



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 630**

(51) Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

A61M 1/02 (2006.01)

B01D 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06840916 .8**

(96) Fecha de presentación : **02.09.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1931404**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

(54) Título: **Procedimiento para separar leucocitos de la sangre.**

(30) Prioridad: **09.09.2005 DE 10 2005 043 237**
22.08.2006 DE 10 2006 039 197

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

(73) Titular/es: **membrana GmbH**
Oehder Strasse 28
42289 Wuppertal, DE

(72) Inventor/es: **Lemke, Horst-Dieter;**
Wiese, Frank;
Von Harten, Bodo;
König, Martin y
Ramlow, Wolfgang

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 630 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

Procedimiento para separar leucocitos de la sangre

La invención se refiere a un procedimiento para separar leucocitos de la sangre, así como a un dispositivo para llevar a cabo este procedimiento.

5 La sangre se compone, esencialmente, de plasma y elementos celulares. Entre estos últimos se cuentan eritrocitos (glóbulos rojos), trombocitos (plaquetas) y leucocitos (glóbulos blancos). Entre los glóbulos blancos se encuentran linfocitos, monocitos y granulocitos neutrófilos (neutrófilos, leucocitos polimorfonucleados (PMN)). Los linfocitos desempeñan una acción decisiva en la inmunidad específica. Los monocitos y granulocitos neutrófilos son tipos de
10 células que intervienen en las defensas inmunitarias inespecíficas o reacciones inflamatorias. Su misión es, por ejemplo, anular microorganismos invasores, marcados previamente por determinadas proteínas propias del organismo (por ejemplo, C3b del sistema del complemento o la inmunoglobulina IgG) como organismos extraños.

Una vez que las células se han aproximado a los microorganismos invasores, vierten tanto radicales de oxígeno como proteasas que destruyen los microorganismos, para ser fagocitados posteriormente. Cuando esta reacción no se produce de forma íntegra, o transcurre sin control y de forma crónica, la liberación de radicales de oxígeno y
15 proteasas, de carácter agresivo, puede dañar tejidos propios del organismo. Durante la inflamación se establece entre todos los tipos de células una intensa comunicación y coordinación que son utilizadas, entre otras, por diversas citoquinas. La reacción es muy compleja y aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, en último término, da lugar a los síntomas clínicamente observables de la inflamación, que incluyen tumefacción, enrojecimiento y fiebre. En este contexto, son característicos, entre otros, un aumento de los monocitos y granulocitos neutrófilos
20 generados en la médula ósea, y circulantes en la sangre, así como de determinados mensajeros químicos. Además de las citoquinas proinflamatorias mencionadas, se forman también las proteínas del complemento C3a y C5a, que se generan por la activación de las proteínas C3 y C5, y que actúan como parámetro de la activación del complemento durante la reacción inflamatoria o de fase aguda.

En una serie de enfermedades inflamatorias tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, se utilizan actualmente terapias extracorporales. Según el actual estado de la técnica, para ello se extrae del paciente un número determinado de células (probablemente, monocitos y granulocitos neutrófilos especiales), haciendo circular la sangre del paciente de forma extracorporal y tratándola con un filtro para células. Se utilizan como filtros de leucocitos, por ejemplo, columnas rellenas con partículas o perlas de acetato de celulosa. En este caso, la separación se produce principalmente por adsorción celular sobre la superficie de las perlas. Estos productos están disponibles ya en el comercio. La sangre se hace pasar a través de una columna que contiene esferas de acetato de celulosa. Las esferas de acetato de celulosa reducen por adsorción, en especial, los granulocitos y monocitos contenidos en la sangre.

El documento US 6.489.007 da a conocer un procedimiento para separar leucocitos de la sangre por adsorción sobre un soporte. En este caso, se hace contactar la sangre con este soporte, preferentemente en forma de lo que se denomina perlas, en donde el soporte posee una afinidad mayor para leucocitos infectados, activados o defectuosos en comparación con leucocitos que no exhiben estas características.

De manera alternativa, se utilizan también fieltros o tejidos para la separación extracorporal de filtros leucocitarios. Por ejemplo, para la separación de leucocitos a partir de una conserva de sangre para transfusiones (tal como un concentrado de eritrocitos o de plaquetas), se utilizan productos basados en fieltros, en los cuales tiene lugar la separación celular principalmente por filtración mecánica a través de dicho fieltro. Para la transfusión, se filtran típicamente lotes de 500 ml de sangre en un plazo menor de media hora. El proceso se lleva a cabo con ayuda de la fuerza de gravedad en un único paso y no en la circulación. Para poder utilizar un filtro celular en la circulación extracorporal, debe ser posible filtrar aproximadamente 1 a 6 l de sangre, impulsados por una bomba, durante algunas horas. Para ello, están disponibles en el comercio fieltros de polipropileno con una carcasa cilíndrica, con una conexión de entrada en la zona de cabeza y una conexión de salida en el extremo opuesto a la zona de cabeza. Con el fieltro utilizado en este caso, los leucocitos quedan retenidos gracias a los efectos de la filtración y la adsorción.

Lo mismo es válido para los dispositivos destinados a separar componentes de la sangre del documento EP 0 312 595, en el que se describe una carcasa cilíndrica rellena con fibras de algodón, con un elemento de entrada y un elemento de salida para la sangre. Las fibras de algodón son fibras cortadas que, según las figuras del documento EP 0 312 595, se encuentran dispuestas en dos capas formadas por agregados de fibras en orden aleatorio. Los componentes de la sangre tales como, por ejemplo, los glóbulos blancos o las plaquetas, quedan retenidos por exclusión de tamaño en los espacios intermedios entre las fibras de los agregados de fibra.

Según el documento EP 1 230 940 se usa también un filtro para separar leucocitos de la sangre. El filtro puede ser un fieltro, un tejido o una membrana de fibras planas o huecas, de carácter poroso. La sangre que se debe tratar se hace circular a través del fieltro, el tejido o la membrana porosa. El material de filtro tiene un revestimiento de un polímero sintético hidrófilo. Este revestimiento permite el paso de trombocitos a través del filtro, con la separación simultánea de leucocitos por adsorción.

El documento WO 95/18665 da a conocer un filtro y un procedimiento para la separación de leucocitos y sustancias con potencial inactivador de virus a partir del plasma u otras fracciones sanguíneas. El filtro se basa en una red de fibras textiles. Sobre la red están unidos, de forma covalente, ligandos con alta afinidad por sustancias inactivadoras de virus o leucocitos. En este caso, se trata de un método selectivo, pero técnicamente muy costoso, puesto que los ligandos deben estar unidos a una matriz polímera de forma directa o a través de un enlazador.

En el documento US 4.925.572 se describe un filtro por el que se hace circular un producto sanguíneo para separar los leucocitos, en el que, según su composición de elemento poroso, los leucocitos se separan tanto por adsorción como por filtración. El elemento poroso puede ser, preferentemente, un elemento formado por fibras, en donde estos elementos porosos pueden tener un diámetro de poro en el intervalo de aprox. 4 hasta aprox. 8 μm . El elemento poroso para separar los leucocitos puede mostrar una modificación superficial con el fin de generar, de este modo, una determinada tensión superficial y, con ella, una buena capacidad de reticulación del elemento. El documento US 4.925.572 aspira a una separación de los leucocitos principalmente por adsorción.

La retención de los leucocitos con este tipo de filtros se basa en un atrapamiento celular en fieltros de fibras, así como en una adsorción más o menos intensa de las células sobre la superficie de las fibras. En general, con este procedimiento, las diferentes células sanguíneas son sometidas a una fuerte sobrecarga mecánica, lo que puede conducir a una activación celular o, incluso, a la destrucción de las células sanguíneas.

Un inconveniente esencial de los sistemas y procedimientos existentes radica en que los diferentes tipos de células no se pueden adsorber de manera dirigida o específica y en que, además de los monocitos y granulocitos, también se adsorben linfocitos, trombocitos y eritrocitos. Dependiendo de la indicación, esto puede no ser necesario o, incluso, perjudicial para el paciente. La adsorción de trombocitos constituye un caso especial. Tras su activación, los trombocitos desempeñan un papel central en la coagulación de la sangre. Para que durante la circulación extracorporeal no se coagule la sangre, la coagulación se debe contrarrestar de manera medicamentosa por medio de la administración de heparina como anticoagulante. Si, a pesar del anticoagulante, se produce coagulación, la consecuencia es la obstrucción del filtro.

Un inconveniente adicional de los filtros convencionales para leucocitos es la a menudo difícil manipulación antes de su aplicación clínica, por ejemplo en lo que se refiere a la ventilación. En la circulación extracorporeal, las burbujas de aire representan un riesgo potencial para el paciente, por lo que es muy deseable evitarlas. Cuanto más sencilla es la eliminación del aire presente en el filtro, mejor es su manipulación y más segura su utilización.

Por lo tanto, es misión de la presente invención poner a disposición un procedimiento para reducir los leucocitos de la sangre en el cual se reduzcan por lo menos los inconvenientes del estado de la técnica, en el que la sangre sea tratada de manera cuidadosa, y en el que existan alternativas para la separación dirigida de distintos tipos de células. Adicionalmente, es misión de la presente invención poner a disposición un dispositivo para llevar a cabo un procedimiento de esta clase.

