

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 236**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2009 PCT/US2009/068005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10075061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09810835 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2367580**

54 Título: **Procesamiento de sangre**

30 Prioridad:

23.12.2008 US 140196 P

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

23.03.2017

73 Titular/es:

**THERAKOS, INC. (100.0%)
1001 US Highway Route 202 North
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**MACPHERSON, JANET, LESLEY;
PERITT, DAVID;
HENRICHSEN, KEVIN;
SYMONDS, GEOFFREY, PHILLIP;
POND, SUSAN y
WONG, PHILIP**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 606 236 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

Procesamiento de sangre

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/140.196 presentada el 23 de Diciembre de 2008.

10 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, generalmente, a métodos y aparatos para procesar sangre y, más particularmente, a métodos y dispositivos para leucaféresis.

15 **Antecedentes**

Las células sanguíneas se producen continuamente a lo largo de la vida de un individuo y proceden de la célula sanguínea más primitiva, la denominada célula madre hematopoyética (HSC). Esta HSC es capaz de originar células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y células sanguíneas de los distintos tipos de células (por ejemplo, glóbulos rojos (RBC) y leucocitos o glóbulos blancos (WBC) y tiende a encontrarse en la médula ósea. Los tipos de células sanguíneas más maduros se encuentran en la sangre y en el tejido linfático. La hematopoyesis es la producción continua de células sanguíneas en el individuo a partir de HSC y HPC. Esto tiene como resultado que la sangre periférica tenga muchos tipos diferentes de células sanguíneas de los distintos linajes mieloide y linfoide y de distintos grados de madurez. Estas células sanguíneas son responsables de procesos fisiológicos tales como el transporte de oxígeno por los glóbulos rojos, la función inmunitaria por las células dendríticas, los linfocitos B y T, y la respuesta inflamatoria por los granulocitos y macrófagos.

La aféresis es un procedimiento médico en el cual la sangre de un individuo se pasa a través de un aparato, se recoge un constituyente predominante (por ejemplo, células mononucleares) y se devuelven los otros constituyentes a la circulación. La aféresis es, generalmente, un proceso de tres etapas que comprende: (1) retirar sangre del individuo, (2) separar los componentes de la sangre (por ejemplo, en base a la densidad) y (3) devolver ciertos componentes de la sangre al individuo. La sangre se separa, normalmente, en tres fracciones: RBC (aproximadamente 45 % de la sangre total), capa leucocitaria (menos que 1 % de la sangre total) y plasma (aproximadamente 55 % de la sangre total). Pueden usarse varios tipos de procedimientos de aféresis dependiendo del componente de sangre que se retira. Por ejemplo, "plasmaféresis" se refiere, generalmente, a la separación y recolección de plasma sanguíneo y "trombocitaféresis" se refiere a la separación y recolección de plaquetas, mientras que "leucaféresis" se refiere, habitualmente, a la separación y recolección de leucocitos (WBC).

Con el avance de las ciencias médicas, la aféresis puede llevarse a cabo de una manera conectada al paciente, de flujo continuo y sistema cerrado. Los dispositivos usados para este propósito incluyen, por ejemplo, los siguientes sistemas de aféresis: sistemas COBE® Spectra, Trima, Spectra Optia (todos comercializados por Gambro BCT), y Amicus y CS-3000+ (comercializados por Fenwal/Baxter).

Recientemente, la leucaféresis también se está usando para recolectar una cierta fracción de células mononucleares sanguíneas (MNC) para su uso en trasplantes de médula ósea y otras áreas de enfermedad. Por ejemplo, a los pacientes que han sido sujeto de ablación para tratar un tumor maligno se les puede infundir una población a granel de células mononucleares del donante que contienen HSC y HPC (aquellas presentes en la sangre periférica, también denominadas células progenitoras de sangre periférica o PBPC) para llevar a cabo la reconstitución subsiguiente de su sistema hematopoyético. En este caso, primero se recolecta la capa leucocitaria (que contiene la mayoría de los WBC (granulocitos, linfocitos, monocitos), PBPC y algunas plaquetas) mientras que el resto de los componentes de la sangre (que incluyen plasma, RBC, plaquetas y algunos WBC) se devuelve al individuo. Las PBPC, después, se enriquecen y se aíslan, mientras que la fracción restante de la capa leucocitaria (que constituye casi el 99 % de la capa leucocitaria) se desecha. Este proceso de enriquecimiento celular (es decir, aislamiento y purificación de células) en la actualidad se lleva a cabo de una manera desconectada del paciente, mediante el uso de dispositivos distintos de aquellos de las máquinas de aféresis. Los dispositivos usados para este propósito incluyen, por ejemplo, el Baxter Isolex 300j y el Miltenyi CliniMACS, los cuales enriquecen las PBPC en base a un ligando específico (CD34, ambos dispositivos y CD133 Miltenyi) sobre la superficie de las células. Otros dispositivos autónomos, tales como el procesador de células sanguíneas COBE 2991 de Gambro o el sistema de lavado de células CytoMate™ de Baxter, se usan frecuentemente para lavar, concentrar o disponer las células en el medio de crecimiento o infusión adecuado.

En otra solicitud, la leucaféresis puede usarse para tratar los WBC de un individuo en un proceso denominado fotoféresis (Edelson et al., Yale J Biol Med., 1989, nov-dic; 62(6): 565-77). En este proceso, el individuo recibe, primero, una dosis de sustancia fotoactivable (por ejemplo, 8 metoxi-psoraleno). Después, se lleva a cabo la aféresis, en la cual los WBC del individuo se irradian con luz Ultravioleta A (UVA), lo que tiene como resultado la activación de una sustancia y la inhibición de los procesos metabólicos de los WBC. Los dispositivos usados para

este propósito incluyen, por ejemplo, el sistema de fotoféresis UVAR y UVAR® XTS™ (comercializado por Therakos).

5 Además del proceso de enriquecimiento descrito anteriormente, las PBPC recolectadas además podrían modificarse en otros procesos antes de volver a infundirlas en el individuo. Esto se lleva a cabo, generalmente, por el uso de una variedad de técnicas en el cultivo celular. En última instancia, las células modificadas (por ejemplo, con actividad, fenotipo o genotipo alterado) podrían volver a introducirse en el paciente para obtener ciertos beneficios terapéuticos. Los ejemplos de procesos de modificación incluyen la producción de HSC/HPC que contienen un gen anti-VIH (R. G. Amado et al. *Human Gene Therapy* (2004), 251-262) y la producción de linfocitos T citotóxicos "educados" para dirigirse a tumores específicos y destruirlos.

15 La Figura 1 es un diagrama en bloque que ilustra los medios actuales por los cuales se saca sangre de un paciente, se procesa y se devuelve. Aquí, una disposición 100 de dispositivos que puede usarse secuencialmente para la recolección de células mediante el empleo de técnicas de leucaféresis y enriquecimiento celular, tal como el uso de lavado y purificación celular. El diagrama enumera, además, modificaciones celulares opcionales. Los dispositivos ilustrativos que pueden usarse en este método incluyen el dispositivo Cobe Spectra. Un dispositivo así, 110, para leucaféresis (recolección) se usa secuencialmente con un dispositivo para el lavado celular, tal como un dispositivo CytoMate de Baxter, 120, (enriquecimiento) el cual se usa, además, en conjunto con un dispositivo de purificación celular (enriquecimiento) tal como un dispositivo Isolex 300i de Baxter, 130. Adicionalmente, pueden emplearse en este esquema dispositivos de manipulación celular (modificación), 140, que incluyen, pero no se limitan a: electroporación, lipofección, transducción viral, luz (UVA, UVB, etc.), adición de fármacos, activación celular, presión, funciones de calentamiento, etc. La bolsa 150 de células sanguíneas procesadas producidas como resultado de los dispositivos 110, 120, 130 y 140 se proporciona al paciente 160 para el retorno de la sangre procesada.

25 La Figura 2 representa un ejemplo específico de un método 300 para la recolección, el enriquecimiento y la modificación celular. El ejemplo es de un método usado para la introducción de un gen anti-VIH en HSC/HPC CD34+ en el cual, durante un período de 5 días:

30 En la etapa 310, se recolectan células mononucleares, es decir, se cosechan por leucaféresis. En esta etapa 310, otros componentes de células sanguíneas, concretamente glóbulos rojos, plaquetas, plasma y células polimorfonucleares se devuelven al paciente.

En la etapa 320, la fracción de células mononucleares se lavan mediante el uso de, por ejemplo, un CytoMate (mencionado anteriormente) (día 2), se enriquecen células CD34+ diana mediante el uso de, por ejemplo, un dispositivo Isolex 300i (día 2) y las células que no son CD34+ se desechan.

35 En la etapa 330, las células CD34+ se cultivan en presencia de citocinas (día 2) y el gen anti-VIH (una ribozima contra una región conservada del gen tat/vpr) se introduce mediante el uso de un retrovirus murino (día 4).

Después de la etapa 330, se lleva a cabo la prueba de liberación del producto (día 5) y las células se infunden al mismo individuo que originalmente se había sometido a leucaféresis.

40 Sin embargo, la aféresis tiene inconvenientes y limitaciones inherentes. Por ejemplo, la aféresis solo es un procedimiento de recolección de constituyentes líquidos. A pesar de los avances tecnológicos, las etapas compuestas de recolección, enriquecimiento y modificación (opcional) de células sanguíneas diana se realizan mediante el uso de dispositivos continuos y discontinuos individuales, como se mencionó anteriormente. De estas etapas, solo la recolección y, en un caso, la recolección y la modificación (fotoféresis) actualmente se llevan a cabo conectadas al paciente. Estos procesos discontinuos actuales demandan mucho tiempo y los materiales, el trabajo y los costes son ineficaces (J. Gryn et al., *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11 (2002), 719-730; K.R. Meehan et al., *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 9 (2000), 767-771). Estos procesos introducen, además, problemas graves tales como (i) la seguridad debido a la potencial contaminación microbiana y (ii) la cadena de custodia (es decir, asegurar que se devuelven al paciente las células correctas y mantener la integridad de las células) debido a la logística de selección y modificación celular. Por ejemplo, la hemólisis es una complicación rara debido al enredo de las líneas de los kits de recolección de aféresis (R. Reddy, *Transfusion and Apheresis Science* 32 (2005) 63-72).

55 Para ilustrar aún más, la trombocitopenia (reducción de plaquetas) es un resultado indeseado conocido de la leucaféresis y el efecto secundario más frecuentemente notificado de leucaféresis en niños (J. Sevilla et al., *Transfusion and Apheresis Science* 31 (2004) 221-231; E. Yamaguchi et al., *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 9 (2000) 565-572). La trombocitopenia es importante porque los pacientes son frecuentemente trombocitopénicos debido a sus enfermedades subyacentes y hay una pérdida adicional de plaquetas durante la leucaféresis. Idealmente, en individuos con una deficiencia en el número de plaquetas debido a ciertos estados patológicos, las plaquetas a las que se les realizó aféresis dentro de la capa leucocitaria deberían separarse y devolverse al individuo. Sin embargo, en la realidad, las plaquetas a las que se les realizó aféresis simplemente se desechan como residuo. Aparte de esto, la reducción de plaquetas en la capa leucocitaria tiene, además, el beneficio adicional de aumentar la eficacia de selección de inmunofinidad de células progenitoras CD34+ (un tipo de PBPC) en un promedio de 1,8 veces (R. Moog, *Transfusion and Apheresis Science* 31 (2004) 207-220).

Otro inconveniente del proceso de leucaféresis es la pérdida de linfocitos valiosos para algunos pacientes. Como se ha comentado anteriormente, las HSC y HPC (en particular las células progenitoras CD34+) se seleccionan, frecuentemente, para usarse en la reconstitución del sistema hematopoyético de un individuo. Para individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la selección de células progenitoras CD34+ mediante el uso de leucaféresis elimina del cuerpo linfocitos valiosos (tales como células CD3+ y CD4+), los cuales, frecuentemente, ya se encuentran en número bajo. Las células progenitoras CD34+ (aproximadamente 1,3% después de la movilización) se encuentran entre las fracciones de células más pequeñas recolectadas durante la leucaféresis de PBPC, mientras que los linfocitos y monocitos representan hasta el 70 % de los productos de aféresis (V. Witt et al., Journal of Clinical Apheresis 16(2001) 161-168).

Existe la necesidad de un dispositivo que pueda superar o al menos mejorar una o más desventajas de los sistemas existentes, que incluyen aquellos mencionados anteriormente.

Sumario

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un aparato para procesar sangre tal como se define en la reivindicación 1.

En relación con la invención, se proporciona un método de procesamiento de sangre. El método comprende las etapas de: obtener sangre de un paciente acoplado a un solo dispositivo de procesamiento de sangre para formar un circuito cerrado entre el paciente y el dispositivo de procesamiento de sangre; recolectar células sanguíneas mononucleares a granel de la sangre por leucaféresis implementada mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado; y enriquecer concurrentemente las células diana separadas de las células que no son diana en las células sanguíneas mononucleares a granel mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado.

En relación con la invención, se proporciona un sistema de procesamiento de sangre. El sistema comprende: un mecanismo para obtener sangre de un paciente y comprende un solo dispositivo de procesamiento de sangre acoplado a los medios de obtención y al paciente para formar un circuito cerrado entre el paciente y el dispositivo de procesamiento de sangre. El dispositivo de procesamiento de sangre comprende: un módulo para recolectar células sanguíneas mononucleares a granel a partir de la sangre por leucaféresis implementada mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado; y un módulo para enriquecer concurrentemente células diana separadas de células que no son diana en las células sanguíneas mononucleares a granel mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado.

Estos y otros aspectos de la invención se exponen con mayor detalle de aquí en adelante.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se describen de aquí en adelante con referencia a las figuras, en las cuales:

La Figura 1 es un diagrama en bloque de dispositivos para la recolección de células por leucaféresis y enriquecimiento mediante el uso de purificación y lavado de células;

La Figura 2 es un diagrama esquemático que describe un ejemplo específico de un método actual para la recolección, el enriquecimiento y la modificación celular;







La Figura 3 es un diagrama de flujo de un método de procesamiento de células sanguíneas de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 4 es un diagrama esquemático que describe la recolección de células, el enriquecimiento de células diana y el retorno de células que no son diana concurrentes;

La Figura 5 es un diagrama esquemático que describe la recolección de células, el enriquecimiento de células diana y el retorno de células diana concurrentes;







La Figura 6 es un diagrama esquemático que describe un método de recolección de células de un paciente, el enriquecimiento de células diana, la modificación de células diana y el retorno de las células diana modificadas al paciente concurrentes;

La Figura 7 es un diagrama esquemático de un dispositivo que lleva a cabo la recolección y el enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención. Los símbolos representan los siguientes componentes:

bolsa de solución salina, ; bomba peristáltica ; prensa, ; detector de aire, ; calibre de presión, ; ;

prensa, ;

La Figura 8 es un diagrama esquemático de un dispositivo que lleva a cabo la recolección, el enriquecimiento y la modificación de acuerdo con otra realización de la presente invención. Los símbolos representan los siguientes








5 componentes: bolsa de solución salina, ; bomba peristáltica, ; prensa, ; detector de aire, ; calibre de presión, ; prensa, ;

La Figura 9 es una vista en perspectiva de elementos del dispositivo de procesamiento de sangre que comprende las unidades o módulos de recolección, enriquecimiento y modificación (opcional);

10 La Figura 10 es una vista en perspectiva de elementos del dispositivo de procesamiento de sangre, según el dispositivo de la Figura 9, donde se resalta el módulo/proceso de enriquecimiento celular;

15 La Figura 11 es una vista en perspectiva de elementos del dispositivo de procesamiento de sangre, según el dispositivo de la Figura 9 o 10, donde se resalta la etapa opcional de modificación de células dentro del dispositivo; y

La Figura 12 es un diagrama esquemático de un dispositivo que lleva a cabo la recolección y el enriquecimiento de acuerdo con otra realización de la presente invención. Los símbolos representan los siguientes componentes:

20 bolsa de solución salina, ; bomba peristáltica, ; prensa, ; detector de aire, ; calibre de presión, ; prensa, ; imán, ;

Descripción detallada

25 A continuación se describen métodos, aparatos y sistemas para el procesamiento de células sanguíneas. En particular, se describen métodos, aparatos y sistemas para leucaféresis que permiten la recolección y el enriquecimiento concurrentes de células diana específicas a partir de la sangre periférica de un individuo, y el resto de los componentes de la sangre se devuelven al individuo. Adicionalmente, las células diana recolectadas podrían modificarse y devolverse al individuo durante el proceso de aféresis o podrían devolverse al individuo más tarde. Las realizaciones de la invención se relacionan con un dispositivo de circuito cerrado que permite la recolección y el enriquecimiento concurrentes de células diana específicas a partir de sangre periférica de un individuo, y el retorno de las células que no son diana al individuo. Las células diana podrían modificarse para alterar su fenotipo, genotipo o actividad, y en una extensión del circuito cerrado devolverse al individuo. Las realizaciones de la invención llevan a cabo eficazmente el proceso de aféresis de una manera conectada al paciente, de flujo continuo y circuito cerrado, por la cual solo se enriquecen componentes diana de la sangre (por ejemplo, células progenitoras CD34+) mientras que todos los demás componentes restantes se devuelven al paciente. Adicionalmente, ciertas otras funciones podrían llevarse a cabo sobre las células diana (por ejemplo, la modificación del fenotipo) con la opción de devolver las células modificadas al paciente. La provisión de un dispositivo así puede reducir significativamente los costos de funcionamiento (sin necesidad de múltiples aparatos y artículos de consumo) y asegurar la consistencia del producto. Permitir que el procedimiento de aféresis suceda en un solo lugar en un solo dispositivo además reduce el riesgo de daño o pérdida del producto. Sin embargo, a partir de esta descripción, resultará evidente para aquellos con experiencia en la técnica que podrían realizarse modificaciones y/o sustituciones sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención.

