

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 979**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 35/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05768180 .1**

96 Fecha de presentación: **04.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1773452**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Procedimiento de lisis/resellado para incorporar un ingrediente activo en eritrocitos**

30 Prioridad:
05.08.2004 FR 0408667

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
**ERYTECH PHARMA
60 AVENUE ROCKEFELLER
69008 LYON, FR**

72 Inventor/es:
GODFRIN, Yann

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 376 979 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 de lisis/resellado para incorporar un ingrediente activo en eritrocitos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento que permite la realización de la técnica denominada de lisis/resellado, que permite incorporar ingredientes activos en eritrocitos.

La invención se refiere asimismo a composiciones de eritrocitos que contienen asparaginasa o similar, o hexafosfato de inositol, y que se pueden obtener mediante la realización del procedimiento según la invención.

10 La técnica de lisis/resellado se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101. Esta última describe una instalación relativamente compleja que comprende, por un lado, un alojamiento refrigerado para la porción de lisis, en el que se coloca un conjunto que comprende elementos de un solo uso, incluyendo un cartucho de diálisis, tubos, bolsas de tipo curvo o serpentines, y elementos metálicos retirables, tales como serpentín de enfriamiento, y, por
15 otra parte, un alojamiento para el resellado, alojamiento el cual está provisto de medios de recalentamiento y en el que se coloca un conjunto de un solo uso de material plástico.

Los glóbulos rojos, que se han separado previamente del plasma y que están sometidos a fuerzas iónicas débiles (en medio hipotónico), se hinchan hasta alcanzar un volumen crítico en el que la membrana está distendida hasta el
20 punto de volverse permeable a los iones y a las macromoléculas. El examen con un microscopio de las membranas eritrocíticas revela entonces la aparición de poros que miden de 20 a 500 nm, por los cuales se puede escapar la hemoglobina (P. Seeman J. Cell. Biol. 1967, 32(1): 55-70). La restauración de la isotonicidad del medio de suspensión conlleva el cierre de los poros, haciendo a la membrana impermeable a las macromoléculas. Sólo se mantiene una permeabilidad iónica.

25 El choque hipotónico se lleva a cabo haciendo circular los glóbulos rojos en el compartimiento de "sangre" de un dializador, que tiene preferentemente fibras huecas, y haciendo circular en contracorriente una disolución hipotónica en el compartimiento de "dializado". La ventaja de esta técnica está en el confinamiento de los glóbulos rojos durante el choque hipotónico, lo que permite reducir considerablemente las pérdidas de constituyentes que son esenciales para la vida de esas células. Así, la semivida de los glóbulos rojos no se modifica significativamente *in vivo*.
30

La ventaja de usar glóbulos rojos como vehículos para medicamentos, con respecto a otras técnicas, tales como el encapsulamiento en liposomas o microesferas, está esencialmente en el hecho de que esos corpúsculos tienen una biocompatibilidad "natural", son totalmente biodegradables según un procedimiento bien conocido, tienen una
35 duración de vida *in vivo* relativamente larga (120 días aproximadamente), y se pueden encapsular en ellos diversas moléculas químicas y terapéuticas.

El proceso de internalización por lisis y resellado de los eritrocitos es un fenómeno multifactorial complejo. Algunos parámetros físicos/químicos importantes que influyen sobre la variabilidad de los resultados son la concentración en
40 términos de hemoglobina antes de la diálisis, el caudal de la suspensión de eritrocitos en el dializador, la osmolaridad del tampón de diálisis hipotónica, las temperaturas de diálisis y de resellado, y la presión transmembránica en el dializador. La fragilidad osmótica de los eritrocitos varía de una muestra sanguínea a otra, y podría ser un factor biológico preponderante. Así, L. Boucher *et al.*, Biotechnoll. Appl. Biochem., 1996, 24, 73-78, han estudiado la influencia de las variaciones de la fragilidad osmótica de diferentes poblaciones de glóbulos rojos sobre la distribución y concentración final de hexafosfato de inositol. En conclusión, los autores indican que la fragilidad osmótica inicial de los glóbulos rojos tiene un papel predominante en términos del grado de lisis y las variaciones en la internalización del ingrediente activo, y que esa fragilidad osmótica depende de numerosos factores, tales como la permeabilidad de los glóbulos rojos, la relación superficie/volumen y el contenido iónico, el estado fisiológico y la edad del donante (véase también A.A. Hussain *et al.*, Br. J. Haematol. 1984, 57(4): 716-718),
50 el tiempo de conservación de la sangre, la presencia de medicamentos, las enfermedades (véase también K. Kolanjiappan *et al.*, Clin. Chim. Acta 2002, 326(1-2): 143-149), y los tratamientos. Los resultados obtenidos, haciendo variar el caudal de la suspensión de eritrocitos, demostraron la extrema sensibilidad de las condiciones de operación, con un caudal que varía entre 12 y 14 ml/min, dependiendo de si los glóbulos rojos pertenecen a un grupo de un nivel de fragilidad reducido o a un grupo de un nivel de fragilidad elevado.

55 Estos textos dan por lo tanto una primera información sobre los diferentes factores que influyen en la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos y sobre la efectividad de la incorporación mediante la técnica de lisis/resellado. Permiten comprender las dificultades encontradas en la práctica, que explican que esa técnica no se puede aplicar normalmente en clínica humana.

60 Una publicación muy reciente resume muy bien la situación actual. C. G. Millan *et al.* han publicado en Journal of Controlled Release 2004, 95: 27-49, un repaso general sobre el uso de los eritrocitos como vehículos farmacéuticos, en el que concluyen que, a pesar del interés que suscitan en medicina humana, su desarrollo es hoy en día muy limitado, debido a las dificultades de almacenamiento, a riesgos de contaminación y a la ausencia de procedimiento industrial válido que permita su preparación.
65

La asparaginasa es una enzima producida a partir de microorganismos bacterianos (*E. coli* o *Erwinia*) que hidroliza y agota la asparagina, un aminoácido indispensable para la fabricación de las proteínas necesarias para la vida celular, en particular fibroblastos. Algunas células linfoblásticas cancerosas no tienen, a diferencia de las células normales, la capacidad de sintetizar ellas mismas su asparagina, y dependen de fuentes extracelulares. El tratamiento mediante asparaginasa les priva por lo tanto de ese constituyente, lo que conduce a su muerte. Este antimitótico es selectivo con respecto de las células tumorales.

Sin embargo, en seres humanos, la asparaginasa nativa induce la producción de anticuerpos que están presentes de media en más del 70% de los pacientes, conduciendo a un aumento en el aclaramiento de la asparaginasa y de reacciones alérgicas a veces muy severas (B. Wang *et al.*, *Leukaemia* 2003 17,8:1583-1588). De este modo, a pesar de ser muy eficaz en el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas, la asparaginasa es altamente tóxica y puede conllevar reacciones de hipersensibilidad, que van desde una simple reacción del tipo urticaria hasta un verdadero choque anafiláctico. Por otro lado, se observan efectos nefastos del tipo neurológico (trastornos de la conciencia), del tipo hemostático (hipofibrinogenemia, disminución del índice sérico de antitrombina III y otros factores de la coagulación, conduciendo a complicaciones hemorrágicas y/o trombóticas), del tipo gastrointestinal y del tipo pancreático (incluyendo pancreatitis agudas).

El encapsulamiento de la asparaginasa en eritrocitos permite mejorar el índice terapéutico (D. Schrijvers *et al.*, *Clin. Pharmacokinet.* 2003, 42 (9): 779-791). Por lo tanto, sería de gran interés proporcionar un procedimiento que permita encapsular asparaginasa en eritrocitos de manera reproducible e industrial.

Por otro lado, el hexafosfato de inositol se ha propuesto como sustituto del 2,3-DPG (2,3-difosfoglicerato) en los eritrocitos, para disminuir significativamente la afinidad del oxígeno por la hemoglobina y aumentar la liberación del oxígeno en los tejidos (documento EP-A-0 101 341). Las patentes US 4.321.259, US 5.612.207 y US 6.610.702 describen la incorporación de ese sustituto en eritrocitos y el uso de estos en diversas aplicaciones terapéuticas. Entre ellas, se menciona una indicación como un aditivo para un tratamiento de cáncer mediante radioterapia, a fin de mejorar la oxigenación de tumores hipóxicos y su sensibilidad a la radioterapia. Sin embargo, esa indicación no está acompañada de ningún elemento de viabilidad.

Para el encapsulamiento, el documento 4.321.259 usa la fusión entre eritrocitos y liposomas que contienen hexafosfato de inositol. El documento US 5.612.207 usa una técnica por electroporación. El documento US 6 610 702 presenta una mejora en la técnica de electroporación, asociando el hexafosfato de inositol con cationes de amonio para formar un complejo hidrosoluble biocompatible que puede promover la penetración en los eritrocitos. Finalmente, en *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1996, 24, 73-78, descrito anteriormente, L. Boucher *et al.* estudian la introducción de hexafosfato de inositol en eritrocitos mediante la técnica de lisis/resellado. Por lo tanto, se abren diferentes vías para el experto en la técnica a fin de introducir ese compuesto en eritrocitos. Sin embargo, como mencionan C. G. Millan *et al.* (anteriormente), cuando se hace referencia al hexafosfato de inositol para el transporte de oxígeno en general, sin embargo, el uso de eritrocitos que incorporan una molécula tal como hexafosfato de inositol se enfrenta hoy en día a la ausencia de un procedimiento industrial válido.

Por lo tanto, en esta aplicación sería muy ventajoso disponer de un procedimiento que permita encapsular hexafosfato de inositol en eritrocitos de manera reproducible e industrial.

