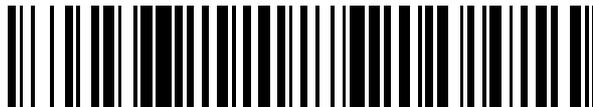


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 102**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10723285 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2403509**

54 Título: **Composición de leucocitos activados**

30 Prioridad:

05.03.2009 US 209298 P

01.04.2009 US 211587 P

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

05.11.2013

73 Titular/es:

**MACROCURE, LTD. (100.0%)
9 Bareket Street P.O. Box 7988 Ryat Matalon
49250 Petach Tikva, IL**

72 Inventor/es:

**SHIRVAN, MITCHELL;
SHINAR, EILAT;
FRENKEL, ORIT;
ZULOFF-SHANI, ADI;
BUBIS, MARINA;
BAIN, EILAT y
GINIS, IRENE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 102 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

Composición de leucocitos activados.

REFERENCIAS CRUZADAS PARA SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud se relaciona con la solicitud de N° de serie 61/209.298, presentada el 5 de Marzo de 2009, titulada Composición de leucocitos activados y la solicitud de N° de serie 61/211.587, presentada el 1 de Abril de 2009, titulada Composición de leucocitos activados para insuficiencias vasculares.

Antecedentes de la invención

10 El proceso de cicatrización de una herida envuelve la participación de las células blancas de la sangre, también conocidas como leucocitos. Los leucocitos incluyen linfocitos, granulocitos y monocitos. Tres tipos comunes de linfocitos son las células T, células B y células asesinas naturales. Las células B y las células T juegan un papel importante en el reconocimiento de antígenos en el cuerpo (Parkin, 2001). Las células asesinas naturales (NK) identifican a las células infectadas por medio de alteraciones en los niveles del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), y destruyen las células infectadas (Moretta, 2008). La participación de los linfocitos en el proceso de curación, se asocia en gran medida con su producción de citoquinas y factores de crecimiento (Keen, 2008). Se ha descrito una nueva clase de células gamma-delta-T en la piel (Jameson, 2002. Havran, 2005). Entre los diferentes tipos de granulocitos están los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los monocitos se diferencian en macrófagos, que son responsables de la destrucción de restos de tejido o de las sustancias extrañas invasivas. Los macrófagos también producen moléculas que controlan la inflamación y la reparación (Riches, 1996).

20 El proceso de cicatrización de una herida se produce en tres fases superpuestas. (Li, 2007; Broughton, 2006; Tsirogianni, 2006; Singer, 1999; Martin, 1997). La primera fase es la fase inflamatoria. Se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, seguidos por monocitos a la zona de la herida, donde matan y fagocitan las bacterias (Agaiby, 1999).

25 La segunda fase de cicatrización de una herida que se conoce como la fase proliferativa, implica la formación de nuevo tejido de granulación. Los fibroblastos proliferan y migran hacia el espacio de la herida y sintetizan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Greiling, 1997). Al mismo tiempo, se produce la angiogénesis, que proporciona nutrientes y oxígeno al nuevo tejido de granulación metabólicamente activo (Tonnesen, 2000). Los queratinocitos de la epidermis intacta comienzan a migrar a través de la matriz provisional y comienzan a proliferar, abriendo el camino para el nuevo tejido epitelial (Kim, 1992).

30 La remodelación es la tercera y última fase de la cicatrización de una herida. Se caracteriza por la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, que contraen y acercan los bordes de la herida entre sí (Tomasek, 2002). La remodelación de las fibras de colágeno por degradación y re-síntesis permite que la herida gane fuerza debido a la re-orientación de las fibras de colágeno (un proceso estrechamente controlado por factores de crecimiento) (Werner, 2003).

35 El reto del tratamiento de las heridas se complica a menudo en los pacientes con múltiples patologías tales como la diabetes, enfermedad de la arteria coronaria e hipertensión. Estas enfermedades tienen el efecto común de exacerbar las complicaciones vasculares debido a diversas condiciones fisiológicas. Las complicaciones de las heridas pueden resultar en un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Doshi, 2008).

40 Tratamientos convencionales para las heridas incluyen el desbridamiento quirúrgico, tratamientos con antibióticos, y diversos apósitos (Moran, 2008; Fonder, 2008). Las heridas resistentes al tratamiento convencional también se conocen como heridas refractarias. Estas heridas conducen a una disminución de la calidad de vida y pueden dar lugar a aumento de la morbilidad y la mortalidad. Por lo tanto, continúa existiendo la necesidad de composiciones y métodos eficaces para la cicatrización de las heridas.

Compendio de la invención

45 La presente invención se refiere a un método para preparar una composición de leucocitos activados que comprende:

- a) incubar los leucocitos humanos (i) a una temperatura de 12° C - 28° C durante un tiempo que varía de aproximadamente 90 minutos a más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o de 12 a 20 horas o (ii) una temperatura de 12° C - 37° C durante un período de tiempo en el intervalo de 5-24 horas de modo que se produzca la transición de los leucocitos en estado quiescente a un estado funcionalmente activo;
- 50 b) someter los leucocitos a un choque hipo osmótico; y
- c) añadir a los leucocitos de la etapa b) una solución de sal fisiológicamente aceptable en una cantidad efectiva para restaurar la isotonicidad.

Un aspecto de la presente invención se dirige a un método para hacer una composición de leucocitos activados (ALC) derivada de la sangre (es decir, obtenible u obtenida a partir de una muestra de sangre entera). El método incluye las etapas de someter los leucocitos, que se pueden obtener a partir de una muestra de sangre humana entera, a una primera incubación durante un período de tiempo y a una temperatura que permite que los leucocitos se activen, que en realizaciones preferidas, es de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 horas, y a temperatura ambiente. Después de la incubación, se ponen en contacto los leucocitos con una solución acuosa fisiológicamente aceptable, tal como, agua destilada estéril, para iniciar el choque hipo osmótico, seguido de poner en contacto los leucocitos conmovionados con una solución de sal fisiológicamente aceptable para restablecer la isotonicidad. Esta composición de leucocitos activados (ALC) se puede utilizar terapéuticamente. Sin embargo, en alguna realización, por separado y sustancialmente concurrente con la primera incubación de los leucocitos, una muestra de plasma, que se puede obtener de la misma o diferente muestra de sangre entera (es decir, del mismo o de un ser humano diferente), se pone en contacto con un agente coagulante a aproximadamente 37° C concurrente con la incubación de los leucocitos, que en realizaciones preferidas, es de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 horas, seguido por la separación de suero de la muestra de plasma coagulada. Los leucocitos se re-suspenden en suero recogido de la muestra de plasma coagulada, formando así la ALC. Después de la primera incubación, los leucocitos pueden ser sometidos además a una segunda incubación durante aproximadamente de 60 a aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 37° C.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a una ALC derivada de la sangre. La composición de leucocitos activados de la presente invención incluye, en términos de la población de leucocitos presentes en ella, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90% de granulocitos, de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de monocitos y de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% de linfocitos, basado en el número total de leucocitos en la ALC. Como se muestra en los ejemplos de trabajo, las ALCs de la invención también pueden caracterizarse y distinguirse de las composiciones conocidas en términos del rendimiento mínimo de leucocitos (en relación con la muestra de sangre entera), la viabilidad de los leucocitos, y los niveles mínimos de activación de granulocitos, por ejemplo, como se indica por CD11b. La ALC puede contener, además, niveles residuales de plaquetas (en cantidades de alrededor de 46,8 +/- 39,2 (10³/μl) y células rojas de la sangre (en la cantidad de aproximadamente 0,1 +/- 0,06 (10⁶/μl) de la ALC. La población de linfocitos puede incluir de aproximadamente 7% a aproximadamente 25% de células B (CD19+), de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% de células NK (CD3- / CD56+), de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de células T (CD3+), de aproximadamente 0,1%, a aproximadamente 30% de células NKT CD3+ / CD56+, de aproximadamente 8% a aproximadamente 20% de células T auxiliares (CD4+ / CD3+), y de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% de células CD8+ / CD3+. Las células pueden suspenderse en un vehículo tal como suero (que puede ser autólogo o alogénico con respecto al receptor) o algún otro líquido fisiológicamente aceptable iso-normal, adecuado para el almacenamiento y la administración de células, tales como la solución utilizada para restablecer la isotonicidad.