45 Definiciones

Término	Definición
Célula mononuclear a granel	La población de células mononucleares a granel recolectada por leucaféresis. También denominada población de células mononucleares a granel.
Captura	El aislamiento de un tipo o tipos específicos de células a partir de una mezcla de células, mediante una interacción específica (por ejemplo, física o química) (por ejemplo, interacciones anticuerpo-antígeno u otras interacciones como se describen en la presente memoria). Esto podría realizarse mediante un sistema de captura de células.
Procesamiento de células	Todas las etapas (algunas de las cuales podrían ser opcionales) que implican la recolección, el enriquecimiento, la modificación y el almacenamiento de células. Las células podrían usarse fuera del cuerpo para investigar, controlar o desechar o podrían infundirse posteriormente a un individuo(s).

ES 2 606 236 T3

Término	Definición
Circuito cerrado	Al menos una sucesión de células se mantiene en un sistema que es un continuo, de manera que las células se obtienen del paciente y pueden devolverse al paciente sin moverse fuera de línea.
Designación de grupo (CD)	Sistema de clasificación para anticuerpos monoclonales generados por laboratorios en todo el mundo contra moléculas superficiales de células, inicialmente, en leucocitos, ahora también antígenos de otros tipos de células.
Concurrente	Parte del mismo proceso en tiempo real, que sucede en tiempo real; puede ser secuencial o simultáneo.
Continuo	Parte de un circuito cerrado.
Flujo continuo	El flujo de sangre desde el paciente al dispositivo y de vuelta al paciente, en el cual las células que no son diana, generalmente se devuelven al paciente, mientras que las células diana podrían recolectarse, podrían fluir por un sistema de enriquecimiento en el dispositivo, podrían modificarse a través de un sistema de modificación en el dispositivo y, después, volver al paciente; todo de una forma conectada al paciente, de circuito cerrado y en tiempo real.
Sistema de flujo continuo	El paso fluido y los controles técnicos que permiten el flujo continuo.
Centrifugación diferencial	La centrifugación para separar una población de células a granel en función del tamaño y la densidad.
Discontinuo	Que no es parte de un circuito cerrado.
Enriquecer	La concentración del tipo de célula diana por un medio físico o químico; esto podría abarcar lavado, aislamiento o purificación.
Integral	Una parte importante de/un requisito.
Aislar	El proceso de extraer (por ejemplo, por captura) un tipo de célula específico o más a partir de una mezcla de células.
Leucaféresis	Un proceso de flujo continuo donde se obtiene la sangre de un donante, se recolecta una población de células mononucleares y se reinfunden los componentes restantes de la sangre (plasma, plaquetas, glóbulos rojos y células polimorfonucleares) al donante.
Ligando	Cualquier molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a otra (por ejemplo, un receptor).
Control	La determinación de parámetros del proceso (por ejemplo, en tiempo real o retrospectivo), por ejemplo, medición del número de un tipo de célula específico (por ejemplo, CD34) que se está capturando.
Células que no son diana	Estas son las células que quedan después del enriquecimiento de células diana de la recolección de células mononucleares a granel, las cuales se recolectaron por leucaféresis.
Modificación	La alteración del fenotipo, el genotipo o la actividad celular, también denominada, en algunos casos, manipulación.
Conectado al paciente	Esto se refiere a cuando el dispositivo se encuentra conectado al paciente. El paciente podría estar conectado al dispositivo durante todo el periodo de recolección y enriquecimiento de células sanguíneas y, potencialmente, modificación celular. El flujo de sangre desde un paciente al dispositivo y de regreso al paciente, en el cual las células que no son diana se devuelven generalmente al paciente, mientras que las células diana podrían recolectarse, podrían fluir por un sistema de enriquecimiento en el dispositivo, podrían modificarse a través de un sistema de modificación en el dispositivo y, después volver al paciente; todo en una forma de circuito cerrado.
Desconectado del paciente	Las etapas de procesamiento celular que suceden cuando el paciente está desconectado del dispositivo.
Pureza	El porcentaje de un tipo específico de célula en la población celular.

Término	Definición
En tiempo real	Tal como sucede.
Control en tiempo real	La determinación de parámetros del proceso tal como está sucediendo, por ejemplo, medición del número de un tipo de célula específico (por ejemplo, CD34) que se está capturando.
Liberación	El proceso de separación (por ejemplo, físico o químico) de la célula desde el sistema de captura.
Mismo dispositivo	Un dispositivo en el cual se pueden llevar a cabo múltiples funciones.
Célula diana	El tipo o los tipos de células enriquecidas de la población de células mononucleares a granel recolectadas por leucaféresis. El tipo (o los tipos) de célula diana se enriquece para luego desecharse o usarse, lo cual podría incluir la modificación y reinfusión en el individuo. Se entiende que el tipo de célula sanguínea diana que se enriquece puede abarcar un tipo de célula o más. También denominada, en la presente invención, tipo de célula diana o población de célula diana.

Los dispositivos multifuncionales y sus métodos de uso, es decir, de circuito cerrado, pueden estar conectados al paciente y comprenden los siguientes aspectos:

- 5 a) recolección: realizar la recolección por leucaféresis de una población de células sanguíneas mononucleares a granel que contiene la población de células diana de interés; y, concurrentemente,
 b) enriquecimiento: enriquecer una población celular diana desde la población de células sanguíneas mononucleares a granel.

- 10 La población celular enriquecida se devuelve al paciente o se retira para el uso subsiguiente fuera de línea, que incluye modificaciones que podrían implicar la posterior infusión de las células modificadas al paciente. El uso fuera de línea de la población celular diana podría incluir el uso para investigación o control. La población celular que no es diana podría devolverse, concurrentemente, al paciente, podría separarse fuera de línea para usarse u, opcionalmente, desecharse. El método, adicionalmente, puede modificar, en una extensión del proceso de circuito
 15 cerrado, la población de células sanguíneas diana antes de devolver la población de células sanguíneas diana modificadas al paciente.

La Figura 3 describe a grandes rasgos un método 300 para procesar sangre que comprende las etapas 310-316 y 330 (indicadas por cuadros con líneas continuas). Si bien no se describen en la Figura 3, las etapas 312-316 podrían llevarse a cabo reiteradamente. El método 300 podría comprender, opcionalmente, una o más de las etapas 320-326 (indicadas por cuadros con líneas discontinuas en la Figura 3). Del mismo modo, una o más de estas etapas 320-326 podrían llevarse a cabo reiteradamente (no mostrado en la Figura 3). Si bien las etapas del método 300 se describen como llevadas a cabo secuencialmente y en un orden particular, el método 300 no está limitado a la secuencia particular, el procesamiento secuencial o todas las etapas, algunas de las cuales son opcionales, que se están llevando a cabo. Aquellos con experiencia en la técnica entenderán que a la luz de esta divulgación, el ordenamiento de las etapas podría cambiarse. Además, podrían llevarse a cabo una o más etapas en paralelo. Por ejemplo, las etapas 312 a 316 podrían llevarse a cabo en paralelo. Además, la etapa 326 podría llevarse a cabo en paralelo con las etapas 314 y 316. De aquí en adelante se describe el método 300 para procesar sangre con mayor detalle.

30 El procesamiento comienza en la etapa 310. En la etapa 312 se obtiene sangre de un paciente acoplado a un solo dispositivo de procesamiento de sangre para formar un circuito cerrado entre el paciente y el dispositivo de procesamiento de sangre.

35 En la etapa 314 las células sanguíneas mononucleares a granel se recolectan de la sangre por leucaféresis implementada mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado. La etapa de recolección 314 podría comprender el uso de centrifugación diferencial para recolectar las células sanguíneas mononucleares. La centrifugación diferencial podría conducirse mediante un sistema de flujo continuo.

40 En la etapa 316 las células diana separadas de células que no son diana en las células sanguíneas mononucleares a granel se enriquecen, concurrentemente, mediante el uso del dispositivo de procesamiento de sangre en el circuito cerrado. Las células diana podrían ser linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, monocitos, neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores T, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos (CTL), células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales,
 45 células mesenquimales, linfocitos, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK) o linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). Los linfocitos T podrían enriquecerse. Los linfocitos T podrían ser CD8+ o CD4+. Las células progenitoras hematopoyéticas y las células madre hematopoyéticas podrían enriquecerse. Las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas podrían ser positivas para uno o más de CD34, CD133 y CD143. Opcionalmente, las células diana podrían ser al menos una de células malignas de la sangre, células malignas del

tejido, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias, al menos un virus, al menos una bacteria, un parásito, células fetales y células efectoras patogénicas.

5 La etapa de enriquecimiento 316 podría comprender la captura de ligandos para enriquecer las células diana. El ligando podría ser un anticuerpo específico para un ligando de superficie celular. El ligando de superficie celular podría ser una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), una selectina, un receptor de molécula de adhesión, un receptor de localización, un receptor de citocina, un receptor de quimiocina o una enzima. El ligando de superficie celular podría ser un antígeno de designación de grupo (CD). El antígeno CD podría ser CD1a, CD4, CD8, CD14, CD25, CD34, CD133 o CD143. El enriquecimiento de células diana en la etapa 316 podría llevarse a cabo por al menos uno de los métodos siguientes: magnético, clasificación de células activada por fluorescencia, microfluídica, soporte sólido, acústico, bioluminiscencia, etiquetado de anticuerpos y sustrato enzimático. El soporte sólido podría comprender una partícula. La partícula podría ser al menos una de una partícula magnética y una partícula de densidad modificada.

15 Las etapas de recolección y enriquecimiento 314, 316 podrían llevarse a cabo en distintas secciones del dispositivo de procesamiento de sangre.

20 En la etapa 320, las células diana enriquecidas podrían modificarse. La etapa de modificación 320 podría incluir una modificación que comprende una o más de activación, expansión, inducción de apoptosis, modificación genética e inducción de especificidad de antígenos. La etapa de modificación 320 podría implicar una modificación que se lleva a cabo por al menos uno de reticulación de receptores de superficie celular, irradiación, y tratamiento con al menos uno de citocinas, quimiocinas, estimulación de antígenos, hormonas, fármacos, presión, y calentamiento. La irradiación podría ser al menos una de radiación gamma, beta, alfa y lumínica. La radiación lumínica podría ser al menos una de ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) y luz visible. Opcionalmente, la etapa de modificación 320 podría implicar una modificación genética que se lleva a cabo por una de transfección y transducción de material genético en al menos una porción de las células diana. La transfección de material genético podría ser una de electroporación y lipofección. La transducción de material genético podría ser por transducción de vectores virales. En otra alternativa, la etapa de modificación 320 podría implicar una modificación que comprenda al menos una de activación de linfocitos T citotóxicos (CTL), activación de células reguladoras T (Treg) y células sanguíneas modificadas genéticamente protegidas del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

35 En la etapa 322, las células que no son diana podrían modificarse. Además, en la etapa 324, las células que no son diana podrían devolverse al paciente. Las células que no son diana podrían devolverse al paciente conectado al circuito cerrado o desconectado del circuito cerrado. Además, las células que no son diana podrían desecharse.

En la etapa 326, las etapas de recolección y enriquecimiento podrían controlarse, concurrentemente, para determinar el número de células. Esto permitiría que se complete la recolección tan pronto como se recolecten y enriquezcan suficientes células, lo cual permite que la recolección se personalice al paciente.

40 El método podría comprender mantener una conexión continua del paciente en el circuito cerrado durante el procesamiento de células diana o desconectar al paciente del circuito cerrado por un intervalo de tiempo durante el procesamiento de las células diana. El procesamiento finaliza (Final) en la etapa 330. A continuación se describen estos y otros aspectos con más detalle.

45 Recolección de células y enriquecimiento concurrente de células diana para usarse fuera de línea, que incluye la modificación y su eliminación

50 La Figura 4 describe, a grandes rasgos, un método 400 de recolección de células 410 del paciente 450, enriquecimiento de células diana 420 y retorno de células que no son diana 452 concurrentes (todo descrito dentro del círculo 402). Las células diana enriquecidas 430 podrían usarse fuera de línea para investigación/prueba 462, 470 o podrían desecharse 482. Opcionalmente, las células diana enriquecidas 430, 462 se modifican para infundirlas 464, más tarde, en el paciente 450. Este aspecto abarca la recolección de células 410, el enriquecimiento de células diana 420 y el retorno 452 concurrentes de células que no son diana al paciente 450 en un circuito cerrado. La etapa de recolección por leucaféresis 410 brinda una población de células mononucleares. Se lleva a cabo una etapa de enriquecimiento en línea 420 de células diana. Las células que no son diana se devuelven 452 al paciente 450. Las células diana enriquecidas 430 podrían usarse fuera de línea y, opcionalmente, podrían modificarse para la investigación, prueba, etc. 470 o para la posterior infusión 464 de células diana en el paciente 450. Las células diana 462 podrían usarse con o sin modificación. Las células además podrían desecharse 482. En la situación donde las células diana se modifican y devuelven 464 al paciente, las células que no son diana 452 no se devuelven necesariamente al paciente 450. El proceso 400 de recolección de células 410, enriquecimiento de células diana 420 y modificación de células fuera de línea concurrentes podría repetirse tantas veces como sea necesario, por ejemplo, para alcanzar un cierto número de células diana. El enriquecimiento de células diana 420 podría ser para uno o varios tipos de células. La modificación de células diana podría ser para uno o varios tipos de células. El circuito cerrado se conecta al paciente 450 en los momentos de recolección de células 410 y retorno de células 452.

65

Recolección de células y enriquecimiento de células diana concurrente para devolver con células que no son diana usadas fuera de línea o desechadas

5 La Figura 5 describe, a grandes rasgos, un método 500 de recolección de células 510 de un paciente 550, enriquecimiento de células diana 520 y retorno concurrentes de células diana 552 al paciente 550. Las células que no son diana enriquecidas 530, se usan después, fuera de línea con o sin modificación para investigación/prueba 562, 570, o se desechan 582. Nuevamente, la etapa de recolección por leucaféresis 510 brinda una población de células mononucleares. Se lleva a cabo la etapa de enriquecimiento en línea 520 de células diana. Las células diana 552 se devuelven al paciente 550. Este aspecto abarca recolección de células 510, enriquecimiento 520 de células 10 diana y retorno 552 de células diana al paciente 550 concurrentes. Las células que no son diana 562 podrían usarse fuera de línea para investigación, prueba, etc. 570 (tanto con o sin una etapa de modificación) o se desechan 582. El circuito cerrado se conecta al paciente 550 en los momentos de recolección de células 510 y retorno de células 552.

Recolección de células, enriquecimiento y modificación de células diana concurrente

15 La Figura 6 describe a grandes rasgos un método 600 de recolección de células 610 de un paciente 650, enriquecimiento 620 de células diana, modificación 660 de células diana 630 y retorno concurrentes de células diana modificadas 670 al paciente 650. Las células que no son diana 652 podrían, además, devolverse al paciente 650. Este aspecto abarca recolección de células 610, enriquecimiento 620 de células diana, modificación 660 de células 20 diana y retorno concurrentes de células diana 670 modificadas al paciente 650, en un procedimiento de circuito cerrado. Las células que no son diana 652 podrían devolverse, opcionalmente, al paciente. El circuito cerrado se conecta al paciente 650 en los momentos de recolección de células 610 y retorno de células 652, 670.

