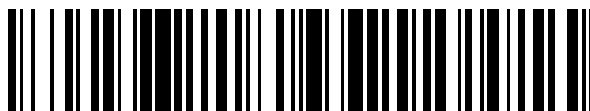


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 956**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/10** (2006.01)  
**C12M 1/12** (2006.01)  
**B04B 7/16** (2006.01)  
**B04B 5/06** (2006.01)  
**B04B 3/00** (2006.01)  
**B01D 29/15** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/CN2012/086694**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14089838**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12890047 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 2933326**

54 Título: **Aparato de filtración dinámica centrífuga y sistema de separación de células por medio de este**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2021**

73 Titular/es:  
**ZHENG, CHONG (100.0%)  
Room 1502, Vanke City Building E01, Kaichuang  
Avenue, Science City, Luogang District  
Guangzhou, Guangdong 510665, CN**

72 Inventor/es:  
**ZHENG, CHONG**

74 Agente/Representante:  
**PAZ ESPUCHE, Alberto**

**ES 2 874 956 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

Aparato de filtración dinámica centrífuga y sistema de separación de células por medio de este

### CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de la separación de células biológicas, en concreto a un dispositivo de filtración centrífuga y a un sistema de separación de células que presenta un filtro de membrana microporoso, y por medio de este sistema se obtiene un método rápido de separación de células.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** El mejor tratamiento para las enfermedades consiste en la reconstrucción de tejido vivo y la regeneración de tejido desgastado por la edad avanzada o una enfermedad; este tratamiento se denomina «terapia celular». La terapia celular tiene un siglo de historia, y su uso está extendido en todos los campos del tratamiento de tumores, el tratamiento hepático y la dermoabrasión, y posee unas amplias posibilidades de desarrollo.

- 15 **[0003]** La cuestión fundamental de la terapia celular es la separación de la célula objetivo. En la técnica anterior, la separación de células se lleva a cabo mediante centrifugadoras; este método de separación no solo es dificultoso de ejecutar, sino que también da lugar a trauma físico y contaminación celular, debido a la operación que exige extraer e introducir líquido celular de forma repetida, y este tipo de operación exige un entorno de laboratorio muy estricto, lo que repercute en la calidad de las células e incrementa los costes de la separación de células.

- 20 **[0004]** En consecuencia, se necesita un dispositivo, sistema y método mejorados para la separación de células.

### SUMARIO DE LA INVENCION

- 25 **[0005]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de filtración centrífuga con una estructura sencilla y fácil de operar; este dispositivo es capaz de separar rápidamente las células en un sistema completamente sellado, lo que reduce los daños a las células durante el proceso de separación, y evita la contaminación celular, y el proceso de separación de células podría estar controlado de forma automática por ordenador.

- 30 **[0006]** Con el fin de lograr el objetivo anteriormente indicado, la presente invención proporciona la siguiente solución técnica:  
Un dispositivo de filtración centrífuga para separar células vivas, que incluye un árbol, un brazo giratorio que está conectado de forma perpendicular al eje de árbol al árbol y que es capaz de girar conforme gira el árbol, y un filtro de membrana microporoso que está montado en el brazo giratorio; y el filtro de membrana microporoso incluye una entrada, una salida, una cavidad frontal en la que se forma la entrada, una cavidad trasera en la que se forma la salida, y una membrana de filtración dispuesta entre la cavidad frontal y la cavidad trasera; el diámetro de cada poro de filtración formado en la membrana de filtración es inferior al de la célula que necesita separarse; la entrada y la cavidad frontal están dispuestas en un extremo alejado con respecto al brazo giratorio, y la salida y la cavidad trasera están dispuestas en un extremo próximo con respecto al brazo giratorio; la entrada está dispuesta en la parte superior o en una pared lateral de la cavidad frontal, y la salida está dispuesta en la parte inferior o en una pared lateral de la cavidad trasera, el agua de la suspensión celular, la partícula biológica y las biomoléculas pasan por la membrana de filtración debido a la presión de la corriente de fluido, y las células son bloqueadas por la membrana de filtración y son arrojadas desde la membrana de filtración para depositarse en la cavidad frontal debido a la fuerza centrífuga.

- 45 **[0007]** Un documento anterior, US 5431814, también da a conocer un aparato de filtración giratorio para separar un material seleccionado suspendido en un fluido, comprendiendo el aparato un armazón que se monta de forma giratoria en un dispositivo giratorio que gira el armazón de forma que un material suspendido en el fluido en una cámara de entrada es forzado a desplazarse sometido a fuerza centrípeta en una dirección radialmente hacia fuera desde el eje de giro.

- 50 **[0008]** El giro del armazón es logrado por un motor a través de un complejo sistema de poleas, soporte, etc., y, lo que es más importante, la entrada y la salida están dispuestas próximas al eje de giro del sistema de filtración, lo que da a lugar a una forma muy distinta de operación.

- 55 **[0009]** Preferiblemente, la longitud del brazo giratorio es de 10-30 cm, la velocidad de giro del brazo giratorio es de 500-1500 revoluciones por minuto, y la fuerza centrífuga producida por el brazo giratorio es de 100-500g.

- [0010]** Preferiblemente, la sección transversal del filtro de membrana microporoso es redonda o cuadrada.

[0011] Preferiblemente, el diámetro del poro de filtración formado en la membrana de filtración es de 1-30  $\mu\text{m}$ .

[0012] Preferiblemente, la membrana de filtración está hecha de un material de poliolefina o poliamida.

[0013] Preferiblemente, la membrana de filtración está hecha de polipropileno, celulosa mixta, un material de PE (polietileno) o de un material de nailon.

[0014] Preferiblemente, la entrada del filtro de membrana microporoso está conectado a un tubo de entrada, que está conectado a un conjunto de tuberías a través de una articulación giratoria; y la articulación giratoria está montada en un soporte que está dispuesto por encima del eje del brazo giratorio, un componente fijo de la articulación giratoria se comunica con el conjunto de tuberías, un componente giratorio de la articulación giratoria se comunica con el filtro de membrana microporoso a través del tubo de entrada, y el filtro de membrana microporoso es capaz de filtrar una suspensión celular continuamente mientras el árbol da vueltas.