La presente invención puede usarse para la promoción de la cicatrización de heridas por medio de la administración o la aplicación de la ALC a una herida.

La invención descrita logra varios resultados inesperados en comparación con al menos una composición de cicatrización de heridas conocida que contiene células blancas de la sangre. Como se demuestra en los ejemplos de trabajo en este documento, estos resultados incluyen el aumento del rendimiento y la viabilidad de los leucocitos (glóbulos blancos) y mayor porcentaje de granulocitos activados. La invención descrita también se cree que incluye un porcentaje inesperadamente más alto de monocitos activados y un porcentaje relativamente más alto de células T CD4 en comparación con las células T CD8.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente una primera parte de un dispositivo representativo para producir las composiciones de ALC de la presente invención, que incluye bolsas A-C (set - 1), que son bolsas o contenedores de almacenamiento de sangre, en donde la bolsa A contiene glóbulos rojos empaquetados obtenidos a partir de un donante; la bolsa B contiene plasma, y la bolsa C contiene los leucocitos (que después de la separación inicial de la sangre entera forman una capa que comúnmente se conoce como la capa leucocitaria).

La figura 2 representa esquemáticamente una segunda parte del dispositivo representativo para la producción de composiciones de ALC de la presente invención, que incluye un set de 7 bolsas después de que la bolsa A con los glóbulos rojos RBC se retira del sistema y las bolsas B y C de la figura 1 se sueldan a las bolsas 1-5 (set - 2).

Las figuras. 3A y 3B son gráficos que ilustran las tendencias generales de la expresión tanto de CD62L como de CD42b, que son indicadores de la activación de las células.

Descripción detallada

La sangre se define en este documento como la sangre entera o cualquiera de sus partes constituyentes (por ejemplo, plasma, leucocitos, plaquetas o glóbulos rojos). Las cantidades de plaquetas y glóbulos rojos que pueden estar presentes en la ALC de la presente invención pueden ser más bajas que en la sangre entera.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en este documento en conexión con cualquier y todos los valores (incluidos los extremos inferior y superior de los intervalos numéricos) se refiere a cualquier valor que tenga un intervalo aceptable de desviación de +/- 0,5% a +/- 20% (y valores entre los mismos, por ejemplo, ± 1%, ± 1,5%, ± 2%, ± 2,5%, ± 3%, ± 3,5%, ± 4%, ± 4,5%, ± 5%, ± 5,5%, ± 6%, ± 6,5%, ± 7%, ± 7,5%, ± 8%, ± 8,5%, ± 9%, ± 9,5%, ± 10%, ± 10,5%, ± 11%, ± 11,5%, ± 12%, ± 12,5%, ± 13%, ± 13,5%, ± 14%, ± 14,5%, ± 15%, ± 15,5%, ± 16%, ± 16,5%, ± 17%, ± 17,5%, ± 18%, ± 18,5%, ± 19%, ± 19,5%, y ± 20%).

Los materiales de partida para producir las ALCs de la invención se pueden obtener de varias fuentes. Sangre entera o uno o más componentes de la misma (por ejemplo, leucocitos y plasma) se pueden obtener a partir de fuentes autólogas o alogénicas. En una realización de la presente invención, la muestra de sangre se recoge del paciente que va a ser tratado en última instancia con la ALC, lo que se denomina en este documento como una muestra de sangre autóloga o una fuente autóloga. En realizaciones en las que la(s) fuente(s), es decir, la sangre o sus componentes, se obtiene a partir de un individuo que no es el destinatario previsto de la ALC, lo que se conoce como una muestra o fuente de sangre alogénica, estos materiales de partida pueden obtenerse convenientemente a partir de un banco de sangre. Las muestras pueden ser examinadas en el banco de sangre para el grupo sanguíneo (ABO, Rh), anticuerpos irregulares a los antígenos de glóbulos rojos, y enfermedades transmisibles por transfusión. Más específicamente, el examen puede llevarse a cabo con anticuerpos utilizando un instrumento Abbott Prism frente a: la hepatitis B, C, VIH 1/2, HTLV y sífilis (-VHC; HBsAg, anti-VIH 1/2 O+; y anti-HTLV I / II). Las muestras también pueden ser examinadas para VIH, VHC y VHB, mediante métodos moleculares (análisis de ácido nucleico - NAT). El examen molecular se puede realizar usando instrumentación comercialmente disponible, por ejemplo, el sistema TIGRIS de Chiron.

En estas realizaciones que implican fuentes alogénicas, las muestras pueden ser obtenidas de donantes con el mismo tipo de sangre que el destinatario pretendido de la ALC. Alternativamente y como se describe adicionalmente en este documento, las muestras de plasma se pueden obtener de donantes de sangre AB+ y los leucocitos se pueden obtener de pacientes de sangre O-. Los pacientes con sangre AB+ son donantes universales de plasma y los pacientes con sangre O- son donantes universales para los leucocitos. Independientemente de la fuente, todo el procesamiento necesario de la(s) muestra(s) se puede llevar a cabo sin la necesidad de equipo altamente especializado.

Un método preferido de fabricación de la composición de ALC de la presente invención se describe ahora con referencia a las figuras 1 y 2, que ilustran un sistema que contiene dos sets de bolsas de infusión estériles interconectados. El sistema se sella para que no haya exposición al ambiente exterior. Específicamente, los tubos que conectan los dos sets se sueldan entre sí para formar un sistema único utilizando un dispositivo de conexión estéril (por ejemplo, TSCD®-II número de catálogo ME-203AH de Terumo). Más concretamente, para garantizar el cumplimiento de las normas de esterilidad, la soldadura y el corte de los tubos se realiza mediante precalentamiento de obleas especiales, a alrededor de 300° C. Esta alta temperatura aumenta la esterilidad del procedimiento de soldadura. Para garantizar aún más la esterilidad, la soldadura puede llevarse a cabo en una vitrina de seguridad biológica clase 100 dentro de un área de contención de clase 100.000.

Como se ilustra en estas figuras, el sistema contiene dos sets de bolsas estériles. El set 1, que contiene bolsas A, B, y C, es un ensamblaje de triple bolsa estándar, disponible en el mercado de uso común para la transfusión de sangre. Una muestra de sangre humana, por lo general en un volumen de aproximadamente 400 a aproximadamente 550 ml, se recoge en un banco de sangre a través de vía venosa y se coloca en una bolsa A, y después se fracciona en sus partes componentes utilizando técnicas estándar en las bolsas A, B y C. Como ejemplo, la bolsa A que contiene la muestra de sangre se centrifuga. Después de la centrifugación, los componentes de la sangre se separan, por ejemplo, usando un extractor de componentes de sangre fabricado por Baxter. La capa leucocitaria que contiene los leucocitos se coloca en la bolsa C, el plasma se coloca en la bolsa B y los eritrocitos permanecen en la bolsa A. Por lo tanto, como resultado de este proceso, la bolsa de A contiene eritrocitos empaquetados; la bolsa B contiene el plasma, y la bolsa C contiene la capa leucocitaria que contiene los leucocitos (y posiblemente el plasma y los eritrocitos residuales). Alternativamente, los componentes de la sangre pueden ser separados de la sangre entera a través de técnicas de aféresis conocidas en la técnica.