Recolección de células

25 Una realización de la invención comprende recolección de células y enriquecimiento de células concurrente. La recolección es la recolección por leucaféresis de las células sanguíneas mononucleares a granel, las células a partir de las cuales las células sanguíneas diana se enriquecen. Esta etapa podría emplear cualquier método conocido en la técnica para obtener células mononucleares a partir de un paciente que incluye, sin limitación, el uso de 30 centrifugación diferencial. Los dispositivos para este fin incluyen los sistemas COBE® Spectra, Trima Spectra Optia (todos comercializados por Gambro BCT) y el Amicus o CS-300 (comercializados por Fenwal/Baxter) Gambro Cobe Spectra u Optia, Fenwal Amicus o CS-3000. Preferentemente, la centrifugación diferencial se realiza mediante un sistema de flujo continuo. En una realización preferida, esta recolección de células sanguíneas a granel usa la tecnología Therakos CellEx debido a su eficacia de recolección superior y su volumen extracorpóreo bajo en 35 comparación con otros dispositivos, los cuales incluyen los dispositivos enumerados anteriormente. Durante la leucaféresis, la población de células que no son mononucleares se vuelve a infundir en el individuo.

40 La Figura 9 ilustra el dispositivo de procesamiento de sangre de acuerdo con una realización de la invención. El paciente 940 se acopla al dispositivo 900 en un circuito cerrado con un catéter de entrada 950 acoplado al paciente 950 para proporcionar sangre como entrada al dispositivo 900 y un catéter de salida 952 como un trayecto de retorno desde el dispositivo 900 al paciente. El dispositivo 900 tiene una interfaz de entrada para recibir sangre directamente desde la circulación del paciente. El dispositivo 900 tiene, además, una interfaz de salida para devolver células diana y/o células que no son diana enriquecidas a la circulación del paciente. El dispositivo 900 y el paciente 45 forman un circuito cerrado cuando se acoplan juntos. El dispositivo 900 incluye una unidad de recolección por leucaféresis 910 y una unidad de enriquecimiento 920. La unidad o el módulo de recolección (leucaféresis) 910 recolecta células mononucleares a granel de la sangre recibida. La unidad o el módulo de enriquecimiento 920 enriquece concurrentemente células diana separadas de células que no son diana en las células sanguíneas mononucleares a granel. El dispositivo 900 tiene una interfaz de operador 960 para recibir entradas y proporcionar salidas a un operador (no mostrado). El dispositivo 900 comprende, además, una plataforma de bomba/válvula 964. 50 El dispositivo 900 podría comprender, además, una unidad de modificación opcional 930. El dispositivo 900 comprende una centrifuga 962 para procesar células sanguíneas como se explica a continuación. Se acopla un controlador (no mostrado) a la interfaz de operador 960 y los otros módulos para el control automático de la operación del dispositivo 900.

55 En el sistema Therakos CellEx, un bol de centrifugación, tal como, por ejemplo, un bol de Latham, como se muestra en la patente de los Estados Unidos N.º 4.303.193 otorgada a Latham, Jr el 1 de diciembre de 1981 y titulada "Apparatus for separating blood into components thereof", la cual se incorpora a la presente invención, en su totalidad, como referencia, separa sangre en glóbulos rojos y capa leucocitaria. El bol de Latham es un separador de componentes sanguíneos que se ha usado durante algún tiempo en el mercado médico de la leucaféresis así como 60 en tratamientos médicos tales como fotoféresis extracorpórea (ECP). La patente de los Estados Unidos N.º 5984887 "Photopheresis treatment of leukocyte" proporciona descripciones de fotoféresis extracorpórea y su método de separación y centrifugación celular.

65 La Figura 7 es un diagrama esquemático más detallado del dispositivo de procesamiento sanguíneo descrito en la Figura 9 (así como el sistema de la Figura 10 descrito a continuación). El dispositivo de procesamiento de sangre 700 se muestra acoplado al paciente 736 en la Figura 7. Un nodo de recolección 702 y un nodo de retorno 756 se

encuentran conectados al paciente de la manera mostrada en la Figura 9. El nodo de recolección 702 es parte de una interfaz de entrada que incluye un catéter 704, el cual, a su vez, se conecta a un sensor de presión (“recolección”) 720. En secuencia, el sensor de presión de recolección 720 se acopla a un detector de aire 722, el cual se acopla a una válvula de recolección 724. La válvula de recolección 724 se acopla a una bomba peristáltica de “recolección” 726, la cual, a su vez, se acopla al sensor de presión del bol 728. El sensor de presión 720 afecta a la operación de la bomba de recolección 726. El sensor de presión del bol 728 se acopla al bol de centrifugación 730. Una salida del bol de centrifugación 730 se acopla a una bomba de glóbulos rojos (RBC) 732 y al catéter 734, el cual, a su vez, se acopla a un trayecto de retorno descrito con más detalle de aquí en adelante.

Una bolsa de anticoagulante (AC) 710 se acopla a una bomba peristáltica de anticoagulante 712 y un catéter adecuado. La bomba 712, a su vez, se acopla a una válvula 714, la cual, a su vez, se acopla a un detector de aire 716. El detector de aire 716 se acopla mediante un catéter adecuado al catéter de entrada 704 y el sensor de presión de recolección 720. Esta disposición permite aplicar el anticoagulante a la entrada de sangre al dispositivo 700 desde el paciente 736.

Otro catéter 770 proporciona una salida desde el bol de la centrifuga 730 y se acopla a una válvula 772. También se encuentra acoplado al catéter 770 un catéter 782 acoplado a una válvula 784. A su vez, la válvula 784 se acopla a una bolsa de retorno 740. La bolsa de retorno 740 se acopla a un detector de aire 742 que, a su vez, se acopla a una válvula 744. La válvula 744, a su vez, se acopla a una válvula 798, a una válvula de solución salina 760 que, a su vez, se acopla a una bolsa de solución salina 762, un catéter 734 y una bomba de retorno 746. La bolsa de retorno 740, el detector de aire 742 y la válvula 744 forman un trayecto de retorno con la bomba de retorno 746. La bomba 746 se acopla a la válvula de retorno 748, que se acopla a un detector de aire 750. El detector de aire 750 se acopla al sensor de presión de retorno 752, el cual se acopla al catéter 754 y al nodo de retorno 756.

La válvula 772 se acopla a un sensor 788 capaz de detectar glóbulos rojos. Un catéter 774 también se acopla a la válvula 772 y, a su vez, se conecta a una bomba leucocitaria 776. La bomba leucocitaria 776 se acopla a una placa 778. La salida de la placa 778 se acopla a un catéter 797, el cual, a su vez, se acopla a la válvula 798. La válvula 798 se acopla a una bomba de retorno 746. El sensor de HCT 788 se acopla a las válvulas configuradas en paralelo 790 y 791. La válvula 790 se acopla a una bolsa de recolección 786. La válvula 791 se acopla a una bolsa de tratamiento 737, en donde se adicionan agentes para el enriquecimiento. La bolsa de tratamiento 737 se acopla a la válvula 793, la cual, a su vez, se acopla al detector de aire 794. El detector de aire 794 se acopla a la válvula 798.

Una bolsa de tampón de selección 795 se acopla a una válvula 796, la cual, a su vez, se acopla al detector de aire 794.

Enriquecimiento de células

La Figura 10 muestra el dispositivo 900 de la Figura 9 reenumerado como dispositivo 1000. El paciente 1040 se acopla con el dispositivo 1000 en un circuito cerrado con el catéter de entrada 1050 y el catéter de salida 1052. En esta realización, la población de células mononucleares 1010 se somete a enriquecimiento 1020, por ejemplo, por captura de partículas recubiertas de anticuerpo, tal como captura de partículas magnéticas. El enriquecimiento 1020 da como resultado células diana enriquecidas 1060, las cuales pueden devolverse al paciente. Además, las células que no son diana que quedan del enriquecimiento 1020 podrían devolverse al paciente 1040 a través del dispositivo 1000. Las células se enriquecen para fines específicos, los cuales incluyen, pero no se limitan a:

1. Eliminación del torrente sanguíneo (por ejemplo, células de mieloma, linfoma leucémico); estos tipos de células se elegirían como células a eliminarse de la sangre y desecharse.
2. Modificación para devolver al paciente y obtener un beneficio; algunos ejemplos incluyen:
 - a. provocar una respuesta inmunitaria mediante el enriquecimiento y la modificación de células leucémicas o células de cáncer metastásico;
 - b. modificación para generar linfocitos T citotóxicos destinados a un cáncer específico; y
 - c. modificación de HSC/HPC para que contengan un gen que impacte sobre un proceso de enfermedad; por ejemplo, un gen anti VIH para impactar sobre el VIH/SIDA.
3. Uso para investigación, prueba, etc., el cual podría incluir una etapa de modificación opcional.

Las células diana son células que se enriquecen a partir de la sangre periférica después de la recolección de células mononucleares a granel. Los tipos de células que pueden enriquecerse a partir del producto a granel de la leucaféresis incluyen, pero no se limitan a, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos T CD4 y CD8, células dendríticas, monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos (CTL), células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), células madre mesenquimales y células epiteliales, véase la Tabla 1 (Fundamental Immunology por William E. Paul 2003 Lippincott Williams & Wilkins ISBN 0781735149; Essential Haematology, Hoffbrand, Pettit y Moss).

TABLA 1

Tipos de células que pueden aislarse de la sangre periférica (con marcadores superficiales conocidos)

- Células madre hematopoyéticas (CD34⁺, CD135⁺)
- Células progenitoras endoteliales (CD34⁺, Flk-1⁺, VEGFR-3⁺, CD133⁺)
- Células estromales de la médula ósea
- Células progenitoras del músculo esquelético
- Células progenitoras del músculo cardiaco
- Células progenitoras hepáticas (C1qRp⁺ o CD34⁺, CD38⁻, CD45⁺)
- Células madre mesenquimales (CD29⁺, CD44⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺)
- Eritrocitos (CD44, Glicoforina A)
- Células dendríticas (CD11c⁺, CD123⁺)
- Linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺)
- Linfocitos NK (CD16⁺, CD57⁺, CD94⁺, CD96⁺, CD122⁺)
- Linfocitos B (CD19⁺, CD22⁺, CD40⁺, CD72⁺, CD79⁺)
- Neutrófilos (CD15⁺, CD128⁺)
- Eosinófilos (CD116⁺, CD125⁺)
- Basófilos (CD125⁺)
- Monocitos - Macrófagos (CD14⁺, CD64⁺, CD68⁺, CD98⁺, CD115⁺, CD163⁺, FcγR1⁺)
- Megacariocitos/Plaquetas (CD41⁺, CD42⁺, CD61⁺, CD109⁺)
- Mastocitos (FcεR1α⁺)
- Progenitores osteoblásticos*
- Osteoclastos

* Aislados de la sangre periférica, pero sin ningún marcador superficial de células identificado hasta la fecha

5 Otros tipos de células destinados a desecharse pueden ser cualquiera conocido en la técnica, que incluyen, sin limitarse a, células de cáncer/leucemia de la sangre u otros tejidos, células infectadas por virus o bacterias, virus o bacterias o parásitos, células fetales o células efectoras patogénicas. Estas células pueden enriquecerse mediante el uso de antígenos de superficie adecuados. Estas últimas células además pueden destinarse a la modificación de acuerdo con el propósito N.º 2 anterior, es decir, la modificación de células y la devolución de las células modificadas para causar una respuesta inmunitaria terapéutica.

10 Durante la etapa de enriquecimiento, puede enriquecerse más de un tipo de célula diana. El sistema podría enriquecer, de varias formas, múltiples tipos de células, por ejemplo, los tipos de células podrían enriquecerse de forma separada en distintas cámaras del dispositivo (900, 1000 de las Figuras 9 y 10). Los distintos tipos de células podrían manejarse juntos (por ejemplo, devolverse, desecharse o modificarse todos) o los tipos de células podrían manejarse de forma separada (por ejemplo, un grupo devolverse, un grupo desecharse, un grupo modificarse o todos los grupos modificarse pero de distintas formas) o variaciones de lo anterior.

15 El enriquecimiento de la(s) célula(s) diana podría ser eliminar las células diana de la sangre periférica (como en las células de leucemia) o enriquecerlas a un porcentaje de pureza requerido para la aplicación terapéutica o para investigación/prueba, etc.

20 El enriquecimiento de la célula diana podría lograrse por medios físicos o químicos, por ejemplo, captura, y se dice que las células diana, por ejemplo, están aisladas, es decir enriquecidas a partir de la población de células sanguíneas a granel. El procedimiento de enriquecimiento podría emplear uno o más métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, captura de antígenos, perlas, materiales magnéticos, clasificación de células activada por fluorescencia, microfluidica, soporte sólido, acústico, bioluminiscencia, etiquetado de anticuerpos o sustrato enzimático. Los soportes sólidos adecuados incluyen partículas que incluyen, sin limitarse a, partículas ferromagnéticas y de densidad modificada. Estos pueden obtenerse, por ejemplo, de Miltenyi Biotec and Dynal (Curr Opin Immunol. Abr 1991; 3(2):238-241). Existen métodos que pueden usarse para la liberación de las células capturadas que incluyen: i) competencia con un exceso de ligando, ii) digestión enzimática, iii) cambio de pH, 25 iv) cambio de la fuerza iónica, v) eliminación del campo magnético, vi) agitación física.

30 El o los ligandos específicos para la población o las poblaciones de células diana pueden ser cualquiera conocido en la técnica y, preferentemente, es un anticuerpo específico para un ligando de superficie celular. El ligando de superficie celular puede ser un antígeno de designación de grupo (CD) que incluye, sin limitarse a, CD1a, CD4, CD8, 35 CD14, CD25, CD34 y CD133, el cual, habitualmente, usa un anticuerpo específico para capturar/seleccionar la célula diana. El ligando de superficie celular puede ser, sin limitarse a, EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), selectinas, receptor de molécula de adhesión, receptores de localización, receptores de citocina, receptores de quimiocina y enzimas que incluyen aldehído deshidrogenasa y otras enzimas intracelulares. En la Tabla 1 se indican varios marcadores de superficie.

40 A modo de ejemplo, una forma de enriquecer células es el uso de anticuerpos o aptómeros. El término anticuerpo se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse un epítipo presente en un antígeno. Como se usa en la presente memoria, el término anticuerpo se refiere a moléculas que unen células. El término pretende abarcar

moléculas de inmunoglobulina intactas tales como anticuerpos monoclonales y policlonales, pero también, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos antiidiopáticos (anti ID), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), proteínas de fusión y cualquier modificación de los anteriores que comprenda un sitio de reconocimiento de ligandos de la especificidad requerida. Como se usa en la presente memoria, un aptómero es un péptido o ácido nucleico que no es de origen natural y que tiene una acción deseada en una diana. Una acción deseada incluye, pero no se limita a, unirse a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifique/altere la diana o la actividad funcional de la diana, adherirse covalentemente a la diana como en un inhibidor suicida, facilitar la reacción entre la diana y otra molécula.

Las HSC/HPC pueden enriquecerse mediante una variedad de métodos que incluyen el uso de marcadores de la superficie celular CD34 o CD133, o niveles elevados de alcohol deshidrogenasa (ALDH). En una realización de la presente invención, las células HSC/HPC CD34+ se enriquecen y, después, se modifican en la etapa de introducción de un gen anti VIH. La introducción podría llevarse a cabo mediante una variedad de medios, por ejemplo, la transducción retroviral.