[0015] El segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema de separación de células que tenga dicho dispositivo de filtración centrífuga, en concreto que presente un filtro de membrana microporoso, con una estructura sencilla y fácil de operar. Este sistema de separación de células proporciona un sistema completamente sellado para separar células automáticamente, lo que podría evitar la contaminación celular.

[0016] Con el fin de lograr el objetivo anteriormente indicado, la presente invención proporciona la siguiente solución técnica:

Un sistema de separación de células, caracterizado por que incluye: un sistema de tuberías completamente sellado y desechable y un sistema de instrumentos; donde el sistema de tuberías completamente sellado y desechable incluye un filtro de membrana microporoso, un filtro principal, una articulación giratoria, una jeringa desechable, un recipiente de líquido de equilibrio, un recipiente de suspensión celular, un recipiente de solución enzimática y un conjunto de tuberías. El filtro de membrana microporoso incluye una entrada, una salida, una cavidad frontal en la que se forma la entrada, una cavidad trasera en la que se forma la salida, y una membrana de filtración dispuesta entre la cavidad frontal y la cavidad trasera. La entrada está dispuesta en la parte superior o en una pared lateral de la cavidad frontal, y la salida está dispuesta en la parte inferior o en una pared lateral de la cavidad trasera. El diámetro de cada poro de filtración formado en la membrana de filtración es inferior al de la célula que necesita separarse. La entrada y la cavidad frontal están dispuestas más alejadas del punto donde se produce la fuerza centrífuga que la salida y la cavidad trasera, y el agua de la suspensión celular, la partícula biológica y las biomoléculas son capaces de pasar por la membrana de filtración debido a la presión de la corriente de fluido, y las células son bloqueadas por la membrana de filtración y son arrojadas desde la membrana de filtración para depositarse en la cavidad frontal debido a la fuerza centrífuga. El conjunto de tuberías incluye una primera tubería, una segunda tubería, una tercera tubería, una cuarta tubería, una quinta tubería, una sexta tubería y una séptima tubería. El recipiente de suspensión celular está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la primera tubería. El filtro principal está montado en la primera tubería. El recipiente de líquido de equilibrio está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la segunda tubería. La segunda tubería está conectada a la primera tubería. Un extremo de la tercera tubería se comunica con la unión entre la primera tubería y la segunda tubería, y el otro extremo se comunica con la jeringa desechable. Un extremo de la cuarta tubería se comunica con la jeringa desechable, el otro extremo se comunica con un extremo fijo de la articulación giratoria. Un extremo de la quinta tubería se comunica con un extremo giratorio de la articulación giratoria, el otro extremo se comunica con el tubo de entrada del filtro de membrana microporoso. Un extremo de la sexta tubería se comunica con la salida del filtro de membrana microporoso, el otro extremo se comunica con el tanque de recogida de residuos. Un extremo de la séptima tubería se comunica con la unión entre la primera tubería y la segunda tubería, y el otro extremo está conectado al recipiente de solución enzimática. El sistema de instrumentos incluye un conjunto de brazo giratorio, una bomba de inyección, una unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio, una unidad de control de la temperatura para la suspensión celular, un vibrador para la suspensión celular y una válvula de control electromagnética; Un extremo del conjunto de brazo giratorio está montado en el filtro de membrana microporoso, un árbol que acciona el brazo giratorio y un eje de giro de la articulación giratoria están en línea recta. La jeringa desechable está controlada por la bomba de inyección. La unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio está dispuesta fuera del recipiente de líquido de equilibrio, para calentar el líquido de equilibrio y controlar su temperatura. La unidad de control de la temperatura para la suspensión celular está dispuesta fuera del recipiente de suspensión celular, para calentar la suspensión celular y controlar su temperatura. El recipiente de suspensión celular y la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular están dispuestas en el vibrador para la suspensión celular, que oscila el recipiente de suspensión celular automáticamente con la frecuencia predeterminada por el ordenador. La válvula de control electromagnética incluye una primera válvula de control, una segunda válvula de control, una tercera válvula de control y una cuarta válvula de control; La primera válvula de control está montada en la primera tubería y está dispuesta delante de la unión entre la primera tubería y la segunda tubería. La segunda válvula de control está montada en la segunda tubería. La tercera válvula de control está montada en la cuarta tubería, y está dispuesta entre la articulación giratoria y la jeringa desechable; y la cuarta válvula de control está montada en la séptima tubería.

[0017] Preferiblemente, el diámetro de cada poro de filtración formado en el filtro principal es mayor que el de la célula objetivo.

5 [0018] Preferiblemente, la válvula de control electromagnética es una válvula de presión electromagnética para controlar la apertura y cierre del conjunto de tuberías.

[0019] Preferiblemente, la membrana de filtración es una membrana hidrófila.

10 [0020] Preferiblemente, el diámetro del poro de filtración formado en la membrana de filtración es de 1-30  $\mu\text{m}$ .

[0021] Preferiblemente, la membrana de filtración está hecha de un material de poliolefina o poliamida.

15 [0022] Preferiblemente, la membrana de filtración está hecha de polipropileno, celulosa mixta, un material de PE (polietileno) o de un material de nailon.

[0023] La ventaja de la presente invención es que: el dispositivo de filtración centrífuga y el sistema de separación de células que tiene dicho dispositivo de filtración centrífuga con una estructura sencilla y fácil de operar son capaces de separar rápidamente células en un sistema completamente sellado, lo que reduce los daños a las células en el proceso de separación, y evita la contaminación celular, y el proceso de separación de células podría estar controlado de forma automática por ordenador, y el sistema de separación de células tiene poca demanda en el laboratorio.

20

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### [0024]

25

La Figura 1 es un dibujo esquemático que muestra un dispositivo de filtración centrífuga según una forma de realización de la presente invención;

La Figura 2 es un dibujo esquemático lateral que muestra el dispositivo de filtración centrífuga según una forma de realización de la presente invención;

30

La Figura 3 es un dibujo esquemático que muestra el filtro de membrana microporoso del dispositivo de filtración centrífuga;

La Figura 4 es un dibujo esquemático que muestra la articulación giratoria que está conectada al tubo de entrada del filtro de membrana microporoso mostrado en la figura 1; y

35

La Figura 5 es un dibujo esquemático que muestra un sistema de separación de células que tiene el dispositivo de filtración centrífuga con el filtro de membrana microporoso mostrado en la figura 1.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRADAS

[0025] Las formas de realización de la presente invención se dan a conocer en detalle combinándolas con las figuras a continuación. Las siguientes son las formas de realización preferidas de la presente invención, lo cual no supone una limitación a la protección de la presente invención.