A continuación la bolsa A se desconecta de la serie de tres bolsas. Como se ilustra en la figura 2, las bolsas B y C se sueldan entonces a las bolsas de infusión por encargo 1-5 (set-2) para formar el sistema usado para hacer la composición de leucocitos activados. Como se describió anteriormente, la soldadura se lleva a cabo con un dispositivo estéril de conexión. La bolsa 1 contiene una primera solución acuosa (por ejemplo 200 ml de agua destilada estéril) que se usa para el propósito de exponer las células en la capa leucocitaria al shock hipo osmótico. Esto sirve para lisar los eritrocitos residuales que puedan estar presentes. La bolsa 2 contiene una segunda solución (por ejemplo, 20 ml de solución de cloruro sódico tamponado (8,91% de ClNa, USP), o cualquier otra solución fisiológicamente aceptable que contenga iones inorgánicos, osmolitos orgánicos tales como la sacarosa, o una combinación de los mismos, tal como la solución de Ringers (Hartmans) lacteada, que sirve para restaurar los leucocitos a la isotonicidad tras el choque hipo osmótico. Cuando se añade la solución de cloruro de sodio a 200 ml de agua destilada, se convierte en una solución de ClNa al 0,9%. La bolsa 3 contiene una tercera solución (por ejemplo alrededor de 60 ml de solución de cloruro cálcico tamponado (1,17% CaCl₂ dihidrato, USP), que actúa para coagular el plasma en la bolsa B, y para facilitar la separación de las plaquetas y el suero. La bolsa 4 y la bolsa 5 cada una contienen aire filtrado estéril, aproximadamente 60 ml y aproximadamente 500 ml, respectivamente. El set

se empaqueta como una unidad única y se esteriliza usando vapor a alta presión, que reduce grandemente el riesgo de infección secundaria en el paciente.

5 Los leucocitos se transfieren entonces de la bolsa C a la bolsa 4 (o a la bolsa 5) y se incuban preferiblemente en una posición vertical, para permitir que se activen. Para los propósitos de la presente invención, la activación de las
 10 células se define como un proceso por medio del cual se permite que las células (leucocitos) lleguen a ser activados y más específicamente, como una transición de un estado quiescente a un estado funcionalmente activo que es acompañada por la síntesis de sustancias biológicamente activas o por la traslocación de sustancias presintetizadas del citoplasma a la membrana celular o por su liberación fuera de las células. Estas sustancias pueden incluir
 15 proteínas o polipéptidos, lípidos, azúcares, radicales de oxígeno y otros restos bioquímicos que funcionan como moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, enzimas, factores de transcripción y receptores de
 20 señalización celular y mediadores celulares. Cuando se detectan e identifican en el interior de la célula o en la superficie celular, estas moléculas son llamadas marcadores de activación.

En algunas realizaciones, los leucocitos se incuban simplemente dejándoles reposar a temperatura ambiente. Para
 15 los propósitos de la presente invención, la temperatura ambiente se refiere a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 12° C a aproximadamente 28° C, y en algunas realizaciones desde aproximadamente 16° C a aproximadamente 25° C. El período de tiempo de incubación, puede variar dependiendo de la temperatura. Los
 20 tiempos de incubación serán más cortos a mayor temperatura. El tiempo de incubación necesario para activar los leucocitos será más o menos inversamente proporcional a la temperatura a la que se lleva a cabo la incubación. Por ejemplo, en realizaciones en las que se permite que los leucocitos estén en reposo a la temperatura ambiente, el
 25 tiempo de incubación oscila generalmente entre aproximadamente 90 minutos, y hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7 o de 8, a aproximadamente 20 horas. En realizaciones preferidas, el tiempo de incubación oscila entre aproximadamente 8 a aproximadamente 20 horas. En una realización más preferida, la incubación de los leucocitos se produce de
 30 aproximadamente 18° C a aproximadamente 24° C durante aproximadamente de 8 horas a aproximadamente 12 horas. En otras realizaciones, la incubación de los leucocitos supone la exposición al calor, por ejemplo, a una temperatura por encima de la temperatura ambiente y de hasta aproximadamente 37° C. El período de tiempo para la incubación a temperaturas elevadas por lo general oscila entre 5 horas a alrededor de 24 horas.

Con relación de nuevo a la figura 2, los leucocitos de la bolsa C se transfieren a la bolsa 4 que es corrientemente más
 30 pequeña que la bolsa C (por ejemplo aproximadamente 250 ml a aproximadamente 500 ml). Además las células pueden transferirse dentro de otra bolsa de 500 ml (bolsa 5). Para permitir la activación de los leucocitos, la bolsa 4 (o la bolsa 5) se coloca en una posición vertical y se incubaba, durante aproximadamente de 8 a aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente.

Después de la incubación, los leucocitos se someten a un choque hipo osmótico que lisa los eritrocitos. En
 35 realizaciones preferidas, el choque hipo osmótico se realiza inmediatamente (es decir, tras la finalización de la etapa anterior sin ningún paso intermedio o demora innecesaria, típicamente en menos de 2 minutos). El choque hipo osmótico puede ser iniciado mediante la transferencia del agua destilada de la bolsa 1 a la bolsa 4 (o bolsa 5) que
 40 contiene los leucocitos. El tratamiento de choque hipo osmótico se lleva a cabo normalmente durante aproximadamente 45 segundos. Después de esta etapa, y preferiblemente inmediatamente después, se restablece la isotonicidad de los leucocitos mediante la transferencia de la solución de cloruro de sodio de la bolsa 2 a la bolsa
 45 4 (o la bolsa 5). La relación del volumen de solución de cloruro sódico a la suspensión de las células en el agua es generalmente de aproximadamente 1:10. El contenido de la bolsa 4 se transfiere entonces a la bolsa 1 (o se deja en la bolsa 5), que es mayor en volumen que la bolsa 4. Como se describió anteriormente, esta composición puede usarse terapéuticamente en los métodos de la invención.

La realización preferida envuelve al menos una etapa adicional. Por lo tanto, en una etapa separada, que puede
 45 llevarse a cabo simultáneamente con la incubación de los leucocitos, el plasma se separa en las plaquetas y en el suero mediante el uso de un coagulante tal como CaCl_2 , seguido de centrifugación. Por lo tanto, en esta realización representativa, CaCl_2 de la bolsa 3 se transfiere a la bolsa B. A la bolsa B, que ahora contiene una composición de plasma y CaCl_2 , típicamente se le permite coagular a una temperatura de aproximadamente 37° C. El plasma permanece en contacto con el agente coagulante durante sustancialmente el mismo período de tiempo que se
 50 incuban los leucocitos.

Después del shock hipo osmótico y de la restauración de la isotonicidad de los leucocitos, y subsiguiente
 55 transferencia del contenido de la bolsa 4 a la bolsa 1 (o de permanecer en la bolsa 5), y después de la coagulación del plasma en la bolsa B, todo el dispositivo de las 7 bolsas se centrifuga. En realizaciones preferidas, la centrifugación se realiza inmediatamente después de la transferencia de los leucocitos a la bolsa 1 (o de permanecer en la bolsa 5), a fin de no exponer a las células al hemolizado. Después de la centrifugación, el
 60 sobrenadante de la bolsa 1 (o la bolsa 5) se transfiere a la bolsa C, y el sedimento de leucocitos formado en la bolsa 1 (o la bolsa 5) como resultado de la centrifugación se vuelve a suspender en el suero en aproximadamente 20 ml a aproximadamente 50 ml de suero de la bolsa B.

En todavía otra etapa de la realización preferida de la presente invención, los leucocitos activados pueden incubarse
 60 en el plasma coagulado mencionado anteriormente antes de que se haga la composición final. En general, este segundo período de incubación se lleva a cabo durante aproximadamente 1-2 horas a 37° C.