Las células diana podrían devolverse al paciente. En ciertas afecciones médicas podría resultar ventajoso desechar o retener las poblaciones de células diana para fines de diagnóstico/control. Por ejemplo, en el procedimiento de diagnóstico desarrollado por Immunicon Inc. denominado CellSearch™ se determinan células de tumores raros en la sangre mediante un sistema separador de perlas magnéticas (referencia). Este procedimiento de recolección a escala más grande podría aumentar la sensibilidad de tal método de diagnóstico. Desechar células tumorales diana específicas o células patogénicas, tales como células Th17 en enfermedades autoinmunitarias podría resultar beneficioso (referencia). Finalmente, la inducción de linfopenia se ha asociado con mejores resultados para ciertos tratamientos por razones tales como dejar espacio para la terapia celular (Dudley, ME et.al. Science. 2002 Oct 25;298(5594):850-4. Epub 2002 Sep 19). Las poblaciones de células destinadas a desecharse pueden ser cualquiera conocida en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, células malignas de la sangre u otros tejidos, células infectadas con virus o bacterias, virus, bacterias o parásitos, células fetales o células efectoras patogénicas tales como Th1, Th17, CTL, etc. Se realiza este enriquecimiento y se logra el porcentaje de pureza requerido para la aplicación terapéutica. En ciertos casos, se requiere un porcentaje de enriquecimiento específico (véase abajo). En el caso de eliminar células patogénicas, por ejemplo, células de cáncer/leucemia, la eficacia del aclaramiento desde la sangre es más importante que el porcentaje de pureza final real. Estas células además pueden destinarse para la modificación de acuerdo con el propósito N.º 2 anterior.

Las dos etapas de recolección y enriquecimiento de células se realizan en una forma de circuito cerrado en un único dispositivo; las etapas pueden llevarse a cabo en las mismas secciones o en secciones distintas del dispositivo. Las células que no son diana podrían devolverse al paciente o desecharse, como se requiera terapéuticamente, o usarse fuera de línea para investigación/prueba. En el caso de afecciones inmunocomprometidas o linfopénicas tal como la infección por VIH, por ejemplo, las células que no son diana pueden devolverse en el sistema de circuito cerrado, lo que permite el retorno de células esenciales, la pérdida de las cuales podría comprometer al paciente. En otros casos en donde no se requiere el retorno de las células diana o en donde el no retorno ofrecería un beneficio, las células que no son diana pueden desecharse o usarse fuera de línea para otros fines. Tal beneficio podría surgir como resultado, por ejemplo, de convertir al paciente en linfopénico, lo que puede aumentar la eficacia de ciertos tratamientos celulares. (Dudley, ME et.al. Science. 2002 Oct 25;298(5594):850-4. Epub 2002 Sep 19).

Modificación de células

La Figura 11 muestra el dispositivo 900 o 1000 de la Figura 9 o 10 renumerado como dispositivo 1100. El paciente 1140 se acopla con el dispositivo 1100 en un circuito cerrado con el catéter de entrada 1150 y el catéter de salida 1152. En esta realización, se proporciona una etapa de modificación adicional de las células diana en una forma conectada al paciente y de circuito cerrado. Esta etapa representa una extensión del sistema de circuito cerrado conectado al paciente de recolección y enriquecimiento celular. La modificación de células diana en un sistema de circuito cerrado conectado al paciente puede llevarse a cabo como una extensión del sistema conectado al paciente de circuito cerrado de recolección y enriquecimiento. Como se muestra en la Figura 11, las células diana enriquecidas 1160 se modifican en un recipiente 1170 para proporcionar células diana modificadas 1180. La modificación opcional puede ser una o más de electroporación, lipofección, transducción viral, luz (ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB), etc.), adición de fármacos, activación celular, presión, calentamiento, etc.

La Figura 8 es un diagrama esquemático más detallado del dispositivo de procesamiento de sangre descrito en la Figura 11. El dispositivo de procesamiento de sangre 800 se muestra acoplado a un paciente 836 en la Figura 8. Los elementos del dispositivo 700 mostrado en la Figura 7 que son los mismos que en el dispositivo 800 de la Figura 8 tienen el número de referencia correspondiente, excepto que el primer dígito es distinto para que se corresponda con el número de la Figura (7XX y 8XX), entonces el nodo de recolección 702 de la Figura 7 es el nodo de recolección 802 de la Figura 8. Para mayor brevedad, la descripción de las características correspondientes no se repetirá en la descripción de la Figura 8 ya que aquellos elementos de la Figura 7 que son iguales en la Figura 8 tienen la misma función y configuración. En cambio, de aquí en adelante solo se describen las diferencias entre las Figuras 7 y 8. La bolsa de recolección 886 se acopla a una bomba de modificación 831, la cual a su vez se acopla a una unidad o un módulo de modificación 833. El módulo de modificación 833 a su vez se acopla a una bolsa de

células modificadas 835. La configuración del dispositivo 800 de la Figura 8 es, de cualquier otra forma, igual al de la Figura 7.

5 La modificación además podría llevarse a cabo como una modificación celular *ex vivo* discontinua para alterar el fenotipo, el genotipo o la actividad de las células. Esto puede ser mediante la adición de citocinas, reticulación de receptores específicos, adición de antígenos, transfección de ADN, ARN o proteínas, inducción de célula apoptótica, incorporación génica que incluye transducción viral. En esta realización la población de células diana enriquecidas 1160 se retira para una etapa de modificación discontinua individual para alterar el fenotipo/el genotipo/la actividad de las células. Después, las células modificadas pueden usarse para investigación o para la aplicación terapéutica mediante la infusión a un paciente. El grado de enriquecimiento es el que se requiere para fines de investigación/prueba o para la aplicación terapéutica.

15 La población de células diana enriquecidas puede modificarse mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, sin limitarse a, activación, expansión, inducción de apoptosis, manipulación genética, inducción de especificidad de antígeno, etc. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante adición de citocinas, reticulación de receptores específicos, adición de antígenos, introducción de ADN, ARN o proteínas, transducción viral, electroporación, lipofección, tratamiento con luz de varias longitudes de onda, adición de fármacos, captura de células o componentes celulares, presión, calentamiento, etc.

20 Las células pueden modificarse mediante una variedad de medios que, en todos los casos menos en el de la fotoféresis (véase abajo), se realizan en un proceso desconectado del paciente mediante un proceso o dispositivo autónomo. Existen muchos ejemplos de procedimientos desconectados del paciente que incluyen modificación de células *ex vivo* para alterar el fenotipo/genotipo/actividad de las células; esto puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de citocinas, reticulación de receptores específicos, adición de antígenos, transfección de ADN o 25 ARN, introducción de proteínas, inducción de células apoptóticas o incorporación de genes mediante, por ejemplo, transducción viral. Los medios para hacerlo incluyen, pero no se limitan a, electroporación, lipofección, transducción viral, irradiación, incubación con fármacos, captura de células, activación de células, presión, calentamiento, reticulación de receptores de superficie celular, tratamiento con citocinas, quimiocinas, hormonas, etc. Por ejemplo, la electroporación o electroporación es un método usado para introducir compuestos extracelulares tales como material genético (ADN o ARN) en una célula aumentando la permeabilidad de la membrana celular causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Esta técnica se usa, actualmente, rutinariamente para fines de investigación y se han llevado a cabo ensayos clínicos que muestran su utilidad potencial en un tratamiento para un ser humano.

35 Las células destinadas a modificación incluyen, pero no se limitan a, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos T CD4 y CD8, células dendríticas, monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos (CTL), células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y células epiteliales, véase la Tabla 1. (Fundamental Immunology por William E. Paul 2003 Lippincott Williams & 40 Wilkins ISBN 0781735149; Essential Haematology, Hoffbrand, Pettit y Moss).

Estas células modificadas son útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones. Por ejemplo, la terapia adoptiva de linfocitos T se describe en C.H. June. J. Clin. Invest. 117, (2007) 1466-1476. En este ejemplo, los linfocitos de la sangre periférica se recolectan del paciente, se enriquecen en una etapa individual y se incuban con sistemas de activación para aumentar la actividad antitumoral de los CTL. Las HSC se han usado en trasplantes de médula ósea durante muchos años y se usan cada vez más en otras aplicaciones tales como tratamiento cardiovascular y cicatrización de heridas.

50 Las modificaciones pueden llevarse a cabo mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limitan a, transfección o transducción de material genético en al menos una porción de la población de células diana, reticulación de receptores específicos o tratamiento con citocinas. La transfección o transducción de material genético puede hacerse mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, sin limitarse a, transducción de vectores, electroporación o lipofección. La modificación puede ser cualquiera conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a, activación de linfocitos T citotóxicos (CTL), activación de linfocitos T reguladores (Treg), inducción de apoptosis o modificación génica de células sanguíneas para la protección contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

60 El tratamiento del VIH con células madre/progenitoras hematopoyéticas modificadas genéticamente se describe en Amado et al. (2004), publicación de patente internacional (PCT) N.º WO 03/006691. En este sistema, las HSC/HPC se recolectan por leucaféresis del paciente como parte de la fracción celular mononuclear, se enriquecen mediante un dispositivo Baxter independiente, se transducen y se incuban antes de la infusión al paciente (véase la Figura 2). En las realizaciones de la invención, a los pacientes se los somete a leucaféresis durante un tiempo más corto, las células se enriquecerán de forma segura en un circuito cerrado y, lo más importante, las células que no son diana pueden devolverse a estos pacientes linfopénicos (véase la Figura 4).

65 Existen muchas otras células diana que podrían enriquecerse mediante el dispositivo y usarse para el tratamiento.

Aquí se ofrecen algunos ejemplos. Las células dendríticas se usan en el tratamiento del cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades de inmunodeficiencia (Nature. 2007 Sep 27;449(7161): 419-26. Revisión). Los linfocitos NK se usan para tratar el cáncer. Los linfocitos T reguladores se están probando para tratar la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) (Semin Immunol. 2006 Apr; 18(2): 78-88), enfermedades de inmunodeficiencia, dermatitis atópica y asma (Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2006 Feb;6(1):12-6. Revisión). Los CTL se usan para tratar el cáncer, enfermedades infecciosas y alergias. Las células endoteliales se usan en tratamientos de regeneración celular de vejiga, vasculatura, etc.

En una realización que combina las tres etapas de recolección, enriquecimiento y modificación en un circuito cerrado conectado al paciente, el grado de enriquecimiento y modificación se determina por los valores requeridos para la aplicación terapéutica. Por ejemplo, en el tratamiento genético del VIH se requiere un enriquecimiento de las HSC/HPC a >20 % y, más preferiblemente, > 80 % de manera que se pueda translucir un número mayor de HSC/HPC con el constructo génico anti-VIH. La transducción necesita optimizarse de manera que se reinfunda un número mayor de HSC/HPC modificadas genéticamente al paciente. Lo mencionado anteriormente se proporciona solo a modo de ejemplo.

En otro ejemplo, los linfocitos T reguladores pueden enriquecerse y después expandirse; la pureza requerida es, generalmente, de >75 % y, preferentemente, >90 % para limitar la hipertrofia de los linfocitos T efectores durante la etapa de modificación/estimulación. Así, los parámetros de enriquecimiento y modificación varían según la enfermedad y la necesidad médica. Nuevamente, lo mencionado anteriormente se proporciona solo a modo de ejemplo.

En otra realización, las realizaciones de la invención permiten controlar las etapas mientras están sucediendo, es decir, en tiempo real, tal como la medición de hematocritos, número celular, fenotipo celular, activación celular, tamaño celular, etc. En el caso, por ejemplo, del enriquecimiento y la modificación de HSC/HPC, esto permite la determinación de los parámetros del proceso a medida que sucede, por ejemplo, la medición del número de células CD34+ y el número de células CD34+ transducidas.

Las referencias citadas en la presente memoria incluyen las patentes US-7211037 ("Apparatus for the continuous separation of biological fluids into components and methods of using same") otorgada a Briggs et al. el 1 de mayo de 2007 y UAS-7186230 ("Method and apparatus for the continuous separation of biological fluids into components") otorgada a Briggs et al. el 6 de marzo de 2007. El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar las realizaciones de la invención, pero no las limita.

Ejemplo 1. Recolección de células mononucleares a partir de sangre periférica, y enriquecimiento de linfocitos T CD4+.

Se preparó una bolsa de sangre periférica para representar un falso paciente. Se recolectaron cuatro (4) unidades de sangre total ABO de donantes sanos en anticoagulante ACD-A, 1-2 días antes del uso. Se eliminaron los glóbulos blancos de las unidades de sangre mediante filtración a través de un filtro de leucorreducción Sepacell y se acumularon en una bolsa de sangre de 2 litros. Se adicionó una capa leucocitaria leucopak para llevar el recuento de glóbulos blancos a concentraciones fisiológicas y la bolsa de falso paciente se mantuvo a temperatura ambiente en una plataforma oscilante para asegurar una suspensión de células homogénea. Se extrajo una muestra de 10 ml de la bolsa de falso paciente y se determinó la composición celular de referencia mediante recuento electrónico de células y diferencial automático en un contador Beckman Coulter AcT, y se evaluó el inmunofenotipo mediante citometría de flujo con un panel de anticuerpos monoclonales que incluía CD45-FITC, CD3-PECy7, CD4-APC, CD8-PECy5, CD14-PECy7, CD15-PE, CD20-APC, CD34-PE.

Un ejemplo de la composición celular dentro de una bolsa de falso paciente es el siguiente:

<i>Recuentos de células</i>	Sangre total de falso paciente
WBC (x10 ⁶)	5,1
Linfocitos (x10 ⁶)	1,85
Monocitos (x10 ⁶)	0,4
Neutrófilos (x10 ⁶)	2,85
RBC (x10 ⁹)	4,35
Plaquetas (x10 ⁶)	85,5
Hemoglobina (g/dl)	11,4
Hct (%)	35,8
<i>Inmunofenotipo</i>	
CD8 (%)	6,5
CD4 (%)	25,9
CD14 (%)	12,3
CD15 (%)	57,7
CD20 (%)	2,3

Sistema de procesamiento de sangre

El sistema de fotoféresis Therakos CellEx constituyó la base del dispositivo de procesamiento de sangre. Como se describió en la Figura 9, el sistema 900 comprende varios componentes que incluyen una cámara de centrifuga 962, una plataforma de bomba 964, una cámara de fotoactivación y una interfaz de operador 960 dirigida por un software fácil de usar. Se añaden prensas y bombas adicionales como se requería y se modificó un conjunto desechable de único uso específico de procedimiento de fotoféresis CellEx para usarse en este ejemplo. En el presente ejemplo de recolección de células mononucleares y enriquecimiento de células CD4+ a partir de sangre periférica no se requiere la cámara de fotoactivación. El sistema de fotoféresis CellEx usa una tecnología de centrifugación de un omega dos omegas que, en conjunto con un bol de Latham acoplado a un tubo conductor de lumen de tres puertos, permite el procesamiento continuo total de la sangre. En comparación con otros dispositivos de leucaféresis, la recolección de un número similar de células mononucleares puede lograrse a partir de un volumen extracorpóreo reducido. El sistema de fotoféresis CellEx puede operarse en un modo de acceso de aguja simple (retorno por lotes) o de aguja doble (retorno continuo), lo que proporciona flexibilidad al paciente. En el presente ejemplo se empleó el modo de aguja doble para el paso sencillo de sangre desde la bolsa de falso paciente a la bolsa de retorno de falso paciente.

Antes de la recolección de células mononucleares, el sistema de fotoféresis Therakos CellEx requiere la carga y cebado de un kit de procedimiento desechable. El kit era un conjunto integral, desechable, de un solo uso compuesto por varios elementos que incluyen un bol de centrifuga Latham, un organizador de tubos de bomba y un módulo de fotoactivación. En este ejemplo, el kit de procedimiento se modificó para que incluya bolsas y prensas adicionales. El kit de procedimiento modificado se instaló y se cebó según el manual de operadores del sistema de fotoféresis Therakos CellEx. Una vez cargado el kit, el sistema llevó a cabo un procedimiento de cebado automático de siete minutos para asegurar la carga adecuada del kit, para probar la integridad del kit y para probar la integridad de los instrumentos, así como cebar el trayecto de fluido estéril con anticoagulante. El anticoagulante usado en este ejemplo fue ACD- A.

Después del cebado, el sistema estuvo listo para la conexión del falso paciente. La bolsa de sangre de falso paciente de 2 l se conectó a la línea de entrada o "acceso de recolección del kit" del kit desechable del sistema CellEx. Una bolsa de sangre de 2 l vacía se conectó a la línea de salida o "acceso de retorno del kit" para representar el otro brazo del falso paciente y se designó como la "bolsa de retorno". Después de la conexión de las dos líneas de acceso del donante, el sistema CellEx se configuró para que funcione en el modo de doble aguja. Todos los otros parámetros del sistema se usaron en las configuraciones por defecto. Los parámetros del sistema eran:

- 1) proceso de 1500 ml de sangre total,
- 2) velocidad de recolección de sangre de 50 ml/min y
- 3) relación de anticoagulante de 10:1.

