable con respecto a la suplementación del medio. También por analogía con los resultados de los exámenes descritos de cultivos de dos dimensiones, la adición de suero humano debe ser de alrededor del 10 - 12%. Borrebaeck y Danielsson están a favor de la adición de 10% de suero humano (C.A.K. Borrebaeck; 1989; L. Danielsson y otros, Immunology 61 (1987), 51-55). En el bioreactor Tecnomouse®, 4% de HSA fue añadido al medio de cultivo. El abandono del FCS como adición al medio parece ser posible. La inactivación del suero debe ser observada estrictamente de manera general. A pesar del modo ventajoso de cultivo tridimensional en el birreactor, no se pudo detectar una inmunización *in vitro* eficiente en el estado actual del desarrollo sin los estimulantes de las células T o B. En vista de la caída de los linfocitos, la cual fue desproporcionalmente alta en el transcurso, el uso de IL-2, por ejemplo, en una concentración de 50 U/ml, y adicionalmente la adición opcional de un medio condicionado de células T sería ventajosa. La concentración final empleada de 0.38 μg de HBsAg por ml estuvo dentro del rango

de concentración también estimado como favorable por Borrebaeck y Danielsson. Debido a que las células no son lavadas por un medio en el fragmento del órgano, sino que son suministradas por fibras huecas de malla estrecha que portan un medio en el espacio tridimensional, no existen razones para incrementar la concentración de Ag o IL-2 como es supuesto por la demanda incrementada de estimulante para la activación de linfocitos como es descrito por Ferro y Hoffmann (Ferro y *otros*, Immunobiology 188 (1993) 51-61; Hoffmann y *otros*, J. Immunol. Methods 179 (1995) 37-49).

El método que usa el dispositivo de acuerdo a la invención permite las siguientes realizaciones especiales:

- operaciones de larga duración para inmunización múltiple, arreglos paralelos y dimensiones para biomasas;
- monitoreo del proceso, por ejemplo, recuperando los anticuerpos específicos formados, o los cócteles de citoquina;
- la recuperación de células del plasma/linfocitos B hipermutados y rearreglados de manera específica de tipo humano y la recuperación del ARN/ADN de células individuales;
- transfección de una línea celular con el gen del anticuerpo para producir el anticuerpo monoclonal; y/o
- la recuperación de células asesinas/supresoras T de antígeno específicas para la terapia autóloga de sustitución de células.

El dispositivo de acuerdo a la invención es apropiado, en particular, para la realización del método descrito anteriormente. Las realizaciones específicas son mostradas en la las Figuras 1 a 4 y 8 a 10.

La invención es ilustrada adicionalmente por medio de las siguientes Figuras y Ejemplos.

Descripción detallada de las figuras

Las Figuras 1 y 2 muestran realizaciones alternativas de un dispositivo para el cultivo de células y/o tejido, que tiene un espacio de cultivo 2 para asentar las células y/o el tejido al cual flujos de líquidos diferentes 4, 6 pueden ser suministrados, preferiblemente de manera continua, específicamente al menos un líquido de suministro libre de células 4 y al menos una fase móvil de células 6.

En la Figura 1, los flujos de líquidos 4, 6 son guiados en líneas permeables 14, 16 en paralelo con una superficie circunferencial y a lo largo de esta superficie circunferencial del espacio de cultivo 2.

Debido a la permeabilidad de las líneas 14, 16, el líquido de suministro libre de células 4 y la al menos una fase móvil de células 6 puede difundirse hacia la matriz 8 contenida en el espacio de cultivo 2.

En la Figura 1, el intercambio de material está indicado por las flechas que apuntan a los poros esbozados 25 de las líneas 14, 16. Las líneas preferiblemente consisten de capilares, específicamente fibras huecas que tienen un diámetro de alrededor de 50 a 150 μm , preferiblemente alrededor de 80 a 120 μm , cuya porosidad es de alrededor de 30 a 500 kDa. Los poros 25 pueden ser mejor vistos en las Figuras 3 y 4.

Las líneas 14, 16 están provistas a lo largo de superficies de contacto 10, 12 del espacio de cultivo 2 de la matriz 8, la Figura 1 también muestra pasajes a través de las superficies de contacto del espacio de cultivo 2 los cuales son representativos de la porosidad de la matriz.

Si varias líneas 14 para los líquidos de suministro 4 van una al lado de la otra, preferiblemente en paralelo, entonces su distancia mutua es del doble a diez veces, preferiblemente de tres a cinco veces, el diámetro del capilar.

Mientras las líneas 14, 16 para al menos un líquido de suministro 4 y la fase móvil de células 6 están provistas a lo largo de una superficie lateral externa del espacio de cultivo 2 o la matriz 8 en el Ejemplo de la Figura 1, el Ejemplo de la Figura 2 proporciona que la matriz 8 sea mantenida en una cámara hueca 20a, 20b, preferiblemente horizontal, estando la matriz circulada por un flujo de al menos una fase móvil de células 6 en un flujo atravesado, mientras al menos un líquido de suministro 4 puede ser suministrado a través de líneas de poros 14, especialmente capilares, las cuales pasan a través del interior de la matriz 8, preferiblemente en paralelo.

La matriz 8 puede ser soportada por una pantalla 18a, 18b sobre el lado inferior o sobre ambos lados. El tamaño de los poros de la pantalla 18a, 18b es preferiblemente alrededor de 30 a 100 μm .

En el ejemplo de la Figura 2, la matriz 8 es una lámina que tienen un grosor de alrededor de 1 a alrededor de 15 mm, preferiblemente alrededor de 2 a 10 mm. La matriz 8 es sostenida dentro de la cámara hueca formada por dos mitades de la carcasa 20a, 20b, las cuales reciben la matriz 8 entre ellas con o sin los dispositivos de soporte 18a, 18b. Las mitades de la carcasa tienen partes de brida 22a, 22b las cuales tienen un puerto 30 para que el líquido de suministro 4 sea suministrado por un lado de los mismos, y, por el otro lado, un puerto 32 para descargar el líquido de suministro 4, el cual puede opcionalmente ser recirculado. A partir de la parte del puerto 30, el líquido de suministro

ES 2 290 714 T3

4 es distribuido a varias líneas 14 que pasan preferiblemente a medio camino a través de la matriz 8 y están dispuestas en paralelo, lo que es mejor observado en la Figura 4.

En la Figura 2, en una dirección atravesada con respecto al espacio de cultivo 2 o la matriz 8, desde la parte superior hasta la parte inferior, una fase móvil de células 6 es suministrada, es decir, en el lado de entrada a través de un puerto 34. Por debajo de la matriz 8, la fase móvil de células puede ser descargada nuevamente a través de un puerto 36 y recirculada. Las partes de bridas 22a, 22b están selladas contra las mitades de la carcasa 20a, 20b de la cámara hueca por medio de sellos 24.

La Figura 8 muestra una construcción esquemática para el dispositivo de la invención que incluye líneas de soporte, que controlan y monitorean. Una mezcla de gas preparada definida (por ejemplo: N₂ 75%, O₂ 20%, CO₂ 5%, Linde AG) es aplicada en un flujo definido (por ejemplo 10 - 100 cm²/min) para equilibrar una concentración de oxígeno disuelto (pO₂) en el espacio de cultivo de preferiblemente 90% (comparado con la saturación relativa del aire). El gas es tomado de un cilindro de gas comprimido 101 filtrado de manera estéril por un filtro 102 y humidificado en una botella de lavado con placa porosa 103. El gas es suministrado por el puerto lateral 104, expulsado en el puerto opuesto 105 y dirigido hacia una trampa estéril (segunda botella de lavado con placa porosa, 106) para evitar la contaminación bacteriana de atrás.

La circulación de la suspensión de células y/o el medio de cultivo de células para la perfusión del módulo de cultivo es accionada por un dispositivo de bombeo peristáltico (107) con un flujo constante de 100 µl/min en un sistema de fluidos de circuito cerrado de alrededor de 12 ml. Un puerto para la inyección o el sondeo del medio y/o suspensión de células está integrado en el circuito de circulación (108).

Los analizadores 109 para pO₂ y los analizadores 110 para el pH son implementados para monitorear el suministro de oxígeno y los valores estables de pH (Fibox 3, pH-1 mini, PreSens GMBH). Puntos sensores estériles (111, 112) son fijados dentro del módulo de cultivo y leídos mediante fibra óptica montada en la carcasa del módulo de cultivo. La transparencia de la polisulfona usada para la carcasa del módulo de cultivo (grosor en el puerto de sondeo (d = 1 mm) permite la lectura óptica de la fluorescencia (tiempo de vida de la fluorescencia).

La Figura 9 muestra una realización alternativa del dispositivo para el cultivo de células y/o tejido en una vista en sección. El dispositivo es similar al mostrado en la figura 2. Por lo tanto, las partes iguales o similares son nombradas con los mismos signos de referencia.