40

[0026] Las figuras 1, 2 y 3 muestran el dispositivo de filtración centrífuga según una forma de realización de la presente invención, y el dispositivo de filtración centrífuga para separar células incluye un árbol 28, un brazo giratorio 211 que está conectado de forma perpendicular al eje de árbol al árbol y gira conforme gira el árbol, y un filtro de membrana microporoso 31 que está montado en un extremo alejado con respecto al brazo giratorio.

45

[0027] El filtro de membrana microporoso 31 incluye una entrada 311, una salida 312, una cavidad frontal 313 que se comunica con la entrada, una cavidad trasera 314 que se comunica con la salida, y una membrana de filtración 315 dispuesta entre la cavidad frontal 313 y la cavidad trasera 314.

50

[0028] Preferiblemente, la entrada 311 se forma en la parte superior de la cavidad frontal 313, y la salida 312 se forma en la parte inferior de la cavidad trasera 314, de forma que el líquido pueda fluir debido a la presión de la corriente de fluido producida por la inyección, como se muestra en la figura 3.

55

[0029] La membrana de filtración 315 es una membrana hidrófila, y está hecha de un material de poliolefinas o poliamidas. Preferiblemente, la membrana de filtración está hecha de polipropileno, celulosa mixta, un material de PE (polietileno) o de un material de nailon. El diámetro del poro de filtración formado en la membrana de filtración 315 es inferior al de la célula que necesita separarse, de forma que las células son bloqueadas por la membrana de filtración y permanecen en la cavidad frontal 313, y el agua y las biomoléculas atraviesan la membrana de filtración y pasan a la cavidad trasera 314 y después se drenan por la salida 312. En general, el diámetro de la

célula es de 5-30  $\mu\text{m}$ , por lo que el diámetro del poro de filtración de la membrana de filtración 315 es inferior a 5  $\mu\text{m}$ .

5 **[0030]** Preferiblemente, el diámetro del poro de filtración de la membrana de filtración es de 1-30  $\mu\text{m}$ ; en una forma de realización óptima, el diámetro del poro de filtración es de 3  $\mu\text{m}$ -5  $\mu\text{m}$ .

10 **[0031]** En esta forma de realización, el filtro de membrana microporoso 31 presenta una cavidad formada en este cuya forma se asemeja a una tarta redonda; la superficie de la membrana de filtración por la que discurre el líquido está dispuesta en un extremo alejado con respecto al brazo giratorio, y la superficie de la membrana de filtración por la que sale el líquido está dispuesta en un extremo próximo con respecto al brazo giratorio. El brazo giratorio gira para producir fuerza centrífuga, de forma que las células son bloqueadas por la membrana de filtración y son arrojadas desde la membrana de filtración puesto que las células tienen un tamaño mayor y pueden resistir mayor fuerza centrífuga, y los poros de filtración se dejan abiertos para que el agua y biomoléculas inservibles o dañinas pasen por los poros de filtración bajo la presión de la corriente de fluido.

15 **[0032]** Preferiblemente, la cavidad frontal 313 está dispuesta en un extremo alejado con respecto al brazo giratorio 211, y la cavidad trasera 314 está dispuesta en un extremo próximo con respecto al brazo giratorio 211, es decir, la ubicación de la cavidad frontal 313 está más alejada del brazo giratorio 211 que la de la cavidad trasera 314. Por tanto, el líquido fluye de la entrada 311 a la salida 312, es decir, el líquido fluye desde el extremo alejado del brazo giratorio 211 hacia el extremo próximo al brazo giratorio 211, y esta dirección de flujo del líquido es opuesta a la de la fuerza centrífuga en el filtro de membrana microporoso 31 mientras gira el brazo giratorio 211. Las células son bloqueadas por la membrana de filtración 315 para que permanezcan en la cavidad frontal 313 cuando la suspensión celular está en la cavidad frontal 313, y después las células son arrojadas desde la membrana de filtración 315 debido a la fuerza centrífuga y los poros de filtración permanecen abiertos para mantener el proceso de filtración constante.

20 **[0033]** En esta forma de realización, un tubo de entrada 375 está conectado a un conjunto de tuberías a través de una articulación giratoria 33. Específicamente, como se muestra en la figura 4, la articulación giratoria 33 incluye un componente fijo 331 y un componente giratorio 332, el componente fijo 331 tiene una cámara para recibir el componente giratorio 332 para que gire en el componente fijo 331. Un anillo de estanquidad 333 está dispuesto en la conexión entre el componente fijo 331 y el componente giratorio 332. El componente fijo 331 está fijo y conectado al conjunto de tuberías, y la parte de conexión 3320 del componente giratorio 332 se comunica con el tubo de entrada 375.

30 **[0034]** Por consiguiente, el tubo de entrada 375 podría girar conforme gira el árbol 28, cuando está fijado el componente fijo de la articulación giratoria.

35 **[0035]** Preferiblemente, la articulación giratoria 33 está dispuesta en el árbol 28 o en su cable de prolongación, de forma que el tubo de entrada 375 y el filtro de membrana microporoso 31 giren de forma sincronizada.

40 **[0036]** El sistema de separación de células según la presente invención se describe a continuación.

45 **[0037]** En referencia con la figura 5, el sistema de separación de células según la forma de realización de la presente invención incluye dos partes, que son un sistema de tuberías completamente sellado y desechable y un sistema de instrumentos.

50 **[0038]** El sistema de tuberías completamente sellado y desechable incluye un filtro de membrana microporoso 31, un filtro principal 32, una articulación giratoria 33, una jeringa desechable 34, un recipiente de líquido de equilibrio 35, un recipiente de suspensión celular 36, un recipiente de solución enzimática y un conjunto de tuberías 37. La descripción detallada se muestra a continuación.

(1) La estructura del filtro de membrana 31 del dispositivo de filtración centrífuga se ha descrito anteriormente.