Esta tarea se resuelve por un procedimiento para reducir el número de leucocitos en sangre mediante el tratamiento de la sangre en una estructura formada por múltiples fibras a base de polímeros orgánicos, en donde la multiplicidad de fibras está contenida en una carcasa con un elemento de entrada y un elemento de salida, en el que la sangre entra en la carcasa a través del elemento de entrada, a continuación circula a través de la carcasa, fluyendo alrededor de las superficies exteriores de las fibras y, por último, abandona la carcasa a través del elemento de salida, y que se distingue por que se utilizan fibras en las que, cuando la sangre circula alrededor de sus superficies exteriores, determinan la formación de un producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 10 μg por m^2 de superficie de fibras, y por que la estructura de fibras muestra un grado elevado de organización, entendiéndose por grado elevado de organización que un número alto de fibras está dispuesto de forma coordinada a lo largo de su dirección de extensión.

La invención comprende igualmente un dispositivo para la reducción del número de leucocitos en la sangre, que comprende una multiplicidad de fibras a base de polímeros orgánicos en una carcasa con un elemento de entrada y un elemento de salida, en donde las fibras tienen al menos uno de sus extremos incorporado en una masa de relleno fijada a la pared interior de la carcasa, de modo que alrededor de las fibras se forma un espacio exterior por el que circula la sangre, y que se distingue por que la estructura de las fibras muestra un grado elevado de organización, entendiéndose por grado elevado de organización que un número alto de fibras está dispuesto de forma coordinada a lo largo de su dirección de extensión, y por que las fibras a base de polímeros orgánicos determinan la formación del producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 10 μg por m^2 de superficie de fibras.

C5a es un producto de disociación de la proteína plasmática C5. El valor máximo de la concentración de C5a en sangre está limitado, por consiguiente, por la concentración de C5 en el plasma sanguíneo, en donde la concentración de C5 en plasma sufre fuertes variaciones individuales y puede alcanzar valores de aproximadamente 40 mg/l hasta 150 mg/l. En base a la relación de la masa molar de C5 a C5a se obtiene una concentración máxima teórica de C5a en sangre de 9 mg/l.

La concentración del producto activador del complemento C5a en el plasma sanguíneo se calcula utilizando un ensayo ELISA sándwich (detección de inmunidad acoplado a enzimas) de la Compañía DRG Diagnostics, Marburgo (Alemania). Después del contacto de las fibras con sangre de donante humano (50 U/ml de heparina), se extraen en diferentes tiempos 1,8 ml de sangre y se detiene con 0,2 ml de solución 100 mM de EDTA. Antes del análisis, se precipita C5, según las instrucciones del fabricante (200 μ l de plasma + 200 μ l de reactivo de precipitación). En la determinación de utilizan 50 μ l del sobrenadante. La sensibilidad de detección del ensayo es de <0,02 μ g/l, el índice de recuperación de C5a en el plasma es de 86-114%, y el coeficiente de variación es de 5-8% (intra-ensayo) o 6-10% (entre ensayos). La concentración medida de C5a depende del volumen de sangre y de la superficie de las fibras. Por lo tanto, para el cálculo de la concentración de C5a referido a la superficie exterior de las fibras, se debe determinar el contenido absoluto de C5a en la muestra y expresarlo en relación con la superficie exterior de las fibras. En este caso, se debe observar una relación del volumen de sangre (V) con respecto a la superficie de las fibras (A) (V/A) de 0,3 l/m². El cálculo de la concentración de C5a referido a la superficie de las fibras se lleva a cabo tras un periodo de tratamiento de 3 h, es decir, la muestra de sangre se hace circular durante 3 h a lo largo de la superficie exterior de las fibras, manteniendo una velocidad de flujo lineal de 5 hasta 30 cm/min. Dado que los resultados de la medición están sujetos a variaciones individuales dependientes del donante, el número de pruebas aleatorias N debe ser de al menos 2, indicándose el valor medio de las pruebas aleatorias.

Sin pretender atenerse a ninguna teoría, se supone que en el tratamiento de enfermedades inflamatorias se asigna a la activación del complemento un significado importante, y se estima que una reducción del número de leucocitos, combinada con la activación del complemento, es esencialmente más efectiva que la disminución del número de leucocitos sola. Para ello, la activación el complemento, determinada por la concentración de C5a en sangre, debe ser superior al valor límite según la invención.

Es probable que el hecho de que determinados leucocitos pueden ser activados por C5a ofrezca una relación entre los parámetros número de leucocitos y C5a. La activación por C5a y otros factores determinan que las células desarrollen una mayor adhesividad, uniéndose en consecuencia con mayor intensidad a las superficies que generan C5a.

Por lo tanto, es preferible que las fibras provoquen una formación adicionalmente reforzada del producto activador del complemento C5a, en una concentración de al menos 75 μ l por m² de superficie de fibras.

De manera especialmente preferida, las fibras determinan una formación del producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 100 μ l por m² de superficie de fibras.

Para evitar que las células contenidas en la sangre resulten dañadas, es importante que la sangre no penetre de forma significativa en el material fibroso, o que no circule a través de este material. Por lo tanto, es preferible usar un material de fibras y, por consiguiente, fibras con una superficie impermeable o, en el caso de fibras con una superficie porosa, con un tamaño de poro máximo de 0,1 μ m.

Las fibras a base de polímeros orgánicos pueden ser fibras multi-filamento, es decir, fibras compuestas por múltiples filamentos individuales, aunque preferentemente las fibras son de tipo mono-filamento, es decir, están compuestas por un único filamento.

Dado que la generación de C5a necesaria para el procedimiento según la invención no depende solamente del polímero, sino también de adiciones o del grado de sustitución del polímero, la expresión "a base de polímeros orgánicos" comprende las sustancias polímeras como tales, sustituciones, mezclas de las mismas, copolímeros de estas sustancias, así como, eventualmente, coadyuvantes o aditivos agregados tales como, por ejemplo, hidrofílicos.

Por la expresión "grado elevado de organización" en el sentido de la presente invención debe entenderse que las fibras exhiben una disposición similar o que, en su mayoría, están dispuestas a lo largo de su dirección de extensión de manera adyacente. En teoría, un haz de fibras rectas, dispuestas de forma paralela entre sí, exhibe el máximo grado de organización. En el sentido de la presente invención, un haz de fibras onduladas muestra también un grado elevado de organización, en donde las fibras del haz de fibras exhiben en su totalidad la misma dirección de extensión. También en este caso, y dentro del sentido de la presente invención, se considera que un haz de fibras dispuesto en un bucle exhibe un grado elevado de organización. En esta situación, la disposición de las fibras entre ellas es similar. De la misma forma, por grado elevado de organización se debe entender que al menos 30% de las fibras están dispuestas en paralelo. Adicionalmente, se incluyen fibras dispuestas en múltiples capas, en donde las fibras dentro de una capa están dispuestas de forma esencialmente paralela entre sí. No obstante, las fibras paralelas de una capa se pueden cruzar con las fibras paralelas de otra capa. Estas estructuras están descritas en el documento EP 285 812. Las estructuras según la invención con un grado elevado de organización no incluyen los fieltros ni las estructuras planas con fibras en disposición aleatoria, en los cuales las fibras están dispuestas de manera totalmente desorganizada y están mezcladas entre sí. En comparación con los fieltros, la estructura según la invención de las fibras con un grado elevado de organización exhibe una superficie mayor y, en la aplicación del procedimiento según la invención, un grosor uniforme de la película de sangre. El grado elevado de organización es responsable de que la sangre que circula a lo largo de las fibras muestre turbulencias comparativamente reducidas y de que las células contenidas en la sangre estén sometidas a una sobrecarga de cizallamiento menor. Además, el grado elevado de organización permite evitar en gran medida la formación de espacios muertos y canales preferidos,

también denominados derivaciones o desvíos ("shunts"). De esta forma, se logra tratar la sangre de manera especialmente cuidadosa.

Así mismo, el grado elevado de organización permite que la reducción del número de leucocitos no esté causada esencialmente por un efecto de tamizado, como sería el caso, por ejemplo, en un fieltro, sino por efectos de adsorción, mediante lo cual se consigue un tratamiento especialmente cuidadoso de la sangre. En el efecto de tamizado que se verifica en un fieltro se produce, obligatoriamente, una involuntaria reducción de otros componentes de la sangre, por ejemplo, de los trombocitos.

Para el procedimiento según la invención o el dispositivo según la invención resultan adecuadas no solo las fibras sólidas, sino que también se pueden utilizar fibras huecas. Las fibras huecas poseen una superficie interior y una exterior. Cuando se usa una fibra hueca, la circulación, al igual que en las fibras sólidas, tiene lugar a lo largo de la superficie exterior. Antes o después de la circulación alrededor de las superficies exteriores de las fibras huecas, la sangre puede circular también por su luz. Sin embargo, se ha demostrado que la circulación adicional alrededor de la luz no aporta ninguna ventaja. Evidentemente, es posible utilizar como fibras huecas membranas de fibras huecas con una estructura impermeable o porosa. En este caso, se debe prestar atención a que el procedimiento según la invención se realice de tal modo, que la sangre no penetre esencialmente en las fibras huecas o en la membrana de fibras huecas, sino que circule alrededor de la pared de la membrana.

Preferentemente, el número de fibras se encuentra dentro del intervalo de 2.000 hasta 20.000 fibras, de forma especialmente preferida, dentro del intervalo de 4.000 hasta 14.000 fibras. El diámetro exterior de las fibras debe ser de entre 0,05 mm y 2 mm, preferentemente entre 0,1 mm y 2 mm y, de forma especialmente preferida, entre 0,2 mm y 1 mm.