Teniendo en cuenta lo anterior, la solicitante se ha puesto como objetivo proporcionar un procedimiento para la lisis/resellado industrial que permita producir eritrocitos que incorporan de manera reproducible cantidades deseadas de ingrediente activo, y que permita obtener un producto que cumpla con las normas para transfusión sanguínea (esterilidad, ausencia de patógenos y pirógenos).

Un objetivo importante de la invención es proporcionar tal procedimiento susceptible de ser aplicado a los peletes globulares que cumplan con las normas requeridas para transfusión sanguínea.

Otro objetivo es proporcionar tal procedimiento que permita encapsular asparaginasa o hexafosfato de inositol en eritrocitos de manera efectiva, reproducible, segura y estable.

Estos objetivos, así como otros, se alcanzan mediante un procedimiento de lisis/resellado para la preparación de eritrocitos que contienen al menos un ingrediente activo, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 1- suspender un pelete globular en una disolución isotónica que tiene un nivel de hematocrito igual o mayor que 65%, con refrigeración entre +1 y +8°C,
- 2- medir la fragilidad osmótica a partir de una muestra de eritrocitos de ese mismo pelete globular, pudiendo ser realizadas las etapas 1 y 2 en un orden cualquiera (incluido en paralelo),
- 3- llevar a cabo un procedimiento de lisis e internalización del ingrediente activo, en el interior de la misma cámara, a una temperatura mantenida constantemente entre +1 y +8°C, que comprende permitir que la suspensión de eritrocitos, que tiene un nivel de hematocrito igual o mayor que 65%, y una disolución de lisis hipotónica, que está refrigerada entre +1 y 8°C, circulen en un cartucho de diálisis; ajustándose los parámetros de lisis según la fragilidad osmótica medida previamente, en el que el caudal de la suspensión de eritrocitos que

pasa al cartucho de diálisis se ajusta, o la osmolaridad de la disolución de lisis se selecciona, basándose en la medida de la fragilidad osmótica; y

4- Llevar a cabo un procedimiento de resellado en una segunda cámara, en cuyo interior la temperatura está adaptada al resellado, preferiblemente entre +30 y +40°C, y en presencia de una disolución hipertónica.

5 En una realización preferida, la etapa 2 se lleva a cabo en una muestra de la suspensión preparada en la etapa 1. Como se explicará después, la suspensión se puede haber preparado a partir de un pelete globular que se ha sometido a operaciones de procesamiento habituales, tales como el lavado con una disolución salina. Además, el ingrediente activo a internalizar puede estar presente en esta suspensión. Por lo tanto, es ventajoso llevar a cabo la
10 etapa 2 en una muestra de esta suspensión, y en el caso de que el ingrediente activo esté en la suspensión inicial, la etapa 2 se lleva a cabo en una muestra de suspensión que contiene el ingrediente activo.

Por el término "internalización" se entiende a la introducción del ingrediente activo en el interior de los eritrocitos.

15 Según una característica de la invención, el pelete globular se suspende en una disolución isotónica que tiene un nivel hematocrito elevado, que es igual o mayor que 65%, y preferentemente igual o mayor que 70%, y esa suspensión se refrigera entre +1 y +8°C, preferentemente entre +2 y +6°C, típicamente del orden de +4°C. Según un método particular, el nivel de hematocrito está comprendido entre 65 y 80%, preferentemente entre 70 y 80%.

20 Según una característica importante de la invención, la fragilidad osmótica se mide con relación a los eritrocitos justo antes de la etapa de lisis. Los eritrocitos o la suspensión que los contiene están ventajosamente a una temperatura próxima o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. Según otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica efectuada se usa rápidamente, es decir, que el procedimiento de lisis se lleva a cabo en un plazo corto después de la toma de la muestra. Preferentemente, ese intervalo de tiempo entre la toma de
25 la muestra y el comienzo de la lisis es menor o igual a 30 minutos, aún más preferiblemente menor o igual a 25 minutos, o incluso a 20 minutos.

Los dos parámetros que permiten controlar la diálisis son el tiempo durante el cual las células están presentes en el dializador (en función de las características de este último) y la osmolaridad del dializado. Los dos parámetros deben ser ajustados en función de las características de resistencia osmótica, o, a la inversa, de fragilidad osmótica de los glóbulos rojos que se procesan para ser sometidos a las etapas de lisis/resellado. Esta resistencia osmótica se puede caracterizar por al menos uno de los parámetros siguientes:

- a. la osmolaridad del medio para el cual aparece la hemólisis, es decir, el comienzo de la formación de los poros.
- 35 b. la velocidad V de la hemólisis, determinada por el gradiente de la parte lineal de la curva % de hemólisis = f (osmolaridad del medio),
- c. el porcentaje de hemólisis para una osmolaridad dada,
- d. la osmolaridad que permite obtener 50% de hemólisis (H_{50}),
- 40 e. el tiempo para obtener un cierto porcentaje de hemólisis (por ejemplo 50%).

Según formas de realización preferidas, la resistencia osmótica se caracteriza con la ayuda de los parámetros b, d o b y d.

45 Por lo tanto, la fragilidad osmótica debe de ser medida en un periodo de tiempo corto, que es compatible con el intervalo de tiempo corto entre la toma de la muestra y el comienzo de la lisis. Según una característica de la invención, se mide uno o más de esos parámetros de hemólisis, frente a una disolución hipotónica, que tiene isotonicidad conocida, por ejemplo agua (agua destilada u otra), a través de una membrana semipermeable. Se puede idear un método manual. Sin embargo, según una realización preferida de la invención, la fragilidad osmótica se mide con la ayuda de un aparato de medición automático configurado para medir la fragilidad osmótica de una muestra de eritrocitos en menos de 15 minutos, más particularmente en menos de 12 minutos y preferentemente en menos de 10 minutos, y el resultado obtenido se usa en un breve intervalo de tiempo para ajustar los parámetros de la lisis e iniciar esta última.

55 La medición de la fragilidad osmótica se puede llevar a cabo con la ayuda de un dispositivo que automatiza al menos en parte la técnica manual descrita por J.V. Dacie en *Practical Haematology*, 2ª ed., Churchill, Londres 1956. Un ejemplo de tal dispositivo se describe en el artículo de J. Didelon *et al.*, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 23 (2000) 31-42. El principio se basa en el uso de un dispositivo que pone juntos, a cada lado de una membrana semipermeable, la muestra de la suspensión de eritrocitos a evaluar y una disolución hipotónica, de isotonicidad conocida, por ejemplo agua destilada, en volúmenes adecuados, a fin de generar una hemólisis lenta de los eritrocitos a medida que los iones de NaCl se difunden hacia la disolución, por ejemplo agua destilada. La evolución de la hemólisis a lo largo del tiempo se sigue mediante la medición de la transmitancia (véase también J. Didelon *et al.*, *Biorheology* 37, 2000: 409-416) por medio de una irradiación láser que tiene una longitud de onda de 808 nm. Una célula fotoeléctrica mide las variaciones de la luz transmitida a través de la suspensión. Por ejemplo, las mediciones se llevan a cabo durante 10 minutos. El dispositivo permite obtener uno o más de los parámetros a - e
65 mencionados anteriormente.

Según un primer método, la medición de la fragilidad osmótica se lleva a cabo en una muestra cuya temperatura inicial está comprendida entre +1 y +8°C, preferentemente con agua destilada, que también a esa temperatura, en condiciones en las que el cambio de la temperatura no es perjudicial para la medición. Según un segundo método, la medición de la fragilidad osmótica se lleva a cabo en una muestra mantenida a la temperatura comprendida entre +1 y +8°C. Así, el dispositivo de medición descrito en J. Didelon et al. anteriormente se puede modificar para permitir el control de la temperatura. Preferentemente, esta temperatura es próxima o idéntica a la temperatura de la lisis.

Una vez que se ha determinado uno o más de estos parámetros, se puede aplicar una relación, teniendo en cuenta el o los parámetros, a fin de determinar el caudal de las células en el dializador, o la osmolaridad del dializado, que es suficiente para obtener glóbulos rojos que encapsulan la sustancia "activa" y/o la cantidad deseada de esta:

$$\text{Caudal de eritrocitos} = [A \times (H_{50})] + [B \times (V)] + K$$

- A y B = variable que son ajustables en función del dializador y de la osmolaridad de la disolución de lisis
- K = constante de ajuste.

$$\text{Osmolaridad del dializado} = [C \times (H_{50})] + [D \times (V)] + K$$

- C y D = variables que son ajustables en función del dializador y del caudal de eritrocitos en el dializador
- K = constante de ajuste.

Según una realización preferida, se mide la concentración de NaCl, en g/l, que provoca una hemólisis de alrededor de 50% (parámetro d.), y el caudal de la suspensión de eritrocitos en el cartucho de diálisis se ajusta según los valores de concentración medidos.

Según un aspecto de la invención, el procedimiento de lisis se inicia cuando la temperatura de la suspensión de eritrocitos está comprendida entre +1 y +8°C, y se ha medido la fragilidad osmótica y se han registrado los parámetros de lisis.

Según una característica ventajosa, la suspensión inicial a procesar se coloca en la cámara de lisis/internalización mencionada anteriormente. Según una realización de la invención, el procedimiento usa un módulo refrigerado provisto de un control de temperatura, se coloca y se conecta en ese módulo una bolsa de la suspensión de eritrocitos, que se refrigera entre +1 y +8°C, a un conjunto retirable estéril de un solo uso, que comprende un cartucho de diálisis, tubos para conectar el cartucho, por un lado, a la bolsa y, por el otro lado, a la disolución de lisis, comprendiendo además el módulo medios susceptibles de provocar la circulación de la suspensión de eritrocitos y de la disolución de lisis, módulo en cuyo interior se estabiliza la temperatura entre +1 y +8°C. El módulo refrigerado está dimensionado para alojar la bolsa y el conjunto retirable de un solo uso. El hecho de que la bolsa, el cartucho de diálisis, y la disolución de lisis, que están conectados por diversos tubos, se proporcionen en un único módulo refrigerado de este tipo es una característica ventajosa del procedimiento según la invención.