Las diferencias principales son que las mitades de la carcasa 20a y 20b son cilíndricas de manera que puedan ser atornilladas en la parte de brida 22a. Cada una de las mitades de la carcasa 20a y 20b tiene un orificio cilíndrico 21a, 21b que tiene una rosca para recibir un tubo 27a, 27b. Al conectar las mitades de la carcasa 20a, 20b a las partes de brida 22a, un buen sellado puede ser logrado usando los sellos 24, 26, 28. En el otro lado de los sellos, el dispositivo de soporte 18a, 18b es presionado contra un reborde 36. Entre los dos dispositivos de soporte 18a, 18b el espacio de cultivo 2 o la matriz 8 están localizados.

Los tubos 38 para el líquido de suministro libre de células 4 son mantenidos en las partes de brida 22c dentro de los orificios 40 donde los orificios 40 y los tubos 38 tienen las correspondientes roscas. Entre las partes de brida 22a y 22a una tercera parte de brida 22b es provista para sellar la conexión de las dos partes de brida 22a y 22c.

La Figura 10 muestra un dispositivo que es similar a la Figura 9 en una vista en sección a lo largo de la línea I-I en la Figura 9, donde la mitad de la carcasa 20a tiene medios adicionales. Para monitorear las células y el medio dentro de la matriz 8, dos puertos 40 y 42 o fibra óptica son provistos dentro de la mitad de la carcasa 20a. La fibra óptica puede ser conectada a un punto sensor 46 para el pH y a un punto sensor 44 para el pO₂.

La otra parte del dispositivo mostrado en la Figura 10 es idéntica a la de la Figura 9.

La invención es descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Químicos, Materias Primas y Equipamiento de Laboratorio

Muestras de sangre para la preparación de células primarias (ejemplo 1, 2) (Haema Holdings AG, Alemania);

Muestras de sangre para la preparación de las MNC (ejemplo 3, 4) (IKIT, Universidad de Leipzig, Alemania);

Muestras de médula (ejemplo 4) (Universidad de Leipzig, Alemania);

Frascos T 75 cm² (Nunclon EasyFlask, Nunc);

ES 2 290 714 T3

Frascos T 25 cm² (Nunclon EasyFlask, Nunc);

Placas multicavidades, 24 cavidades (Nunclon, Nunc);

5

Techno Mouse (Integra Biosciences, Alemania);

Incubador de Células (Cellsafe, Heraeus, Alemania);

10 Aire suplementado con dióxido de carbono al 5%, 37°C de temperatura, humedad al 90% de humedad relativa;

Citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, Alemania);

Detección de citoquina por ELISA (Quantikine-Immunoassay, R&D-Systems Bierman, Alemania);

15

Detección de citoquinas por ensayo de citometría de flujo (CBA, BD Biosciences, Alemania);

Microscopio Invertido (Olympus IX-50, Olympus Deutschland, Alemania);

20

Cámara CCD Digital a Color (DP-50, Olympus Deutschland, Alemania);

Autoclave (Tecnoclav 120, Fedegari, Integra Biosciences, Alemania).

25

Esterilización

Incubación de los artículos en una atmósfera saturada de vapor de agua de 121°C de temperatura y una presión de 100 kPa sobre la ambiente (presión) durante 20 min.

30

Todos los componentes del birreactor de perfusión fueron esterilizados por irradiación gamma (17 kGy) ensamblados de manera estéril bajo un dispositivo de flujo laminar. La inoculación de las células suspendidas (alrededor de 1x10⁶/módulos) fue hecha también bajo condiciones esterilizadas. La regulación del birreactor que incluye el módulo de cultivo y los fluidos de soporte es transferida a un incubador termoregulado (37°C).

35

Medio de cultivo

medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Invitrogen);

40

suero de feto de ternero (FSC, HyClone, USA);

citoquinas (IL-4, GM-CSF, TNF- α) (AL-Immunotools, Alemania);

45

Anticuerpos

Anticuerpos para citometría de flujo (BD Biosciences, Alemania)

50

Reactivos/Abreviaturas

CD1a - CD86 Cluster de marcadores definidos de Diferenciación sobre la superficie de la célula establecido en diagnóstico clínico.

55

FITC Isotiocianato de fluoresceína, fluorocromo para el marcado de proteínas de enlace por ejemplo anticuerpos

PerCP Fluorocromo para el marcado de proteínas de enlace por ejemplo anticuerpos (diferente longitud de onda de excitación/emisión para fluorescencia de FITC)

60

PE Ficoitirina, fluorocromo para el marcado de proteínas de enlace por ejemplo anticuerpos (diferente longitud de onda de excitación/emisión para fluorescencia de FITC o PerCP)

células T linfocitos T humanos de preparaciones de sangre periférica

65

células B linfocitos B humanos de preparaciones de sangre periférica

ES 2 290 714 T3

	APC	Las células que presentan antígeno son partes que se exponen de moléculas antigénicas que usan las moléculas complejas de mayor histocompatibilidad (MHC II) sobre la superficie de sus células, por ejemplo las células dendríticas (DC)
5	DC	Células dendríticas
	GC	Los centros germinales son una estructura histológica en el ganglio linfático o el bazo y juegan un importante papel en la respuesta inmune humoral en el hombre
10	efGC	Los centros germinales extra foliculares son una forma especial de los centros germinales con una estructura histológica y reducida en el ganglio linfático y el bazo y pudieran también ser encontrados en órganos no linfáticos por ejemplo la costura sinovial de las extremidades
15	IL-2 - IL-12	Interleucinas, sustancia mensajeras altamente específicas para la comunicación entre los leucocitos involucrados en la quimotaxis celular y la activación de las células
	IFN- α , β , γ	Interferon, sustancias mensajeras altamente específicas para la comunicación entre los leucocitos involucrados en la quimotaxis celular y la activación de las células
20	GM-CSF	Factor de estimulación de la colonia de Macrófagos y Granulocitos, sustancias mensajeras altamente específicas para la diferenciación y activación de las células
	FCS	suero fetal de ternero, preparación biológica de sangre de terneros no nacidos
25	DNA / RNA	ácidos nucleicos (ácido desoxiribonucleico, ácido ribonucleico) moléculas específicas con información de codificación del genoma y del transcriptoma en células
	SFM / SFM2	medio de cultivo de células para la aplicación libre de suero (Gibco, Invitrogen)
30	ELISA	Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas, método analítico para la cuantificación y detección específica de péptidos y proteínas
	MNC	Células mononucleares (Leucocito de la preparación de sangre periférica)
35	HbsAG	Antígeno del virus de la hepatitis B común
	HLA-DR	Antígeno del leucocito humano, tipo DR celular y factores de antígeno tisular para el reconocimiento auto y no auto del sistema inmune
40	IgM / IgG	Inmunoglobulinas, moléculas de anticuerpos de tipo M o G
	PWM	Mitógeno Pokeweed, lectina herbal de pokeweed con alta potencia mitogénica e inmunogénica (de Sigma-Aldrich)
45	LPS	Lipopolisacrido, partes de la pared celular de las bacterias (<i>E. coli</i>) con alta potencia mitogénica e inmunogénica (de Sigma-Aldrich)
	CMV	Citomegalovirus, virus patógeno al humano latente

50 Ejemplo 1

Generación y subcultivo de células competentes inmunes

55 Para investigar las funciones inmunes celulares las células dendríticas, los linfocitos T (células T) y los linfocitos B (células B) *in vitro* fueron sub-cultivados o generados a partir de muestras de sangre humana de un solo paciente para garantizar un concepto autólogo para los co-cultivos posteriores compuestos de diferentes poblaciones de células.

60 Las células mononucleares (MNC) fueron separadas de la sangre total o preparaciones de leucoféresis por medio de centrifugación en gradiente de densidad. Las células competentes inmunes humanas fueron aisladas mediante separaciones magnéticas inmunes por marcadores de superficie en un primer paso para CD14 y en un segundo paso para CD4 y CD19. Adicionalmente un agotamiento del CD25 fue aplicado para remover las células regulatorias con potencial supresor.

65 Las sub-poblaciones aisladas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de cultivo de suero fetal de ternero (FCS; HyClone).

Los monocitos obtenidos por la separación de CD-14 fueron usados para diferenciar células dendríticas (DC) humanas mediante estimulación de citoquinas. Por lo tanto la IL-4 y GM-CSF fueron suplementadas 24 h y 48 h después de la preparación (cada 800 IU/ml para 2×10^6 células/ml). TNF- α adicional fue añadido el día 8. Las DC fueron caracterizadas mediante citometría de flujo para marcadores de superficie y la actividad de la fagocitosis.