Preferentemente, la disposición de las fibras tiene una superficie específica para el tratamiento de la sangre de entre 0,1 y 100 cm² de superficie de fibras por ml de sangre a tratar, preferentemente de entre 0,5 y 20 cm² de superficie de fibra por ml de sangre a tratar. La cantidad de sangre a tratar se obtiene de la duración del tratamiento hemático y del caudal.

Como fibras de polímeros orgánicos se pueden tomar en consideración fibras de polímeros naturales o de polímeros sintetizados por vías sintéticas. Las fibras de polímeros naturales son, en especial, aquellas que tienen como base polímeros celulósicos que comprenden también fibras sometidas a las llamadas reacciones polímero-análogas. Ejemplos de estas fibras a base de celulosa son las de celulosa regenerada, acetato de celulosa o celulosa modificada tales como, por ejemplo, con ésteres de celulosa, éteres de celulosa, celulosa modificada con grupos bencilo (bencilcelulosa), o celulosas modificadas con dietilaminoetil, o mezclas de estos polímeros celulósicos. Con fibras a base de polímeros celulósicos el procedimiento según la invención logra una fuerte reducción del número de leucocitos, obteniéndose una reducción especialmente elevada con fibras de celulosa regenerada. Además, también se pueden utilizar fibras a base de quitina o quitosano.

Entre los polímeros orgánicos cabe citar también aquellos polímeros fabricados por vías sintéticas. Como fibras de polímeros sintéticos se pueden usar las que están compuestas por poliolefinas, poliamidas, poliácridonitrilo, policarbonatos o poliésteres, así como de las modificaciones, mezclas, combinaciones o copolímeros de estos polímeros. Preferentemente, se utilizan fibras a base de polímeros sulfónicos tales como, por ejemplo, polisulfona o polietersulfona. Estos polímeros se pueden combinar con polímeros adicionales tales como, por ejemplo, óxido de polietileno, polihidroxiéter, polietilenglicol, alcohol polivinílico o policaprolactona a modo de aditivos. Adicionalmente, las fibras pueden estar dotadas de un recubrimiento con un aditivo. Preferentemente, estas fibras contienen un hidrofiliador, por ejemplo, polivinilpirrolidona o, también, modificaciones hidrófilas de estos polímeros.

Evidentemente, el procedimiento no solo es adecuado para reducir el número de leucocitos en la sangre entera, sino también para la reducción del número de leucocitos residuales en el plasma sanguíneo u otros concentrados hemáticos. Por consiguiente, en el marco de la presente invención, el término sangre comprende sangre entera, plasma sanguíneo o un concentrado hemático.

Se ha demostrado que, con los materiales fibrosos mencionados, se reducen, en primer lugar, leucocitos. En particular, con los materiales de fibras de celulosa se reduce principalmente el número de granulocitos y monocitos. Con materiales celulósicos, los linfocitos experimentan una escasa reducción.

Por lo tanto, en el marco del procedimiento según la invención resulta posible reducir de manera dirigida una clase determinadas de tipos celulares; por ejemplo, de la clase de los leucocitos, reducir los monocitos y los granulocitos, pero no los linfocitos. Además, los materiales fibrosos a base de celulosa se distinguen por que la retención de trombocitos se realiza en escasa medida.

Para poder garantizar de manera más segura que todas las fibras entran en contacto de forma uniforme con la sangre que circula a lo largo de las fibras, estas pueden estar dispuestas entre sí con una determinada separación, por ejemplo por medio de las denominadas fibras de separación ("spaceryarn"). La separación entre fibras resulta especialmente ventajosa para evitar el efecto de tamizado. Estas fibras de separación son especialmente convenientes, puesto que, a través de ellas, se garantiza la existencia de un espacio regular entre las fibras dispuestas de manera esencialmente paralela. Estructuras con este tipo de fibras de separación se describen, por ejemplo, en los docu-

mentos EP 732 141 o EP 285 812. Preferentemente, las fibras de separación están compuestas por el mismo material que la mayoría de las fibras paralelas. No obstante, también es posible reducir el número de otros tipos de células presentes en la sangre usando fibras de separación de un material diferente.

- 5 En determinadas aplicaciones, podría ser conveniente separar específicamente también los trombocitos de la sangre. Para estos casos, son apropiadas las fibras de tereftalato de polietileno (PET), polisulfona o polietersulfona. Si se desea una reducción de trombocitos y leucocitos, el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo con una combinación, por ejemplo, de fibras de celulosa y fibras de PET.

10 Tal como se ha descrito, una multiplicidad de fibras a base de polímeros orgánicos se encuentra dispuesta preferentemente en una carcasa con un elemento de entrada y un elemento de salida. En este caso, las fibras están normalmente dispuestas de forma tal que al menos uno de sus dos extremos está incluido en una masa de relleno fijada a la pared interior de la carcasa, de manera que alrededor de las fibras se genera un espacio exterior por el que circula la sangre. Por ejemplo, las fibras pueden tener sus extremos incluidos de forma separada en masas de relleno, extendiéndose de modo esencialmente lineal entre estas masas de relleno. Estructuras de este tipo se utilizan, por ejemplo, en el modo habitualmente designado como flujo cruzado ("cross-flow") en módulos de fibras huecas y se encuentran presentes, entre otros, en los módulos de diálisis disponibles en el comercio. En los módulos de este tipo, la realización del procedimiento según la invención implica la circulación de sangre por el espacio exterior de las fibras huecas. Sin embargo, las fibras también tener solamente uno de sus extremos, o tener ambos extremos incluidos en la misma masa de relleno, mientras que la circulación se produce alrededor del otro extremo, o bucle libre. Estas estructuras de fibras se describen, por ejemplo, en los documentos EP 732 142 o EP 371 189.

20 El grado de relleno de la carcasa con las fibras de polímeros orgánicos según la invención debe ser de entre 10% y 70%, preferentemente entre 30% y 60%. Dado que las fibras, dependiendo del material fibroso, pueden hincharse en diferente medida al entrar en contacto con el líquido, la determinación del grado de relleno de la carcasa con fibras debe efectuarse con las fibras en estado hinchado. En el caso de fibras fuertemente hinchables, tal como sucede por ejemplo en las que tienen la celulosa como base, cabe observar claras diferencias del diámetro de la fibra en estado hinchado y no hinchado. Así, en función del hinchamiento se alcanzan diferentes grados de relleno cuando las fibras se hallan presentes en estado seco. Por el contrario, las fibras que no se hinchan, o que lo hacen en escasa medida, tales como, por ejemplo, las basadas en polisulfona, exhiben nulas o escasas diferencias en la determinación del grado de relleno en estado hinchado o no hinchado.

30 El grado de relleno de la carcasa se debe limitar a los intervalos previamente mencionados con el fin, por una parte, de poner a disposición una superficie de fibras suficientemente grande y, por otra parte, para evitar la aparición de un efecto de tamizado en la reducción de leucocitos durante la realización del procedimiento según la invención.

35 El tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa debe ser de al menos 0,5 min, sin superar una duración de 5 min. En caso de un tiempo de permanencia superior a 5 min, aumenta la tendencia de la sangre a coagular y el riesgo de coagulación se incrementa a pesar del uso de un anticoagulante. En caso de tiempos de permanencia inferiores a 0,5 min, por el contrario, la adsorción leucocitaria es insuficiente. Por consiguiente, es preferible un tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa de 1 min a 3 min.

40 La velocidad de flujo lineal de la sangre a través de la carcasa con múltiples fibras a base de polímeros orgánicos debe ser de entre 5 y 30 cm/min. Por velocidad de flujo lineal se entiende la velocidad media con la que la sangre circula a través de la carcasa desde el elemento de entrada hasta el elemento de salida. En el cálculo de la velocidad de flujo lineal se incluye la llamada sección transversal de circulación libre, que se compone de la superficie de las secciones transversales en el interior de carcasa, deduciendo la suma de las superficies de las secciones transversales de todas las fibras en la carcasa. En este contexto, se debe prestar atención a que en el cálculo de la superficie de las secciones transversales de una fibra se debe tener en consideración el diámetro exterior de la fibra; en el caso de materiales fibrosos que se hinchan en contacto con la sangre, resulta determinante el diámetro exterior en estado hinchado. Velocidades de flujo lineal menores que 5 cm/min favorecen la agregación de trombocitos y la coagulación de la sangre. Las velocidades de flujo mayores que 30 cm/min dificultan la adsorción de los componentes celulares de la sangre a las superficies de las fibras.

50 Tal como se ha mencionado anteriormente, las fibras a base de polímeros orgánicos tienen un elevado grado de organización en su estructura. En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención o del dispositivo según la invención, las fibras a base de polímeros orgánicos se encuentran dispuestas en forma de haces de fibras esencialmente paralelas entre sí. En una forma de realización preferida adicional del procedimiento según la invención, las fibras a base de polímeros orgánicos están dispuestas en una o múltiples capas, en donde las fibras, dentro de una capa, muestran una disposición esencialmente paralela.

La invención se explicará más detalladamente mediante los siguientes ejemplos y figuras.

55 Muestran:

Figura 1: Reducción del número de leucocitos en una muestra de sangre mediante el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa regenerada, en función del tiempo.

Figura 2: Reducción del número de granulocitos, linfocitos, monocitos y trombocitos en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa regenerada, en función del tiempo.

5 Figura 3: Concentración del producto activador del complemento C5a en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa regenerada, en función del tiempo.