El término "bolsa" se refiere a las bolsas flexibles que se usan habitualmente en el campo de las transfusiones sanguíneas y derivados sanguíneos.

Según un aspecto importante de la invención, se llevan a cabo etapas para mantener los eritrocitos en suspensión homogénea en la bolsa, para mantener estable el nivel de hematocrito de la suspensión que atraviesa el dializador. Según una característica de la invención, la bolsa está así provista de una circulación externa en bucle, susceptible de provocar una circulación de la suspensión de y hacia la bolsa.

Mediante la expresión "cartucho de diálisis" se entiende un elemento que comprende dos compartimientos separados por una pared de diálisis, a través de la cual se puede efectuar un intercambio iónico que permite modificar de manera controlada la presión osmótica de una disolución acuosa situada en uno de los compartimientos, introduciendo en el otro compartimiento una disolución acuosa que comprende una sal. Este tipo de cartucho se usa ampliamente en el campo médico. Según un método preferido, se usa un cartucho de diálisis que tiene fibras huecas, por ejemplo un cartucho de este tipo que tiene las siguientes propiedades específicas: diámetro interior de las fibras comprendido entre 100 y 400 μm, superficie exterior total de las fibras comprendida entre 0,3 y 2 m², longitud de las fibras comprendida entre 10 y 40 cm, coeficiente de ultrafiltración comprendido entre 1,5 y 8 ml/h.mmHg.

Tal como se ha expuesto más arriba con detalle, el procedimiento de lisis se puede iniciar cuando la temperatura de la suspensión en la bolsa está comprendida entre +1 y +8°C. Según un método ventajoso, la temperatura de la suspensión se controla con la ayuda de un sensor dispuesto en la circulación exterior de tipo bucle.

Según la fragilidad osmótica detectada, se pueden ajustar dos parámetros principales, el caudal de la suspensión de eritrocitos en el cartucho de diálisis y la osmolaridad de la disolución de lisis, entendiéndose que es preferible fijar, en ambos casos, un caudal constante para la disolución de lisis. El valor del caudal no es crítico. Típicamente, para un cartucho de diálisis que tiene fibras huecas, como se describe anteriormente, el caudal de la disolución de lisis se

fija entre 50 a 300 ml/min., preferentemente entre 150 y 250 ml/min.

5 La disolución de lisis es una disolución salina hipotónica con respecto a la suspensión de glóbulos rojos. Cuando se fija a un valor constante, su osmolaridad puede estar típicamente entre 20 y 120 mOsm, preferentemente entre 70 y 110 mOsm, por ejemplo en el orden de 90 mOsm.

A título de ejemplo, la disolución de lisis puede comprender Na_2HPO_4 y/o NaH_2PO_4 y un azúcar, tal como glucosa.

10 Según un primer método, el caudal de la suspensión de eritrocitos se ajusta mediante el cartucho de diálisis, mientras que se fijan el caudal y la osmolaridad del tampón de lisis. Cuanto más elevada sea la fragilidad osmótica, más se aumenta el caudal de la suspensión. Típicamente, para un cartucho cuyas especificaciones se han indicado anteriormente, el caudal variará en el intervalo de 5 a 200 ml/min., preferentemente de 10 a 40 ml/min.

15 Según un segundo método, la osmolaridad de la disolución de lisis se ajusta, mientras que se fijan los caudales de suspensión y de la disolución de lisis. Cuanto más elevada sea la fragilidad osmótica, más aumenta la osmolaridad de la disolución de lisis. Típicamente, la osmolaridad variará en el intervalo de 10 a 200 mOsm/l, preferentemente de 20 a 150 mOsm/l.

20 Según un tercer método, el caudal de la suspensión de eritrocitos a través del cartucho de diálisis y la osmolaridad de la disolución de lisis se ajustan al mismo tiempo.

25 Según la invención, se introduce uno o varios ingredientes activos destinados a ser incorporados en los eritrocitos. El o los principio(s) activo(s) puede(n) estar presente(s) en la bolsa de suspensión y/o puede(n) ser introducido(s), preferiblemente de manera progresiva, en la circulación de la suspensión aguas arriba o aguas abajo del cartucho de diálisis. Puesto que los volúmenes introducidos son pequeños, la refrigeración del ingrediente activo es opcional.

30 La suspensión de glóbulos rojos es producida preferentemente a partir de un pelete globular que procede de un grupo sanguíneo compatible con el receptor, desleucocitado, carente de patógenos detectados, y en particular presentado en una bolsa que contiene, por ejemplo, 500 ml. Los glóbulos rojos se pueden irradiar cuando se destinan a pacientes fuertemente inmunodeprimidos susceptibles de experimentar una reacción inmunológica del tipo "injerto/hospedante" (R.J. Davey Immunol. Invest. 1995, 24 (1-2): 143-149).

35 Según una característica de la invención, el pelete globular inicial, que se usa para preparar la suspensión, se ha sometido previamente a un procesamiento que tiene como objetivo eliminar los elementos de la sangre distintos de los eritrocitos. Este tipo de procesamiento, por ejemplo lavado con una disolución salina para eliminar el plasma o una disolución de conservación, es conocido por el experto en la técnica.

Según un método particular, el lavado se lleva a cabo en presencia de uno o más ingredientes activos a encapsular.

40 El lavado se puede realizar mediante cualquier técnica habitual, tal como la técnica de bolsa cuádruple o 4 bolsas para el lavado de glóbulos rojos (método y bolsa de transferencia MacoPharma). Asimismo, se puede utilizar un lavador automático de glóbulos rojos del tipo COBE 2991 Cell Processor.

45 Según otra característica de la invención, los eritrocitos se pueden procesar previamente con una disolución que puede aumentar y/u homogeneizar su resistencia osmótica. Tales disoluciones son conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, una disolución que contiene L-carnitina puede permitir la obtención de una mejora en la resistencia osmótica de los glóbulos rojos. Como otros ejemplos, se pueden citar las disoluciones de heparina, de citrato-fosfato-dextrosa (CPD) y de manitol.

50 Preferentemente, la temperatura durante la etapa de lisis se mantiene entre +2 y +6°C, y de manera aún más preferida en los alrededores de +4°C.

55 El procedimiento de resellado se lleva a cabo preferiblemente volviendo a calentar la suspensión lisada y añadiendo una disolución de resellado hipertónica. La temperatura de resellado puede estar comprendida entre +30 y +40°C. Está preferentemente comprendida entre +35 y +38, por ejemplo aproximadamente 37°C. La incubación puede durar típicamente de 15 a 45 minutos.

60 Preferentemente, la suspensión que sale del cartucho de diálisis así como una disolución hipertónica de resellado se introducen, preferiblemente en continuo, en una bolsa intermedia. La suspensión se recalienta en ella, y se incuba a la temperatura deseada durante un tiempo suficiente para asegurar el resellado. Según un aspecto particular, la bolsa intermedia se coloca en un módulo o cámara calentado, cuya temperatura interna está controlada a la temperatura deseada.

65 En una variante, la suspensión se lleva en una bolsa intermedia, así como la disolución de resellado. Cuando la totalidad de la suspensión se ha recogido en esta bolsa, se sella y se transfiere a un módulo que permite el calentamiento hasta y la incubación a la temperatura deseada.

La suspensión de glóbulos rojos resellados puede después sufrir una o más etapas de lavado con la ayuda de una disolución salina, a fin de eliminar las células no o mal selladas, residuos y hemoglobina extracelular.

5 Según otra característica, los eritrocitos se procesan en una disolución para conservar los eritrocitos, por ejemplo, que contienen L-carnitina.

Los eritrocitos producidos se almacenan preferiblemente a una temperatura comprendida entre +1 y +8°C, preferiblemente entre +2 y +6°C, típicamente aproximadamente +4°C.

10 El nivel de hematocrito final del producto listo para usar está comprendido en la práctica entre 40 y 70%.

La presente invención tiene asimismo por objeto un dispositivo de lisis/resellado susceptible de ser usado para llevar a cabo el procedimiento de preparación de eritrocitos según la invención, comprendiendo el dispositivo:

- 15
- un módulo susceptible de ser refrigerado a una temperatura comprendida entre +1 y +8°C, y que comprende medios para enfriar y controlar la temperatura,
 - un conjunto retirable estéril de un solo uso, configurado para poder ser colocado en el módulo, y que comprende un cartucho de diálisis susceptible de ser conectado, en un lado, a una entrada para la disolución de lisis, y, en el otro lado, a una entrada para la suspensión de eritrocitos,
 - 20 - medios para ajustar el caudal de la suspensión de eritrocitos a través del cartucho para lisis, y/o para ajustar la osmolaridad de la disolución de lisis, según la fragilidad osmótica de los eritrocitos a procesar.

25 Según una realización, el conjunto retirable, que es en sí mismo un aspecto de la invención, es un kit de un solo uso, y comprende una bolsa que puede contener la suspensión de eritrocitos y un tubo que conecta esa bolsa al cartucho de diálisis, y el módulo comprende una bomba susceptible de cooperar con ese tubo y hacer que la suspensión de eritrocitos circule desde la bolsa hacia y a través del cartucho, estando esa bomba opcionalmente conectada a los medios para ajustar el caudal. El conjunto permite que se mantenga la esterilidad.