En otras realizaciones, la composición de ALC se puede preparar a partir de volúmenes más pequeños de muestras de sangre, con disminuciones proporcionales en los volúmenes de todas las soluciones y el uso de bolsas más pequeñas. Además, el uso de estas bolsas de tamaño diferente proporciona ALCs con diferentes composiciones. Incluso en estas realizaciones, se pueden usar como materiales de partida muestras de sangre alogénica o autóloga. El uso de volúmenes más pequeños proporciona al médico la capacidad de realizar la recogida de sangre de forma autónoma, sin necesidad de utilizar un banco de sangre externo, tal como en situaciones de emergencia en el tratamiento de pacientes con sistemas inmunitarios saludables pero que sufren de algún tipo de herida traumática (por ejemplo, campo de batalla y condiciones de combate). En estas realizaciones, puede prescindirse de las pruebas de enfermedades transmisibles y antígenos. Sin embargo, en tales casos, los pacientes con heridas refractarias no son donantes de sangre clínicamente aceptables para la preparación eficaz de la ALC. Cuando surge esta situación, se produce la ALC a partir de donantes alogénicos por los medios descritos en este documento.

Las ALCs de la presente invención incluyen leucocitos, por ejemplo, granulocitos, monocitos y linfocitos. Los granulocitos incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En su sentido más amplio, la población de leucocitos de la ALC generalmente contiene de aproximadamente 40% a aproximadamente 90% de granulocitos, de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de monocitos y de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% de linfocitos. Cantidades específicas de las células pueden diferir en función de las técnicas de análisis empleadas. Cuando el análisis se realiza usando FACS (es decir, usando un análisis gráfico de puntos de dispersión lateral frente a un análisis gráfico de puntos de dispersión frontal), la composición de leucocitos generalmente contiene de aproximadamente 55% a aproximadamente 80% de granulocitos; de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de monocitos y de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% de linfocitos, y en algunas realizaciones, comprende aproximadamente 58-76% de granulocitos; aproximadamente 5-11% de monocitos y aproximadamente 9-23% de linfocitos. Cuando el análisis se realiza usando un Analizador Cell Dyn, la composición de leucocitos generalmente contiene de aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de granulocitos; de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de monocitos, y de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% de linfocitos. La subpoblación de linfocitos de la ALC puede confirmar las siguientes células en los intervalos generales de la siguiente manera: de aproximadamente 7% a aproximadamente 25% de células B (CD19+); de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% de células NK (CD3- / CD56+), de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de células T (CD3+); de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 30% de células NKT CD3+ / CD56+, de aproximadamente 8% a aproximadamente 20% de células T auxiliares (CD4+ / CD3+), y de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% de células CD8+ / CD3+. En realizaciones preferidas, la subpoblación de linfocitos se enriquece con al menos 9% de células CD56+ (CD3- / CD56+; CD3+ / CD56+; CD3+ / CD56+ / CD8+), la cantidad de los linfocitos T auxiliares (CD4+ / CD3+) se reduce a menos de 20%, y/o la relación de células T auxiliares a células T supresoras (CD4+ / CD3+ : CD8+ / CD3+) es menos de 0,8.

Los pacientes que sufren de heridas pueden estar fisiológicamente comprometidos o por otro lado sanos. Por ejemplo, debido a sistemas metabólicos ya con discapacidad, los diabéticos y otros pacientes médicamente comprometidos son candidatos para ALCs derivadas de sangre heteróloga, ya que sus propios leucocitos pueden no ser óptimos para el procedimiento. Sin embargo, los pacientes por lo demás sanos, como en el ejemplo de pacientes con trauma, son también buenos candidatos para las composiciones de ALC de la presente invención.

La presente invención es útil en la promoción de la curación de una multitud de tipos de heridas. Aunque en la práctica se puede utilizar en combinación con otras modalidades de tratamiento, no requiere de ellos para lograr la curación eficaz de la herida. Los inventores han contemplado la aplicación de ALC a cualquier tipo de herida y prevén que no haya limitaciones en cuanto al tipo de herida que puede ser tratada. La facilidad de aplicación, por ejemplo, con una jeringa estándar o un dispositivo de aplicación similar, hace a las composiciones ALC de la invención seguras y fáciles de usar.

Las heridas susceptibles de tratamiento con la invención están típicamente en forma de pinchazos, cortes o desgarros de los tejidos vivos. Las heridas de la piel pueden penetrar la epidermis, dermis o en el caso de heridas de espesor total, el tejido subcutáneo. Por lo tanto, los tipos representativos de heridas susceptibles de tratamiento con las composiciones y métodos de la presente invención incluyen úlceras por decúbito o presión; úlceras diabéticas, heridas del esternón profundas, por ejemplo, después de la cirugía a corazón abierto (para la gran vena safena después de la revascularización coronaria y la cosecha de la gran vena safena), y heridas post-operatorias posteriores a la cirugía abdominal, y cualquier otro tipo de cirugía. Otras heridas son las que se originan por un trauma tal como por disparos de armas, cuchillos o cualquier otro objeto que pueda causar un corte o desgarrar en la piel. Las heridas de la cavidad oral (por ejemplo, dientes), así como heridas que surgen como un efecto secundario de la medicación o como un síntoma de diversas patologías (por ejemplo, úlceras asociadas con el sarcoma de Kaposi), así como las heridas internas (por ejemplo, fisuras anales, y las heridas o lesiones en el tracto gastrointestinal, tales como úlceras en el estómago o los intestinos) también pueden ser susceptibles al tratamiento con la presente invención.

La ALC también puede ser utilizada para tratar cualquier herida exacerbada por insuficiencia vascular. La insuficiencia vascular, para los propósitos de la presente invención, se refiere a la circulación sanguínea inadecuada que da como resultado una perfusión insuficiente de las zonas afectadas. Tal insuficiencia puede ser causada por un traumatismo (por ejemplo, daño a la vasculatura adyacente a una fractura del esqueleto), o diversas patologías (por ejemplo, la diabetes y la aterosclerosis). En cualquier caso, sea inducida por el trauma o la enfermedad, la