Figura 4: Reducción del número de granulocitos, linfocitos, monocitos y trombocitos en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa regenerada y uso adicional de fibras de PET, en función del tiempo.

10 Figura 5: Reducción del número de leucocitos en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa modificada, en función del tiempo.

Figura 6: Concentración del producto activador del complemento C5a en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de celulosa modificada, en función del tiempo.

Figura 7: Reducción del número de leucocitos en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de polietersulfona, en función del tiempo.

15 Figura 8: Reducción del número de leucocitos en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de polietersulfona y uso adicional de fibras de PET, en función del tiempo.

Figura 9: Concentración del producto activador del complemento C5a en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención, utilizando fibras huecas de polietersulfona y uso adicional de fibras de PET, en función del tiempo.

20 Ejemplo 1

Muestras de sangre se trataron por el procedimiento según la invención, usando fibras huecas de celulosa regenerada y se determinaron el número de leucocitos, el número de determinados tipos de leucocitos, el número de trombocitos, así como la formación del producto activador del complemento C5a, en función del tiempo. La Figura 1 muestra la reducción porcentual relativa del número de leucocitos (WBC – siglas en inglés de glóbulos blancos) en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención. Para ello, se utilizó un conjunto de fibras huecas de celulosa regenerada, con una superficie exterior de 1,36 m² y una superficie interior de 1,27 m². El conjunto de fibras huecas, compuesto por 7400 fibras con un diámetro de fibra de 242 μm en estado hinchado, y una longitud de 260 mm, se dispuso en una carcasa cilíndrica con un diámetro interior de 33 mm. El grado de relleno de la carcasa fue de aprox. 40%. Como muestra de sangre se usaron 410 ml de sangre humana, que se hicieron circular por un periodo máximo de 3 h, con un caudal de 50 ml/min, correspondiente a una velocidad de flujo lineal de 10 cm/min. El tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa fue de 2,5 min. Los resultados experimentales representados en la Figura 1 demuestran claramente que la circulación de la sangre a lo largo de la superficie exterior de las fibras determina una marcada reducción del número de leucocitos. La circulación alrededor del interior solo da lugar a una escasa reducción del número de células de aprox. 15% de la cantidad inicial. Las circulaciones interior y exterior no aportan ninguna ventaja con respecto a la circulación exclusivamente exterior. Tampoco la circulación interior a lo largo de 2 módulos consecutivos conduce a una reducción de leucocitos equivalente a la que se puede alcanzar con la circulación exterior, aun cuando la superficie de contacto de la sangre con el material fibroso, de 2,54 m², es manifiestamente mayor que con la circulación exterior (1,36 m²). De la Figura 1 se desprende que solamente se logra reducir el número de células cuando la sangre circula a lo largo del exterior de las fibras huecas. Las fibras huecas a través de las que ha circulado sangre por el interior exhiben nula o escasa adhesión celular. Lo mismo resulta válido cuando se combinan la circulación interior con la circulación exterior.

La Figura 2 muestra la medida en que se reduce el número de los diferentes tipos de leucocitos, y el efecto que el procedimiento según la invención tiene sobre el número de trombocitos. En la Figura 2 se representa la reducción porcentual relativa del número de monocitos, granulocitos, linfocitos y trombocitos en función del tiempo de tratamiento de la sangre, calculada usando fibras huecas de celulosa regenerada con una superficie exterior de 0,56 m² y 240 ml de sangre humana. A tal efecto, se dispusieron 5400 fibras con un diámetro de fibras en estado hinchado de 275 μm y una longitud de 120 mm en una carcasa cilíndrica con un diámetro interno de 38 mm. El grado de relleno de la carcasa fue de aprox. 29%. La muestra de sangre se hizo circular durante un periodo máximo de 3 h, con un caudal de 117 ml/min, correspondiente a una velocidad de flujo lineal de 14 cm/min. El tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa fue de aprox. 0,8 min. Después de 3 h, se verificó una separación de monocitos y granulocitos mayor que 95%, aunque menor para linfocitos y trombocitos, que experimentaron solo una reducción de 20% y 15%, respectivamente. Por lo tanto, con el empleo de celulosa regenerada se pueden separar de la sangre especialmente los monocitos y granulocitos.

La Figura 3 muestra la concentración del producto activador del complemento C5a en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención. Los experimentos se calcularon bajo las mismas condiciones que las indicadas en la Figura 1. Después de 3 horas de tratamiento de la sangre se calculó, con la circulación externa, un

contenido de C5a en la muestra tratada de 403 $\mu\text{g/l}$, lo que corresponde a una formación de C5a de 165 μg en la muestra de sangre tratada, o de 121 μg de C5a por m^2 de superficie de fibras.

Ejemplo 2

Se utilizó un módulo de fibras huecas semejante al descrito en el Ejemplo 1, Figura 2, si bien el haz de fibras huecas contuvo, adicionalmente, fibras de tereftalato de polietileno (PET). La Figura 4 muestra la reducción porcentual relativa, en función del tiempo, del número de monocitos, granulocitos, linfocitos y trombocitos con el uso adicional de fibras de tereftalato de polietileno. Las condiciones experimentales se corresponden, por lo demás, con las descritas en el Ejemplo 1 con respecto a la Figura 2. Mediante el uso adicional de fibras de tereftalato de polietileno se logra una separación mucho más rápida de monocitos y granulocitos, en comparación con el empleo exclusivo de fibras de celulosa regenerada. Ya al cabo de 15 minutos se había separado de la muestra más de 95% de los monocitos y 75% de los granulocitos. La separación de linfocitos en la muestra fue de aprox. 60% y la de trombocitos alcanzó aprox. 75%.

Ejemplo 3

Utilizando membranas de fibras huecas de celulosa modificada con grupos bencilo (bencilcelulosa), disponibles en el comercio, se trataron muestras de sangre por el procedimiento según la invención y se determinaron tanto el número de leucocitos como la formación del producto activador del complemento C5a en función del tiempo. La Figura 5 muestra la reducción porcentual relativa del número de leucocitos (WBC – véase antes) en función del tiempo con respecto a la cantidad inicial en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención. En este caso, se utilizan fibras huecas con una superficie interior de 1,36 m^2 y una superficie exterior de 1,47 m^2 . La muestra de sangre tratada consistió en 440 ml de sangre humana. Para ello, se utilizó un conjunto de fibras de 7900 fibras, con un diámetro de fibras de 246 μm en estado hinchado y una longitud de 240 mm, incluido en una carcasa cilíndrica con un diámetro interior de 34 mm. El grado de relleno de la carcasa fue de aprox. 41%. La muestra de sangre se hizo circular durante un periodo máximo de 3 h, con un caudal de 50 ml/min, correspondiente a una velocidad de flujo lineal de 9,4 cm/min. El tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa fue de aprox. 2,5 min. De manera análoga a los experimentos representados en la Figura 1, resulta evidente que se produce una marcada reducción de leucocitos solo con la circulación a lo largo de la superficie exterior. Aun cuando la superficie interior tiene un tamaño similar al de la superficie exterior, la circulación a través del interior solo conduce a una escasa reducción de aprox. 15% de la cantidad inicial. Las circulaciones interior y exterior no suponen ninguna ventaja con respecto a la circulación exclusivamente exterior. La circulación a lo largo de la superficie exterior, paralela a las fibras, determina una reducción de los leucocitos contenidos en la muestra de sangre de 80%.

La formación del producto activador del complemento C5a se analizó bajo las mismas condiciones experimentales y con la misma membrana de fibras huecas que se han indicado en la Figura 5. Los resultados aparecen representados en la Figura 6. De modo similar a la Figura 5, se observa también en este caso una clara diferencia entre la circulación interior y la exterior. A pesar de que las superficies de contacto tienen prácticamente el mismo tamaño, la formación de C5a con la circulación exterior es aprox. 2,5 veces mayor que con la circulación interior. Después de 3 h de circulación exterior, se observa en la muestra de sangre una concentración de C5a de 365 $\mu\text{g/l}$, correspondiente a 161 μg en la muestra de sangre, o a 109 μg de C5a por m^2 de superficie de fibras.

Ejemplo 4

Tal como se muestra en la Figura 7, también es posible reducir los leucocitos utilizando fibras huecas de polietersulfona. En este caso, se utilizaron fibras huecas con un diámetro exterior de 300 μm , una longitud efectiva de 275 mm, una superficie interior de 1,6 m^2 y una superficie exterior de 2,2 m^2 , en un módulo con un diámetro interior de 38,5 mm recubierto con 8500 fibras, es decir, con un grado de relleno de aprox. 52%. Se hicieron circular 381 ml de sangre humana a través del módulo, con un caudal de 50 ml/min. La velocidad de flujo lineal fue de aprox. 9 cm/min y el tiempo de permanencia, de 3,1 min. También aquí se demuestra que las fibras huecas de polietersulfona (PES) con circulación exterior producen una reducción del número de leucocitos de aproximadamente 70%. Bajo las condiciones requeridas para calcular el contenido de C5a en relación con la superficie exterior de las fibras, se determinó para las fibras huecas de polietersulfona una formación de C5a referida a la superficie de 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2$.