La dotación de CD14 negativo fue cultivado en el medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternero y puede ser crio-preservado a -80°C por tres meses. El medio de crio-conservación estaba compuesto del medio RPMI 1640, 25% (v/v) de suero fetal de ternero y 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich).

Las células T y B fueron obtenidas usando la dotación de CD14 negativo a partir de la separación de CD14-(+) aislados o después de la revitalización de las muestras crio-preservadas por separación para CD19 o CD4 respectivamente.

Las DC generadas fueron caracterizadas mediante citometría de flujo para un panel de marcadores de superficie (marcadores CD) y capacidad para la fagocitosis (Phagotest, BD Biosciences). Después del día 12 de la diferenciación las DC generadas mostraron desplazamientos típicos en la expresión de los marcadores de superficie como está descrito en la literatura: El marcador CD14 de monocitos desapareció el primer día de la suplementación con citoquina (IL-4; GM-CSF). Por el contrario el marcador CD1a se intensificó. Durante el proceso de diferenciación el CD40, CD83 y CD86 se incrementaron significativamente. El marcador HLA-DR, la mayor parte del complejo MHC-II que es importante para la presentación del antígeno fue expresado de manera consistente (Fig. 5).

Las DC generadas muestran una actividad fagocítica mejorada comparada con las células CD-14 positivas aisladas recientemente (monolitos/macrófagos). La actividad fagocítica se incrementó desde 6.33 a 16.15%. Por lo tanto las DC fueron incubadas con bacterias marcadas fluorescentes (*E. coli*-FITC) y la intensidad de la fluorescencia fue medida por citometría de flujo. Las células con bacterias fagocitadas pudieron ser discriminadas de las bacterias libres mediante tinción con iodo de propidio (PI) adicional y de las bacterias absorbidas mediante la incubación de control en hielo (0°C) (Fig. 6).

Ejemplo 2

Formación espontánea de una red celular compleja mediante co-cultivo de células T y DC

Un co-cultivo definido de células T y DC pudo ser establecido. Las DC fueron pre-incubadas en un cultivo de suspensión con un antígeno particular (perlas de látex-CMV, kit diagnóstico para CMV, Abbott Diagnostics) durante 4 h. Luego 10^5 DC/ml fueron sembradas en placas multi cavidades (24 cavidades) y estimuladas para la asistencia inmunológica por un mitógeno pokeweed (PWM, $1 \mu\text{g/ml}$). Después de 24 h de cultivo las DC se esparcieron sobre la superficie de los platos de cultivo y 10^5 de células T fueron añadidas (no cebadas para el Antígeno-CMV por selección de los donantes de sangre sin infección por CMV latente o aguda). El co-cultivo fue monitoreado por alrededor de 14 días. Después de 6-10 días las DC han formado una red compleja de dendritos por medio de un proceso de auto organización (Fig. 7). Las anteriormente suspendidas células T cambiaron a la adherencia, migraron hacia la red dendrítica y se pusieron en estrecho contacto con los dendritos. La proliferación de las células T fue iniciada y clusters de la proliferación flotantes pudieron ser observados con un contacto holgado con la superficie de contacto (Fig. 7).

Además, la formación de una red en las células T y DC co-cultivadas pudo ser mostrada también en cultivos tridimensionales. Un hidrogel derivado del sistema de coagulación de la sangre humana con fibrinógeno fue preparado y descrito en el manual (Tissucol Immuno Kit, Baxter Bioscience) pero usando una dilución en diez veces.

Las células T y DC fueron suspendidas en solución de fibrinógeno y después de la coagulación inducida, introducidas de manera homogénea en la matriz gelatinosa para una concentración final de 0.8×10^6 resp. 4.9×10^6 células/ml. La matriz fue preparada en capas en forma de discos de alrededor de 1 mm de altura. Dependiendo de la concentración de 1:10 a 1:5, diluidas por buffer de fosfato (PBS) antes de la coagulación, ellas tenían una transparencia moderada hacia la opacidad.

Las células introducidas fueron estimuladas mediante suplementación con Mitógeno de $1 \mu\text{g/ml}$ lipopolisacarido bacteriano (*E. coli*; LPS). Bajo control microscópico las células introducidas fueron cultivadas durante alrededor de 10 días.

Desde el día 4 al 6 del periodo de cultivo las DC forman una red dendrítica como es observado en el cultivo de dos dimensiones mediante procesos de auto organización. Desde el día 4 al 6 las células T anteriormente distribuidas de manera homogénea están amontonadas alrededor de las DC por migración y formaron cluster de proliferación hasta la finalización del cultivo.

Ejemplo 3

Examen de un cultivo tridimensional de larga duración de MNC humanas en un birreactor Tecnomouse® (Ejemplo de Referencia)

Dos poblaciones diferentes de la misma preparación de MNC de un donante humano saludable fueron cultivadas durante 56 y 34 días en un birreactor Tecnomouse® (ver la descripción anteriormente). El espacio de cultivo de alrededor de 4.3 ml fue inoculado con un número inicial de células de 2.4×10^8 (55.8×10^6 células/ml) y 1.54×10^8 (35.8×10^6 células/ml). El sistema de perfusión del birreactor (espacio intercapilar) fue preincubado por medio de perfusión continua con medio de cultivo IFM de jarras de recirculación de 5 l con un régimen de perfusión de 75 ml/h durante 30 min. El espacio de cultivo (espacio extra capilar) fue preincubado con medio de cultivo SFM1 durante 30 min. Las células fueron suspendidas en 6 ml de SFM2 y 0.5 ml de HEVAC y transferidas al espacio de cultivo. Las jarras con el medio fueron cambiadas en intervalos de 14 días. Glutamina fue añadida en el espacio intercapilar de acuerdo con la concentración nominal en el IFM a intervalos de 7 días. 2 ml de SFM2 y 0.5 ml de HEVAC fueron añadidos una vez en el espacio intercapilar en el día 34. Para el suministro del birreactor fue usada la mezcla de gas de un incubador de cultivos de células (mezcla aire/ CO_2 , 5% de CO_2). El gas circuló a 1.8 l/min. Para monitorear la situación metabólica, el suministro de nutrientes y para el reconocimiento temprano de cualquier infección, las concentraciones de glucosa y lactato fueron medidas diariamente en el sobrenadante del cultivo de células de la población de MNC. Los conteos de células fueron realizados con el método bromuro de etidio/acridina naranja. Los sobrenadantes del cultivo fueron analizados mediante ELISA para el anticuerpo IgM, IgG, anti-lípido A, anti-LPS J5 y anti-HBsAg. La citoquina IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF- α fueron analizadas adicionalmente. Un análisis FACS comparativo de ambas poblaciones en el día 1 y 34 del cultivo se suponía que descubriera cualquier proceso de diferenciación y proliferación que ocurriera durante el cultivo. Los marcadores de superficie CD45, CD2, CD3, CD20, BMA031, CD11a, CD25-F, CD45 fueron examinados para observar desplazamientos en el modelo de los marcadores de diferenciación y proliferación durante el tiempo de cultivo de 34 días en el cultivo MNC.

La población de linfocitos y MNC fueron usadas y una vitalidad de alrededor del 90% pudo ser detectada después de 5 semanas de cultivo. Con respecto al porcentaje de distribución de las sub-poblaciones inmunocompetentes, la composición de la población inicial de MNC correspondió aproximadamente a la distribución normal en la sangre humana periférica como es descrito por Classen (M. Classen y otros, Urban & Schwarzenberg Munich, Viena, Baltimore (1991)). En las primeras cinco semanas de cultivo la distribución de las células cambió claramente a favor de los macrófagos y las células dendríticas. La evaluación detallada de los análisis FACS muestra que los procesos de activación y las proliferaciones tienen lugar en ambas variantes de cultivo. Los marcadores de proliferación HLA-DR, CD71 y CD25 aumentaron en todas las sub-poblaciones durante las primeras 5 semanas. La única excepción fueron las células supresoras T en las cuales meramente un aumento del HLA-DR pudo ser observado. A pesar del claro decrecimiento de los conteos de linfocitos, se puede observar una proliferación o activación dentro de la población de linfocitos. En ambas variantes de cultivo, un incremento de los marcadores de células T CD2, CD4 y TCR $\alpha\beta$ pudo ser detectado. Un aumento de CD8 puede ser observado solamente cuando los valores medios son considerados, de manera que, para concluir, puede derivarse un impulso de desarrollo de todas las sub-poblaciones de células T. Esta derivación está soportada por la reducción de las células T naive (CD45RA) con un incremento simultáneo de las células T de memoria o células T activadas (CD45RO). La detección continua del CD11a y Lcam1 habla a favor de la expresión funcional de las moléculas de adhesión. Las concentraciones de anticuerpos examinadas en el transcurso por medio de ELISA mostraron que altas concentraciones de anticuerpos pueden ser detectadas incluso hasta la semana 8 del cultivo (ver Tabla 7).