55 (2) El filtro principal 32 podría filtrar las impurezas de la suspensión celular. En esta forma de realización, el filtro principal 32 está dispuesto en dirección ascendente con respecto a la dirección de flujo del líquido, es decir, cerca del recipiente de suspensión celular 36, de forma que algunas partículas más grandes y algunas impurezas (como algunos tejidos sin digerir y grandes moléculas) puedan filtrarse durante el proceso de lavado y filtración de los tejidos.

(3) La estructura de la articulación giratoria 33 del dispositivo de filtración centrífuga se ha descrito anteriormente.

(4) La jeringa desechable 34 está accionada por la bomba de inyección 23 (se describirá a continuación) para extraer e inyectar líquido.

(5) El recipiente de líquido de equilibrio 35 se usa para contener líquido de equilibrio (también denominado líquido amortiguador o líquido de lavado), el recipiente de líquido de equilibrio 35 se deja por debajo de 37 °C, controlado por la unidad de control de la temperatura del líquido de equilibrio 24. La temperatura de 37 °C se aproxima a la temperatura del cuerpo humano, lo que ayuda a proteger las células. Asimismo, la unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24 podría estar regulada para la temperatura de acuerdo con el requisito de protección de las células.

El líquido de equilibrio podría ser una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) o una solución láctica de Ringer. En esta forma de realización, el líquido de equilibrio es preferiblemente una solución láctica de Ringer, puesto que la concentración de electrolitos, el valor del pH y la presión osmótica son muy cercanos a los de los líquidos extracelulares, para ayudar a la supervivencia de las células, retirando la colagenasa del líquido celular, para eliminar la influencia perjudicial en las células. Preferiblemente, la temperatura de las materias primas debería mantenerse próxima a la temperatura del cuerpo humano durante el proceso de extracción de células, por lo que la presente invención proporciona la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25, que calienta el recipiente de suspensión celular 36 y lo controla para que esté por debajo de una temperatura determinada, que por lo general es 37 °C.

(6) El recipiente de suspensión celular 36 está dispuesto boca abajo en esta forma de realización, cuya abertura está dispuesta hacia abajo. El recipiente de suspensión celular 36 se usa para contener materias primas del cuerpo humano para extraer células; la materia prima podría ser todo tipo de tejidos, entre los que se encuentran: tejido adiposo, sangre, médula ósea, músculo, piel, hígado, membrana muscular, placenta, cordón umbilical, fluidos corporales, secreciones y cultivos celulares, etc. En esta forma de realización, el tejido adiposo se separa para cultivar células madre adiposas. El tejido adiposo podría obtenerse por medio de cualquier proceso adecuado del estado de la técnica, como liposucción (con una jeringa) o lipectomía. La cantidad que se extrae de tejido adiposo depende de varios factores, entre los que se incluye: capacidad de extracción de tejido adiposo y la cantidad necesaria de células madre adiposas. Preferiblemente, para mezclar la solución de colagenasa con el tejido adiposo rápidamente, y digerir el tejido adiposo rápidamente usando la colagenasa, el recipiente de suspensión celular 36 y la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25 están ambos dispuestos en el vibrador para la suspensión celular 26, para oscilar el recipiente de suspensión celular 36.

(7) El recipiente de solución enzimática se usa para preparar una solución durante el procesamiento del tejido, y la solución enzimática es una solución de colagenasa en esta forma de realización.

(8) El conjunto de tuberías 371, 372, 373, 374, 375, 376 comprende una primera tubería 371, una segunda tubería 372, una tercera tubería 373, una cuarta tubería 374, una quinta tubería 375, una sexta tubería 376 y una séptima tubería.

**[0039]** El recipiente de suspensión celular 36 está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la primera tubería 371, y el filtro principal 32 está montado en la primera tubería 371.

**[0040]** El recipiente de líquido de equilibrio 35 está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la segunda tubería 372, y la segunda tubería 372 se comunica con la primera tubería 371.

**[0041]** Un extremo de la tercera tubería 373 se comunica con la unión entre la primera tubería 371 y la segunda tubería 372, y el otro extremo se comunica con la jeringa desechable 34.

**[0042]** Un extremo de la cuarta tubería 374 se comunica con la jeringa desechable 34, y el otro extremo se comunica con un extremo fijo de la articulación giratoria 33.

**[0043]** Un extremo de la quinta tubería 375 se comunica con un extremo giratorio de la articulación giratoria 33, y el otro extremo se comunica con la entrada del filtro de membrana microporoso 31.

**[0044]** Un extremo de la sexta tubería 376 se comunica con la salida del filtro de membrana microporoso 31, y el otro extremo se comunica con el tanque de recogida de residuos 27.

**[0045]** Un extremo de la séptima tubería se comunica con la unión entre la primera tubería y la segunda tubería, y el otro extremo se comunica con el recipiente de solución enzimática.

**[0046]** En este sistema, cuando finaliza el proceso de separación de células, la quinta tubería 375 que está conectada a la entrada y la sexta tubería 376, que está conectada a la salida, son cortadas por unas tijeras térmicas

y se sellan, de forma que el filtro de membrana microporoso 31 esté sellado para dejar las células necesarias almacenadas para su uso.

5 **[0047]** Todas las tuberías anteriormente descritas pueden ser duras o blandas, en función de los requisitos reales. En esta forma de realización, todas las tuberías están hechas de un material blando, como por ejemplo una tubería de polietileno que se usa normalmente, una tubería de resina de silicona o cualquier otro material empleado por las tuberías en el estado de la técnica. El diámetro de la tubería depende del tamaño o el número del tejido y la velocidad de flujo del líquido, etc. La tubería es capaz de aguantar presión positiva o bien presión negativa producida por la jeringa.

10 **[0048]** Todas las partes del sistema de tuberías completamente sellado y desechable son de un único uso y están completamente selladas, lo que garantiza que el proceso de separación de células a partir de la suspensión celular se lleva a cabo en un sistema de tuberías sellado para evitar la contaminación.

15 **[0049]** A continuación se describe el sistema de instrumentos que puede reutilizarse para el sistema de separación de células.

20 **[0050]** En referencia a la figura 5, el sistema de instrumentos incluye un brazo giratorio, una válvula de control electromagnética 22, una bomba de inyección 23, una unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24, una unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25, y un vibrador para la suspensión celular 26.