Ejemplo 5

En el Ejemplo 5, además de fibras huecas de polietersulfona, se utilizan fibras de PET para llevar a cabo el procedimiento según la invención. La Figura 8 muestra la reducción porcentual relativa de leucocitos (WBC – véase antes) en una muestra de sangre tratada por el procedimiento según la invención. A tal efecto, se utilizaron fibras huecas de polietersulfona (PES) combinadas con fibras de tereftalato de polietileno (PET), con una superficie interior de 1,31 m^2 y una superficie exterior de 1,57 m^2 . En una carcasa cilíndrica con un diámetro interior de 34 mm se dispusieron 8000 fibras con un diámetro de fibras de 260 μm y una longitud de 240 mm. El grado de relleno de la carcasa fue de aprox. 47%. Como muestra de sangre se usaron 470 ml de sangre humana, que se hicieron circular durante un periodo máximo de 3 h con un caudal de 50 ml/min, correspondiente a una velocidad de flujo lineal de 10 cm/min. El tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa fue de 2,3 min. En este caso, se demuestra que las fibras huecas de polietersulfona, combinadas con fibras de tereftalato de polietileno, producen, con la circulación exterior, una

reducción del número de leucocitos de aproximadamente 50%. La circulación interior da lugar solamente a una escasa reducción de aprox. 18% de la cantidad inicial.

5 De manera análoga a los resultados representados en la Figura 8, dependiendo de la circulación existen también grandes diferencias en relación con la formación de C5a. Los resultados que se muestran en la Figura 9 se calcularon con la misma membrana que se describe en la Figura 8, y bajo las mismas condiciones requeridas para el cálculo del contenido de C5a con respecto a la superficie de fibras. Con la circulación interior, se determinó una concentración de C5a de solamente 30 $\mu\text{g/ml}$ y, con la circulación exterior, se obtuvo una concentración de C5a de 192 $\mu\text{g/ml}$. Este último valor corresponde a una generación de C5a de 90 μg en la muestra de sangre tratada, o de 58 μg por m^2 de superficie de fibras.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para reducir el número de leucocitos en sangre por medio de un tratamiento *in vitro* de la sangre en una estructura consistente en una multiplicidad de fibras a base de polímeros orgánicos, en donde esta multiplicidad de fibras está contenida en una carcasa con un elemento de entrada y un elemento de salida, en la que la sangre se introduce en la carcasa a través del elemento de entrada, circula seguidamente por la carcasa, circulando la sangre a lo largo de las superficies exteriores de las fibras y, finalmente, abandona la carcasa a través del elemento de salida, caracterizado por que se utilizan fibras que con la circulación de la sangre a lo largo de su superficie exterior determinan una formación del producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 10 μm por m^2 de superficie de fibras, y por que la disposición de las fibras exhibe un grado elevado de organización, entendiéndose por grado elevado de organización que una gran parte de las fibras están dispuestas de manera adyacente a lo largo de su dirección de extensión.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las fibras determinan una formación en sangre del producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 75 μg por m^2 de superficie de fibras.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que las fibras a base de polímeros orgánicos son fibras huecas, y por que la sangre circula a lo largo de la superficie exterior de las fibras huecas.
4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el número de fibras a base de polímeros orgánicos se encuentra dentro del intervalo de 2.000 hasta 20.000 fibras.
5. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el diámetro de fibra de las fibras a base de polímeros orgánicos es de entre 0,05 mm y 2 mm.
6. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la superficie específica de la estructura de las fibras a base de polímeros orgánicos se encuentra entre 0,1 y 100 cm^2 por ml de sangre a tratar.
7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que las fibras a base de polímeros orgánicos están compuestas por celulosa regenerada, acetato de celulosa o celulosa modificada con grupos bencilo (bencilcelulosa).
8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las fibras a base de polímeros orgánicos están compuestas, esencialmente, de polietersulfona o polisulfona.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que la estructura de la multiplicidad de fibras contiene, adicionalmente, también fibras de tereftalato de polietileno.
10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el grado de relleno de la carcasa con fibras se encuentra dentro del intervalo de 10% hasta 70%.
11. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el tiempo de permanencia de la sangre en la carcasa es de 0,5 min hasta 5 min.
12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que la velocidad de flujo lineal con la que circula la sangre a través de la carcasa es de entre 5 y 30 cm/min.
13. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que las fibras a base de polímeros orgánicos están presentes en forma de haces de fibras con fibras esencialmente paralelas.
14. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que las fibras a base de polímeros orgánicos están dispuestas en una o múltiples capas, y por que las fibras dentro de una capa se disponen de forma esencialmente paralela.
15. Dispositivo para la reducción de leucocitos de la sangre, que comprende una multiplicidad de fibras a base de polímeros orgánicos en una carcasa con un elemento de entrada y un elemento de salida, en donde las fibras tienen incluidos al menos uno de sus extremos en una masa de relleno fijada a la cara interior de la carcasa, de manera que alrededor de las fibras se forma un espacio exterior a través del que circula la sangre, caracterizado por que la disposición de las fibras exhibe un grado elevado de organización, en donde por grado elevado de organización se entiende que una gran parte de las fibras están dispuestas de modo adyacente a lo largo de su dirección de extensión, y por que las fibras a base de polímeros orgánicos determinan una formación del producto activador del complemento C5a en una concentración de al menos 10 μg por m^2 de superficie de fibras.