Las citoquinas IL-8 e IL-1ra pudieron ser detectadas a lo todo lo largo del tiempo de cultivo. La evaluación de la determinación diaria de glucosa y lactato en el medio recirculante (espacio intercapilar) produjo un nivel de lactato y glucosa en las concentraciones establecidas el cual fue estable a lo todo lo largo del transcurso del cultivo, lo que permite concluir un suministro de nutrientes estable sin una acumulación crítica de productos finales metabólicos.

La caída de la proporción de CD45 RA/RO y el decrecimiento del cociente IgM/IgG en el transcurso del tiempo muestran que una primera y también una segunda inmunización parecen ser ya posibles en aproximaciones de exámenes bastantes simples.

En las mediciones diarias de las concentraciones de glucosa y lactato durante todo el tiempo del transcurso del cultivo, el contenido de glucosa fue al menos 12.3 mmol/l. La concentración máxima de lactato fue 1.9 mmol/l.

ES 2 290 714 T3

TABLA 1

Resultados del conteo de células en el transcurso de un cultivo tridimensional de larga duración de MNC humanas en un birreactor Tecnomouse®

Tiempo	Células mononucleares (células/ml)			Linfocitos (células/ml)		
	Total	Vivas	Viabilidad	Total	Vivos	Viabilidad
Inicio	55.8x10 ⁶	n.d.	n.d.	35.8x10 ⁶	n.d.	n.d.
Día 34	334,000	302,000	90.4%	182,000	167,000	91.8%
Día 56	728,000	349,000	47.9%	n.d.	n.d.	n.d.
n.d. = no pudo ser determinado						

TABLA 2

Proporción de los linfocitos y los macrófagos/células dendríticas en la población total respectiva determinada por análisis FACS

Proporción de la población total:	Células mononucleares, inicio del cultivo	Células mononucleares, día 34	Linfocitos, día 34
Linfocitos:	81%	17%	8%
Macrófagos/células dendríticas:	19%	83%	92%
Macrófagos/células dendríticas vitales:	12%	20%	42%

Nota: La clasificación en sub-poblaciones mencionadas aquí fue efectuada por medio de la diferencia en la desviación de células en la dispersión hacia delante y hacia el lado del dispositivo FACS debido a las propiedades físicas diferentes de las células y a través de la fluorescencia diferente de las células después del marcado con la mezcla de anticuerpos CD45-F/CD 14-PE.

ES 2 290 714 T3

TABLA 3

Modelo de distribución de diferentes marcadores de proliferación y diferenciación en los macrófagos/células dendríticas vitales en la población total respectiva

Examen de los macrófagos/células dendríticas vitales							
Detec ción del antíge no positi vo	Células mononucleares, inicio del cultivo		Células mononucleares, día 34		Linfocitos, día 34		Anti cuer pos
	Frac ción	Media	Frac ción	Media	Frac ción	Media	
CD 14	77.06%	542.47	88.51%	523.30	88.79%	588.21	CD 14-PE
HLA-DR	87.20%	98.22	00.00%	5048.07	99.95%	4697.59	HLA-DR-F
CD 4	95.73%	7.70	64.97%	122.98	58.81%	99.10	CD 4-PerCP
CD 71	96.81%	6.85	99.32%	339.82	98.86%	201.69	CD 71-F
CD 25	97.99%	3.22	99.88%	57.77	99.99%	201.69	CD 25-F

TABLA 4

Modelo de distribución de diferentes marcadores de proliferación y diferenciación en linfocitos en la población total respectiva

Detec ción del antíge no positi vo	Células mononucleares, inicio del cultivo		Células mononucleares, día 34		Linfocitos, día 34		Anti cuer pos
	Frac ción	Media	Frac ción	Media	Frac ción	Media	
Control ¹	0.9%	4	4.9%	8	0.3%	62	
CD 2	74.1%	15	92.6%	30	95.6%	33	CD 2-F
CD 3	n.d.	n.d.	88.6%	76	89.5%	69	CD 3-PerCP
CD 4	44.4%	36	63.2%	46	62.9%	45	CD 4-PerCP
CD 8	20.0%	155	21.6%	262	17.1%	223	CD 8-PerCP
CD 4/8	2.2		2.9		3.7		

ES 2 290 714 T3

CD 5	64.5%	139	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CD 5-PE
CD 20	n.d.	n.d.	8.8%	37	12.5%	35	CD20-PerCP
TCR ab	66.3%	30	87.7%	33	82.6%	28	BMA 031-F
CD 11a	95.8%	47	98.1%	55	97.5%	51	CD 11a-F
CD 25	3.5%	8	7.3%	21	8.6%	16	CD 25-F
CD 45 RA	75.5%	86	37.7%	51	33.8%	43	CD 45 RA-F
CD 45 RO	19.0%	25	72.1%	53	70.7%	38	CD 45 RO-F
CD 71	2.9%	5	6.6%	14	8.8%	12	CD 71-F
HLA-DR	10.4%	40	19.8%	45	19.7%	67	HLA-DR-F
Lecam 1	24.4%	14	27.2%	28	21.1%	23	LECAM 1-F
^ = Autofluorescencia sin marcado de anticuerpos, n.d. = no determinado							

TABLA 5

Modelo de distribución de diferentes marcadores de proliferación y diferenciación en células T helper/células T inflamatorias en la población total respectiva

Detección del antígeno positivo	Células mononucleares, inicio del cultivo		Células mononucleares, día 34		Linfocitos, día 34		Anticuerpos
	Fracción	Media	Fracción	Media	Fracción	Media	
Control ¹	0.1%	9	2.5%	11	5.7%	11	
TCR ab	75.4%	13	85.1%	34	85.9%	29	BMA 031-F
CD 11a	96.8%	19	98.1%	55	97.3%	39	CD 11a-F
CD 25	3.8%	10	8.4%	26	11.0%	17	CD 25-F
CD 45 RA	59.3%	42	23.2%	38	18.8%	37	CD 45 RA-F
CD 45 RO	29.2%	36	78.3%	61	76.9%	44	CD 45 RO-F
CD 71	0.4%	9	3.6%	15	6.5%	13	CD 71-F
HLA-DR	3.6%	7	9.9%	16	13.2%	24	HLA-DR-F
Lecam 1	18.6%	14	19.2%	24	18.5%	26	LECAM 1-F
¹ = Autofluorescencia sin marcado de anticuerpos							

ES 2 290 714 T3

TABLA 6

Modelo de distribución de diferentes marcadores de proliferación y diferenciación en células supresoras T en la población total respectiva

Detección del antígeno positivo	Células mononucleares, inicio del cultivo		Células mononucleares, día 34		Linfocitos, día 34		Anticuerpos
	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media	
Control ¹	0.1%	3	0.2%	20	1.1%	5	
TCR ab	96.8%	18	97.8%	35	96.9%	31	BMA 031-F
CD 11a	100.0%	54	100.0%	93	100.0%	83	CD 11a-F
CD 25	2.1%	8	0.4%	8	2.3%	22	CD 25-F
CD 45 RA	85.7%	71	61.7%	51	62.0%	50	CD 45 RA-F
CD 45 RO	14.4%	14	64.0%	31	57.7%	30	CD 45 RO-F
CD 71	0.9%	8	0.3%	45	0.4%	6	CD 71-F
HLA-DR	6.2%	9	19.1%	15	14.1%	23	HLA-DR-F
Lecam 1	20.3%	16	28.6%	31	21.1%	23	LECAM 1-F
¹ = Autofluorescencia sin marcado de anticuerpos							

TABLA 7

Detección de diferentes anticuerpos en el sobrenadante del cultivo de células de las poblaciones mencionadas y el suero del donante de MNC mediante ELISA

Detección de anticuerpos	Suero del donante de MNC	Sobrenadante del cultivo de MNC, día 34	Sobrenadante del cultivo de MNC, día 56	Sobrenadante del cultivo de linfocitos, día 34
IgM	++	+	+	+
IgG	+++	++	++	++
Anticuerpo	+	--	--	--
Lípido-A				
Anticuerpo	+	--	--	--

ES 2 290 714 T3

LPS-J5				
Anticuerpo	+++	++	+	+
Anti-HBs				
Leyenda: "--" = 0-0.1; "+" = 0.1-1; "++" = 1-10; "+++" = 10-100 µg/ml				

TABLA 8

Detección de diferentes citoquinas en el sobrenadante del cultivo de células de las poblaciones mencionadas

Detección de citoquina (pg/ml)	Células mononucleares, día 34	Células mononucleares, día 56	Linfocitos, día 34
IL-8	3879	492	4931
IL-1ra	38020	14400	36800
IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, TNFα	0	0	0