25 **[0051]** Un extremo de un brazo giratorio 211 del conjunto de brazo giratorio 21 está montado en el filtro de membrana microporoso 31, un árbol que acciona el brazo giratorio del conjunto de brazo giratorio 21 y un eje de giro de la articulación giratoria 33 están en línea recta, de forma que el brazo giratorio y la articulación giratoria giran de forma sincronizada. Un elemento de equilibrio 212 con un bloque de equilibrio del conjunto de brazo giratorio 21 está dispuesto en el extremo opuesto del brazo giratorio. El conjunto de brazo giratorio 21 está accionado por el árbol 28.

30 **[0052]** La jeringa desechable 34 está controlada por la bomba de inyección 23.

**[0053]** La unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24 está dispuesta fuera del recipiente de líquido de equilibrio 35, para calentar el líquido de equilibrio y controlar su temperatura.

35 **[0054]** La unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25 está dispuesta fuera del recipiente de suspensión celular 36, para calentar la suspensión celular y controlar su temperatura. Asimismo, el recipiente de suspensión celular 36 y la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25 están dispuestas en el vibrador para la suspensión celular 26, que oscila el recipiente de suspensión celular 36 automáticamente con la frecuencia predeterminada por el ordenador.

40 **[0055]** La válvula de control electromagnética 22 incluye una primera válvula de control 221, una segunda válvula de control 222, una tercera válvula de control 223 y una cuarta válvula de control.

45 **[0056]** La primera válvula de control 221 está montada en la primera tubería 371 y está dispuesta delante de la unión entre la primera tubería 371 y la segunda tubería 372.

**[0057]** La segunda válvula de control 222 está montada en la segunda tubería 372.

50 **[0058]** La tercera válvula de control 223 está montada en la cuarta tubería 374 y está dispuesta entre la articulación giratoria 33 y la jeringa desechable 34.

**[0059]** La cuarta válvula de control está montada en la séptima tubería.

55 **[0060]** La primera válvula de control 221, la segunda válvula de control 222, la tercera válvula de control 223 y la cuarta válvula de control son todas válvulas de presión electromagnéticas.

60 **[0061]** El sistema de tuberías completamente sellado y desechable que tiene el filtro de membrana microporoso 31, el filtro principal 32, la articulación giratoria 33, la jeringa desechable 34, el recipiente de líquido de equilibrio 35, el recipiente de suspensión celular 36, el recipiente de solución enzimática y el conjunto de tuberías 37, junto con el sistema de instrumentos que tiene el brazo giratorio 21, la válvula de control electromagnética 22, la bomba de inyección 23 y la unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24, la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25, y el vibrador para la suspensión celular 26, constituye el sistema de separación de células anteriormente mencionado, que podría completar el proceso de lavado de células tisulares, digestión en la solución enzimática, filtrado y separación de células, y lavado y recolección de células. El sistema

de separación de células con una estructura de sellado sencilla y adaptable para cultivar las células necesarias, se opera en un entorno no contaminante y ayuda a la producción de extracción celular.

5 **[0062]** El siguiente sistema de separación de células es acorde con la primera forma de realización mostrada anteriormente, y se describe un método de separación de células que emplea este sistema de separación de células. A través de la descripción de este método de separación de células podría entenderse mejor la estructura y funcionamiento del sistema de separación de células anteriormente mencionado.

10 **[0063]** El método de separación de células se lleva a cabo mediante la extracción de células madre adiposas del tejido adiposo del cuerpo humano como materia prima.

**[0064]** El método incluye las siguientes etapas (las válvulas que no se mencionan en las etapas están cerradas de forma predeterminada):

15 1. Calentar el líquido de equilibrio, y conectar los recipientes de un solo uso, el filtro, la jeringa y el conjunto de tuberías.

20 **[0065]** La temperatura determinada establecida en la unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24 es 37 °C, el recipiente de líquido de equilibrio 35 está dispuesto en la unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio 24, para calentar el líquido de equilibrio hasta que la temperatura llegue a 37 °C, y el líquido de equilibrio con 37°C no solo se usa para preparar solución de colagenasa, sino también para proporcionar líquido de lavado de células. El sistema de instrumentos está conectado al sistema de tuberías: la primera tubería 371 está conectada al recipiente de suspensión celular 36, la segunda tubería 372 está conectada al recipiente de líquido de equilibrio 35, la séptima tubería está conectada al recipiente de solución enzimática, la jeringa desechable 34 está conectada a la bomba de inyección 23, la articulación giratoria 33 está montada en el soporte, el filtro de membrana microporoso 31 está montado en el brazo giratorio 211.

2. Digerir el tejido adiposo en la solución enzimática.

30 **[0066]** El tejido adiposo se pone en el recipiente de suspensión celular 36, que no es un equipo de infusión de PVC (policloruro de vinilo). El líquido de equilibrio cuyo volumen equivale al del tejido adiposo se extrae del recipiente de líquido de equilibrio 35, y se vierte en el recipiente de solución enzimática. En esta forma de realización, el líquido de equilibrio, que es solución láctica de Ringer, se mezcla con la colagenasa que se toma según la actividad enzimática descrita en la descripción del producto de colagenasa para formar la solución enzimática para digerir el tejido adiposo, y la solución enzimática en el recipiente de solución enzimática se vierte en el recipiente de suspensión celular 36. La temperatura determinada establecida en la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular 25 es 37 °C. Y después el vibrador para la suspensión celular 26, sobre el que está dispuesto el recipiente de suspensión celular, empieza a oscilar, la velocidad es de 100 RPM (revoluciones por minuto), el tiempo es de 20-40 minutos, el tiempo de digestión se ajusta en función de la actividad enzimática y el grado de digestión del tejido adiposo.

**[0067]** El tejido adiposo es digerido por la solución enzimática para dividirse en tres capas, de abajo a arriba,

- 40
- capa de solución de agua,
  - capa de emulsión,
  - y capa de aceite.

45 **[0068]** Las células madre adiposas están dispuestas en la capa de solución de agua y la capa de emulsión. Puesto que la parte inferior del recipiente de suspensión celular 36 está conectada a la primera tubería 371, la bomba de inyección está configurada para filtrar y separar células del líquido celular.