Se inició la recolección de sangre al presionar el botón de inicio en la interfaz de operador y el sistema procesó automáticamente el volumen de sangre total establecida de 1500 ml.

A medida que la sangre se bombeaba continuamente desde el falso paciente hacia el bol de Latham, se eliminaban continuamente glóbulos rojos y plasma y se devolvían a través de una segunda línea intravenosa representada en el ejemplo por la "bolsa de retorno". En el modo de aguja simple, los glóbulos rojos y el plasma se devuelven a través de la misma línea en un modo por lotes. La plataforma de bomba del sistema CellEx impulsa múltiples bombas y dirige y desplaza los componentes sanguíneos a lo largo del procesamiento de sangre. Se retuvieron células mononucleares como una capa de glóbulos blancos o "capa leucocitaria" entre los glóbulos rojos y el plasma en el bol. La posición de la "capa leucocitaria" se controló por medio de un rayo láser.

Una vez que se procesaron 1500 ml de sangre total, el sistema CellEx pasó al modo "recolección de capa leucocitaria". La cosecha de células mononucleares se logró al detener la bomba que controla el flujo de glóbulos rojos a la "bolsa de retorno". Esto permitió a los glóbulos rojos entrar en el bol y desplazar la "capa leucocitaria" hacia arriba, aunque con alguna interrupción de la capa de glóbulos blancos, y hacia afuera a través del puerto de plasma en la parte superior del bol por una válvula abierta. El plasma y la "capa leucocitaria" se dirigieron a la "bolsa de tratamiento" cebada previamente con anticoagulante. Cuando el sensor óptico de hematocritos del sistema detectó un hematocrito de 3 %, la bomba de recolección se detuvo temporariamente y el bol se centrifugó para permitir que la banda de glóbulos blancos se reformara. La recolección en la bolsa de tratamiento, después, prosiguió hasta que el sensor óptico detectó un hematocrito de 24 %. Esto hizo que la válvula se cerrara y desviara el fluido desde el bol a la línea de retorno. La "bolsa de tratamiento" en este momento contiene la preparación de células mononucleares recolectadas. La "bolsa de tratamiento" consistía fundamentalmente en células mononucleares, aunque también contenía plaquetas y una baja concentración de granulocitos y glóbulos rojos con un hematocrito de aproximadamente 1-2 %. La "bolsa de tratamiento" de células se conectó a través del conjunto de procedimiento modificado a una bolsa adicional para el enriquecimiento.

Un ejemplo de recolección de células mononucleares de 1570 ml de sangre total anticoagulada (falso paciente) es:

<i>Recuentos de células</i>	Células de sangre total de falso paciente	Células totales de recolección mononuclear	Rendimiento (%)
WBC ($\times 10^6$)	8007	3757	47
Linfocitos ($\times 10^6$)	2904	2939	101
Monocitos ($\times 10^6$)	628	343	55
Neutrófilos ($\times 10^9$)	4475	486	109
RBC ($\times 10^9$)	6822	48	0,7
Plaquetas ($\times 10^6$)	134235	59007	44
Hemoglobina (g/dl)	11,35	0,55	
Hct (%)	35,8	1,9	
<i>Inmunofenotipo</i>			
CD8 ($\times 10^6$)	520	575	110
CD4 ($\times 10^6$)	2074	225	109
CD14 ($\times 10^6$)	985	909	92,3
CD15 ($\times 10^6$)	4620	556	12,0
CD20 ($\times 10^6$)	184	229	124

Enriquecimiento a partir de células mononucleares recolectadas de células diana CD4+

- 5 Una vez completada la recolección de células mononucleares CellEx, se lavó una fracción del producto de células mononucleares con tampón de enriquecimiento celular y se introdujeron perlas de selección CD4+ (Dynal) a una concentración a través del puerto de acceso libre de agujas de la "bolsa de tratamiento". La mezcla de perlas y células mononucleares se incubó durante 30 minutos con recirculación a través del trayecto de serpentina del módulo de fotoactivación del kit desechable CellEx. La incubación se terminó mediante el desplazamiento de las células a través de una bomba peristáltica hacia el interior de una bolsa ubicada en un concentrador de partículas magnéticas. Las células diana CD4+ se retuvieron en la "bolsa de células enriquecidas" y se retiraron las Dynabeads mediante la adición de Detechabeads. Las fracciones de células enriquecidas CD4+ diana y de células que no son diana se recolectaron en bolsas de recolección individuales. Se tomaron muestras para determinar el número de células, el rendimiento y la pureza mediante el uso de un contador celular Coulter y citometría de flujo de los marcadores de superficie celular relevantes.

Los números que se muestran abajo son para una pequeña alícuota de 2 ml de células mononucleares recolectadas.

<i>Recuentos de células</i>	Células totales de recolección mononuclear	Células diana enriquecidas CD4	Rendimiento (%)
WBC ($\times 10^6$)	34	6,6	19,5
Linfocitos ($\times 10^6$)	16,6	6,5	24,6
Monocitos ($\times 10^6$)	3,1	0,1	2,2
Neutrófilos ($\times 10^6$)	4,4	0,01	0,3
RBC ($\times 10^9$)	0,43	0	0
Plaquetas ($\times 10^6$)	534	0	0
<i>Inmunofenotipo</i>			
CD8 ($\times 10^6$)	15,3	2,9	
CD4 ($\times 10^6$)	59,9	99,2	
CD14 ($\times 10^6$)	24,2	2,5	
CD15 ($\times 10^6$)	14,8	2,2	
CD20 ($\times 10^6$)	6,1	2,6	

20 Ejemplo 2. Recolección de células mononucleares y enriquecimiento de células CD8+ a partir de sangre periférica

Descripción general

- 25 La Figura 12 ilustra un sistema modificado 1200 relacionado con el sistema 700 de la Figura 7. Para mayor brevedad, las características de la Figura 7 que son idénticas en el sistema 1200 de la Figura 12 conservan los mismos números de referencia (por ejemplo, la bomba de anticoagulante 712 en las Figuras 7 y 12). Además, estas características numeradas de forma idéntica también conservan la misma configuración en el sistema 1200 de la Figura 12, a menos que se describa explícitamente de cualquier otra forma en lo sucesivo. El sistema 1200 de la Figura 12 es un dispositivo para el procesamiento de sangre que implica la recolección y el enriquecimiento (versión 2) y comprende 3 bolsas nuevas, 6 prensas nuevas y 2 imanes. Se modificó un kit de procedimiento CellEx estándar como se ilustra en la Figura 12. La cámara de fotoactivación se reemplazó por una bolsa CLINicell25 1278. El paciente 1200 está representado en la Figura 12 por una bolsa de paciente N.º 1 1206 acoplada al nodo de retorno

756 y por una bolsa de paciente N.º 2 que no se muestra en la Figura 12, pero que puede reemplazarse por la bolsa 1206 y acoplarse al nodo de retorno 756 en distintas etapas del proceso para permitir la enumeración de células durante la recolección y el enriquecimiento.

5 El sistema de la Figura 12 se modifica de la siguiente manera. Se dispone un imán 1276 adyacente a la placa 778, y puede engancharse y desengancharse de la placa 778. En la Figura 7, la salida del sensor de HCT 788 se acopla a las válvulas 790 y 791 (NUEVA1 y NUEVA2) en paralelo, las cuales a su vez se acoplan a las bolsas de recolección y tratamiento 786 y 737, respectivamente. En la Figura 12, se mantiene esta configuración, pero se añaden trayectos paralelos adicionales a la salida del sensor de HCT 788. Se acopla una válvula (NUEVA6) 1240 a la salida del
 10 sensor de HCT 788 y, a su vez, a una bolsa de desperdicios 1242. Se acopla otra válvula (NUEVA5) 1250 a la salida del HCT 788 y se acopla un catéter 1252 entre la válvula 1250 y la válvula (NUEVA3) 793, y el detector de aire 794. Además, la salida de la válvula (NUEVA4) 796 se acopla en la Figura 12 entre la válvula 793 y el detector de aire 794, en vez de entre el detector de aire 794 y la válvula 798 como se muestra en la Figura 7. Finalmente, se dispone un imán secundario 1254 adyacente a un trayecto entre la válvula (NUEVA1) 790 y la bolsa de recolección 786.

15 Se combinaron cuatro unidades de sangre total para crear un “falso paciente” 1204 acoplado al nodo de recolección 702 y se tomó una muestra para el análisis por contador Coulter y citometría de flujo. El kit modificado se cargó en un dispositivo CellEx, se cerraron las válvulas NUEVA1 790, NUEVA4 796, NUEVA5 1250 y NUEVA6 1240 y se abrieron las válvulas NUEVA2 791 y NUEVA3 794. Como un estado inicial, esto proporcionó un canal abierto para la
 20 comunicación continua a través de la bolsa de tratamiento 737. El software de CellEx estándar se usó para preparar el kit y un software de diagnóstico que funciona en un ordenador portátil se conectó al puerto IR del CellEx para permitir la operación configurada de usuario adicional de las bombas, las válvulas y la centrifuga.

Cebado

25 La válvula NUEVA2 791 se cerró y la válvula NUEVA1 790 se abrió para crear un trayecto a la bolsa de recolección 786, y esta línea se cebó haciendo circular la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en el sentido horario. Una vez cebada la línea, se detuvo la bomba 776, se cerró la válvula NUEVA3 793 y se abrió la válvula NUEVA4 796 para permitir que el tampón de selección 795 se bombee por el kit. La bomba de recirculación/leucocitaria 776 se activó
 30 en sentido antihorario. Después de cebar la línea al tampón de selección 795, se detuvo la bomba 776, se cerró la válvula NUEVA1 790 y se abrió la válvula NUEVA6 1240. Esto abre el trayecto a la bolsa de desperdicios 1242. Mediante la activación de la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en una dirección horaria, se cebó la línea a la bolsa de desperdicios 1242. Cuando se cebó esta línea a la bolsa de desperdicios 1242, se detuvo la bomba 776, se cerraron las válvulas NUEVA6 1240 y NUEVA4 796 y se abrió la válvula NUEVA5 1252 para cebar la línea 1252 que
 35 desvía la bolsa de tratamiento 737 haciendo funcionar la bomba de recirculación/leucocitaria en sentido antihorario. Una vez que se cebó la línea 1252, 1250, se detuvo la bomba 776, se cerró la válvula NUEVA5 1250 y se abrieron las válvulas NUEVA2 791 y NUEVA3 793; el cebado se completó.

Conexión de “paciente” y recolección

40 Se conectó el “falso paciente” 1204 a la línea de recolección 702, 704 y la bolsa de paciente N.º 1 1206 se conectó a la Línea de retorno 756, 754. Se puso en funcionamiento un procedimiento CellEx estándar de doble aguja usando parámetros por defecto para recolectar la capa leucocitaria (como se describió en el Ejemplo 1 anterior de la presente memoria). Inmediatamente después de la recolección de capa leucocitaria, se presionó el botón “Detener”
 45 y se detuvo el software CellEx automático. Después, el operador manipuló las bombas CellEx, las válvulas NUEVAS y la centrifuga, y con el software de diagnóstico en el ordenador portátil.

Enriquecimiento de células diana

50 Todas las válvulas del sistema 1200 se cerraron excepto las válvulas (NUEVA2) 791, (NUEVA4) 796, (azul, parte inferior de plasma) 744, (rosada, parte superior de plasma) 784 y (retorno) 748. Esto creó un trayecto abierto para que el material restante en el bol 730 y la bolsa de retorno 740 se bombee a la bolsa de paciente N.º 1 1206. Esto se logró al permitir que la bomba de glóbulos rojos 732 gire en sentido horario y la bomba de retorno 746 en sentido antihorario. Esto creó un trayecto desde el bol de la centrifuga, a través de las bombas 732 y 746 a la bolsa del
 55 paciente N.º 1 1206 mediante los elementos 748, 750, 752, 754 y 756 y por la bolsa de retorno 740. Las bombas 732, 746 se detuvieron, la válvula (azul - parte inferior del plasma) 744 se cerró y la válvula de solución salina 764 se abrió. Para lavar el bol 730, se activó la bomba de glóbulos rojos 732 en una dirección antihoraria y se bombeó solución salina desde la bolsa de solución salina 762 hacia el bol 730. Cuando el bol 730 estuvo casi lleno hasta la mitad, se detuvo la bomba 732 y se cerró la válvula de solución salina 764. Después se pulsó la centrifuga 730 y la
 60 sangre se bombeó a la bolsa de paciente N.º 1 1206 a través de la bomba de glóbulos rojos 732 en sentido horario y la bomba de retorno 746 en sentido antihorario. Cuando el bol 730 se vació, la bomba de glóbulos rojos 732 se desactivó y se elevó levemente la velocidad de la bomba de retorno 746 para purgar la sangre restante de las líneas hacia la bolsa de paciente N.º 1 1206. Se detuvo la bomba 746 y se reemplazó la bolsa de paciente N.º 1 1206 con la bolsa de paciente N.º 2 (no mostrada en la Figura 12), la cual se acopló al nodo de retorno 756. Se analizó una
 65 muestra de la bolsa de paciente N.º 2 en un contador Coulter y por citometría de flujo para analizar la composición celular. Se procesó un total de 1800 ml de sangre, a un recuento de células nucleadas totales de $6,6 \times 10^6$ /ml. Las

células CD8 componían 8,1 % del material de partida. Después del enriquecimiento, la capa leucocitaria fue de 139 ml, con un recuento de células nucleadas totales de $24,2 \times 10^6$ /ml, de las cuales 22,4 % eran positivas para CD8 (recuperación = 78 %).

5 Las células que quedaron en los tubos se bombearon a la bolsa de tratamiento 737 mediante la operación de la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en sentido horario a 100 milímetros por minuto durante varios segundos. Después, se detuvo la bomba 776, se cerró la válvula NUEVA4 796, se abrió la válvula NUEVA3 793 y se determinó el volumen de leucocitos recolectados por peso. La bolsa de tratamiento 737 se agitó para mezclar los contenidos y se recolectó una muestra para el análisis por recuento Coulter y citometría de flujo.

10 En este ejemplo, el número de células en la bolsa de tratamiento 791 se ajustó a 1×10^9 , lo cual es el número que supuestamente podría capturarse, mediante el uso de un solo frasco de 5 ml de Dynabeads. Se inyectaron Dynabeads en la bolsa de tratamiento 737 y la mezcla de perlas/células se cicló a través de la placa 778 y la bolsa de tratamiento 737 mediante la activación de la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en sentido antihorario. En este modo, las válvulas 1240, 1250, 790, 796, 772 y 798 están cerradas. Las válvulas 791 y 793 se encuentran abiertas. Por lo tanto, la circulación sucede a través de la bolsa de tratamiento 737 a la placa 778 mediante los elementos 793, 794 y 780. El imán 1276 se encuentra desenganchado de la placa 778. La circulación continúa desde la placa 778 a través de la bomba leucocitaria 776, el sensor de HCT 788 y la válvula 791 a la bolsa de tratamiento 737. Por lo tanto, en este modo, la circulación a través de este trayecto es en sentido antihorario. Durante el período de incubación, las células que expresan el antígeno celular específico (en este ejemplo, CD8) se unen a las Dynabeads recubiertas con anticuerpo. Esta incubación y circulación dura al menos 30 minutos, con mezclado o agitación de la bolsa de tratamiento 737 y la placa 778.

25 Cuando se completó la etapa de circulación de antígeno/anticuerpo, la placa 778 se ubicó en un MPC ClinExVivo Dynal (el imán de 8 kGauss) 1276 con el imán 1276 enganchado. La bomba de recirculación/leucocitaria 776 continuó bombeando durante varios minutos para quitar cualquier Dynabead del tubo entre la placa 778 y la parte superior de la bolsa de tratamiento 737.

30 Una vez que quedó libre la línea entre la placa 778 y la bolsa de tratamiento 737, la bomba 776 se detuvo, la válvula (NUEVA2) 791 se cerró, la válvula (NUEVA6) 1240 se abrió y la bomba de recirculación/leucocitaria 776, después, se reactivó en la dirección horaria. Esto interrumpió la comunicación continua hacia la bolsa de tratamiento 737 por medio de la válvula 791 cerrada. La circulación fluyó desde la bolsa de tratamiento, a través de los elementos 793, 794, 780 a la placa 778, con el imán 1276 enganchado. Todas las células en la bolsa de tratamiento 737 se bombearon a través de la placa 778. Los complejos de Dynabead-célula (fracción enriquecida o positiva para CD8) se atraparon en la placa 778 a través del imán 1276. La circulación continuó desde la placa 778, a través de la bomba leucocitaria 776 y el sensor de HCT 788 hasta la bolsa de desperdicios 1242 a medida que se abría la válvula (NUEVA6) 1240. Así, las células restantes (fracción negativa) fluyeron hacia la bolsa de desperdicios 1242.