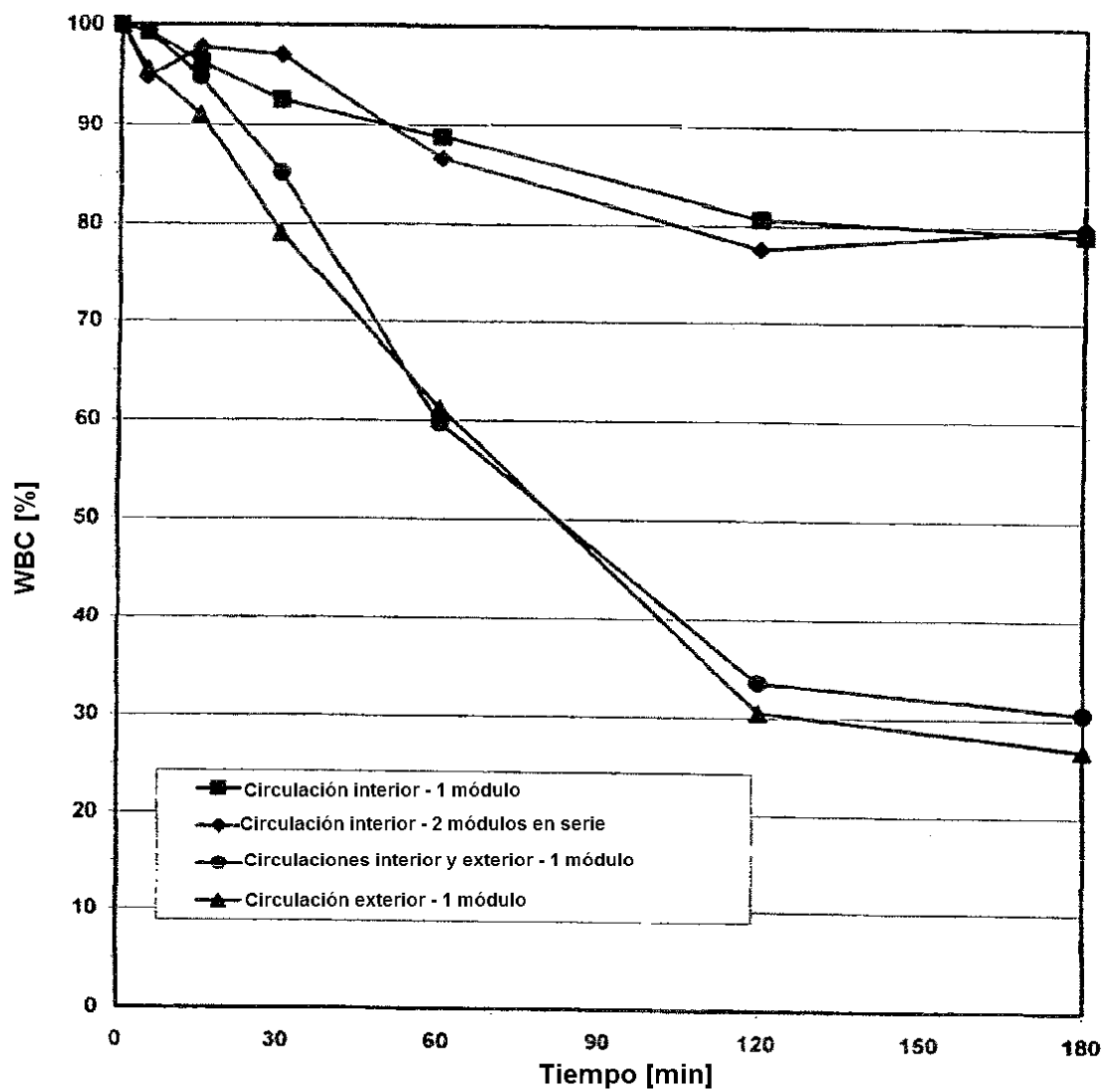


Figura 1

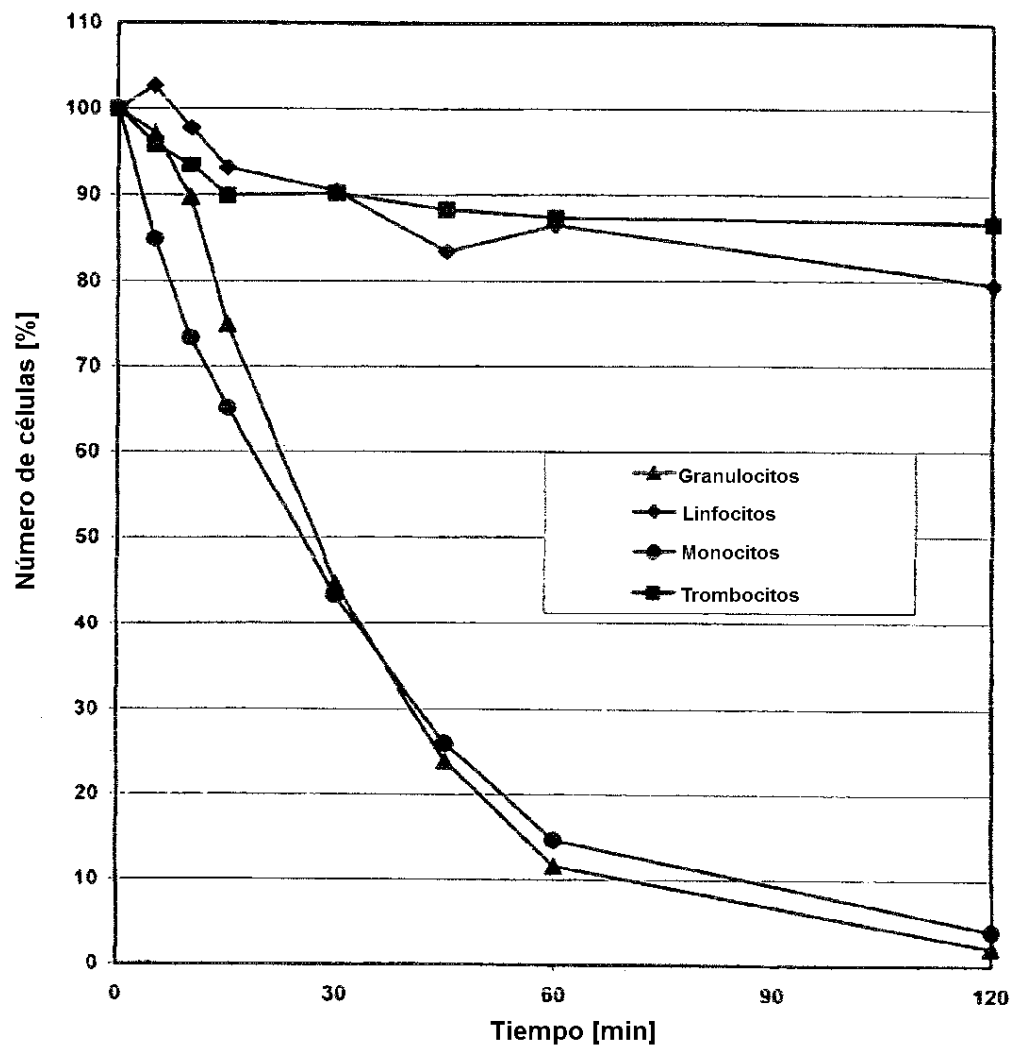


Figura 2

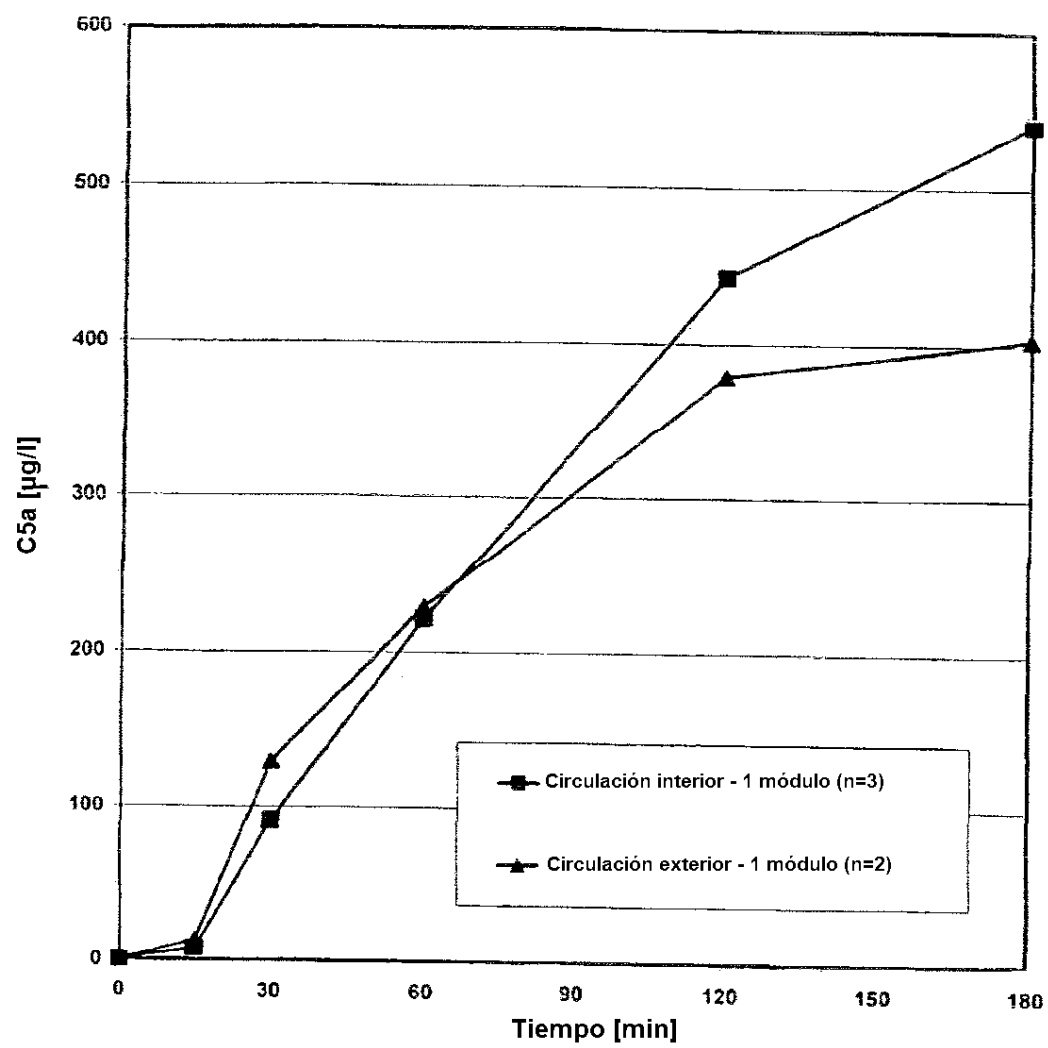


Figura 3