50 **[0069]** Asimismo, en otra forma de realización de la presente invención, si la materia prima es otro tejido, la estratificación de la solución puede que no sean tres capas como se ha mostrado en la forma de realización anterior, pero la cantidad de líquido celular está bajo control, el experto en la materia solo necesita realizar algunos ajustes para obtener las células objetivo.

3. Filtrar las impurezas y moléculas usando el dispositivo de filtración, separar y extraer las células usando el filtro de membrana microporoso.

55 **[0070]** En la primera etapa, los parámetros del proceso de filtración, el proceso de centrifugación y el proceso de separación están configurados en el ordenador. Se abre la primera válvula de control 221 y se extrae la suspensión celular soluble en agua en la capa inferior del recipiente de suspensión celular 36 por medio de la jeringa

desechable 34 que está accionada por la bomba de inyección 23. En este punto, la suspensión celular fluye por el filtro principal 32, que podría filtrar el tejido no digerido e impurezas, etc.

5 [0071] En la segunda etapa, se cierra la primera válvula de control 221 y se abre la tercera válvula de control 223, la suspensión celular es impulsada por la jeringa desechable 34 que está accionada por la bomba de inyección 23, para pasar por la cuarta tubería 374, la articulación giratoria 33 y la quinta tubería 375 para verterse en la cavidad frontal del filtro de membrana microporoso giratorio 31, y agua, biomoléculas más pequeñas y colagenasa pasan a la cavidad trasera a través de los poros de filtración, y después pasan al tanque de recogida de residuos 27 a través de la sexta tubería 376. Las células permanecen en la cavidad frontal y son arrojadas desde la membrana de filtración debido a la fuerza centrífuga, lo que evita la corrosión de la membrana. El radio de giro del brazo giratorio es de 20 cm y la velocidad de giro del brazo giratorio es de 1500 revoluciones por minuto.

15 [0072] En la tercera etapa, se repiten los anteriores procesos hasta que se extrae por completo la suspensión celular que está bajo la capa de aceite en el recipiente de suspensión celular.

20 [0073] Con el fin de aumentar la eficiencia en la separación de células, el líquido de equilibrio podría verterse en el conjunto de tuberías repetidamente y el proceso de filtración de células podría también llevarse a cabo repetidamente, el detalle de las etapas es el siguiente: se abre la segunda válvula de control 222, se extrae el líquido de equilibrio a 37 °C de temperatura en el recipiente de líquido de equilibrio 35; en esta forma de realización, el líquido de equilibrio son 100 ml. A continuación, se cierra la segunda válvula de control 222 y se abre la primera válvula de control 221, y se inyecta el líquido de equilibrio en el recipiente de suspensión celular 36, y se repite la segunda etapa para obtener células en la capa de emulsión.

4. Lavar las células en el filtro de membrana microporoso usando el líquido de equilibrio.

25 [0074] En primer lugar, se abre la segunda válvula de control 222, y se extrae el líquido de equilibrio del recipiente de líquido de equilibrio 35 usando la jeringa desechable 34.

30 [0075] A continuación, se cierra la segunda válvula de control 222, se abre la tercera válvula de control 223, para que el líquido de equilibrio pase a la cavidad frontal del filtro de membrana microporoso 31 a través de la cuarta tubería 374, para lavar el líquido celular en la cavidad frontal y retirar las pequeñas moléculas perjudiciales. El líquido de lavado en esta forma de realización es 150 ml.

[0076] Esta etapa de lavado se lleva a cabo para separar células de la enzima en el líquido celular.

5. Retirar el filtro de membrana microporoso 31, y sellarlo.

35 [0077] Se retira el filtro de membrana microporoso 31, y el líquido celular en este podría usarse directamente. En esta forma de realización, el tubo de entrada y el tubo de salida son cortados por unas tijeras térmicas y se sellan, de forma que el filtro de membrana microporoso almacena las células para su uso. El filtro de membrana microporoso 31 es oscilado por un vibrador justo antes de su uso.

40 [0078] El método de separación de células logra una serie de procesos, como digerir tejido, filtrar células, ganar células y recolectar células automáticamente, que se llevan a cabo en el sistema de tuberías completamente sellado y desechable, lo que evita la contaminación debido a la exposición a factores externos, reduce el trauma físico de las células en la operación, y cultiva células con un alto índice de supervivencia.