- insuficiencia vascular disminuye la probabilidad de curación eficaz de la herida. La ALC puede ser útil en la mejora de los resultados de la cicatrización de heridas en estos pacientes y debe ser administrada según los métodos descritos en este documento. Además, los algoritmos de tratamiento no deben estar limitados por la gravedad o el tipo de herida, o la extensión de la insuficiencia vascular. La ALC puede ser más eficaz en pacientes que se presentan con las heridas más graves y la insuficiencia vascular.
- 5 En general, la aplicación de la composición de leucocitos activados se lleva a cabo por medio de una o más inyecciones de la ALC directamente en la herida o el tejido que rodea la herida. La ALC puede aplicarse directamente en una herida abierta.
- 10 Para la inyección dentro de la herida, se prefiere utilizar una jeringa Luer-Lock o cualquier otra jeringa disponible comercialmente que tenga un mecanismo de bloqueo entre la jeringa y la aguja. El espacio biológico de una herida, particularmente una herida de presión, es a menudo limitado. Cuando se inyecta en una herida, existe un riesgo de que la presión haga que la jeringa se separe de la aguja. El uso de una jeringa de bloqueo elimina este riesgo.
- 15 Cuando la inyección en el tejido de la herida no es posible, la ALC se puede aplicar directamente en la cavidad de la herida. La aplicación en este método se puede hacer utilizando la aplicación directa con una jeringa o tubo.
- 20 La ALC se puede aplicar alrededor del lugar de la herida con la ayuda de un apósito. Los apósitos secos incluyen gasas y vendas, mallas no adhesivas, membranas y láminas, espumas y adhesivos tisulares. Los apósitos de barrera que mantienen la humedad incluyen pastas, cremas y ungüentos, membranas o láminas no permeables o semipermeables, hidrocoloides, hidrogeles y productos de combinación. Los apósitos bioactivos incluyen apósitos antimicrobianos, apósitos interactivos, apósitos biológicos de un solo componente y productos de combinación. En algunas realizaciones, la herida se empaqueta con gasa estéril empapada en la ALC. El apósito, por ejemplo, tal como una almohadilla de gasa estéril, puede ser saturado con composiciones tales como la solución de Ringer (Hartman) lacteada, un apósito que contiene alginato, apósito de poliuretano o apósito de carboximetilcelulosa, que se aplica para cubrir la herida, seguido de la aplicación de un apósito seco. Si la herida del sujeto está muy infectada, se pueden aplicar apósitos de plata tales como Silverlon. La elección de apósito después de la inyección se basa en la determinación del médico. La disponibilidad comercial, historia de éxito clínico pasado, y la tolerancia del paciente son todos factores a ser considerados en la selección de un apósito para las heridas. El apósito puede ser retirado periódicamente, por ejemplo, típicamente después de aproximadamente 24 horas, con el fin de irrigar la herida, por ejemplo, con agua estéril y jabón.
- 25 En otra realización, la composición de ALC puede colocarse en una matriz o ensamblaje fisiológicamente inerte y/o reabsorbible (por ejemplo, colágeno) e insertarse por medio de un ajuste a presión, en la herida. Esto permite un suministro sostenido de la ALC en el sitio, lo que beneficia al paciente porque las células permanecen un período más largo in situ.
- 30 Las composiciones de ALC pueden aplicarse a la herida una vez o más de una vez, por ejemplo, después de 4 semanas, una vez que el médico determina si otra aplicación es necesaria. Los factores que pueden ser tenidos en cuenta incluyen el aumento de dimensiones de la herida (ancho, largo y profundidad), supuración, fiebre o cualquier otro signo o síntoma que indique una infección recalcitrante de tal manera que el re-tratamiento se justifique. Además de repetir el tratamiento, la remisión para el desbridamiento quirúrgico puede estar indicada en cualquier momento el médico considere adecuado.
- 35 La ALC se puede utilizar en combinación con cualquier otro tratamiento de heridas convencional, tal como el calentamiento (calor terapéutico), estimulación eléctrica, magnetismo, fototerapia láser, terapia de vibración cicloidal y ultrasonido. También se puede utilizar con terapia biológica, tal como la terapia de larva, sustitutos de la piel, queratinocitos cultivados (Epicel, Genzyme Biosurgery), el reemplazo dérmico humano (Dermagraft, Smith and Nephew, Inc.), dermis procesada derivada de cadáveres (Allodeim, Life Cell Corporation), equivalente a dos capas de piel (Apligraf, Organogenesis Inc.), Transcyte (Smith and Nephew, Inc.), factores de crecimiento (PDGF es actualmente el único factor de crecimiento con licencia para uso tópico), y sellador de fibrina. En algunas realizaciones, la ALC se utiliza en conjunción con VAC, que es una terapia de heridas comercialmente disponible fabricada por KCI. VAC promueve la cicatrización de la herida mediante la aplicación de presión negativa a una herida. En estas realizaciones, ALC se aplica preferiblemente a una herida antes de la terapia de VAC. En aún otras realizaciones, ALC se utiliza en conjunción con la terapia hiperbárica (Thackham, 2008). Por ejemplo, ALC se puede aplicar a una herida justo antes de que un paciente reciba la terapia hiperbárica. ALC también se puede usar en conjunción con terapia de ondas de choque de baja energía (o sea, impulsos de aproximadamente $0,1 \text{ mJ/mm}^2$; 5 Hz por centímetro de longitud de la herida). Véase, por ejemplo, Dumfarth, *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 86:1909-13 (2008).
- 40 Después del tratamiento, las heridas pueden ser evaluadas en cuanto a sus medidas de longitud, anchura y altura. Típicamente, una herida se considera curada cuando todas las mediciones de estos parámetros son insignificantes. La ALC también puede proporcionar un efecto analgésico.
- 45 La composición de leucocitos activados es particularmente útil en las heridas que incluyen las úlceras diabéticas del pie y úlceras de decúbito. Úlceras de decúbito son las úlceras por presión causadas por la obstaculización del flujo
- 50
- 55

de la sangre, por lo general debido a la presión prolongada sobre un área en particular. (Berlowitz, 2007). Las úlceras de decúbito causan morbilidad y mortalidad en las personas de edad avanzada. Al menos el 48% de las úlceras por presión de estadio IV permanecen sin cicatrizar después de un año de tratamiento. (Girouard, 2008). Los pacientes que sufren de úlceras de decúbito también suelen tener patologías concomitantes como la diabetes y la hipertensión. Estas patologías complican aún más el éxito del tratamiento de úlceras de decúbito.

5 Para el tratamiento de las úlceras de decúbito, la composición se aspira en una jeringa estéril de cualquier tamaño, usando una aguja de calibre 18 (18G). La aspiración se realiza lentamente para minimizar el daño a las células. Mientras que el tamaño de la jeringa y la aguja no son en ningún sentido limitativos, se prefiere una aguja de gran calibre para la aspiración. Esto facilita la transferencia y reduce el daño celular.

10 La aplicación de la composición de leucocitos activados a la úlcera comprende inyectar la composición en la herida. Toda la muestra de la jeringa puede ser desplegada y el médico puede optar por aplicar ALC adicional si se determina que es necesario en función de los parámetros clínicos.

15 La aguja de 18G utilizada para la aspiración se intercambia con una aguja que oscila en tamaño de 22 a 35 G. ALC se puede inyectar en la herida en varios lugares. La inyección puede producirse de aproximadamente cada centímetro a aproximadamente cada tres centímetros para toda la longitud de la herida. En cada sitio de la inyección, se inyecta 0,1- 0,3 ml de ALC.

La totalidad de la jeringa puede ser inyectada de una sola vez en un solo sitio dentro de la herida.

Se describirán ahora aspecto(s) de la presente invención de acuerdo con los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1- Análisis de la activación celular

Una composición de leucocitos activados hecha según la realización preferida de la presente invención se cuantificó mediante el análisis de diversos marcadores de superficie celular. Un aumento en la agregación de las plaquetas con cualquiera de los monocitos o granulocitos es un signo de la activación de los monocitos y granulocitos a través de la expresión de la selectina P. CD62L es una proteína de membrana de plasma que se desprende durante la activación y por lo tanto disminuye con la activación de las células. CD42b es un marcador de activación de las plaquetas relacionado con el proceso de la coagulación como un factor de agregación. Interacciona con la matriz extra-celular, así como con las moléculas de adhesión y también se utiliza en la presente invención como un indicador de la activación de los monocitos y granulocitos.

Se tomaron muestras de las células en tres puntos de tiempo: capa leucocitaria fresca (Fr. BC); capa leucocitaria incubada (IBC)), y composición de leucocitos activados final (FP) (Tabla 1).

Tabla 1: Marcadores de superficie celular que indican la activación de leucocitos

% de células CD62L positivas			
	Fr. BC	IBC	FP
Monocitos	68	55	44
Granulocitos	97	47	39
% de células CD42b positivas			
Monocitos	26	74	92
Granulocitos	3	15	39

Fr. BC se tomó inmediatamente después de la preparación de la capa leucocitaria. IBC se tomó después del primer periodo de incubación y FP se tomó del producto final. En cada punto de tiempo, se marcaron las células con anticuerpos monoclonales específicos (anticuerpos anti-CD14 conjugados con alofocianina (APC), anticuerpos anti-CD42b conjugados con ficoeritrina (PE), y anticuerpos anti-CD62L conjugados con fluoresceína-isotiocianato (FITC), y después se analizaron por FACS.

Las células de cada punto de tiempo se lavaron con solución de tinción de FACS (PBS, 2% de suero de ratón normal; 0,02% de azida de sodio), con alícuotas y tinción según el protocolo de tinción. Brevemente, $0,5 \times (10^6 / \mu\text{l})$ células se incubaron con anticuerpos monoclonales apropiados durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) o a +4° C en la oscuridad. Después de la incubación, la composición celular se trató con tampón de lisis de eritrocitos, se lavó, y finalmente se re-suspendió en PBS para la adquisición por FACS. Para la tinción positiva (+) CD62L, la composición celular se incubó con anticuerpos anti CD14 (APC) humanos y anticuerpos anti CD62L

(FITC) humanos a 4° C. Para la tinción de CD42b + la composición de células se incubó con anti-CD14 (APC) humanos y anti-CD42b (PE) humanos a temperatura ambiente (RT). La composición celular de control negativo se incubó con anti-CD14 humanos y los controles de isotipos adecuados en condiciones relevantes. La dispersión de la luz y fluorescencia asociada con las células se midió con un FACSCalibur (Becton Dickinson). Los monocitos se determinaron como células positivas CD14 y los granulocitos se identificaron por sus propiedades de dispersión de luz características. Las células positivas CD62L o CD42b se definieron como el porcentaje de monocitos y granulocitos con fluorescencia mayor de un umbral, como se determinó por monocitos y granulocitos incubados con anticuerpos de control de isotipo.