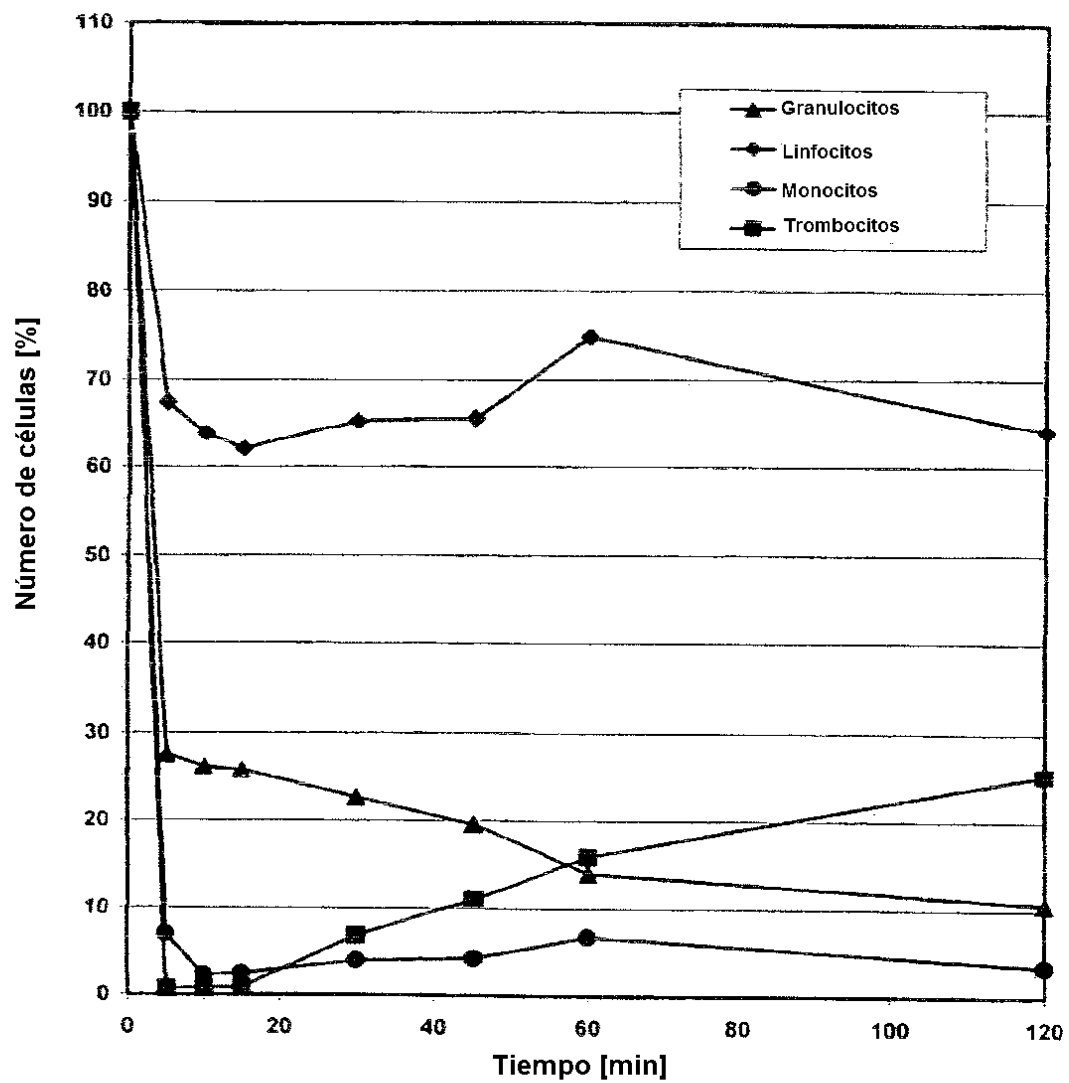


Figura 4

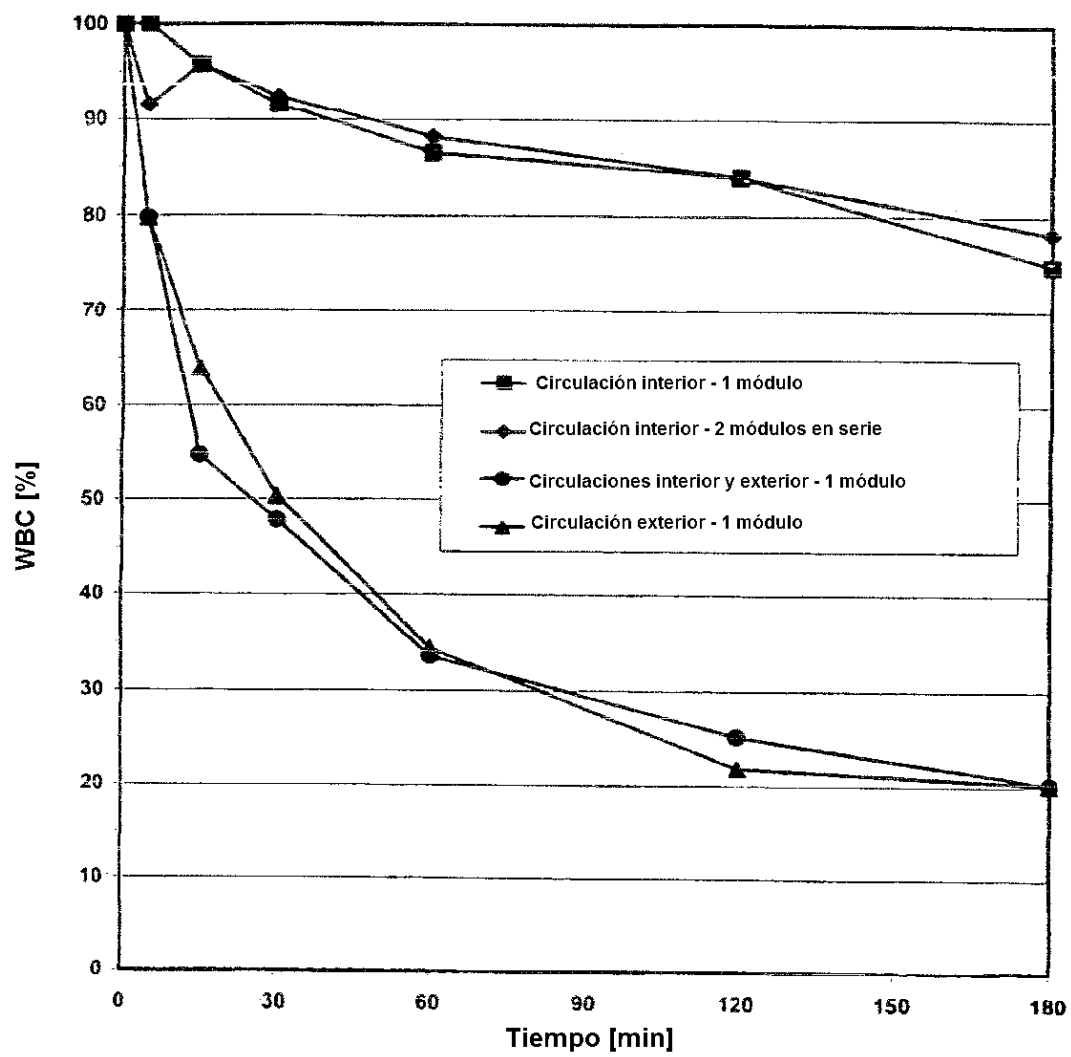


Figura 5

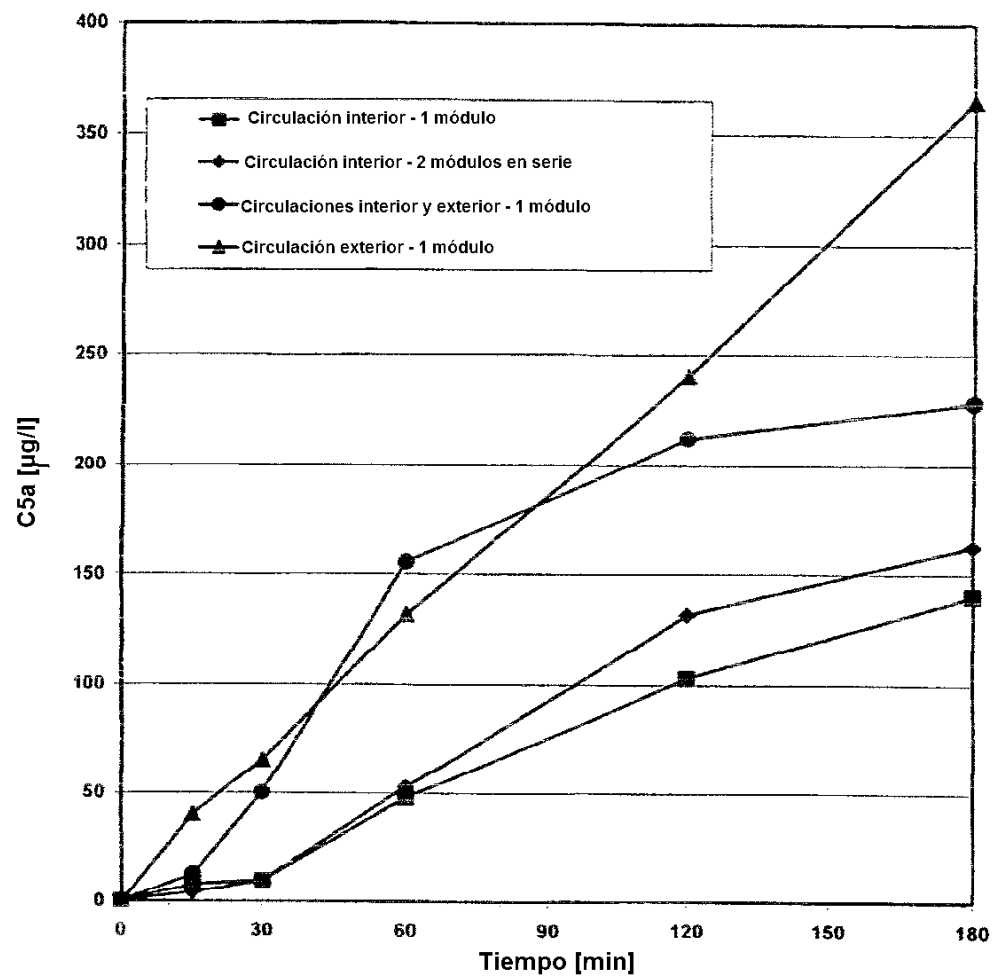


Figura 6