30 Según una característica ventajosa, la bolsa está provista además de un tubo de tipo bucle que está conectado a la bolsa en sus dos extremos, y el módulo comprende una bomba susceptible de cooperar con ese tubo y asegurar una circulación de los contenidos de la bolsa desde y hacia esa bolsa. Tal bolsa flexible provista de un tubo de tipo bucle, y de al menos un punto de entrada o salida, constituye un aspecto de la invención en sí. Esa bolsa puede comprender al menos otro tubo flexible, conectado a cada entrada/salida. La bolsa puede estar asociada a una

35 bomba (por ejemplo, una bomba peristáltica), dispuesta para cooperar con el tubo de tipo bucle, y/o un soporte para la bolsa y eventualmente la bomba. Tal bolsa se puede usar para administrar composiciones (por ejemplo suspensión, emulsión) a seres humanos o animales, puesto que es deseable conservar un cierto grado de homogeneidad en la composición, por ejemplo composición para suministro parenteral.

40 Según otra característica ventajosa, una sonda de temperatura está dispuesta en el tubo de tipo bucle.

Según otra característica, un tubo para inyectar el ingrediente activo se conecta al tubo que conecta la bolsa a la entrada de "sangre" del cartucho de diálisis.

45 Según otra característica, el cartucho de diálisis está conectado mediante un tubo a un matraz susceptible de contener la disolución de lisis, y el módulo refrigerado comprende un medio de recepción para este matraz y una bomba susceptible de cooperar con el tubo para hacer circular la disolución de lisis hacia y a través del cartucho de diálisis.

50 Los medios de enfriamiento y de control de la temperatura son susceptibles de mantener una temperatura comprendida entre +2 y +6°C, preferiblemente del orden de +4°C, en el módulo.

Según otra característica, la salida de "sangre" del cartucho de diálisis está conectada a un tubo de salida que desemboca o que es susceptible de desembocar en el exterior del módulo. Según otra característica, un tubo para inyectar el ingrediente activo está conectado a ese tubo de salida. El tubo de salida puede estar conectado a una segunda bolsa (bolsa intermedia) que puede recoger la suspensión de eritrocitos procedente de la lisis así como una disolución de resellado (introducida preferiblemente mediante un tubo secundario que desemboca en el tubo de salida un poco más arriba de su desembocadura en la bolsa intermedia). Esa bolsa está ventajosamente dispuesta en un segundo módulo provisto de medios susceptibles de controlar la temperatura en el módulo entre +30 y +40°C, preferiblemente entre +35°C y +38°C.

55

60

Según una realización ventajosa, el conjunto retirable de un solo uso comprende, en una sola unidad, las bolsas, los tubos de circulación, los tubos de inyección (provistos de un dispositivo de inyección o de un receptáculo destinado a cooperar con tal dispositivo), el cartucho de diálisis, y preferiblemente un matraz de disolución de lisis.

65 Preferentemente, el propio conjunto retirable no comprende medios específicos destinados al enfriamiento o al

calentamiento. Estas funciones son llevadas a cabo únicamente por los módulos o cámaras en los que se colocan las dos partes del conjunto.

5 Las bombas usadas en el procedimiento y el dispositivo son preferiblemente bombas peristálticas (bombas de oclusión); según una realización, la bomba que provoca la recirculación de la suspensión desde y hacia la bolsa inicial y la bomba para hacer circular el tampón de lisis tienen una velocidad de rotación constante predeterminada, mientras que la bomba que envía la suspensión hacia el cartucho de diálisis tiene una velocidad de rotación que se puede ajustar en función de la fragilidad osmótica de los eritrocitos a procesar.

10 La introducción de ingrediente activo se puede llevar a cabo por cualquier medio adecuado, por ejemplo una jeringuilla de émbolo de velocidad fijo, que está eventualmente controlada, conectada al tubo de inyección correspondiente. En una variante, las jeringuillas de émbolo se pueden sustituir por bombas peristálticas.

15 El dispositivo comprende medios para ajustar el caudal de la suspensión de eritrocitos a través del cartucho de lisis y/o para ajustar la osmolaridad de la disolución de lisis, en función de la fragilidad osmótica de los eritrocitos a procesar.

20 Según una característica, los medios de ajuste de caudal son concebidos para controlar la bomba que envía la suspensión hacia el cartucho de diálisis. Según otra característica alternativa, los medios de ajuste son concebidos para controlar la osmolaridad de una disolución de lisis, bien para diluir y reducir la osmolaridad, o bien para aumentar esa osmolaridad introduciendo un soluto adecuado. En una variante, opcionalmente se puede introducir en el módulo una disolución de lisis que tiene una osmolaridad ajustada a la fragilidad osmótica de los eritrocitos a procesar.

25 Según un método preferido, el dispositivo comprende medios electrónicos que pueden controlar el proceso de lisis y eventualmente el proceso de resellado según instrucciones introducidas por el operador (por ejemplo, el operador introduce directamente los datos referentes al caudal de la suspensión de eritrocitos), o según datos introducidos por el operador que se refieren a la fragilidad osmótica (configurándose los medios electrónicos para determinar y ajustar los parámetros de lisis, por ejemplo el caudal de la suspensión de eritrocitos). Esos medios electrónicos están conectados preferiblemente a los sensores de temperatura (que permiten controlar la temperatura en los módulos y/o al sensor de temperatura para la suspensión de eritrocitos). Esos medios son susceptibles de controlar y hacer funcionar las bombas, por ejemplo la presión y el caudal de la suspensión a través del cartucho de diálisis.

35 Preferentemente, los módulos están provistos, al menos en una cara, de una superficie de vidrio, que permite controlar visualmente la instalación y la circulación de las disoluciones y suspensión.

40 El procedimiento y el dispositivo se pueden usar para incorporar numerosos ingredientes activos, seleccionados en particular de entre medicamentos, vacunas, enzimas, péptidos, antígenos y agentes de contraste, que se usan en terapia humana o animal (véase, por ejemplo, C. G. Millan, J. Controlled Released 2004, 95: 27-49). Otro objeto de la invención es la aplicación del procedimiento según la invención a la incorporación efectiva, reproducible, fiable y estable de asparaginasa. Por asparaginasa se entiende, según la invención, cualquier asparaginasa de cualquier origen, ya sea natural, sintético, artificial o recombinante, y los derivados que la incorporan, por ejemplo combinaciones de asparaginasa y un copolímero tal como polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, asparaginasa pegilada o pegasparaginasa, que es una forma de asparaginasa encapsulada en PEG; por ejemplo Oncaspar® comercializado por Enzon y Medac).

50 Según los diversos métodos posibles, la asparaginasa se introduce en la bolsa inicial y/o en la circulación de la suspensión aguas arriba y/o aguas abajo del cartucho de diálisis. Preferentemente se introduce en la circulación de la suspensión aguas arriba del cartucho de diálisis. Ventajosamente, la fragilidad osmótica se mide en la suspensión que contiene asparaginasa. La suspensión se resella después, se lava, opcionalmente se le añade una disolución conservante, y después se almacena, preferentemente en una bolsa flexible, lista para su uso.

55 Se conocen métodos que permiten dosificar la asparaginasa en la suspensión, de forma que es posible ajustar el volumen de suspensión en la bolsa final a fin de que corresponda a una dosis prescrita para el tratamiento.

Según una realización preferida, el pelete inicial se desleucocita y/o se irradia.

60 Según un aspecto específico, asimismo se introduce un ingrediente activo, destinado a un tratamiento combinado, por ejemplo vincristina y/o metotrexato, y/u opcionalmente cualquier otro ingrediente activo que sea ventajoso, además de la asparaginasa.

65 La invención también se refiere a una suspensión o un pelete de eritrocitos que contiene asparaginasa, susceptible de ser obtenido mediante la realización del procedimiento de la invención. Esta suspensión se puede producir en una disolución salina farmacéuticamente aceptable (generalmente un medio estándar para eritrocitos, una disolución que contiene NaCl y uno o más ingredientes seleccionados de glucosa, dextrosa, adenina y manitol, por ejemplo SAG-manitol o ADsol). Esta disolución es capaz de asegurar la conservación de los eritrocitos, y puede incluir un

aditivo de conservación, tal como L-carnitina. Los eritrocitos pueden asimismo contener vincristina y/o metotrexato, y/u opcionalmente cualquier otro ingrediente activo que sea ventajoso junto con la asparaginasa. La suspensión o pelete se puede procesar a fin de diluirlo antes del uso. La suspensión también se puede procesar para que esté lista para uso. El nivel de hematocrito final del producto que está listo para uso es preferiblemente de 40 a 70%.

5 La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento para tratar leucemias agudas linfoblásticas y linfomas, mediante la administración de una cantidad efectiva de una suspensión de eritrocitos que contiene asparaginasa, y que se puede obtener según el procedimiento de la invención. Un aspecto particular de la invención comprende la extracción de una o más muestras de sangre, de un paciente o de uno o más donantes, la preparación
10 de un pelete de eritrocitos, la incorporación de asparaginasa según la invención, y la producción de un lote de eritrocitos que incorpora asparaginasa, y después la administración de la suspensión al paciente, por vía intravenosa. Típicamente, se administra un volumen de suspensión de eritrocitos procesados que corresponde a 60 a 200 unidades de asparaginasa por kg de peso corporal.