Como se muestra en las figuras 3A y 3B y la Tabla 1, los resultados fueron consistentes con la expectativa de que la expresión de CD62L disminuiría a medida que progresaba la activación y la de CD42b aumentaría a medida que progresaba la activación. Estos datos demuestran que los leucocitos se activaron.

Ejemplo 2 - Análisis de una composición de leucocitos activados

- 5 Las Tablas 2 y 3 muestran las composiciones celulares de la ALC final tal como se determinó por análisis con un analizador Cell Dyn. Se analizaron las células después de que se volvieron a suspender los leucocitos activados en el suero. Las células viables se tiñeron utilizando exclusión de azul tripán y se observaron en el microscopio.

Tabla 2: Composición de la composición de leucocitos activados

	Plaquetas (10 ³ /μl)	Eritrocitos (10 ³ /μl)	Leucocitos (10 ³ /μl)
Concentración en ALC final	46,8	0,1	6,8
Desviación estándar	39,2	0,06	3,8

- 10 Tabla 3: Composición de leucocitos en ALC

Leucocitos					
	Granulocitos				
	% de neutrófilos	% de basófilos	% de eosinófilos	% de monocitos	% de linfocitos
% en ALC final	66,5	1,6	4,6	9,1	18,5
Desviación estándar	8,2	0,3	3	2,1	4,1
Intervalo	52-78	1-2	1-9	6-12	13-24

- 15 Los resultados del Cell Dyn, como se muestra en la Tabla 2, mostraron que ALC contenía plaquetas en la cantidad de 46,8 +/- 39,2 (10³/μl), eritrocitos en la cantidad de 0,1 +/- 0,03 (10⁶/μl), y leucocitos en la cantidad de 6,8 +/- 3,8 (10³/μl). Basado en el análisis de Cell Dyn, se determinó también que la composición de leucocitos de ALC (como se muestra en la Tabla 3) contenía 52%-78% de neutrófilos, 1-2% de basófilos, 1-9% de eosinófilos, 6%-12% de monocitos, y 13%-24% de linfocitos, teniendo en cuenta la desviación estándar. Los intervalos representados en estas tablas representan los resultados altos y bajos después de 8 análisis separados usando el analizador Cell Dyn.

Ejemplo 3

Comparación entre el método de la invención y el proceso anterior de la técnica

- 20 Para poner de relieve las diversas ventajas inesperadas asociadas con la presente invención, se compararon realizaciones de la misma con el proceso descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.146.890, para Danon ("Danon").

Realizaciones de la invención

- 25 Haciendo referencia a las figuras 1 y 2, inmediatamente después de separar la sangre entera en sus componentes primarios, es decir, los glóbulos rojos de la sangre, plasma y capa leucocitaria, la capa leucocitaria se transfirió de la bolsa C a la bolsa 4 y se incubó durante 12 horas ± 2 horas a temperatura ambiente. Este paso fue seguido de la

5 transferencia de agua destilada de la bolsa 1 a la bolsa 4 (o bolsa 5), para los propósitos de llevar a cabo un tratamiento de choque hipo osmótico (que resulta en la producción de un hemolizado). Este tratamiento se llevó a cabo durante aproximadamente 45 segundos. Inmediatamente después, la solución de cloruro de sodio tamponada contenida en la bolsa 2 se transfirió a la bolsa 4 (o bolsa 5) para el propósito de la restauración de la isotonicidad de la capa leucocitaria (leucocitos).

Al mismo tiempo que la incubación de la capa leucocitaria, arriba, se transfirió la solución de cloruro de calcio tamponada de la bolsa 3 a la bolsa B que contenía la porción de plasma, a efectos de permitir la coagulación del plasma. Esto se dejó que tuviera lugar durante el transcurso de 12 horas \pm 2 horas, más el tiempo adicional corto durante el cual los leucocitos se sometieron al choque hipo osmótico y luego la restauración de la isotonicidad.

10 Inmediatamente después de la restauración de la isotonicidad, todo el conjunto de la bolsa se sometió a centrifugación (típicamente de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 minutos), seguido de la separación de las células del hemolizado. De este modo, las células fueron expuestas a la influencia del hemolizado durante un período mínimo de tiempo, es decir, aproximadamente 10 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante de hemolizado en la bolsa 1 (o la bolsa 5) se descartó, y se añadió medio fresco a la bolsa 1 (o bolsa 5), seguido de
15 incubación durante aproximadamente 1-2 horas a 37° C. Después de la incubación, las células se sometieron a una sola etapa de lavado.

Procedimiento comparativo (técnica anterior)

20 Siguiendo las enseñanzas de Danon, la capa leucocitaria se sometió a un choque hipo osmótico inmediatamente después de procesar la sangre entera y se separó en sus 3 componentes principales, o sea, los glóbulos rojos de la sangre, plasma y capa leucocitaria. Por lo tanto, en agudo contraste con la presente invención, el procedimiento de Danon no implica la incubación de la capa leucocitaria después de la separación de los principales componentes de la sangre y antes de someter a la capa leucocitaria al choque hipo osmótico. El choque hipo osmótico se llevó a cabo mientras que la capa leucocitaria estaba contenida en la bolsa PB₃.

25 Como un paso separado, y después del choque hipo osmótico, la solución de cloruro de calcio tamponada se transfirió de la bolsa PB₆ a la bolsa PB₂, bolsa que contenía el plasma, seguido de la congelación del plasma en PB₂ durante 10 minutos, y de después colocarlo en un baño de agua a 37° C durante un período adicional de 30 minutos de incubación. Durante este tiempo, la fracción de capa leucocitaria que había sido sometida a choque hipo osmótico se dejó en reposo de manera que los leucocitos permanecieron expuestos al hemolizado.

30 Después de la conclusión de este proceso de coagulación, que en total duró alrededor de 40 minutos, todo el sistema de bolsa fue sujeto a centrifugación, y el hemolizado se descartó. Por lo tanto, las células fueron expuestas al hemolizado durante un período de al menos aproximadamente 55 minutos (es decir, que incluía el periodo de reposo de 40 minutos que coincidió con la coagulación del plasma, y un periodo adicional de 15 minutos para la centrifugación). En contraste, en el método de la invención, los leucocitos se centrifugaron inmediatamente durante
35 alrededor de 5 minutos y por lo tanto fueron expuestos al hemolizado durante mucho menos tiempo, es decir, menos de 10 minutos.

Después de descartar el sobrenadante de PB₃, se añadió medio fresco a la misma, seguido de la transferencia de toda la suspensión de nuevo a PB₇, que después se incubó durante aproximadamente 17 horas a 37° C. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces. En contraste, en las realizaciones de la presente invención, el período de incubación se llevó a cabo en el plasma coagulado durante 1-2 horas, y se lavó una sola vez.

40 Hasta que se llevó a cabo la incubación antes mencionada, se llevaron a cabo todos los pasos anteriores en bolsas de transfusión, que eran las bolsas en las que se recogió la sangre entera. En contraste, las realizaciones de la invención implicaron el uso de las bolsas de infusión que se utilizan habitualmente para administrar soluciones intravenosas, tales como solución salina.

45 El procedimiento de Danon se llevó a cabo 4 veces y se comparó con los resultados generados por la realización de la presente invención. Los resultados que se mencionan a continuación, se promediaron.