Ejemplo 4

Diferenciación de linfocitos B leucémicos en las células del plasma aplicando el cultivo de tejido tridimensional

10 ml de tejido de médula de un paciente con leucemia linfática crónica B (B-CLL) fueron obtenidos mediante biopsia. Más del 91% de las células de la médula nucleadas eran linfocitos B leucémicos CD19/20 positivos, portando su anticuerpo en la superficie de las células. Un total de 2.57×10^9 de células BM con una viabilidad del 100% conjuntamente con eritrocitos y los remanentes del espécimen después de la biopsia fueron suspendidas en 8 ml de medio IFM. Las células fueron vertidas en el espacio de cultivo de un casete de cultivo del Tecnomouse®. Se permitió que tuviera lugar la reorganización del tejido en ese espacio de cultivo debido al suministro efectivo de oxígeno a través de dos membranas planas de silicona y de la perfusión del medio basal a través de las fibras huecas. El birreactor fue operado durante 145 días a regímenes de perfusión de 50 ml/h. Las cosechas fueron realizadas cada dos semanas. Las alícuotas de las células inoculadas y cosechadas y los sobrenadantes del medio de cultivo del espacio extra capilar fueron analizados. Las células suspendidas fueron caracterizadas para marcadores DC mediante citometría de flujo. Los sobrenadantes fueron analizados para inmunoglobulinas segregadas mediante ELISA y citoquinas usando el Quantikine-Immunoassay (R&D Systems, Bierman).

Por el contrario a la rápida apoptosis de las células B-CLL *in vitro* descrita en la literatura la auto organización del tejido de la médula en el birreactor condujo a un comportamiento como *in vivo* durante al menos 14 días. Los marcadores de células B CD19/20 permanecieron en más del 90% de las células. Después de ese periodo la expresión de CD19/20 decrece rápidamente para finalmente llegar al 10% en el día 145. Desde el día 14 una cantidad significativa de 600 pg/ml de IL-6 fue acumulada en el espacio de cultivo de células tridimensional. Los niveles de interleucina 6 permanecen muy altos durante todo el periodo del cultivo como es mostrado en la siguiente tabla.

ES 2 290 714 T3

Día de cultivo	14	56	112	145
IL-6 (pg/ml)	600	300	450	600

Con el transcurso del tiempo del cultivo las inmunoglobulinas segregadas se acumularon hasta unos títulos muy altos. En el día 145 1.5 g/l de IgM y 3.0 g/l de IgG pudieron ser encontrados en el sobrenadante cosechado.

Tanto la carencia de los marcadores CD en los linfocitos en la etapa tardía del cultivo así como las grandes cantidades de IgM e IgG acumuladas corresponden a la diferenciación de las células tumorales B-CLL dentro de la las células de plasma no divisoras que segregan el anticuerpo. Accionado por las citoquinas, tal como la IL6, el microambiente del cultivo de médula *in vitro* de los pacientes después del día 14 cambio subsecuentemente a un nuevo fenotipo de inducción de las células del plasma. De esta forma, la auto organización y la auto reorganización del tejido linfático humano funcional tridimensional pudo ser inducido proporcionando el diseño del proceso y el birreactor correctos.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para el cultivo de células y/o tejido que comprende al menos un espacio de cultivo (2) que contiene la(s) matriz(ces) (8) apropiado para asentar las células y/o el tejido y al menos dos medios de entrega de fluidos (14, 16; 27, 38) para entregar diferentes fluidos al espacio (2) o la matriz (8), donde al menos un gas de suministro o líquido de suministro libre de células (4) y al menos una fase móvil de células (6) es suministrado, donde
 - (i) dicha al menos fase móvil de células (6) fluye a través de la matriz (8) en un flujo atravesado; y
 - (ii) la matriz preferiblemente horizontal (8) es mantenida en una cámara hueca (20a, 20b) a través de la cual dicha al menos una fase móvil de células (6) fluye en un flujo atravesado.
2. El dispositivo de acuerdo a la reivindicación 1, donde los flujos de líquidos (4, 6) pueden ser suministrados al espacio de cultivo (2) o la matriz (8) a través de líneas permeables (14, 16), al menos una de las líneas siendo permeable a la fase móvil.
3. El dispositivo de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde dicho al menos un líquido de suministro (4) puede ser suministrado a través de líneas permeables (14, 16), preferiblemente capilares, a través o a lo largo del espacio de cultivo (2) o la matriz (8).
4. El dispositivo de acuerdo a la reivindicación 1, donde la administración y la remoción del gas o líquido de suministro libre de células (4) es proporcionado a través de membranas microporosas.
5. El dispositivo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde
 - (i) la matriz del espacio de cultivo tiene una porosidad que permita un suficiente flujo por la fase móvil, la migración de las células dentro de la matriz y la formación de gradientes de flujos locales (microambientes) y preferiblemente tiene una porosidad de más de 30 μm ; y/o
 - (ii) los espacios huecos de la matriz (8) tienen diámetros de al menos el doble del diámetro de las células de la fase móvil; y/o
 - (iii) la matriz (8) es seleccionada de geles, materiales porosos, tales como espumas de poros abiertos, textiles tejidos y textiles no tejidos.
6. El dispositivo de acuerdo a la reivindicación 5, donde la matriz (8) es una lámina, que tiene preferiblemente un grosor de alrededor de 1 a 15 mm, más preferiblemente alrededor de 2 a 10 mm.
7. El dispositivo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde
 - (i) los flujos de líquidos (4, 6) se difunden o fluyen a través de la matriz (8); y/o
 - (ii) la matriz (8) es soportada por uno o dos lados de la misma por medios de soportes (18a, 18 b) permeables a las células, especialmente una pantalla, el tamaño de los poros de los medios de soportes (18a, 18 b) siendo preferiblemente de alrededor de 30 a 100 μm ; y/o
 - (iii) un flujo de la fase móvil es establecido por perfusión externa de fluidos (bombeo) o flujo por gravedad (volteo periódico).
8. El dispositivo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho al menos un gas de suministro o líquido de suministro (4) puede ser suministrado a la matriz (8) a través de varias líneas de poros (14), especialmente capilares, las cuales pasan preferiblemente en paralelo el interior de la matriz (8), donde el diámetro de las líneas (capilares) está preferiblemente de 50 a 150 μm , más preferiblemente alrededor de 80 a 120 μm , la porosidad de las líneas (14) (capilares) es de alrededor de 30 a 500 kDa, y/o la distancia mutua de la líneas (14) (capilares), las cuales pasan preferiblemente en paralelo, es del doble a diez veces, preferiblemente de tres a cinco veces, el diámetro del capilar.
9. El dispositivo de acuerdo a una o más de las reivindicaciones 1 a 8, donde
 - (i) un microambiente apropiado para un cultivo de tipo tejido ha sido formado dentro de la matriz (8) el cual garantiza la formación de gradientes de concentración y un suministro óptimo de esta fase, específicamente por medio de un flujo controlable directo continuo o discontinuo de al menos una población de células o tejido a través de la presente fase inmóvil de células en la matriz (8); y/o
 - (ii) la fase móvil de células puede ser recirculada o pasada directamente sin sedimentación en el circuito remanente; y/o

ES 2 290 714 T3

(iii) el antígeno puede ser aplicado al espacio de cultivo (2) si es necesario; y/o

(iv) un medio es provisto con el cual se puede realizar la cosecha de células o productos; preferiblemente por medio de mecanismos mecánicos, dinámicos y/o enzimáticos.