15 La invención tiene asimismo por objeto el uso de eritrocitos que contienen asparaginasa, y que se pueden obtener según el procedimiento de la invención, para la preparación de un medicamento o fármaco destinado a tratar un paciente contra una leucemia aguda linfoblástica o un linfoma. Un aspecto particular de la invención comprende el uso de una o más unidades de sangre extraídas de un paciente o uno o más donantes para la preparación de un pelete de eritrocitos, la incorporación de asparaginasa según la invención, y la producción de un lote de eritrocitos
20 que incorporan asparaginasa, para el tratamiento del paciente con esos eritrocitos. Según un método particular, el uso tiene como objeto producir una bolsa que contiene una dosis, por ejemplo un volumen de suspensión de eritrocitos procesados que comprende el equivalente de 60 a 200 unidades de asparaginasa por kg de peso corporal.

25 Otro objeto de la invención es la aplicación del procedimiento según la invención a la incorporación efectiva, reproducible, fiable y estable de fosfato de inositol, en particular de hexafosfato de inositol y pentafosfato de inositol, o sus derivados. Preferiblemente es hexafosfato de inositol.

30 Según los diversos métodos posibles, el fosfato de inositol se introduce en la bolsa inicial y/o en la circulación de la suspensión aguas arriba y/o aguas abajo del cartucho de diálisis. Preferiblemente se introduce en la bolsa inicial. Es ventajoso medir la fragilidad osmótica en la suspensión que contiene fosfato de inositol. Después, la suspensión se lisa, se resella, se lava, opcionalmente se añade una disolución de conservación, y después se almacena, preferiblemente en una bolsa flexible, lista para el uso.

35 Se conocen métodos que permiten dosificar el fosfato de inositol en la suspensión, de forma que es posible ajustar el volumen de suspensión en la bolsa final a fin de que corresponda a una dosis prescrita para el tratamiento.

Según una realización preferida, el pelete inicial se desleucocita y/o se irradia.

40 La invención también describe una suspensión o un pelete de eritrocitos que contiene fosfato de inositol, en particular hexafosfato o pentafosfato de inositol, susceptible de ser obtenido mediante la realización del procedimiento de la invención. Esa suspensión se puede producir en una disolución salina farmacéuticamente aceptable (generalmente un medio estándar para eritrocitos, una disolución que contiene NaCl y uno o más
45 ingredientes seleccionados de glucosa, dextrosa, adenina y manitol, por ejemplo SAG-manitol o ADsol). Esta disolución es capaz de asegurar la conservación de los eritrocitos, y puede incluir un aditivo de conservación, tal como L-carnitina. Esa suspensión o pelete se puede procesar a fin de diluirlo antes del uso. La suspensión también se puede procesar para que esté lista para uso. El nivel de hematocrito final del producto que está listo para uso es preferiblemente de 40 a 70%.

50 La invención también describe un método para la oxigenación tumoral, en particular asociado a radioterapia, que comprende la administración al paciente de una cantidad efectiva de una suspensión de eritrocitos que incorpora fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, y que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención. Un aspecto particular de la invención comprende la extracción de una o más muestras de sangre, de un paciente o de uno o más donantes, la preparación de un pelete de eritrocitos, la incorporación de fosfato de inositol,
55 en particular hexafosfato de inositol, según la invención, y la producción de un lote de eritrocitos que incorpora ese compuesto, y después la administración de la suspensión al paciente por vía intravenosa. Preferentemente, ese método está asociado a un tratamiento de radioterapia, y de este modo los eritrocitos procesados se pueden administrar en continuo, por vía intravenosa, durante todo o parte del tratamiento de radioterapia y, preferiblemente además, antes y/o después de ese tratamiento, durante un periodo de tiempo suficiente.

60 El método se puede usar en el tratamiento de diversos cánceres, y en particular cánceres del pulmón, próstata, recto, esófago, así como tumores cerebrales. El método está destinado particularmente para tumores que son débilmente radiosensibles, generalmente hipóxicos, y en particular gliomas malignos. Según aspectos particulares de la invención, el método está destinado al tratamiento de glioblastoma y de los cánceres ORL
65 (otorrinolaringológicos).

La presente invención describe además el uso de tales eritrocitos que contienen fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, que se pueden obtener según el procedimiento de la invención, para la preparación de un medicamento o fármaco destinado a tratar un paciente contra un cáncer del tipo de los descritos anteriormente, en particular en asociación con un procedimiento de radioterapia. Un aspecto particular de la invención comprende el uso de una o más unidades de sangre extraídas de un paciente o uno o más donantes para la preparación de peletes de eritrocitos, la incorporación del compuesto activo según la invención, y la producción de lotes de eritrocitos que incorporan ese compuesto, para el tratamiento del paciente con esos eritrocitos.

La invención también describe un método para tratar drepanocitosis u otro estado hipóxico, que comprende la administración al paciente de una cantidad efectiva de una suspensión de eritrocitos que incorpora fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, y que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención. Un aspecto particular de la invención comprende la extracción de una o más muestras de sangre, de un paciente o de uno o más donantes, la preparación de un pelete de eritrocitos, la incorporación de fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, según la invención, y la producción de un lote de eritrocitos que incorpora ese compuesto, y después la administración de la suspensión al paciente por la vía intravenosa.

La presente invención describe además el uso de tales eritrocitos que contienen fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, que se pueden obtener según el procedimiento de la invención, para la preparación de un medicamento o fármaco destinado a tratar un paciente con hipoxia. La hipoxia se caracteriza por un suministro bajo de oxígeno a los tejidos, particularmente el músculo y los huesos. Este tratamiento es particularmente interesante para tratar un paciente que sufre drepanocitosis. Un aspecto particular comprende el uso de una o más unidades de sangre extraídas de un paciente o uno o más donantes para la preparación de peletes de eritrocitos, la incorporación del compuesto activo según la invención, y la producción de lotes de eritrocitos que incorporan ese compuesto, para el tratamiento del paciente con esos eritrocitos.

El hexafosfato de inositol o similar incorporado en los eritrocitos conduce a una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Esto conduce a una mejor oxigenación de los tejidos y a una reducción de los síntomas de hipoxia debido a drepanocitosis. P50 es la presión de O₂ (PO₂) que corresponde a una saturación del 50% de la hemoglobina con oxígeno. Un incremento de P50 de 25 mmHg conduce a un incremento de la oxigenación de alrededor de dos veces (la oxigenación es la diferencia de saturación entre los valores de PO₂ de 100 mmHg y 40 mmHg). Por lo tanto, para un adulto que tiene 2000 ml de glóbulos rojos, la transfusión de una bolsa de sangre que contiene 200 ml de eritrocitos que contienen hexafosfato de inositol puede conducir a un aumento de más de 10% de los eritrocitos que tienen un poder de oxigenación que es doble del normal. Esto conduce a un incremento de más de 20% de la oxigenación, lo que es beneficioso en individuos hipóxicos.

El método puede comprender transfusiones por un volumen que representa entre 5 y 20%, preferiblemente 10-15% de la masa de los eritrocitos del individuo, y la frecuencia de transfusión puede ser ventajosamente de una por mes o dos meses.

La invención se describirá ahora con más detalle por medio de ejemplo no limitativo con referencia a realizaciones y los dibujos, en los que:

- la Figura 1 es una representación esquemática de un dispositivo de lisis/resellado según la invención;
- la Figura 2 es un diagrama de flujo básico del procedimiento;
- la Figura 3 es una gráfica que muestra el progreso de la hemólisis de los eritrocitos, expresado como una concentración (g/l) de NaCl que produce una hemólisis del 50% según el tiempo de incubación, expresado en minutos;
- la Figura 4 es una gráfica similar a la de la Figura 3, midiéndose la hemólisis en esta ocasión en presencia de asparaginasa (200 UI/ml);
- la Figura 5 es una gráfica similar a la de las Figuras 3 y 4, llevándose a cabo la medición en presencia de asparaginasa (400 UI/ml); y
- la Figura 6 es una gráfica que muestra el rendimiento del encapsulamiento según la concentración de NaCl, en g/l, que produce una hemólisis de alrededor de 50%.

Ejemplo 1: Instalación

Se hace referencia en primer lugar a la Figura 1. Un primer marco en líneas discontinuas representa un primer módulo 1 que tiene una forma generalmente paralelepípeda y que comprende una cara frontal de vidrio, no ilustrada, y que está conformada de manera que se pueda abrir y cerrar. En la parte inferior de ese módulo se disponen unas bombas peristálticas P1, P2 y P3, y medios de recepción (no ilustrados) de un conjunto retirable, que se describirá ahora. Las bombas P1 y P3 tienen un caudal constante predeterminado. La bomba P2 está controlada para hacer variar el caudal.

El conjunto retirable comprende una bolsa 2 flexible, que contiene la suspensión de eritrocitos a lisis. Esta bolsa 2 está equipada de un tubo 3 flexible, en una configuración de tipo bucle, que coopera con la bomba P1 a fin de asegurar una circulación desde y hacia la bolsa para mantener los eritrocitos en suspensión. Esta bolsa está

además conectada, en su base, a un tubo 4 flexible que está conectado a la entrada del compartimiento de "sangre" de un cartucho 5 para diálisis. Este tubo 4 coopera con la bomba P2, que asegura la circulación de la suspensión desde la bolsa al cartucho. Una jeringuilla de tipo émbolo controlado PS1 se conecta al tubo 4 aguas arriba del cartucho 5, destinándose esta jeringuilla de tipo émbolo a la introducción de un ingrediente activo en la circulación de eritrocitos. La salida del compartimiento de "sangre" del cartucho 5 está conectada a un tubo 6 flexible de salida, que desemboca en el exterior del módulo 1. Una segunda jeringuilla de tipo émbolo controlado PS2 se conecta al tubo 6, estando destinada esta jeringuilla de tipo émbolo a la introducción de un ingrediente activo en la circulación de eritrocitos lisados. Un matraz 7 que contiene una disolución de lisis se coloca en el módulo 1, y se conecta a la entrada de "dializado" del cartucho 5 mediante un tubo 8 flexible, que coopera con la bomba P3 asegurando la circulación de la disolución de lisis a través del cartucho 5. Finalmente, la disolución de lisis que sale del cartucho se evacua del módulo 1 mediante un tubo 9 flexible de evacuación que desemboca en un matraz 10 situado fuera del módulo 1.