40 Cuando la bolsa de tratamiento 737 estuvo vacía, la bomba de recirculación/leucocitaria 776 se detuvo, la válvula (NUEVA3) 793 se cerró, la válvula (NUEVA4) 796 se abrió y la bomba 776 se reactivó en la misma dirección para permitir que el tampón de selección de la bolsa 795 purgue la línea desde la parte inferior de la bolsa de tratamiento 737, a través de la placa 778 y hacia la bolsa de desperdicios 1242, lo que asegura que se procese la mayoría de las células restantes en las líneas.

45 Una vez que las líneas se purgaron con el tampón durante varios minutos, la bomba de recirculación/leucocitaria 776 se detuvo, la válvula (NUEVA6) 1240 se cerró, la válvula (NUEVA2) 791 se abre y la placa 778 se separa del imán 1276. Se añadió tampón de la bolsa 795 a la placa 778 y la bolsa de tratamiento 737 a través del ciclado de la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en sentido horario. Cuando se hubo añadido suficiente tampón, se detuvo la bomba 776, se cerró la válvula (NUEVA4) 796, se abrió la válvula (NUEVA3) 793 y, después, se volvió a iniciar la bomba 776. La mezcla de células-perlas se hizo circular a través de la placa 778 y la bolsa de tratamiento 737 durante varios minutos para volver a suspender los complejos Dynabead-células. La circulación sucede a través de la bolsa de tratamiento 737 a la placa 778 mediante los elementos 793, 794 y 780. La circulación continúa desde la placa 778 a través de la bomba leucocitaria 776, el sensor de HCT 788 y la válvula 791 a la bolsa de tratamiento 737. Por lo tanto, en este modo, la circulación a través de este trayecto es en sentido antihorario. Esta etapa podría repetirse y equivale al lavado de la fracción positiva para eliminar impurezas.

60 Después del lavado, se inyectaron 2 ml de DETACHaBEAD de Dynal en la bolsa de tratamiento 737 y se incubaron con los complejos de Dynabead-células mediante la activación de la bomba de recirculación/leucocitaria 776 en sentido horario durante al menos 45 minutos. Después de la incubación, la placa 778 se colocó en el imán 1276. La bomba de recirculación/leucocitaria 776 se rotó en el sentido horario durante varios minutos para quitar cualquier Dynabead de los tubos entre la placa 778 y la parte superior de la bolsa de tratamiento 737. Una vez que la línea quedó libre de Dynabeads, la bomba 776 se detuvo, la válvula (NUEVA2) 791 hacia el interior de la bolsa de tratamiento 737 se cerró, la válvula (NUEVA1) 790 hacia el interior de la bolsa de recolección 786 se abrió y la bomba de recirculación/leucocitaria 776 se volvió a activar en la dirección horaria. La circulación sucede a partir de la bolsa de tratamiento 737 a la bolsa 778 a través de los elementos 793, 794 y 780. La circulación continúa desde la placa 778 a través de la bomba leucocitaria 776, el sensor de HCT 788 y la válvula 790 a la bolsa de recolección

786. El imán 1276 se mantuvo enganchado con la placa 778.

Se bombearon fluido y células en la bolsa de tratamiento 737 a través de la placa 778 y las Dynabeads (ahora desprendida de las células) se atraparon mediante el imán 1276 mientras que las células (selección positiva) fluían hacia el interior de la bolsa de recolección 786. Cualquier Dynabead no capturada por el imán principal 1276 debería capturarla después el imán secundario 1254, antes de entrar en la bolsa de recolección 786. Cuando la bolsa de tratamiento 786 estuvo vacía, la bomba de recirculación/leucocitaria 776 se detuvo, la válvula (NUEVA3) 793 se cerró, la válvula (NUEVA4) 796 se abrió y la bomba 776, después, se reactivó en la misma dirección. El tampón de la bolsa de tampón de selección 795 purgó la línea de la parte inferior de la bolsa de tratamiento 737, a través de la placa 778 y hasta la bolsa de recolección 786, lo que asegura que se procese la mayoría de las células en las líneas.

Cuando las líneas se purgaron con tampón durante varios minutos, la bomba de recirculación/leucocitaria 776 se detuvo. La bolsa de desperdicios 1240 y la bolsa de recolección 786 se pesaron para determinar el volumen de recolección, y la bolsa de desperdicios 1240 (fracción negativa) se muestreó para el análisis por contador Coulter, citometría de flujo y pH. La fracción enriquecida en la bolsa de recolección 786 se concentró y, después, se muestreó para el análisis por recuento Coulter, citometría de flujo y pH. El rendimiento de células positivas para CD8 fue de 33 % y la pureza fue de 92 %.

Retorno de células que no son diana

Las células en la bolsa de desperdicios 1242 se concentraron para el retorno al paciente representado por la bolsa de paciente N.º 2 (no mostrada en la Figura 12, pero puede sustituirse por la bolsa 1206). Se cerraron todas las válvulas del sistema 1200, excepto las válvulas (NUEVA5) 1250, (NUEVA6) 1240, (Verde - Parte inferior de leucocitos) 798, (rosada, parte superior de plasma) 784 y (retorno) 748, las cuales estaban, todas, abiertas. Esto abrió un trayecto para transferir los contenidos de la bolsa de desechos 1242 hacia el interior del bol 730 y el exceso de flujo se recolectó en la bolsa de retorno 740. Así, la circulación desde la bolsa de desperdicios 1242 fue a través de las válvulas 140 y 1250, el detector de aire 794, la válvula 798 y la bomba 732 al bol de la centrífuga 730. Desde el bol 730, la circulación se produjo a través de la 784 hacia el interior de la bolsa de retorno 740. Esto se logró al rotar la bomba de glóbulos rojos 732 en sentido antihorario.

Una vez que la bolsa de desperdicios 1240 estuvo vacía, se detuvo la bomba 732 y se cerraron todas las válvulas excepto las válvulas (azul, parte inferior del plasma) 744, (rosa, parte superior del plasma) 784 y (retorno) 748. A continuación, todo el aire del bol 730 se purgó mediante la activación de la bomba de glóbulos rojos 732 en una dirección antihoraria a 20 mililitros por minuto, al mismo tiempo que se giró simultáneamente la centrífuga 730 a una velocidad de 600-1000 RPM durante varios segundos y, después, se apagó la centrífuga 730. Este proceso de encender y apagar la centrífuga 730 al mismo tiempo que la bomba de glóbulos rojos 732 bombeaba continuamente se repitió varias veces hasta que no se vieron más burbujas de aire escapar del bol 730. Una vez completado, la centrífuga 730 se impulsó lentamente hasta la velocidad total con la bomba 732 aún activada, y los contenidos del bol 730 se dejaron separar durante varios minutos.

Después de la separación, la bomba de glóbulos rojos 732 se detuvo, las válvulas (NUEVA2) 791 y (amarilla, parte superior de leucocitos) 772 se abrieron y la válvula (rosada, parte superior del plasma) 784 se cerró. El bombeo antihorario de la bomba de glóbulos rojos 732 se reanudó a 20 mililitros por minuto. La circulación es desde la bomba de retorno 742 al bol de centrífuga 730 a través del detector de aire 742, válvula 774 y la bomba 732. Desde el bol 730, la circulación continúa a la bolsa de tratamiento a través de la válvula 772, el sensor de HCT 788 y la válvula 791. Este proceso eliminó la solución salina de la parte superior del bol 730 mientras que la mayoría de las células que no son diana en el producto sanguíneo permanecen en el bol 730.

Cuando la bolsa de retorno 740 estuvo vacía, la centrífuga 730 se detuvo y todos los contenidos del bol 730 se devolvieron a la bolsa de paciente N.º 2 (no mostrada en la Figura 12) a través de la bomba de glóbulos rojos 732 en sentido horario y la bomba de retorno 746 en sentido antihorario a través de la válvula 748, el detector de aire 750, el sensor de presión 752 y el nodo de retorno 756. Cuando el bol 730 se vació, las bombas 732 y 746 se detuvieron, la válvula (azul, parte inferior del plasma) 744 se cerró, la válvula de solución salina 764 se abrió y la bomba de retorno 746 se reactivó en sentido antihorario a 100 mililitros por minuto durante varios segundos para purgar las células sanguíneas que no son diana restantes hacia el interior de la bolsa de paciente N.º 2 (no mostrada en la Figura 12). La bomba 746 se detuvo y la bolsa de paciente N.º 2 se pesó para determinar el volumen total y se muestreó para el análisis por recuento Coulter y citometría de flujo. Las células que no son diana contenían solo 2,7 % de células CD8.

Ejemplo 3. Recolección de células mononucleares y enriquecimiento de células CD34+ a partir de sangre periférica

La recolección y el enriquecimiento de células CD34+ pueden llevarse a cabo como se describe en los Ejemplos 1 y 2, mediante el uso de materiales que unen específicamente CD34.

Enriquecimiento de células CD34+ a partir de células mononucleares recolectadas

5 En una realización de la invención, el sujeto puede movilizarse con G-CSF. Una vez completada la recolección de células mononucleares CellEx estándar, el producto de células mononucleares se lava con tampón de enriquecimiento celular PBS/EDTA (Miltenyi) complementado con HSA y perlas de selección CD34+ (Miltenyi) introducidas a través del puerto de acceso libre de agujas de la "bolsa de recolección". La mezcla de células mononucleares y perlas se incuba durante 30 minutos con recirculación a través del módulo de captura del kit desechable CellEx modificado y se termina al desplazar las células a través de una bomba peristáltica en el sistema de imanes Miltenyi CliniMACS aproximadamente al caudal sugerido por el fabricante. Las células diana CD34+ pueden enriquecerse a partir de células que no son diana, y las fracciones de células diana y no diana pueden recolectarse en bolsas de recolección separadas y modificarse aún más o devolverse al paciente.

Resultados

15 El sistema de fotoféresis Therakos CellEx es capaz de recolectar con alto rendimiento células mononucleares y puede conectarse en un solo trayecto de fluido a un sistema de enriquecimiento celular para el enriquecimiento adicional de células diana. Otras mejoras en la conexión y la interfaz entre los módulos de recolección y enriquecimiento del sistema combinado podrían aumentar la recuperación y el rendimiento de las células diana.

20 Ejemplo 4. Recolección de células mononucleares. enriquecimiento de células CD4+ a partir de sangre periférica y modificación.

Las células del Ejemplo 1 o 2 pueden modificarse en un trayecto de fluido cerrado, como se muestra en la Figura 8.

25 Las células enriquecidas se transfieren por medio de una bomba a la cámara de modificación. Se introduce un agente tal como un factor de crecimiento (por ejemplo, interleucina-2), péptidos y/o un agente de suministro de genes (ejemplo, vector viral) y las células se mantienen a temperatura constante (se cultivan). Esto hace que las células alteren su fenotipo y/o genotipo, y que tengan distintas propiedades físicas y funcionales. Las células modificadas podrían cultivarse aún más y usarse como agentes terapéuticos.

30 Notas sobre requerimientos de hardware y software

La plataforma de bomba es virtualmente la misma que la CellEx existente con un cabezal de bomba adicional añadido (hay lugar en el rincón inferior izquierdo de la plataforma de la bomba).

35 Si se retiran del CellEx las esferas y circuitos usados para la fotoféresis, queda espacio suficiente para añadir lo que se requiere para la selección e incluso la modificación. Pueden añadirse ganchos para bolsas adicionales en el lado izquierdo del instrumento.

40 En la forma precedente, se ha descrito varios métodos, aparatos y sistemas para procesar células sanguíneas. Si bien se ha divulgado un número pequeño de realizaciones, a la luz de esta descripción resultará evidente para aquellos con experiencia en la técnica que podrían realizarse numerosos cambios y sustituciones sin apartarse del alcance y espíritu de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para procesar sangre, comprendiendo dicho aparato:

5 una interfaz de entrada para acoplarse con un paciente a fin de recibir sangre directamente de la circulación de dicho paciente;
 un módulo de leucaféresis acoplado a dicha interfaz de entrada para recolectar células sanguíneas mononucleares a granel a partir de dicha sangre recibida;
 10 un módulo de enriquecimiento acoplado a dicho módulo de leucaféresis para enriquecer células diana concurrentemente separadas de las células que no son diana en dichas células sanguíneas mononucleares a granel;
 un módulo de modificación de las células diana adaptado para proporcionar una modificación seleccionada del grupo que consiste en activación de linfocitos T citotóxicos (CTL); activación de linfocitos T reguladores (Treg) y células sanguíneas modificadas genéticamente protegidas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
 15 unidas a al menos uno de dicho módulo de leucaféresis y dicho módulo de enriquecimiento, modificando dicho módulo de modificación dichas células diana enriquecidas;
 una interfaz de salida acoplada a al menos uno de dicho módulo de leucaféresis y dicho módulo de enriquecimiento para acoplar con dicho paciente para devolver células diana enriquecidas a la circulación de dicho paciente; formando dicho aparato y dicho paciente un circuito cerrado cuando se acoplan juntos; y
 20 un controlador para el control automático de la operación de dichas interfaces de entrada y salida, dicho módulo de leucaféresis y dicho módulo de enriquecimiento.

2. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho controlador comprende:

25 una memoria para almacenar datos e instrucciones para el control automático de la operación de dichas interfaces de entrada y salida, dicho módulo de leucaféresis y dicho módulo de enriquecimiento; y
 un procesador acoplado a dicha memoria capaz de acceder a dichos datos y dichas instrucciones, estando dicho procesador adaptado para llevar a cabo dichas instrucciones para el control automático de la operación de dichas interfaces de entrada y salida, de dicho módulo de leucaféresis y de dicho módulo de enriquecimiento.

30 3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además medios para devolver dichas células diana modificadas a dicho paciente.

35 4. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un módulo de modificación de células que no son diana acoplado a al menos uno de dicho módulo de leucaféresis y dicho módulo de enriquecimiento; modificando dicho módulo de modificación de células que no son diana las células que no son diana.

40 5. El aparato de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además medios para devolver las células que no son diana modificadas a dicho paciente.

6. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos una bomba para hacer circular al menos una porción de dicha sangre dentro del aparato.

45 7. El aparato de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además una bomba y al menos una válvula acopladas a dicha interfaz de entrada para proporcionar dicha sangre a dicho módulo de leucaféresis y otra bomba y al menos una válvula acopladas a dicha interfaz de salida para devolver sangre desde dicho aparato.

50 8. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho módulo de leucaféresis comprende un bol de centrifuga que usa centrifugación diferencial para recolectar dichas células sanguíneas mononucleares.

9. El aparato de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicha centrifugación diferencial se realiza mediante un sistema de flujo continuo.