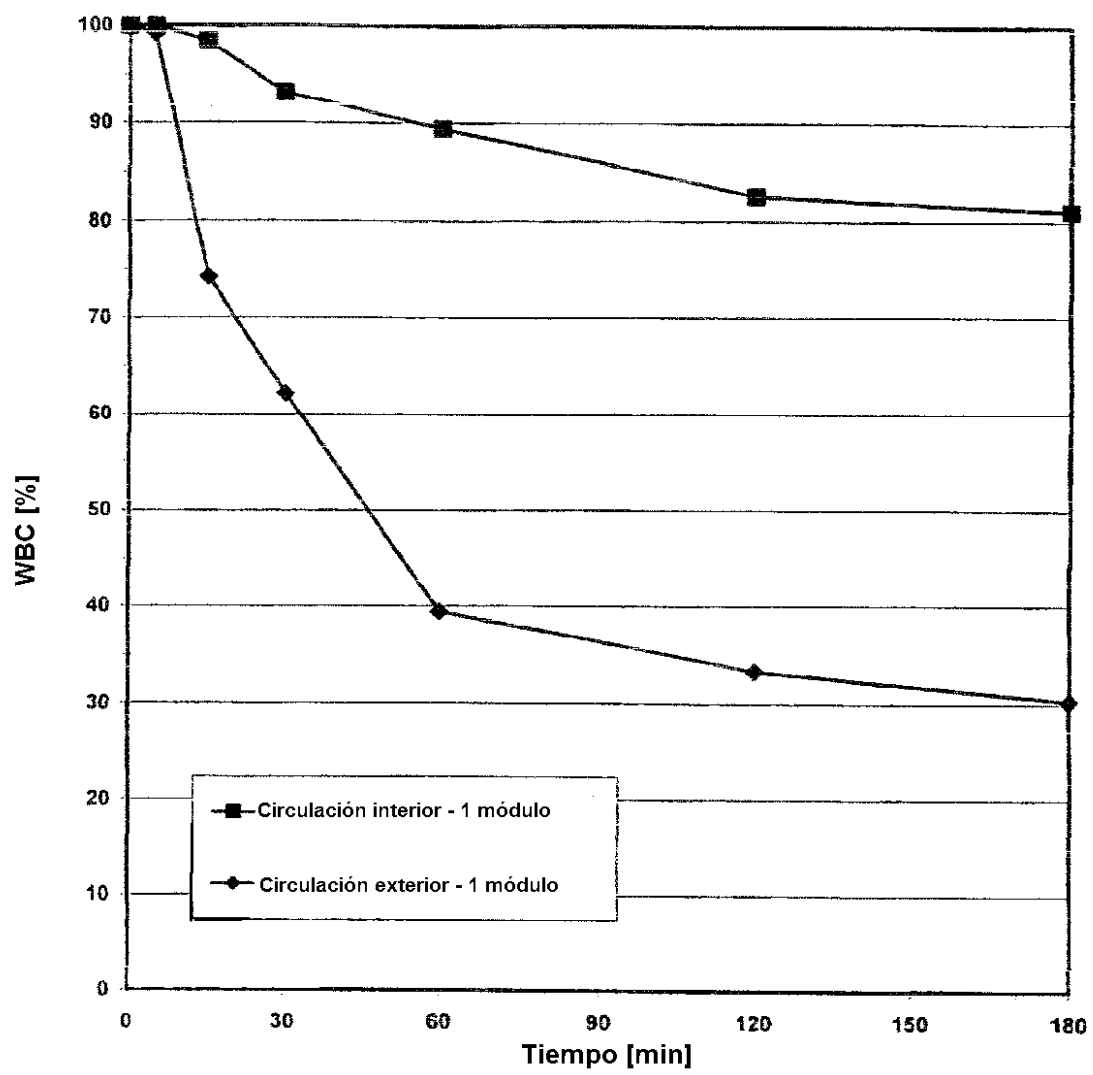


Figura 7

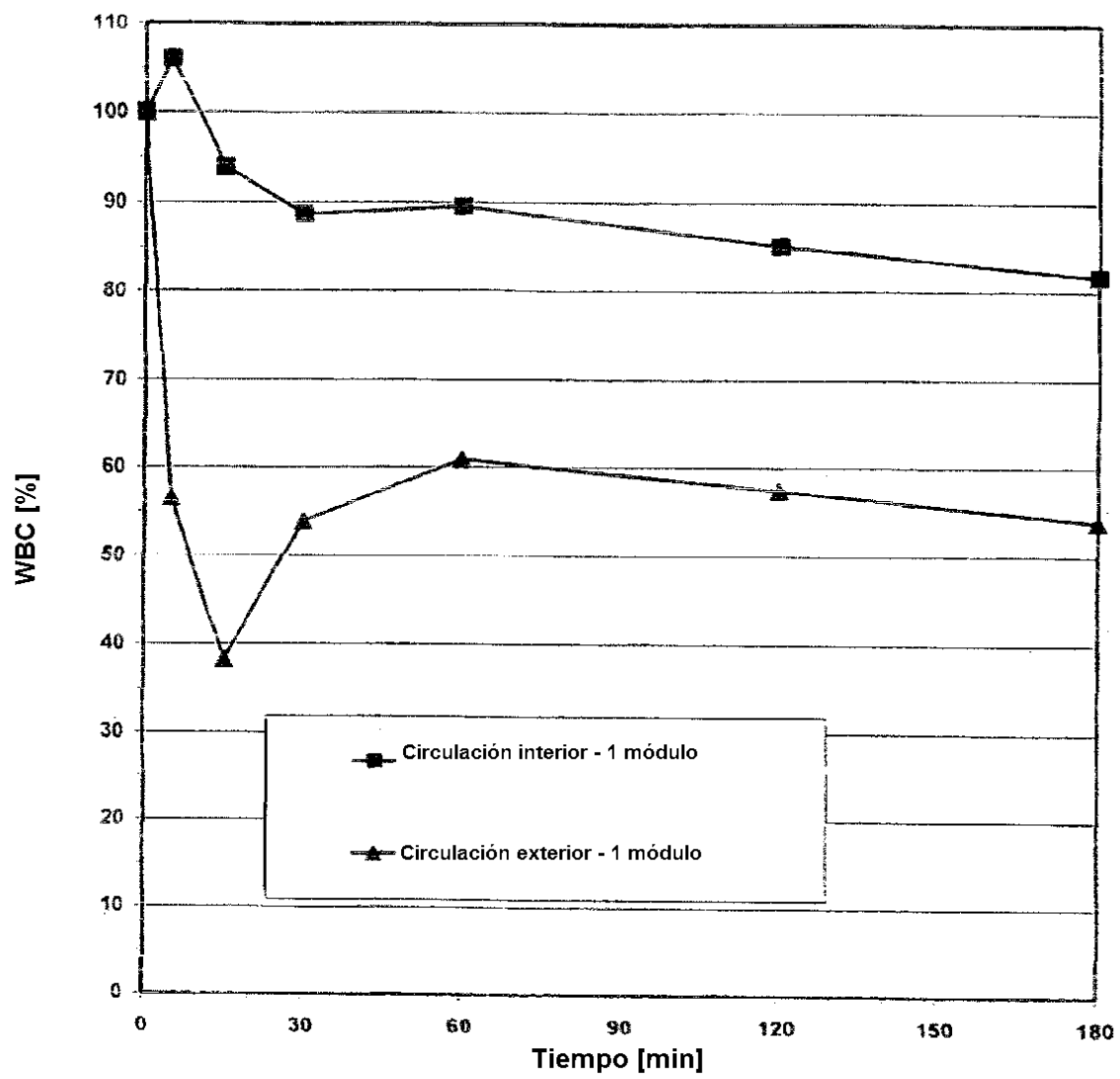


Figura 8

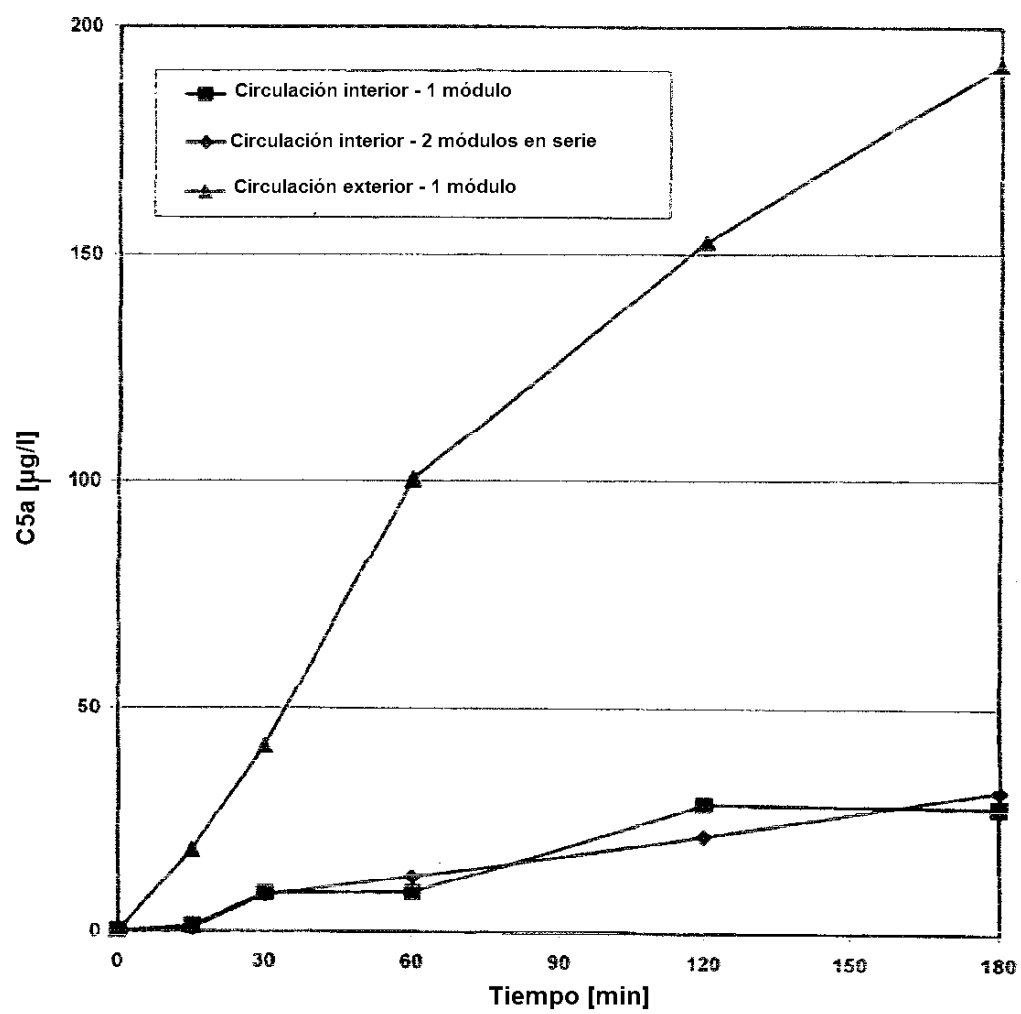


Figura 9