**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo de filtración centrífuga, para separar células vivas, **caracterizado por que** comprende un árbol (28), un brazo giratorio (211) que está conectado de forma perpendicular al eje de árbol al árbol (28) y que es capaz de girar conforme gira el árbol para producir fuerza centrífuga, y un filtro de membrana microporoso (31) que está montado en el brazo giratorio (211);
- 5
- donde el filtro de membrana microporoso (31) comprende una entrada (311), una salida (312), una cavidad frontal (313) en la que se forma la entrada, una cavidad trasera (314) en la que se forma la salida, y una membrana de filtración (315) dispuesta entre la cavidad frontal (313) y la cavidad trasera (314); el diámetro del poro de filtración de la membrana de filtración (315) es de 1-30 µm;
  - la entrada (311) y la cavidad frontal (313) están dispuestas en un extremo alejado con respecto al brazo giratorio (211), y la salida (312) y la cavidad trasera (314) están dispuestas en un extremo próximo con respecto al brazo giratorio (211);
  - la entrada (311) está dispuesta en la parte superior o en una pared lateral de la cavidad frontal (313), y la salida (312) está dispuesta en la parte inferior o en una pared lateral de la cavidad trasera (314).
- 10
2. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la longitud del brazo giratorio (211) es de 10-30 cm, la velocidad de giro del brazo giratorio (211) es de 500-1500 revoluciones por minuto, y la fuerza centrífuga producida por el brazo giratorio (211) es de 100-500 g.
- 20
3. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la sección transversal del filtro de membrana microporoso (31) es redonda o cuadrada.
- 25
4. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el diámetro del poro de filtración de la membrana de filtración (315) es inferior a 5 µm.
- 30
5. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la membrana de filtración (315) está hecha de un material de poliolefina o poliamida o de una mezcla de celulosa.
- 35
6. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 5, **caracterizado por que** la membrana de filtración (315) está hecha de polipropileno, un material de PE (polietileno) o un material de nailon.
- 40
7. Dispositivo de filtración centrífuga según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la entrada (311) del filtro de membrana microporoso (31) está conectado a un tubo de entrada (375), que está conectado a un conjunto de tuberías a través de una articulación giratoria (33); y la articulación giratoria (33) está montada sobre un soporte que está dispuesto por encima del eje del brazo giratorio (211), un componente fijo (331) de la articulación giratoria (33) se comunica con el conjunto de tuberías, un componente giratorio (332) de la articulación giratoria (33) se comunica con el filtro de membrana microporoso (31) a través del tubo de entrada (375), y el filtro de membrana microporoso (31) es capaz de filtrar una suspensión de células continuamente mientras el árbol da vueltas.
- 45
8. Sistema de separación de células, **caracterizado por que** comprende:
- un sistema de tuberías completamente sellado y desechable y un sistema de instrumentos;
  - donde el sistema de tuberías completamente sellado y desechable comprende un filtro de membrana microporoso (31), un filtro principal (32), una articulación giratoria (33), una jeringa desechable (34), un recipiente de líquido de equilibrio (35), un recipiente de suspensión celular (36), un recipiente de solución enzimática y un conjunto de tuberías (371, 372, 373, 374, 375, 376);
  - el filtro de membrana microporoso (31) comprende una entrada (311), una salida (312), una cavidad frontal (313) en la que se forma la entrada, una cavidad trasera (314) en la que se forma la salida, y una membrana de filtración (315) dispuesta entre la cavidad frontal (313) y la cavidad trasera (314); la entrada (311) está dispuesta en la parte superior o en una pared lateral de la cavidad frontal (313), y la salida (312) está dispuesta en la parte inferior o en una pared lateral de la cavidad trasera (314); el diámetro de cada poro de filtración formado en la membrana de filtración (315) es inferior al de la célula que necesita separarse; la entrada (311) y la cavidad frontal (313) están dispuestas más alejadas del punto donde se produce la fuerza centrífuga que la salida (312) y la cavidad trasera (314);
  - el conjunto de tuberías (371, 372, 373, 374, 375, 376) comprende una primera tubería (371), una segunda tubería (372), una tercera tubería (373), una cuarta tubería (374), una quinta tubería (375), una sexta tubería (376) y una séptima tubería;
  - el recipiente de suspensión celular (36) está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la primera tubería (371); el filtro principal (32) está montado en la primera tubería (371);
  - el recipiente de líquido de equilibrio (35) está dispuesto boca abajo, cuya abertura se comunica con la segunda tubería (372), y la segunda tubería (372) está conectada a la primera tubería (371);
  - un extremo de la tercera tubería (373) se comunica con la unión entre la primera tubería (371) y la segunda tubería (372), y el otro extremo se comunica con la jeringa desechable (34);
- 50
- 55
- 60

- un extremo de la cuarta tubería (374) se comunica con la jeringa desechable (34), el otro extremo se comunica con un extremo fijo de la articulación giratoria (33);
- un extremo de la quinta tubería (375) se comunica con un extremo giratorio de la articulación giratoria (33), el otro extremo se comunica con el tubo de entrada del filtro de membrana microporoso (31);
- 5 - un extremo de la sexta tubería (376) se comunica con la salida (312) del filtro de membrana microporoso (31), y el otro extremo se comunica con un tanque de recogida de residuos (27);
- un extremo de la séptima tubería se comunica con la unión entre la primera tubería (371) y la segunda tubería (372), y el otro extremo se comunica con el recipiente de solución enzimática;
- el sistema de instrumentos comprende un conjunto de brazo giratorio (211), una bomba de inyección (23),
- 10 una unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio (24), una unidad de control de la temperatura para la suspensión celular (25), un vibrador para la suspensión celular (26) y una válvula de control electromagnética (22);
- un extremo del conjunto de brazo giratorio (21) está montado en el filtro de membrana microporoso (31), un árbol (28) que acciona el brazo giratorio (21) y un eje de giro de la articulación giratoria (33) están en
- 15 línea recta;
- la jeringa desechable (34) está controlada por la bomba de inyección (23); la unidad de control de la temperatura para el líquido de equilibrio (24) está dispuesta fuera del recipiente de líquido de equilibrio (35), para calentar el líquido de equilibrio (24) y controlar su temperatura; la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular (25) está dispuesta fuera del recipiente de suspensión celular (36), para calentar
- 20 la suspensión celular (25) y controlar su temperatura; el recipiente de suspensión celular (36) y la unidad de control de la temperatura para la suspensión celular (25) están dispuestas en el vibrador (26) para la suspensión celular (25), que oscila el recipiente de suspensión celular (36) automáticamente con la frecuencia predeterminada por un ordenador;
- la válvula de control electromagnética (22) comprende una primera válvula de control (22), una segunda
- 25 válvula de control (222), una tercera válvula de control (223) y una cuarta válvula de control;
- la primera válvula de control (221) está montada en la primera tubería (371) y está dispuesta delante de la unión entre la primera tubería (371) y la segunda tubería (372);
- la segunda válvula de control (222) está montada en la segunda tubería (372);
- 30 - la tercera válvula de control (223) está montada en la cuarta tubería (374) y está dispuesta entre la articulación giratoria (33) y la jeringa desechable (34);
- la cuarta válvula de control está montada en la séptima tubería.

9. Sistema de separación de células según la reivindicación 8, **caracterizado por que** el diámetro de cada poro de filtración formado en el filtro principal (32) es mayor que el de la célula objetivo.

35 10. Sistema de separación de células según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la válvula de control electromagnética (22) es una válvula de presión electromagnética para controlar la apertura y cierre del conjunto de tuberías (371, 372, 372, 373, 374, 375, 376).

40 11. Sistema de separación de células según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la membrana de filtración (315) es una membrana hidrófila.

45 12. Sistema de separación de células según la reivindicación 8, **caracterizado por que** el diámetro del poro de filtración formado en la membrana de filtración (315) es de 1-30 µm.

13. Sistema de separación de células según la reivindicación 10, **caracterizado por que** la membrana de filtración (315) está hecha de un material de poliolefina o poliamida o de una mezcla de celulosa.