El tubo 6 de salida penetra en un segundo módulo 11 que tiene una forma generalmente paralelepípeda, y que comprende una cara frontal de vidrio, no ilustrada, y que está conformada de manera que se pueda abrir y cerrar. En la parte inferior de ese módulo se encuentran dispuestos unos medios de recepción (no ilustrados) de elementos que pertenecen del conjunto retirable. Estos comprenden una bolsa 12 flexible, que está conectada al tubo 6, y en la que se almacena la suspensión lisada. Una jeringuilla de tipo émbolo controlado PS3 se conecta al tubo 6 y permite inyectar el producto de resellado.

El conjunto retirable se produce totalmente de material plástico flexible y transparente, lo que permite una visibilidad completa del proceso.

El dispositivo está provisto además de diversos medios no representados:

- unos medios que permiten enfriar el interior del módulo 1 y controlar en él la temperatura entre +2 y +4°C, que comprenden, entre otros, una sonda de temperatura dispuesta en el tubo 3, a fin de medir la temperatura de la suspensión circulante en él, una sonda de temperatura para medir la temperatura T1 en el interior del módulo 1,
- el módulo 11 está provisto además de medios que permiten calentar el interior del módulo 11 y controlar la temperatura T2 en él entre +37 y +38°C; una sonda de temperatura está colocada en el interior del módulo,
- unos medios para detectar (por ejemplo, ultrasonidos o colorimétricos) la presencia de eritrocitos en los tubos en D1 y D2,
- unos medios PR1 para medir la presión en la entrada del cartucho de diálisis,
- un dispositivo electrónico que recibe, por un lado, la información que provienen de las sondas de temperatura, de presión y de los medios de detección, y, por otro lado, la información relativa a los ajustes de los parámetros de la lisis; a partir de estos datos, el dispositivo controla las bombas P1, P2 y P3. En la Figura 2 se representa un diagrama de flujo del proceso.

El dispositivo electrónico está constituido de un ordenador diseñado para hacer funcionar el diagrama de flujo anterior.

Según una característica adicional, registra los parámetros de cada procedimiento de lisis, y por lo tanto de cada pelete procesado.

Ejemplo 2: Encapsulamiento de asparaginasa

En este ejemplo, la fragilidad osmótica se define mediante la concentración de NaCl, expresada en g/l, que provoca alrededor de 50% de hemólisis.

1) Influencia de asparaginasa sobre la fragilidad osmótica:

a. Preparación de disoluciones de asparaginasa:

Se inyectaron 2,5 ml de NaCl al 0,9% por medio de una jeringuilla, vía el tabique, en un matraz que contiene 10000 UI de asparaginasa en forma de polvo. La mezcla se agitó hasta que se disolvió, obteniéndose entonces una disolución madre a una concentración de 4000 UI/ml. Los contenidos se retiraron por medio de la jeringuilla y se colocaron en un tubo de hemólisis de 5 ml. Se prepararon 3 disoluciones y se almacenaron a +4°C: una disolución de 0 UI (que constituye un control de NaCl al 0,9%), una disolución de 3200 UI/ml (se añadieron 625 µl de disolución de NaCl al 0,9% a la disolución madre) y una disolución de 1600 UI/ml (se eliminó 1 ml de la disolución de 3200 UI/ml, al que se añadió 1 ml de disolución de NaCl al 0,9%).

b. Lavado de los glóbulos rojos:

- partiendo de sangre completa que se recogió sobre citrato fosfato dextrosa y se centrifugó a +4°C durante 20 minutos a 1000 g,

ES 2 376 979 T3

- el plasma se decantó, y se eliminó la capa leucocitaria,
- se añadió NaCl al 0,9% a +4°C, volumen a volumen, al pelete de glóbulos rojos,
- 5 - se llevó a cabo la centrifugación durante 10 minutos a 1000 g, y después el sobrenadante se eliminó,
- se llevó a cabo una segunda operación de lavado, y después una tercera, repitiendo ambas etapas anteriores
- 10 - se eliminó el sobrenadante, y el hematocrito se ajustó a 80% con una disolución de NaCl al 0,9%,
- se prepararon tubos con un volumen de suspensión de glóbulos rojos de 875 µl.

Esto se llevó a cabo en 6 muestras de sangre de 6 donantes diferentes.

15 c. Adición de la disolución de asparaginasa

- la fragilidad osmótica inicial se midió con respecto a las 6 muestras,
- 20 - se añadieron 125 µl de disolución de asparaginasa 0, 1600 ó 3200 UI/ml a la proporción de 6 tubos por cada concentración de asparaginasa; cada tubo se agitó suavemente durante unos momentos. Las concentraciones finales contenidas en los tres grupos de seis tubos son: 0, 200 y 400 UI/ml. Los tubos se almacenaron a +4°C en hielo machacado, hasta que se midió la fragilidad osmótica,
- 25 - se ensayaron 4 tiempos de incubación: 5, 15, 30 y 60 minutos. El final del tiempo de incubación se define como la retirada del tubo del hielo machacado,
- la medición de la fragilidad osmótica se lleva a cabo a temperatura ambiente.

30 d. Las medidas de la fragilidad osmótica se llevan a cabo en el dispositivo comercializado por SODEREL MEDICAL, Haillecourt, Francia, con el nombre OSMOCELLS®.

e. Resultados

35 El desarrollo y dispersión de la fragilidad osmótica de los eritrocitos antes de la diálisis, en ausencia o en presencia de asparaginasa, se exponen en las Figuras 3, 4 y 5.

40 Estos resultados demuestran una amplia variabilidad de la fragilidad osmótica de los eritrocitos de una muestra de sangre a la siguiente, según la concentración de asparaginasa presente y según el tiempo. Estos resultados destacan la importancia de medir la fragilidad osmótica en la muestra de eritrocitos a procesar, tan cerca como sea posible de la fase de diálisis, y preferiblemente en presencia de la asparaginasa a encapsular.

2) Procedimiento de encapsulamiento y resellado:

45 a. Equipo

- cartucho de diálisis:
 - modelo PRISMA M60 PPI comercializado por GAMBRO, Lakewood, CO, USA
 - 50 • dimensiones (cm): 38 x 21 x 9
 - volumen de la cámara de sangre: 84 ml
 - 55 • fibras huecas: copolímero de acrilonitrilo y metilsulfonato de sodio
 - área superficial efectiva: 0,60 m²
- parámetros de operación de la instalación:
 - 60 - P1 = 20 ml/min.
 - P2 = variable
 - 65 - P3 = 150 ml/min.

- PS3 = 10% de P2
- T2 = 30 min.

5 b. productos

- glóbulos rojos empaquetados proporcionados por "Centre de Transfusion Sanguine" (Centro de Transfusión de Sangre de Francia), es decir, glóbulos rojos en suspensión en SAG-manitol,

10 - ajuste del hematocrito a 70%

- disolución de asparaginasa: usada para tener 400 UI por ml de suspensión de glóbulos rojos antes de la diálisis.

15 c. Resultados

La Figura 6 muestra el rendimiento del encapsulamiento en el caso de 400 UI/ml de asparaginasa con un caudal de P2 de 22 ml/min. en el dializador. Parece que el rendimiento del encapsulamiento varía según la fragilidad osmótica antes de la diálisis (5 muestras). La optimización del procedimiento de la invención se produce ajustando los parámetros de la diálisis, y en particular el caudal de la suspensión de eritrocitos en el dializador, según la fragilidad osmótica medida, para asegurar un rendimiento del encapsulamiento que sea tan constante como sea posible a pesar de la variabilidad inherente en las muestras de sangre.

Tomándose el caudal P2 (caudal de la suspensión de eritrocitos en el cartucho de diálisis) como el medio de ajuste, fue posible establecer los siguientes niveles óptimos para el cartucho de diálisis usado.

Tabla 1:

Fragilidad osmótica g/l	CAUDAL P2 ml/min
> 4,7	24
4 a 4,7	25
3,5 a 4	22
< 3,5	20

La reducción en el caudal de P2 para una fragilidad osmótica > 4,7 se explica por el fenómeno resultante de la diálisis. El incremento en la presión transmembranosa para caudales del orden de 26 ml/min. y superior provoca un incremento en el efecto de la ósmosis. Por lo tanto, es ventajoso disminuir el caudal de P2, como se indica.