55 10. Moléculas de adhesión celular epitelial (EpCAM), selectinas, receptores de moléculas de adhesión, receptores de localización, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas, enzimas y antígenos de designación de grupo (CD) para su uso como ligandos de la superficie celular en un método de procesamiento de sangre; donde el método de procesamiento de sangre comprende las etapas de:

- 60 a) obtener sangre de un paciente acoplado a un solo dispositivo de procesamiento de sangre para formar un circuito cerrado entre dicho paciente y dicho dispositivo de procesamiento de sangre;
- b) recolectar células sanguíneas mononucleares a granel de dicha sangre por leucaféresis implementada usando dicho dispositivo de procesamiento de sangre en dicho circuito cerrado;
- c) enriquecer concurrentemente las células diana separadas de las células que no son diana en dichas células sanguíneas mononucleares a granel usando dicho dispositivo de procesamiento de sangre en dicho circuito cerrado; y
- 65 d) modificar dichas células diana enriquecidas, donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste en

activación de linfocitos T citotóxicos (CTL); activación de linfocitos T reguladores (Treg) y células sanguíneas modificadas genéticamente protegidas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

- 5 donde dicha recolección de la etapa b) comprende el uso de centrifugación diferencial para recolectar dichas células sanguíneas mononucleares y dicho enriquecimiento de la etapa c) comprende el uso de ligando de captura para enriquecer dicha célula diana.
- 10 11. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el método de procesamiento de sangre comprende además la etapa de desechar las células que no son diana.
- 15 12. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, donde el método de procesamiento de sangre comprende además mantener una conexión continua de dicho paciente en dicho circuito cerrado durante el procesamiento de dichas células diana o; donde el método de procesamiento de sangre comprende además la etapa de desconectar a dicho paciente de dicho circuito cerrado por un intervalo de tiempo durante el procesamiento de dichas células diana.
- 20 13. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el método de procesamiento de sangre comprende la etapa de controlar concurrentemente dichas etapas de recolección y enriquecimiento.
- 25 14. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde dichas etapas de recolección y enriquecimiento se realizan en diferentes secciones de dicho dispositivo de procesamiento de sangre.
- 30 15. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha centrifugación diferencial se realiza mediante un sistema de flujo continuo.
- 35 16. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el antígeno CD se selecciona del grupo que consiste en CD1a, CD4, CD8, CD14, CD25, CD34, CD133 y CD143.
- 40 17. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde dichas células diana se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, monocitos, neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores T, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos (CTL), células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales, células mesenquimales, linfocitos, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK) y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).
- 45 18. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 17, donde dichas células progenitoras hematopoyéticas y dichas células madre hematopoyéticas están enriquecidas y opcionalmente son positivas para al menos uno de CD34, CD133 y CD143.
- 50 19. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células malignas de la sangre, células malignas del tejido, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias, al menos un virus, al menos una bacteria, un parásito, células fetales y células efectoras patogénicas.
- 55 20. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el método de procesamiento de sangre comprende además la etapa de devolver las células que no son diana al paciente conectado o desconectado a dicho circuito cerrado.
21. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el método de procesamiento de sangre comprende además la etapa de modificar células que no son diana y devolver dichas células que no son diana al paciente conectado o desconectado a dicho circuito cerrado.
22. Los ligandos de la superficie celular de acuerdo con la reivindicación 10, donde el enriquecimiento de las células diana se efectúa mediante al menos un método de magnético, clasificación de células activada por fluorescencia, microfluídica, soporte sólido, acústico, bioluminiscencia, etiquetado de anticuerpos y sustrato enzimático.