5

10. El dispositivo de acuerdo a una o más de las reivindicaciones 1 a 9, el cual es apropiado para ejecutar un método para el cultivo de células y/o tejido de mamíferos que imita las estructuras celulares y las funciones inmunológicas de tejidos inmunológicamente activos, dicho método comprendiendo el paso de cultivar células de mamífero inmovilizadas en uno o más espacios de cultivo en contacto con al menos una mezcla de gas definida o un líquido de suministro libre de células y al menos una fase móvil que contiene células de un tipo de células diferentes de aquella de las células de mamíferos inmovilizadas, dichas células teniendo propiedades regulatorias o siendo capaces de formar posteriormente anticuerpos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

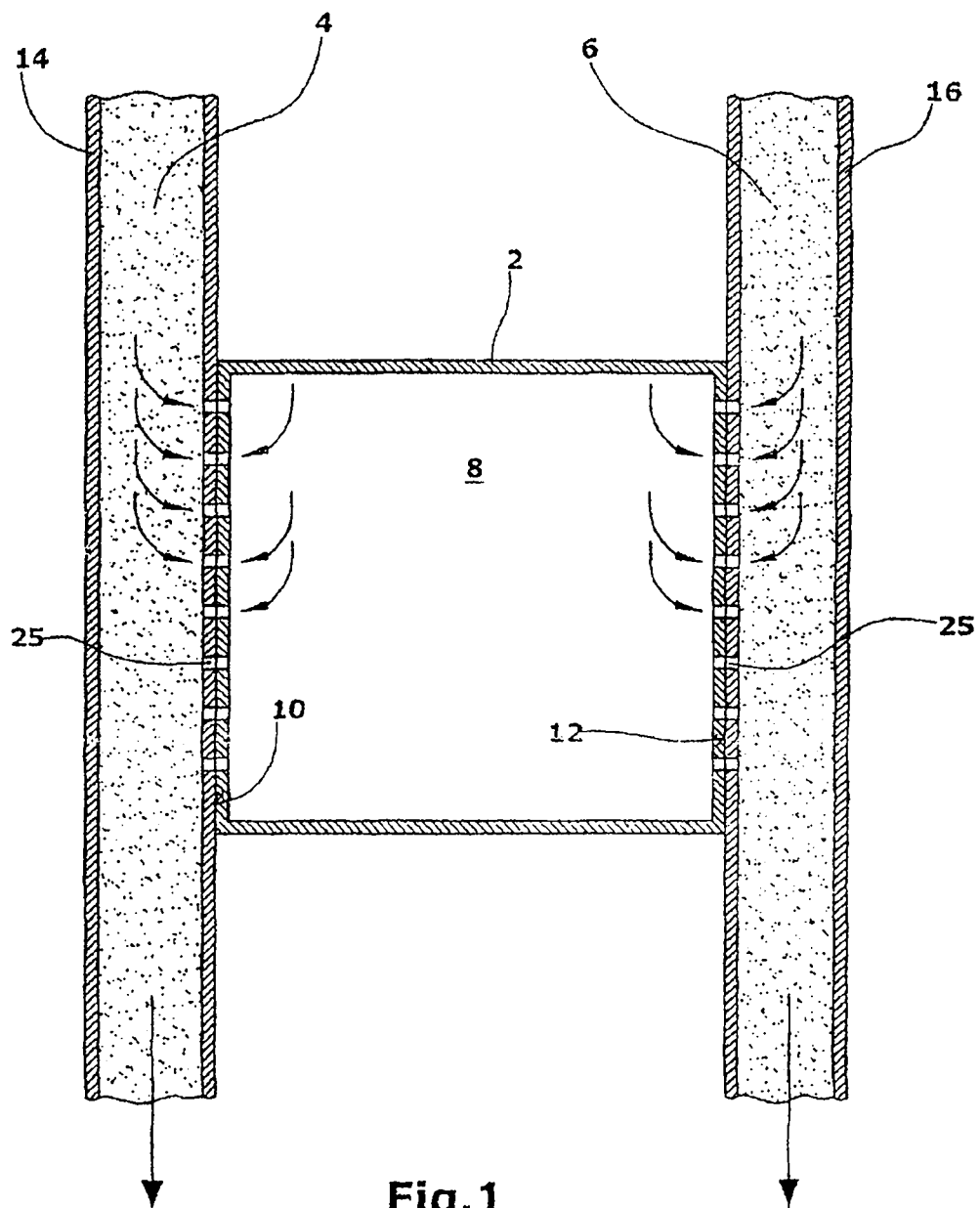


Fig.1

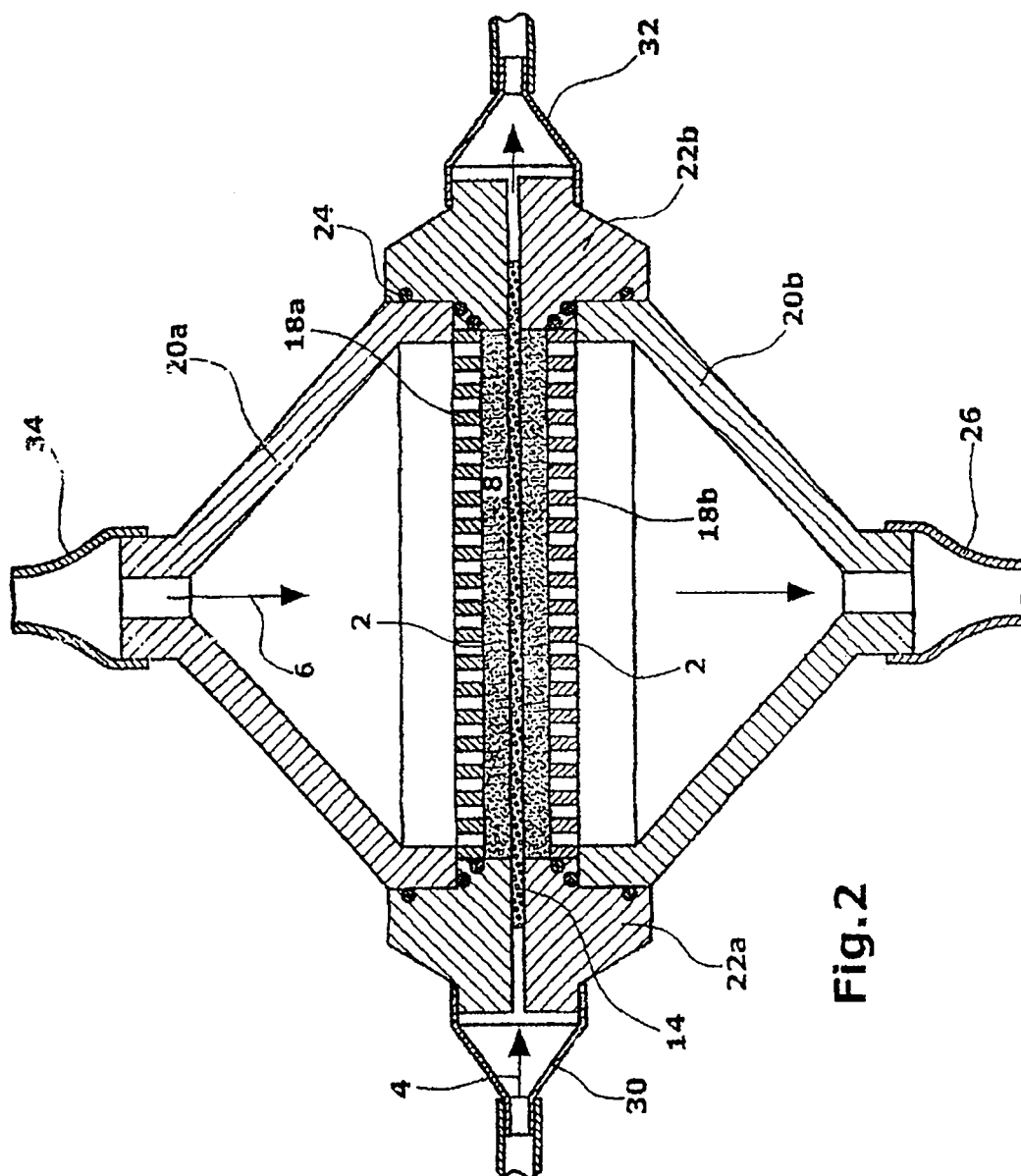


Fig. 2

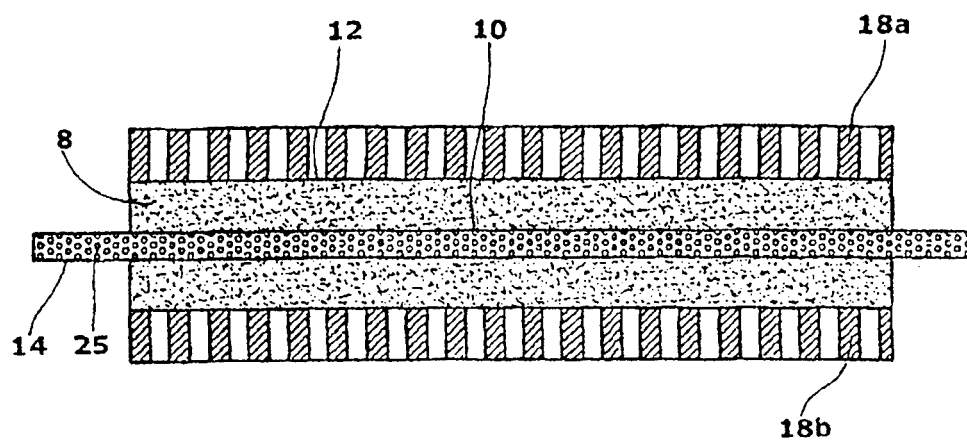


Fig.3

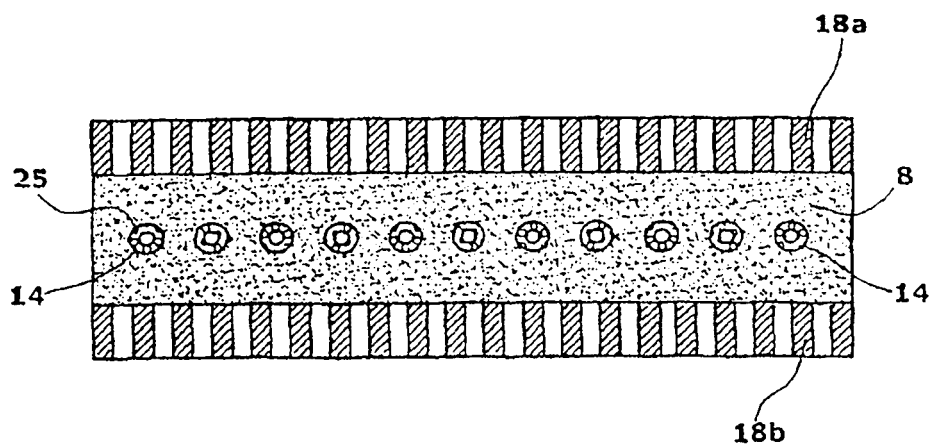
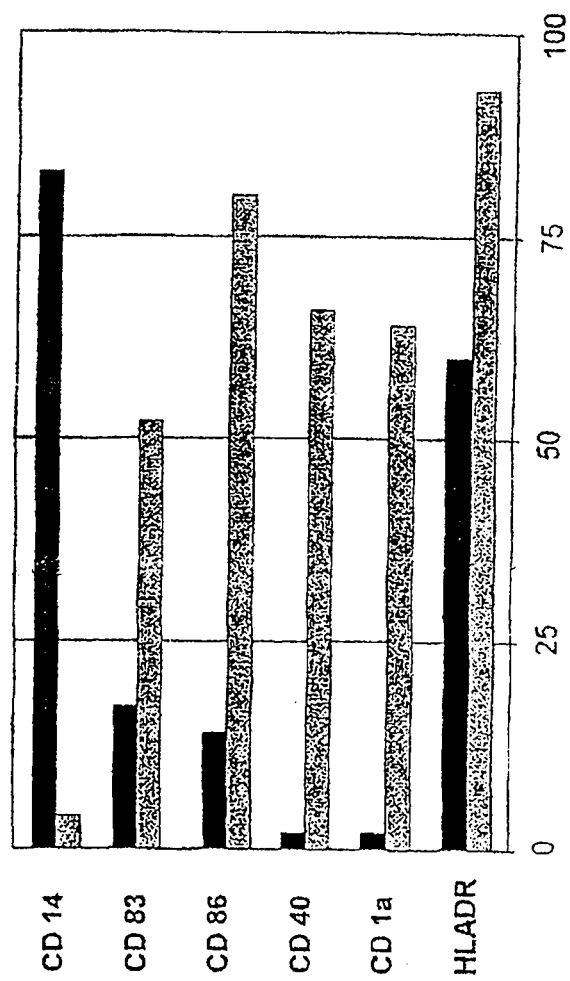
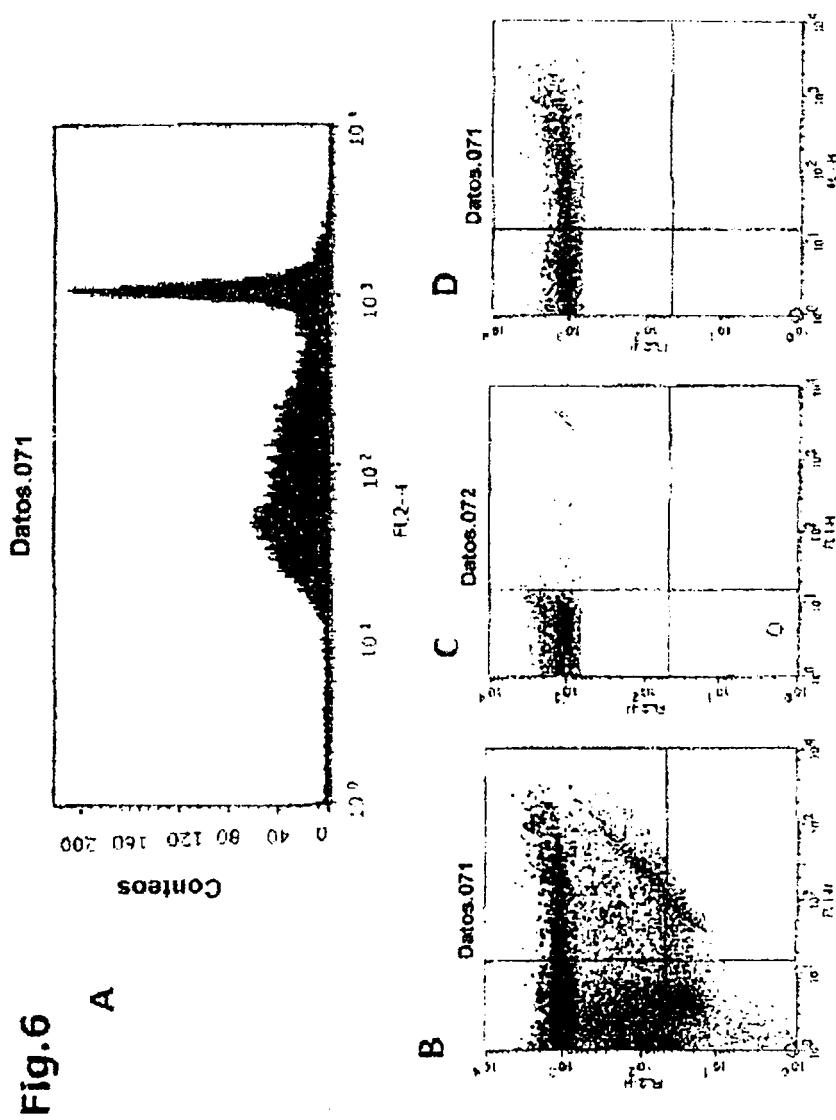
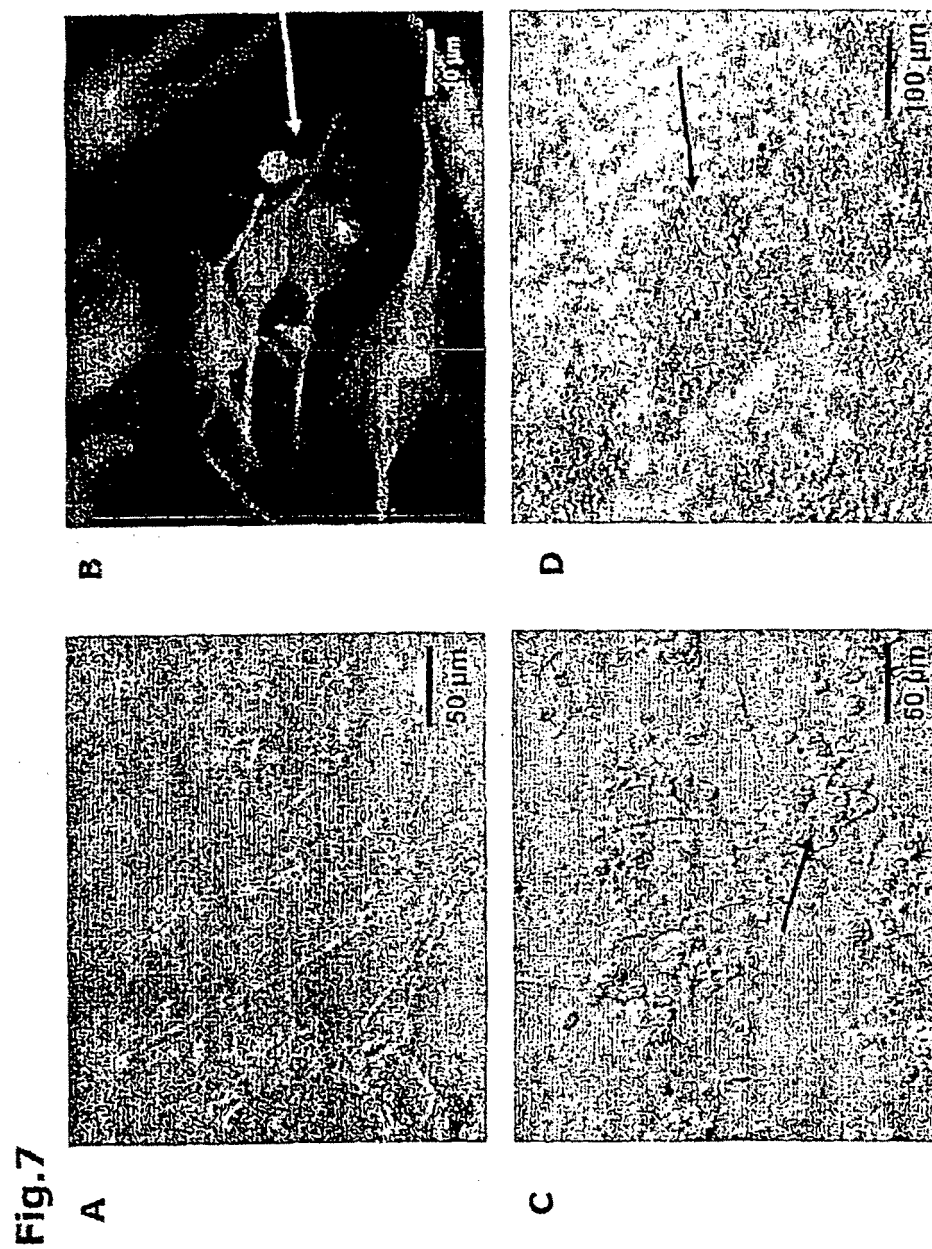