Se han seguido los parámetros hematológicos y de incorporación de 7 muestras diferentes de eritrocitos procesadas mediante el procedimiento según la invención (ajustándose P2 según la tabla 1, es decir, dependiendo de la fragilidad osmótica de cada muestra), y esos parámetros hematológicos se compararon con los valores obtenidos para un individuo sano. En la Tabla 2 se presentan las medias de los parámetros hematológicos medidos

Tabla 2:

Parámetros hematológicos	Material celular inicial	Producto final (D0)	Producto final después de + 24h a + 4°C	Valores norm. (células circulantes)
Volumen celular medio (MCV) (femtolitro)	84,7 ± 2,9	76,6 ± 3,9	80 ± 3,7	83 - 97
Hemoglobina celular media (pg)	28,4 ± 1,7	22,1 ± 0,7	22,5 ± 1,6	28 - 32
Concentración de hemoglobina celular media (%)	34,0 ± 1,2	29,2 ± 0,9	27,9 ± 1,2	31 - 35
Fragilidad osmótica (induciendo la salinidad alrededor de 50% de hemólisis) (g/l)	3,97 ± 0,5	3,53 ± 0,4	No llevado a cabo	3,7 - 4,3
Haematocrito de la suspensión (%)	60,5 ± 3	50,4 ± 2,6	47,6 ± 3	NA
Concentración de hemoglobina de la suspensión (g/dl)	18,7 ± 1,1	12,9 ± 0,7	13,1 ± 0,6	NA
Concentración de eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	6,31 ± 0,44	5,8 ± 0,44	5,8 ± 0,37	NA
Hemoglobina extracelular (g/dl)	0	0	1	NA
NA = no aplicable				

Parámetros de incorporación:

5 La dosificación de asparaginasa se realizó en los eritrocitos después de la lisis mediante congelación-descongelación, usando el método descrito en J.L. Orsonneau, Annales de Biologie Clinique 2004, vol. 62, No. 5.

- Nivel globular medio de asparaginasa, expresado en UI de asparaginasa por 10^9 eritrocitos: $10 \pm 1,1$.

10 - Concentración corpuscular media de asparaginasa, expresada en UI/ml de eritrocitos: $112 \pm 11,3$.

- Rendimiento del encapsulamiento (concentración corpuscular de asparaginasa en el producto final/concentración de asparaginasa antes de la diálisis): $29,8 \pm 2,1$.

15 En los ensayos preliminares llevados a cabo sobre 14 muestras diferentes sin tener en cuenta la fragilidad osmótica y sin ajustar el caudal, pero con caudales de P2 de 18 a 30 ml/min., fue posible medir un rendimiento medio de encapsulamiento de $32 \pm 12,4\%$, que representa una variabilidad excesivamente amplia. Por el contrario, el ajuste del caudal de P2 en el experimento anterior permitió obtener un rendimiento medio de encapsulamiento mucho más homogéneo ($29,8\% \pm 2,1$).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de lisis/resellado para preparar eritrocitos que contienen un ingrediente activo, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:
- 5 (1) - suspender un pelete globular en una disolución isotónica que tiene un nivel de hematocrito igual o mayor que 65%, con refrigeración entre +1 y +8°C,
 (2) - medir la fragilidad osmótica a partir de una muestra de eritrocitos de ese mismo pelete globular, pudiendo ser realizadas las etapas 1 y 2 en un orden cualquiera,
 10 (3) - llevar a cabo un procedimiento de lisis e internalización del ingrediente activo, en el interior de la misma cámara, a una temperatura mantenida constantemente entre +1 y +8°C, que comprende permitir que la suspensión de eritrocitos, que tiene un nivel de hematocrito igual o mayor que 65%, y una disolución de lisis hipotónica, que está refrigerada entre +1 y 8°C, circulen en un cartucho de diálisis; ajustándose los parámetros de lisis según la fragilidad osmótica medida previamente, en el que el caudal de la suspensión de eritrocitos que pasa al cartucho de diálisis se ajusta, o la osmolaridad de la disolución de lisis se selecciona, basándose en la medida de la fragilidad osmótica; y
 15 (4) - llevar a cabo un procedimiento de resellado en una segunda cámara a una temperatura entre +30 y +40°C por medio de una disolución hipertónica.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fragilidad osmótica se mide por medio de un dispositivo de medición que se configura a fin de medir la fragilidad osmótica de una muestra de eritrocitos en menos de 15 minutos, y el resultado obtenido se usa en un breve período de tiempo a fin de ajustar los parámetros de la lisis.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que uno o más parámetros de hemólisis de la muestra de eritrocitos se miden frente a una disolución hipotónica, que tiene una isotonicidad conocida, a través de una membrana semipermeable.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se mide uno o más de los siguientes parámetros:
- 30 a. la osmolaridad del medio para el cual aparece la hemólisis,
 b. la velocidad de la hemólisis, determinada por el gradiente de la parte lineal de la curva % de hemólisis = f (osmolaridad del medio),
 c. el porcentaje de hemólisis para una osmolaridad dada,
 d. la osmolaridad que permite obtener 50% de hemólisis,
 35 e. el tiempo para obtener un cierto porcentaje de hemólisis.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa un módulo refrigerado provisto de un control de temperatura, se coloca en el módulo una bolsa de la suspensión de eritrocitos, que está refrigerada entre +1 y +8°C, y se conecta, o se va a conectar, a un conjunto retirable de un solo uso que comprende un cartucho de diálisis, tubos para conectar el cartucho, en un lado, a la bolsa y, en el otro lado, al matraz, comprendiendo además el módulo medios que pueden causar la circulación de la suspensión de eritrocitos y de la disolución de lisis, en el interior de cuyos módulos la temperatura se estabiliza entre +1 y +8°C.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el procedimiento de lisis se comienza cuando la temperatura de la suspensión en la bolsa está entre +1 y +8°C.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se mantiene un nivel estable de hematocrito en la suspensión durante todo el tiempo de su paso por el cartucho de diálisis.
- 50 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se usa una bolsa que está provista de una circulación de tipo bucle externa que puede provocar la circulación de la suspensión hacia y desde la bolsa.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ingrediente activo está presente en la bolsa de la suspensión y/o se introduce en la circulación de la suspensión antes y/o después del paso a través del cartucho de diálisis.
- 55 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pelete globular contiene eritrocitos que se han procesado previamente con una disolución que puede incrementar y/u homogeneizar su resistencia osmótica.
- 60 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura durante las etapas 1 y 3 se mantiene entre +2 y +6°C, y es preferentemente de forma aproximada +4°C.
- 65 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ingrediente activo se selecciona de entre asparaginasa y hexofosfato de inositol.

- 5 13. Procedimiento según la reivindicación 12, para producir eritrocitos que incorporan asparaginasa destinados a tratar un paciente frente a leucemias linfoblásticas agudas y linfomas, o para producir eritrocitos que incorporan hexafosfato de inositol destinados a tratar tumores hipóxicos en asociación con un tratamiento de radioterapia, o tratar drepanocitosis u otros estado hipóxico.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la fragilidad osmótica se mide en una muestra de la suspensión obtenida en la etapa (a).
- 10 15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la medida de la fragilidad osmótica llevada a cabo se usa rápidamente, es decir, el procedimiento de lisis se lleva a cabo poco tiempo después de que se toma la muestra, siendo el intervalo de tiempo entre la toma de muestra y el comienzo de la lisis menor o igual a 30 minutos, preferiblemente menor o igual a 25 minutos, más preferiblemente menor o igual a 20 minutos.
- 15 16. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se hace uso de un dispositivo que pone juntos, en un lado y otro de una membrana semipermeable, la muestra de la suspensión de eritrocitos a evaluar, y una disolución hipotónica, que tiene isotonicidad conocida, por ejemplo agua destilada, en un volumen adecuado, para generar una hemólisis lenta de los eritrocitos a medida que los iones de NaCl se difunden hacia la disolución, por ejemplo agua destilada, en el que el progreso de la hemólisis a lo largo del tiempo es seguido por una medida de la transmitancia por medio de un haz de láser que tiene una longitud de onda de 808 nm, y una célula fotoeléctrica mide las variaciones en la luz transmitida a través de la suspensión.
- 20 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 16, en el que la medida de la fragilidad osmótica se lleva a cabo en eritrocitos, o una suspensión que los contiene, a una temperatura próxima o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis.
- 25 18. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la resistencia osmótica se caracteriza por medio de los parámetros b, d, o b y d.
- 30 19. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la suspensión obtenida en la etapa (1) contiene el ingrediente activo.
- 35 20. Procedimiento según la reivindicación 3, 4 ó 18, en el que se mide la concentración de NaCl, en g/l, que produce un 50% de hemólisis (parámetro d.), y el caudal de la suspensión de eritrocitos en el cartucho de diálisis se ajusta según los valores de concentración medidos.
- 40 21. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento de lisis se comienza cuando la temperatura de la suspensión de eritrocitos está entre +1 y +8°C, y la fragilidad osmótica se ha medido y se han registrado los parámetros de la lisis.
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución de lisis fluye a través del cartucho de diálisis a un caudal constante.