Resultados

50 Se determinó para cada lote de sangre entera la cantidad total de las células blancas de la sangre (leucocitos) obtenidos a partir de una unidad estándar de sangre, calculada como la concentración final multiplicada por el volumen final de suspensión celular. Los resultados promediados de los 111 lotes de sangre entera procesada según el método de la presente invención, y los 4 lotes que se procesaron según el procedimiento descrito en Danon, se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de células blancas de la sangre por unidad de sangre – (la presente invención proporcionó aproximadamente rendimientos de 90 veces más cantidad de células blancas.)

Número de lotes	Células blancas de la sangre (x 10 ⁶)	
	Promedio	Desviación estándar
Invención presente (n=111)	449	220
<i>Danon</i> (n=4)	5	4

- 5 Los resultados muestran que el método de la presente invención dio como resultado aproximadamente 90 veces más cantidad de leucocitos obtenidos a partir de una unidad de sangre estándar (aproximadamente 450 ml), en comparación con el procedimiento de *Danon*. Más en general, el presente método da como resultado un rendimiento de al menos aproximadamente 100 × 10⁶, 125 × 10⁶, 150 × 10⁶, 175 × 10⁶, 200 × 10⁶, 225 × 10⁶, 250 × 10⁶, 275 × 10⁶, 300 × 10⁶, 325 × 10⁶, 350 × 10⁶, 375 × 10⁶, 400 × 10⁶, 425 × 10⁶, 450 × 10⁶, 475 × 10⁶, 500 × 10⁶, o más leucocitos por unidad de sangre estándar (incluyendo todos los sub-rangos de los mismos).
- 10 El número de células viables contenidas dentro de la población total de células, expresado como un porcentaje, se midió por el método de exclusión de azul tripán. Las células se contaron en un hemocitómetro de Newbauer después de la suspensión en azul de tripán (relación 1:1) para la evaluación del recuento de células y el porcentaje de viabilidad. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5.

Procedimiento	Viabilidad (% de células vivas)	
	Promedio	Desviación estándar
Invención presente (n=111)	98%	0,02%
<i>Danon</i> (n=4)	77%	6%

- 15 Los datos de la Tabla 5 muestran que además de una producción más baja (como se muestra en la Tabla 4), el procedimiento de *Danon* produjo una suspensión de células con significativamente menor viabilidad. Es decir, casi una cuarta parte (o sea, 23%) de la preparación estaba compuesta de leucocitos muertos (más de un porcentaje de 10 veces de células muertas). En agudo contraste, casi todas las células blancas de la sangre procesadas según el método de la Invención fueron determinadas como viables. Más en general, la ALC de la invención puede contener al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más, leucocitos viables sobre la base de este número total de células de leucocitos en la ALC (incluyendo todos los sub-rangos de los mismos).

- 20 La Expresión del marcador de activación de CD11b en granulocitos se midió por citometría de flujo, y se presenta como un porcentaje de las células CD11b positivas en la población de granulocitos (Células Positivas CD15). Las células de la muestra del producto final fueron teñidas simultáneamente con anti-CD11b conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y anti-CD15 conjugado con ficoeritrina (PE), y se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, California, Estados Unidos). Se analizó la expresión de CD11b en los granulocitos en las células de 81 lotes de lotes del producto final realizados según el método de la Invención, y de 3 lotes de productos final producidos según el procedimiento de *Danon*.

Tabla 6 Expresión de CD11b en los granulocitos

Procedimiento	% de granulocitos expresando el marcador de activación CD11b	
	Promedio	Desviación estándar
Invención presente (n=81)	84,6	6,2
<i>Danon</i> (n=3)	46,9	9,2

- 35 Como muestran los datos contenidos en la Tabla 6, el método de la invención produjo casi dos veces más granulocitos activados en términos porcentuales, en comparación con el procedimiento de *Danon*. Más en general, los ALCs de la presente invención pueden contener al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%,

79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, o más, granulocitos CD11b (+), en relación con la población total de granulocitos en la ALC (incluyendo todos los sub-rangos de los mismos).

Los resultados de la experimentación comparativa demuestran que la invención descrita actualmente alcanza por lo menos 3 resultados inesperados en comparación con el procedimiento descrito en *Danon*, a saber, un mayor rendimiento de leucocitos viables, un alto porcentaje de células viables, y un mayor nivel de activación de granulocitos, como se muestra por el aumento de la expresión del marcador de activación CD11b. Estos aumentos son dramáticos e inesperados.

5

Lista de la bibliografía citada en la solicitud

J. Li, et al., *Pathophysiology of Acute Wound Healing*. Clinical Dermatol. 2007 Enero-Febrero; 25(1) : 9-18.

10

G. Broughton 2nd, et al., Wound Healing: An Overview. Plast Reconstr Surg. 2006 Junio; 117 (7 Suppl):1e -S-32e-S.

AK Tsirogianni, et al., *Wound Healing: Immunological Aspects*. Injury. 2006 Abril; 37 Suppl 1:S5-12. Epub 2006.

AJ Singer, et al., Cutaneous Wound Healing. New Eng. J. Med. 1999; 341(10): 738-46.

P. Martin, *Wound Healing—Aiming For Perfect Skin Regeneration*. Science 1997; 276 (5309): 75-81.

15

AD Agaiby, et al., *Immuno-Inflammatory Cell Dynamics During Cutaneous Wound Healing*. J. Anat. 1999 Noviembre; 195 (Pt 4): 531-42.

DWH Riches, *Macrophage Involvement In Wound Repair, Remodeling and @brosis*. En The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, (1996) 1ª edición (ed. Clark RAF), páginas 95±141. Nueva York, Londres: Plenum Press.

D. Greiling, et al., *Fibronectin Provides a Conduit for Fibroblast Transmigration from Collagenous Stroma into Fibrin Clot Provisional Matrix*. J. Cell. Sci. 1997; 110: 861-70.

20

MG Tonnesen, et al., *Angiogenesis In Wound Healing*. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2000; 5 (1): 40-6.

JP Kim, et al., *Mechanisms of Human Keratinocyte Migration on Fibronectin: Unique Role of RGD Site and Integrins*. J. Cell. Physiol. 1992; 151: 443-50.

JJ Tomasek et al., *Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. (2002) 3: 349-363.

25

S Werner, et al., *Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines*. Physiol Rev. 2003 Julio; 83 (3): 835-70.

D. A. Keen, *Review of Research Examining the Regulatory Role of Lymphocytes in Normal Wound Healing*. J. Wound Care. 2008.

J Jameson, et al., A Role for Skin - T Cells in Wound Repair. Science 296: 747-749, 1992.

30

W L Havran, et al., *Epithelial Cells and Their Neighbors. III. Interactions Between Intraepithelial Lymphocytes and Neighboring Epithelial Cells*. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 2005 Octubre; 289 (4): G627-30.

J Parkin, et al., *An Overview of the Immune System*. Lancet. 2001; 357: 1777-1789.

A Moretta, et al., *Human NK Cells: From HLA Class I-Specific Killer Ig-like Receptors to the Therapy of Acute Leukemias*. Immunol. Rev. 2008 Agosto; 224: 58-69.

35

BM Doshi, et al., *Wound Healing From a Cellular Stress Response Perspective*. Cell Stress Chaperones. 2008 Diciembre; 13 (4): 393-9.

G J Moran, et al., *Antimicrobial Prophylaxis for Wounds and Procedures in the Emergency Department*. Infect. Dis. Clin. North Am. 2008.

40

MA Fonder, et al., *Treating the Chronic Wound: A Practical Approach to the Care of Nonhealing Wounds and Wound Care Dressings*. J. Am. Acad. Dermatol. 2008 Febrero; 58 (2): 185-206.

JA Thackham, et al., *The Use of Hyperbaric Oxygen Therapy to Treat Chronic Wounds: A Review*. Wound Repair Regen. 2008, 1998 Mayo - Junio; 16 (3): 321-30.