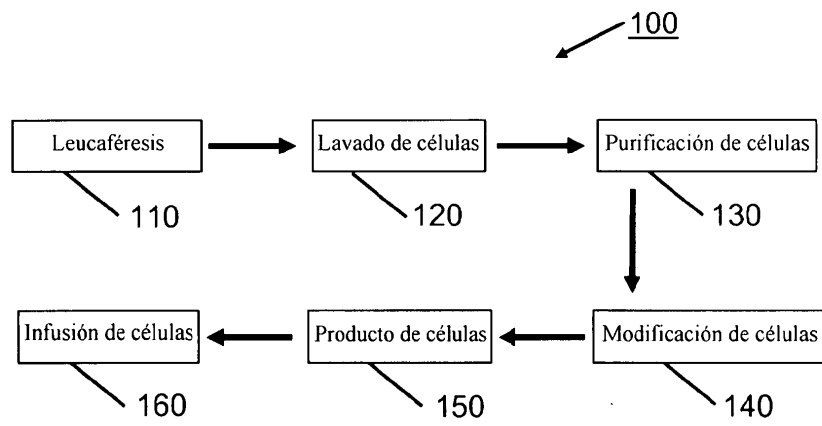


FIG. 1

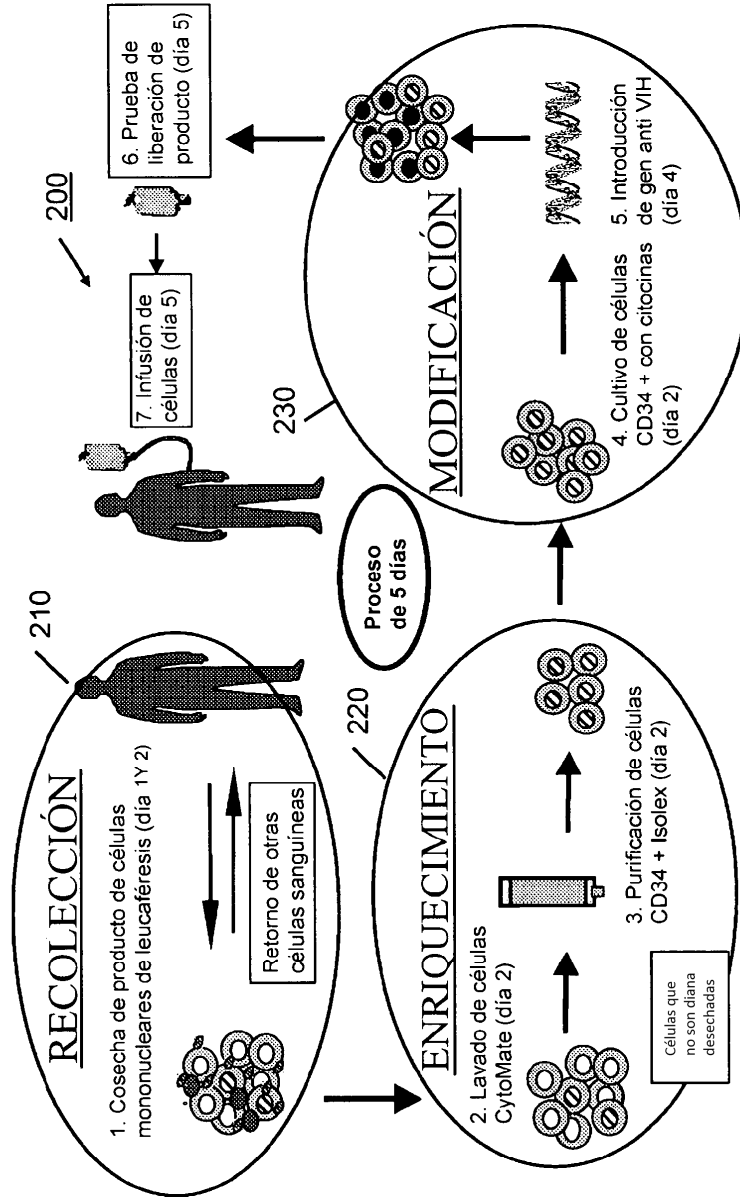


FIG. 2

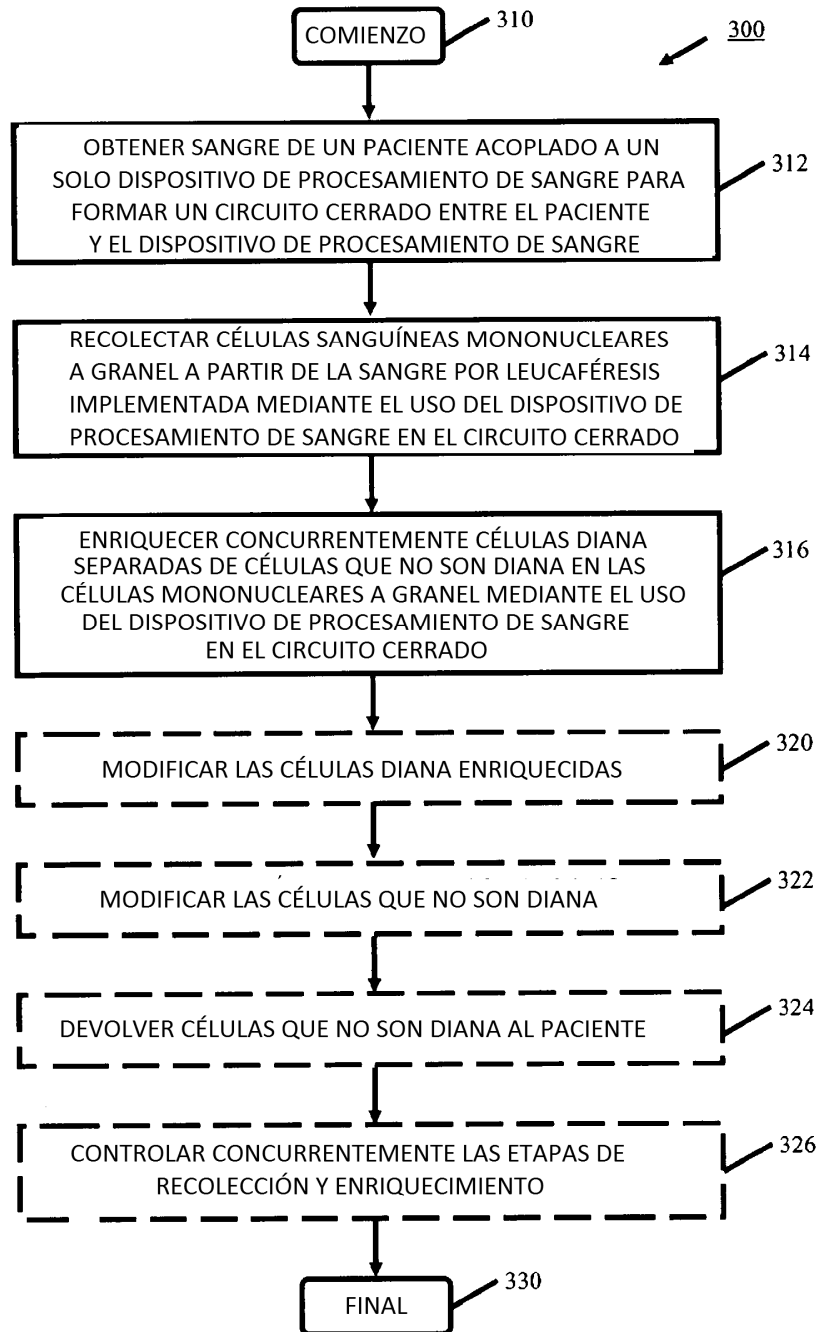


FIG. 3

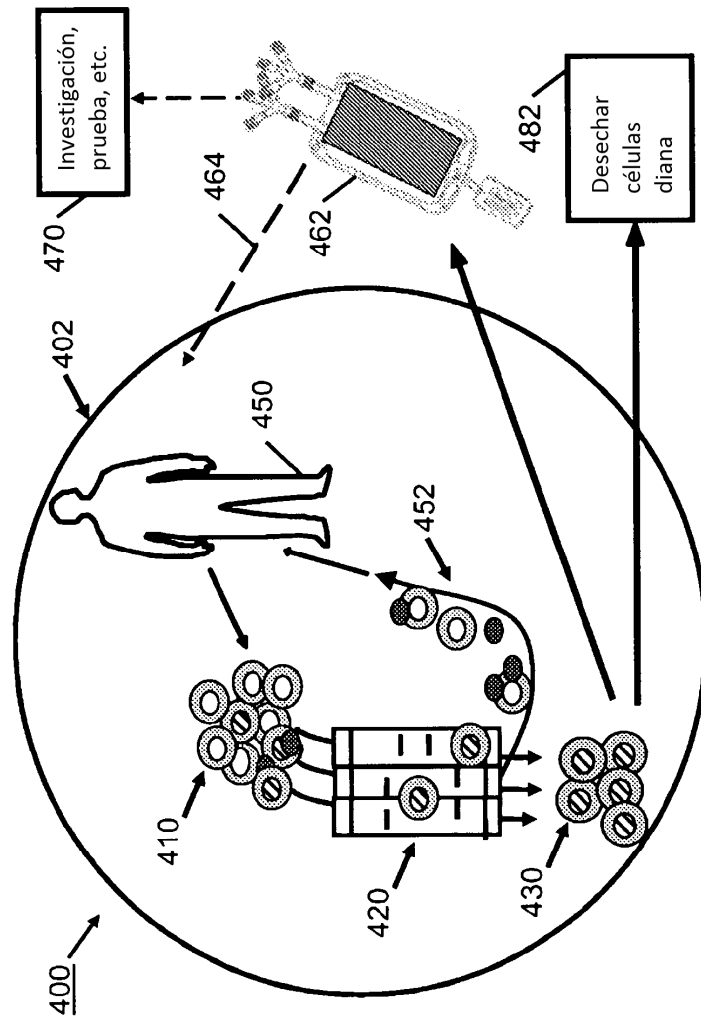


FIG. 4

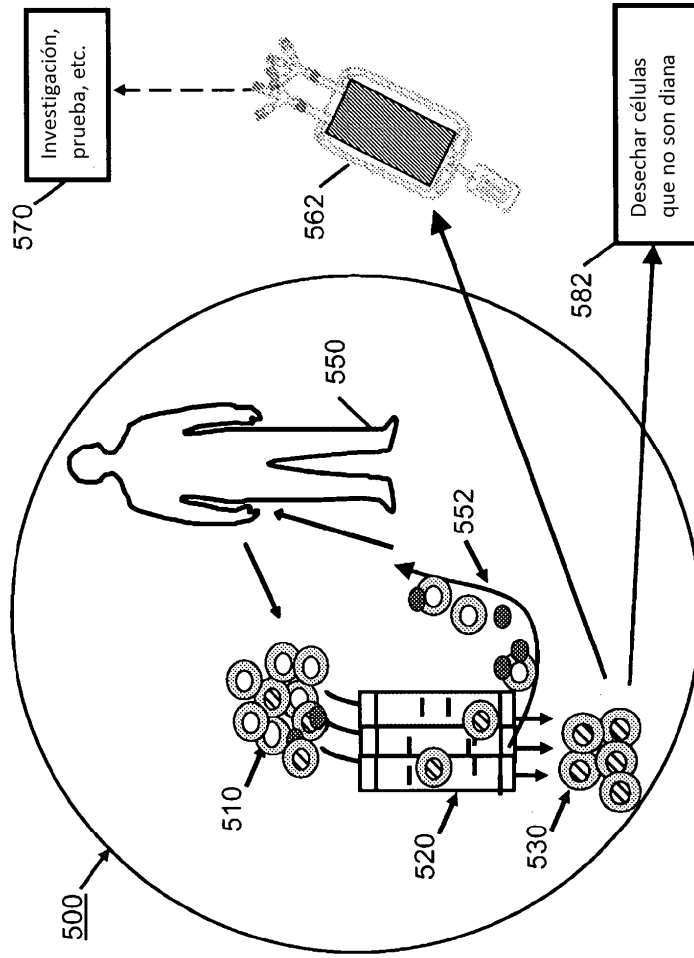


FIG. 5

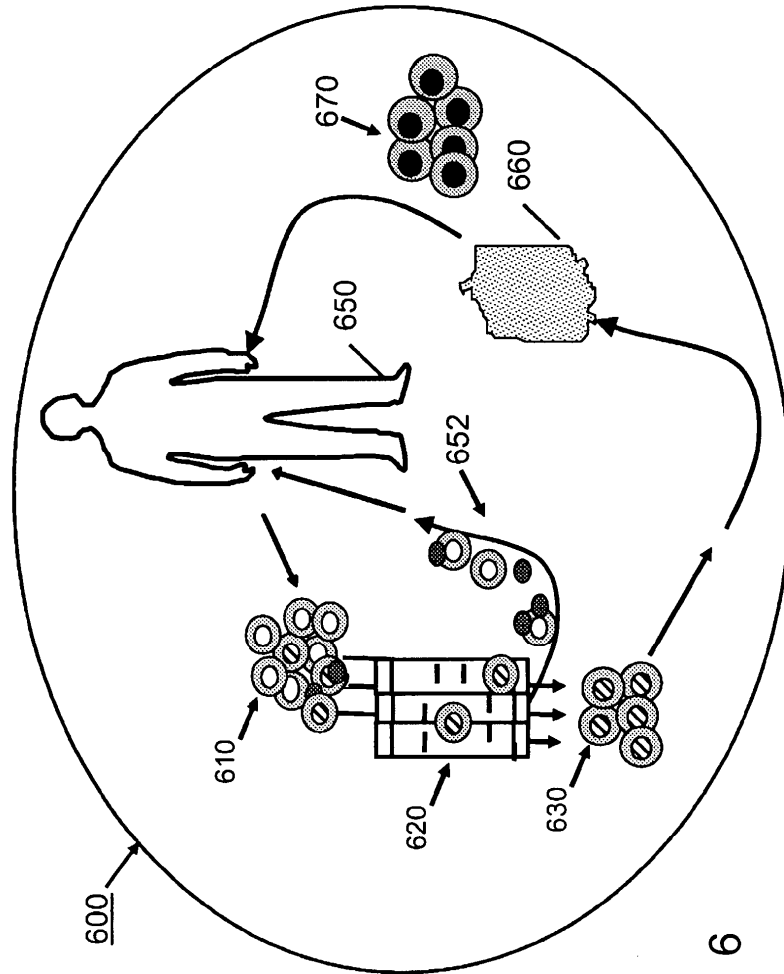


FIG. 6

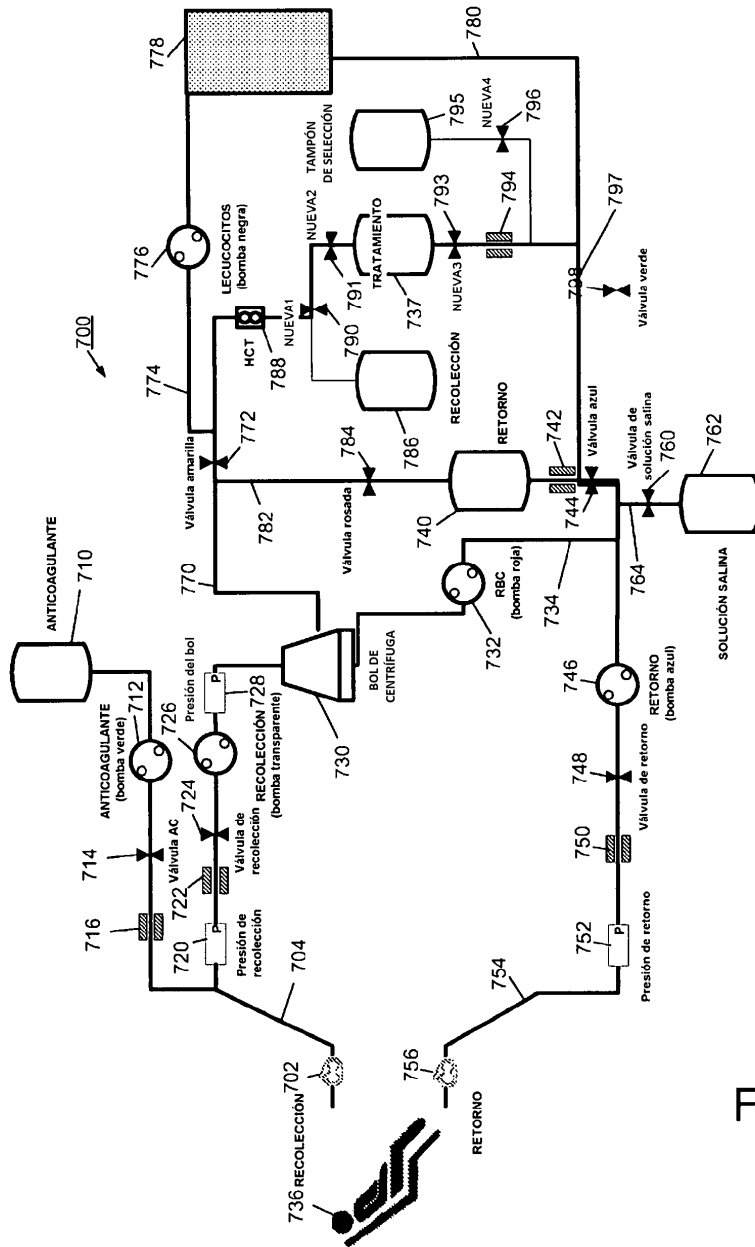


FIG. 7

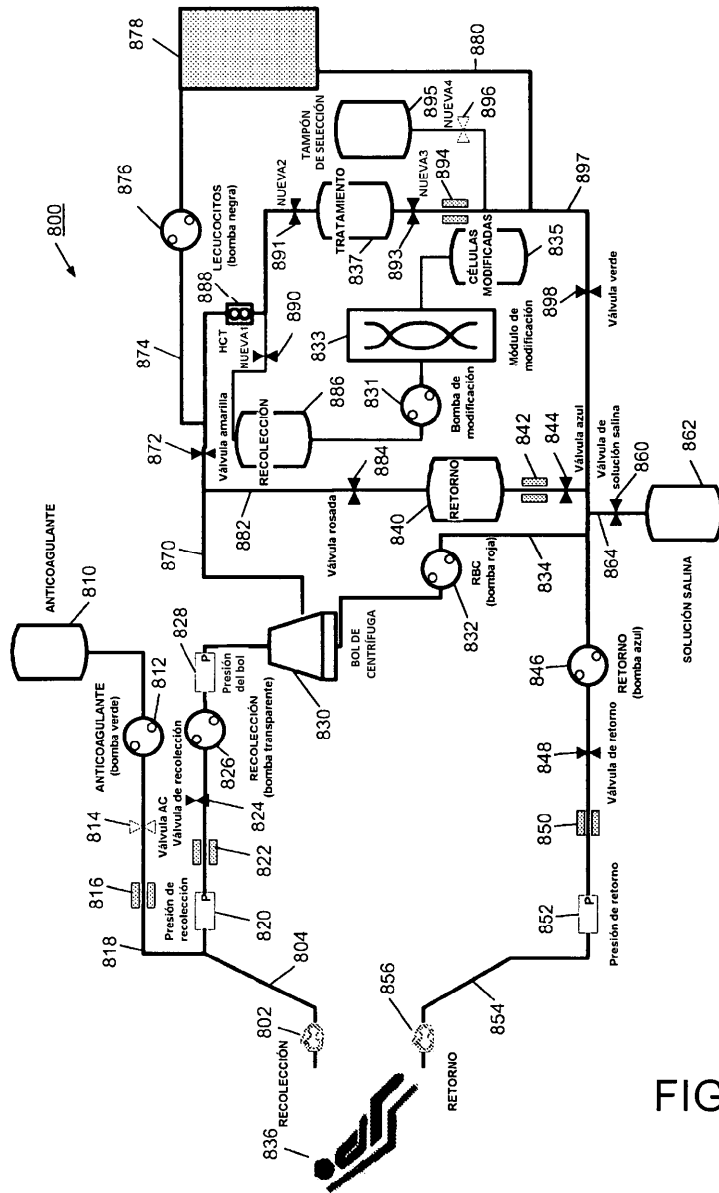


FIG. 8

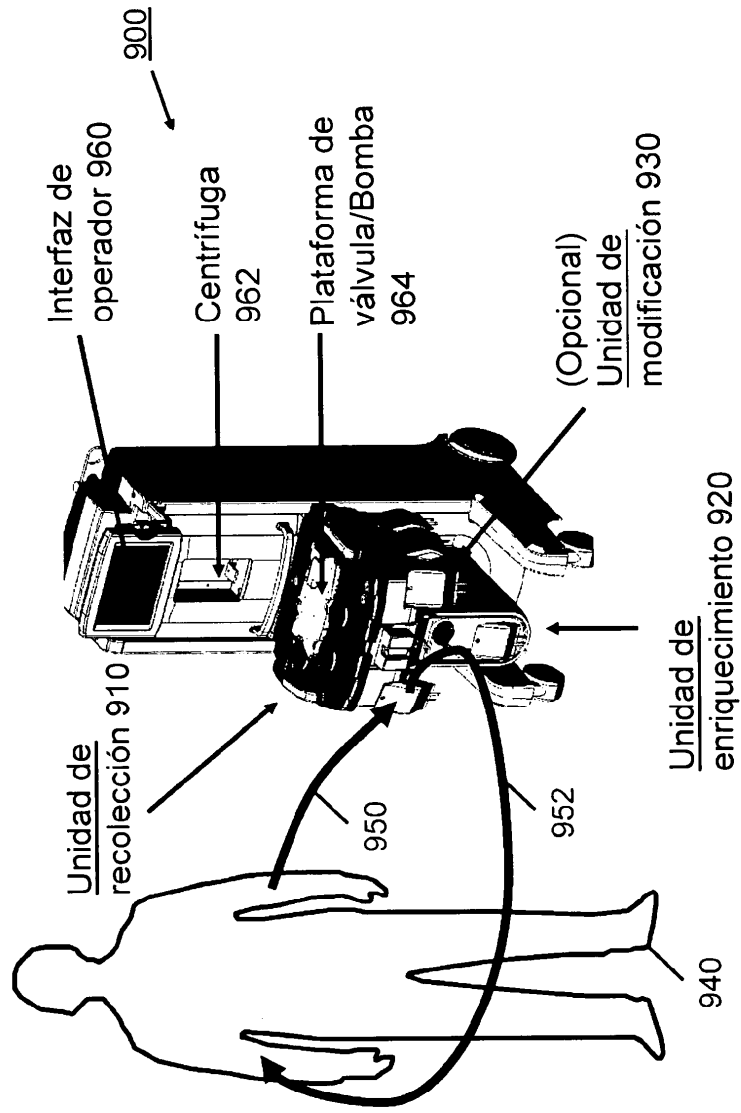


FIG. 9

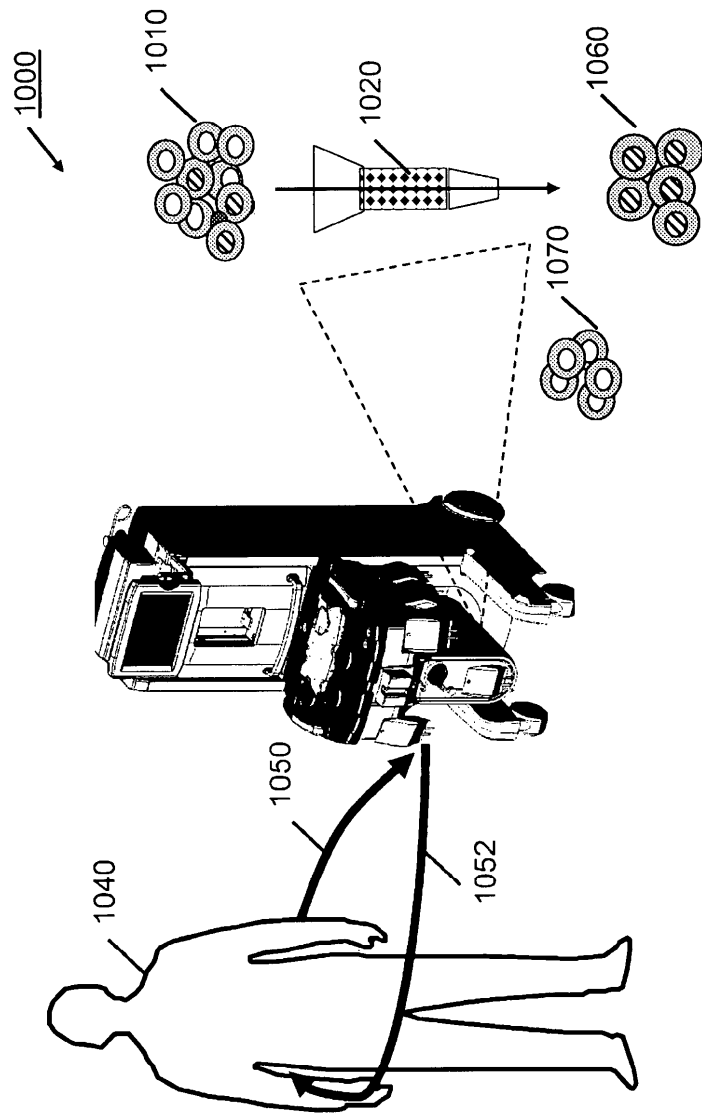


FIG. 10

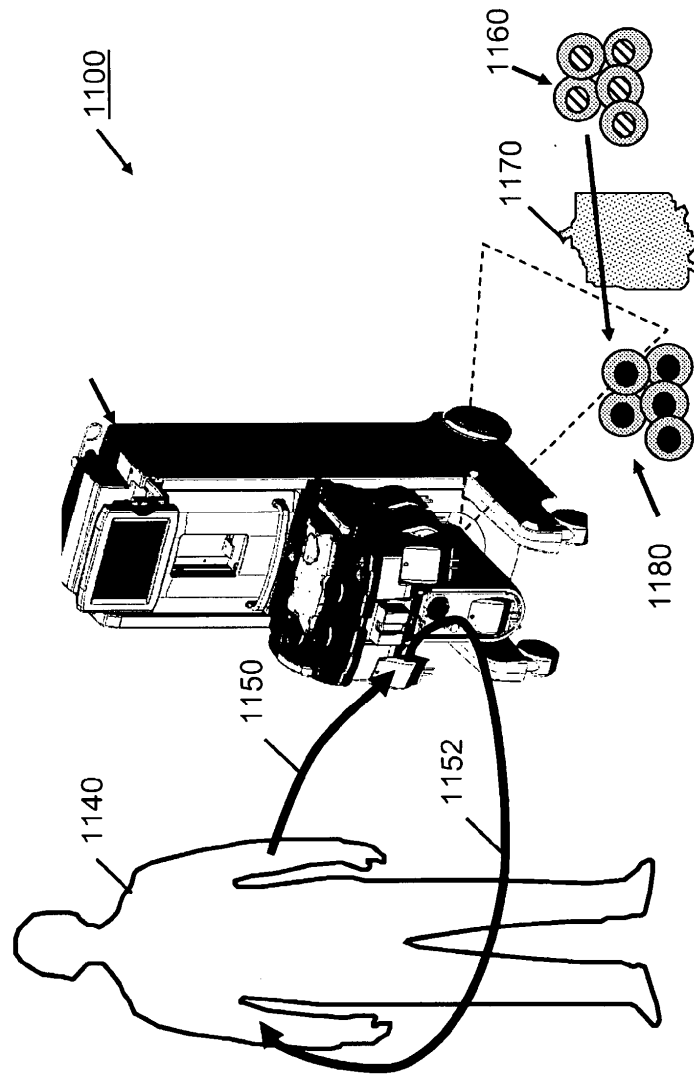


FIG. 11

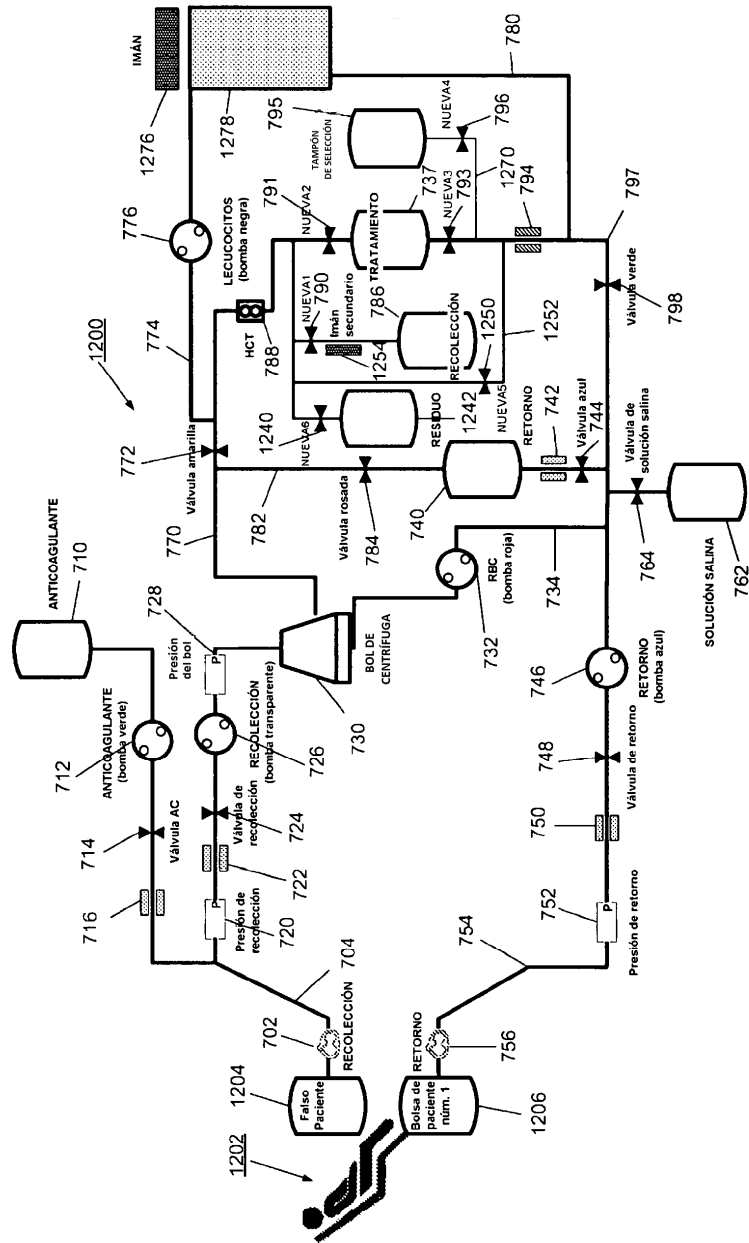


FIG. 12