50 14. Sistema de separación de células según la reivindicación 13, **caracterizado por que** la membrana de filtración (315) está hecha de polipropileno, un material de PE (polietileno) o un material de nailon.

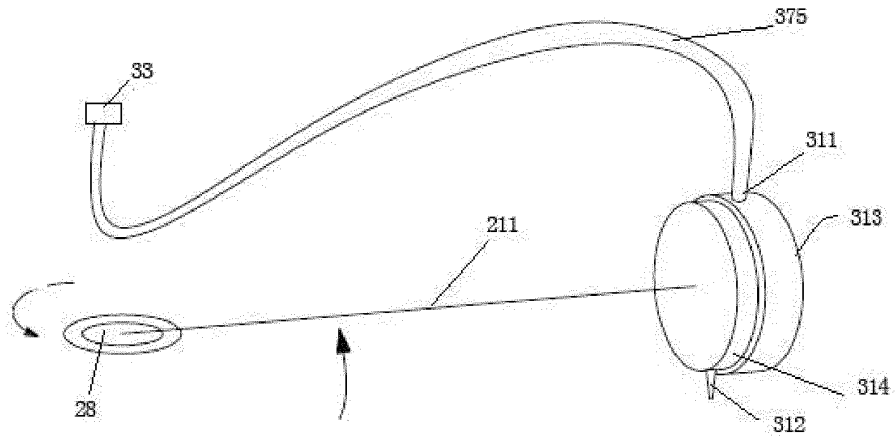


FIG. 1

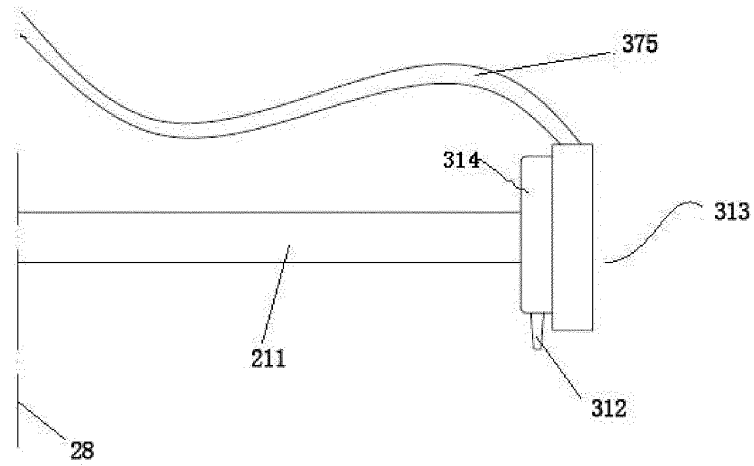


FIG. 2

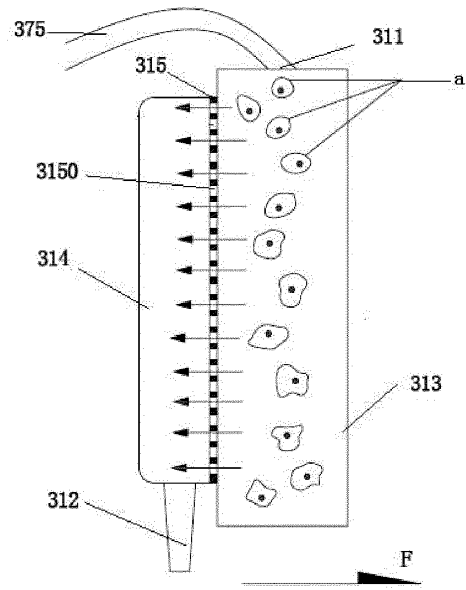


FIG. 3

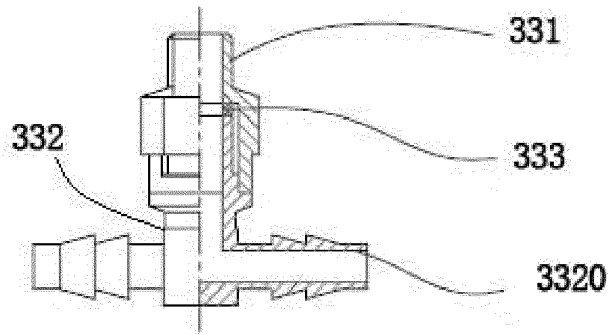


FIG. 4

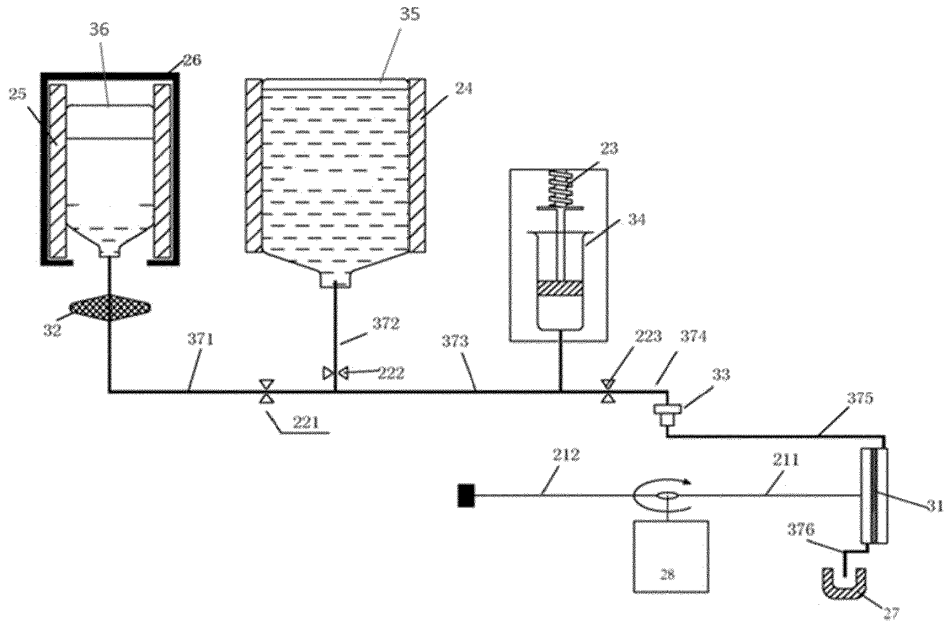


FIG. 5