D R Berlowitz, et al., *Are all pressure ulcers the result of deep tissue injury? A Review of the Literature*. Ostomy Wound Manage. 2007 Octubre; 53 (10): 34-8.

K. Girouard, et al., *The symptom of pain with pressure ulcers: a review of the literature*. *Ostomy Wound Manage.* 2008 Mayo; 54 (5): 30-40, 32.

5 Todas las publicaciones citadas en la solicitud que incluyen ambas, publicaciones de patentes y publicaciones que no son patentes son indicativas del nivel de conocimiento de aquellos expertos en la técnica a los que esta invención se refiere.

10 Aunque la invención en esta solicitud se ha descrito en relación a realizaciones particulares, ha de entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Debe por lo tanto entenderse que pueden hacerse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que otros arreglos pueden visualizarse sin abandonar el alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una composición de leucocitos activados que comprende:
 - a. incubar leucocitos humanos a
 - (i) una temperatura de 12° C - 28° C durante un tiempo que varía de aproximadamente 90 minutos a más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 12 a 20 horas o
 - (ii) una temperatura de 12° C - 37° C durante un tiempo que varía de 5-24 horas de manera que los leucocitos hacen la transición de un estado quiescente a un estado funcionalmente activo;
 - b. someter a los leucocitos a un shock hipo osmótico; y
 - c. añadir a los leucocitos de la etapa b, una solución de una sal fisiológicamente aceptable en una cantidad eficaz para restaurar la isotonicidad.
2. El método de la reivindicación 1 que además comprende:
 - poner en contacto una muestra separada de plasma humano con un agente coagulante para obtener suero, en donde los leucocitos y el plasma pueden obtenerse del mismo donante o de donantes diferentes; y
 - mezclar los leucocitos de la etapa c con el suero de la etapa d.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde los leucocitos se obtienen de un donante que tiene el tipo sanguíneo O negativo y el plasma se obtiene de un donante que tiene el tipo sanguíneo AB positivo.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el shock hipoosmótico comprende poner en contacto los leucocitos con agua, y en donde la solución de sal fisiológicamente aceptable es una solución de cloruro sódico al 0,9%.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además incubar los leucocitos en el suero a 37° C.
6. Una composición de leucocitos activados preparada por el método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende:
 - a) 40% - 90% de granulocitos;
 - b) 5% - 20% de monocitos; y
 - c) 5% - 30% de linfocitos.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde los granulocitos comprenden:
 - a) 52% - 78% de neutrófilos;
 - b) 1% - 9% de eosinófilos; y
 - c) 1% - 2% de basófilos.
8. La composición de la reivindicación 6 o 7, en donde los linfocitos comprenden:
 - a) 7% - 25% de células B (CD 19+);
 - b) 20% - 30% de células NK (CD3- / CD56+);
 - c) 40% - 60% de células T (CD3+);
 - d) 0% - 30% de células NKT (CD3+ / CD56+);
 - e) 8% - 20% de células T auxiliares (CD4+ / CD3+); y
 - f) 20% - 30% de células CD8+ / CD3+.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso como un medicamento.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso como un agente de curación de heridas.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso para tratar heridas.

- 5
12. La composición para uso según la reivindicación 11, en donde la herida es una úlcera de decúbito, úlcera de presión, úlcera de las extremidades inferiores en un paciente diabético, una herida profunda del esternón, una herida post operatoria, una herida post operatoria refractaria del área del tronco, una herida a la gran vena safena después de la revascularización coronaria y recolección de la gran vena safena, una herida causada por un trauma, una fisura anal, o una úlcera venosa.
 13. Un apósito que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
 14. Una matriz o ensamblaje fisiológicamente inerte y/o reabsorbible que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

Figura 1 – Set 1

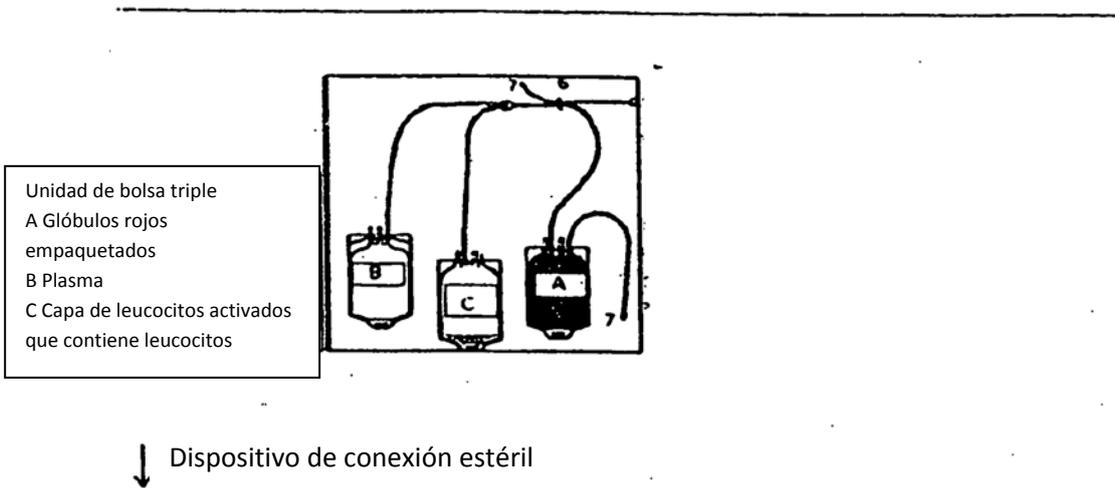
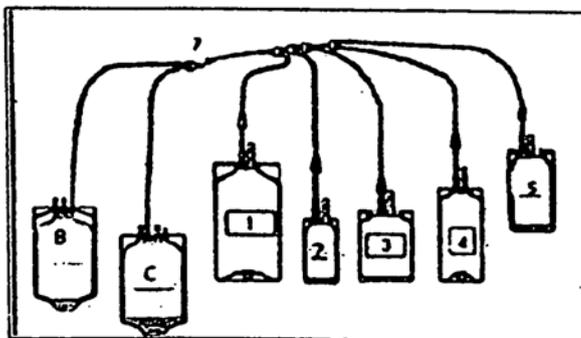


Figura 2 – Set 2



Bolsa 1: agua para dilución (shock hipo osmótico), 200 ml; Bolsa 2: solución tamponada de cloruro sódico, 20 ml; Bolsa 3: cloruro de calcio tamponado, 60 ml; Bolsa 4: aire, 60 ml; Bolsa 5: aire 30 ml

Figura 3A: Expresión de CD62L

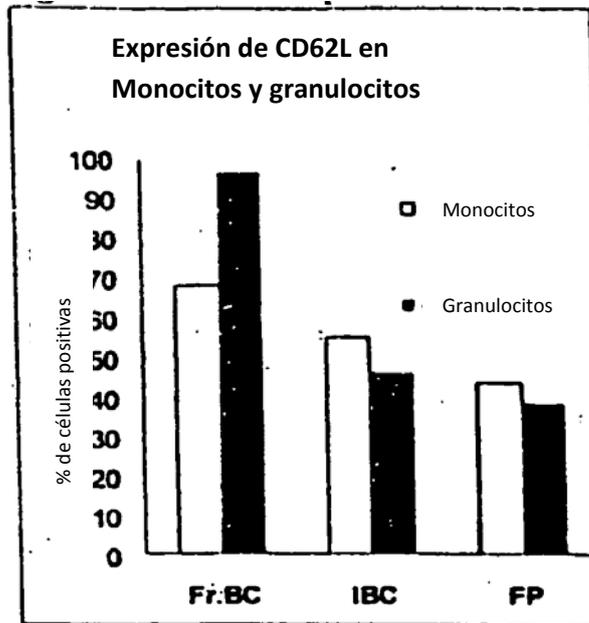


Figura 3B: Expresión de CD42b