Fig.4

Fig.5







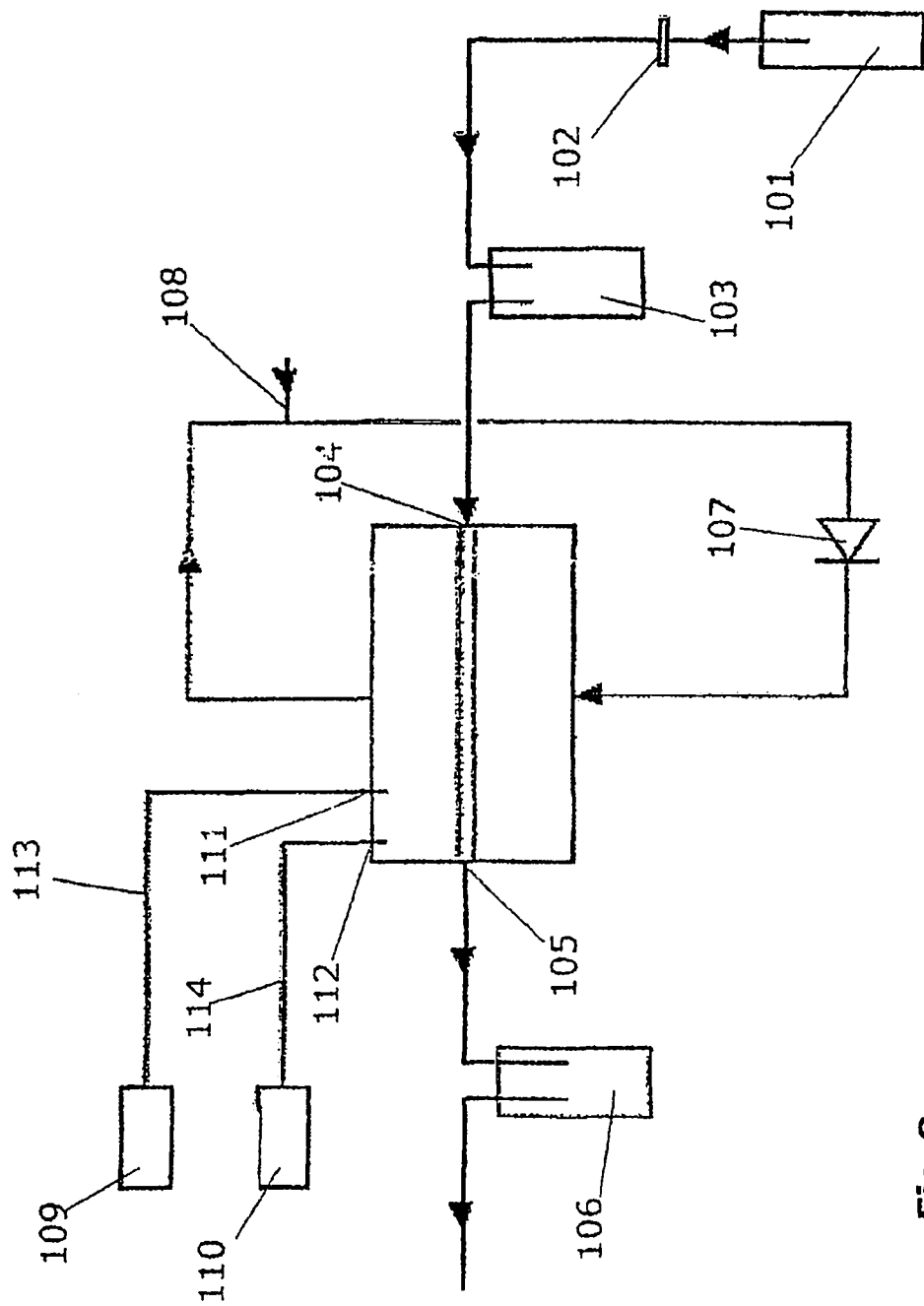


Fig.8

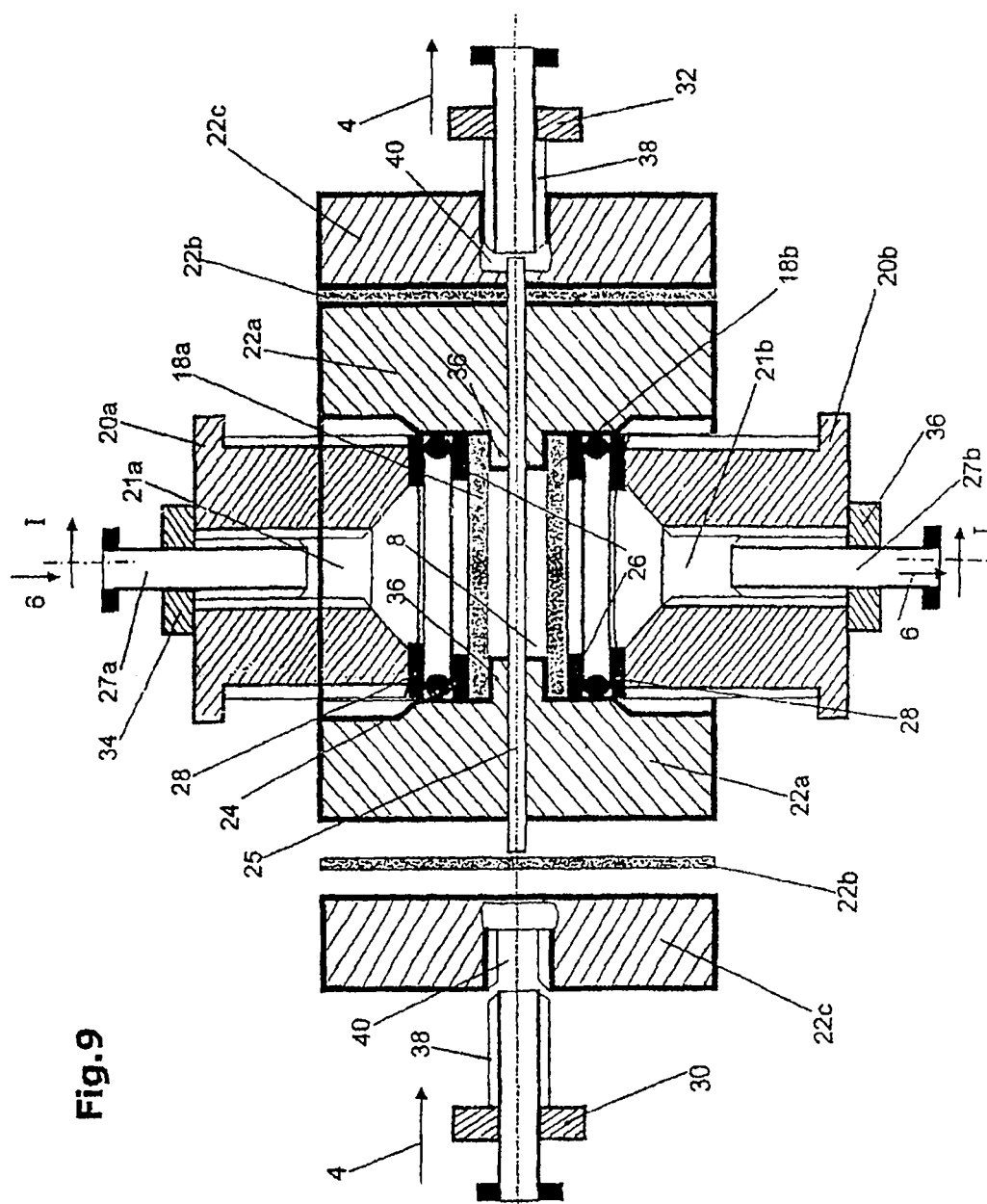


Fig. 9

Fig.10