Figura 1

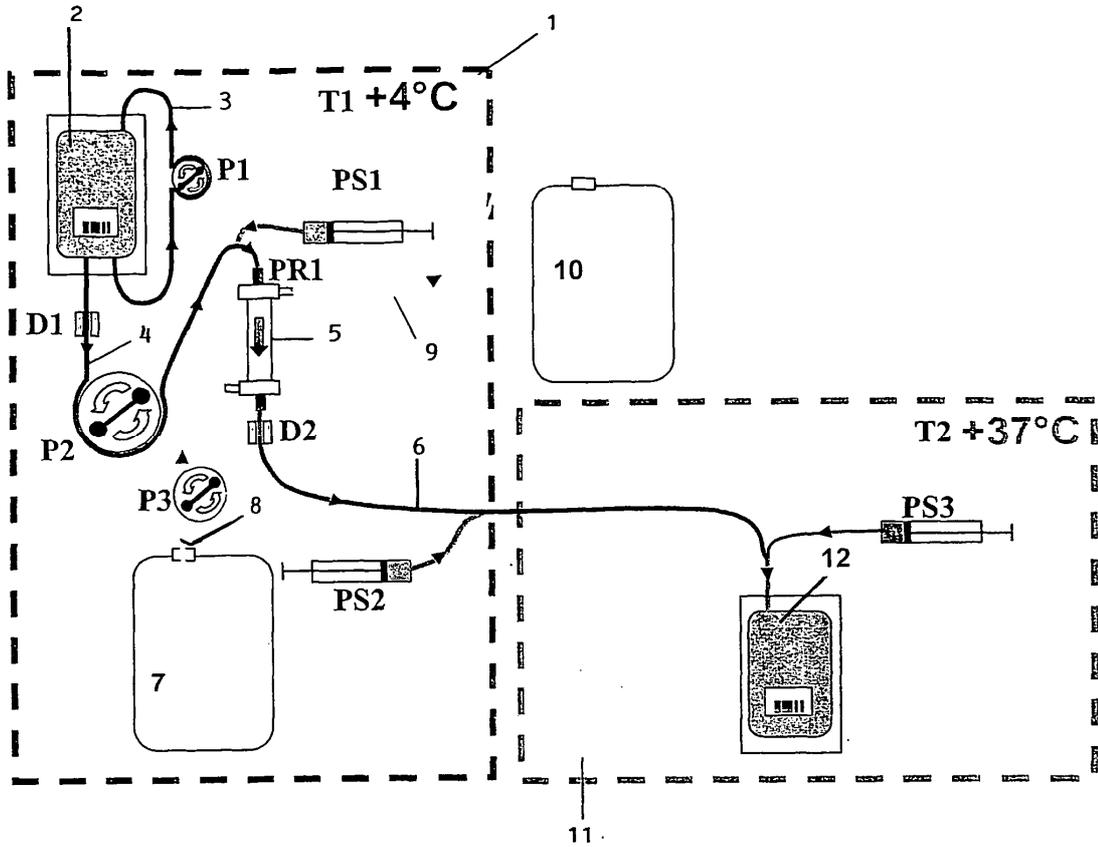


Figura 2

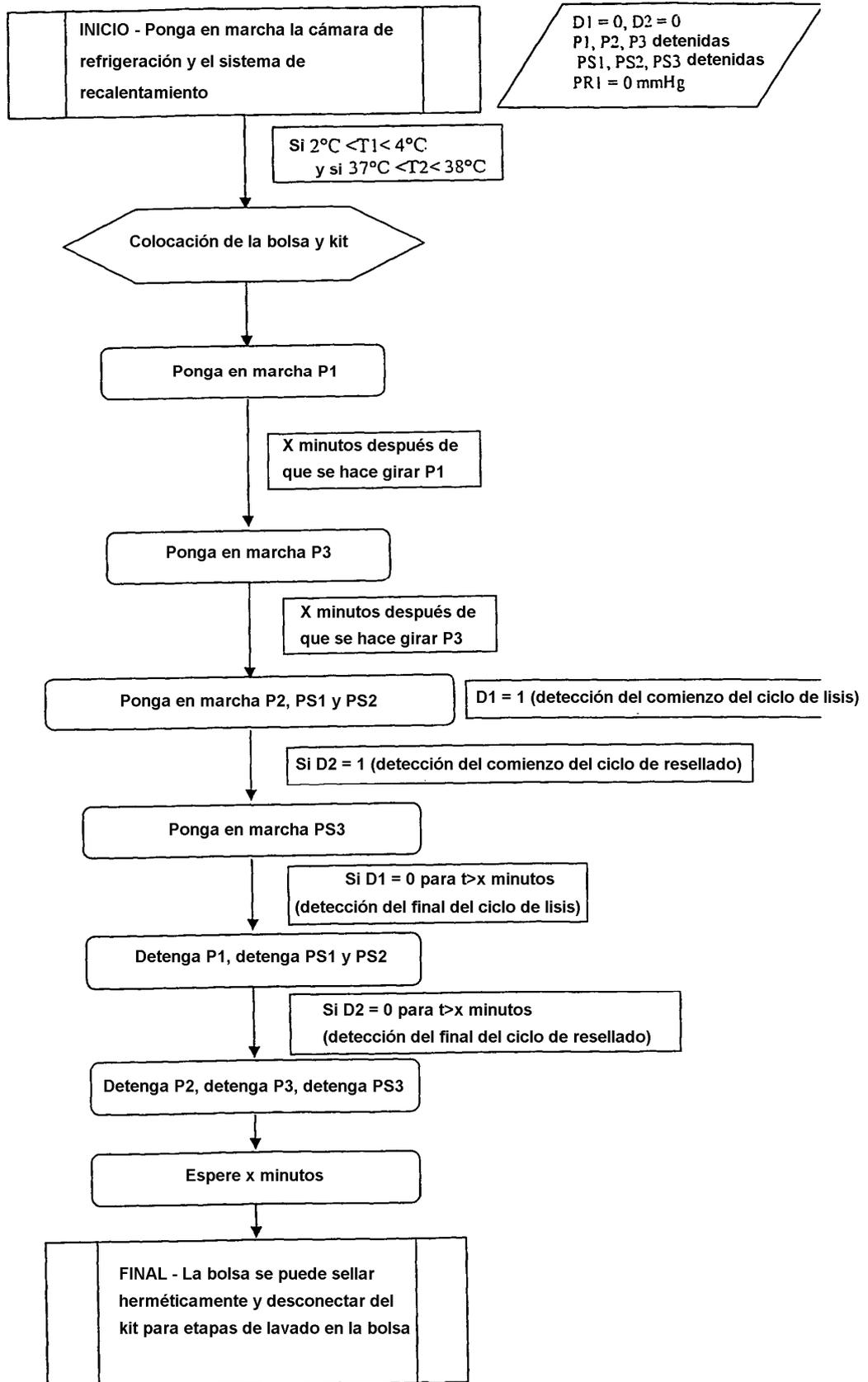


Figura 3

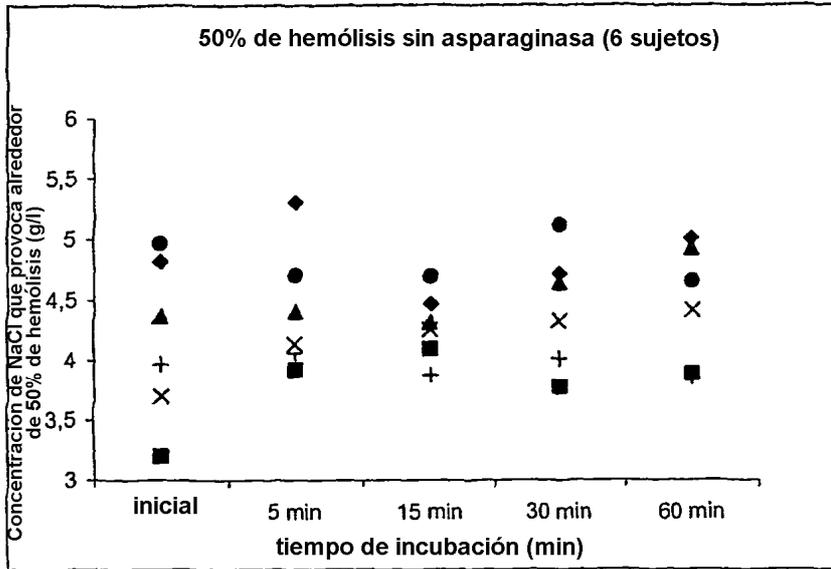


Figura 4

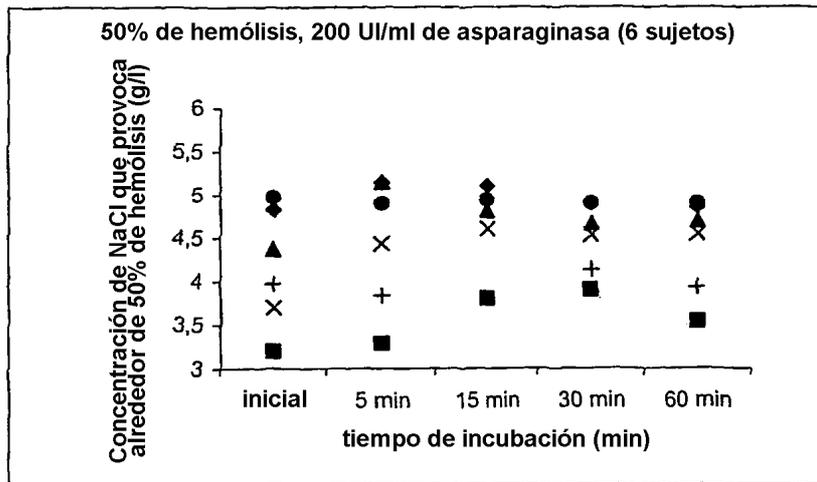


Figura 5

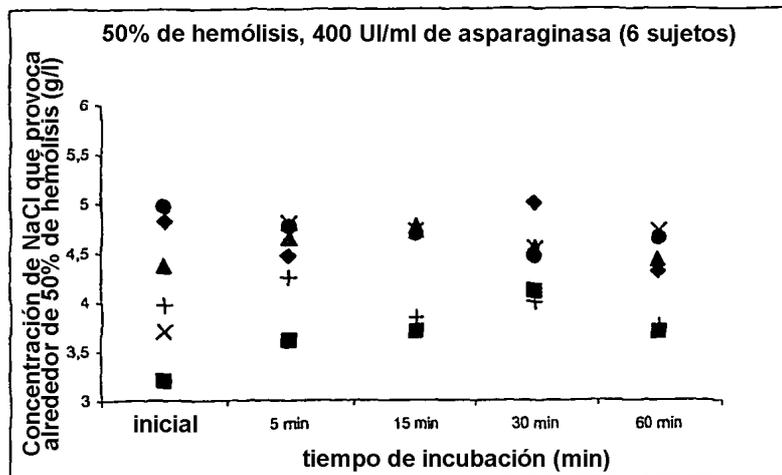


FIGURA 6

