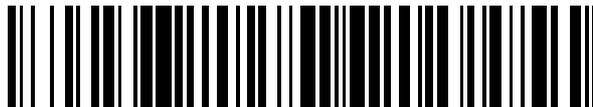


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 772**

51 Int. Cl.:

B01D 61/14 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2003 PCT/US2003/019428**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2003 WO04000444**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2003 E 03761157 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 1517740**

54 Título: **Uso de un dispositivo de filtración de flujo tangencial y métodos para el enriquecimiento de leucocitos**

30 Prioridad:

19.06.2002 US 390730 P

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

10.05.2017

73 Titular/es:

**NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4800 Montgomery Lane, Suite 800
Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:

**BOSCH, MARNIX L.;
HARRIS, PAUL C.;
MONAHAN, STEVEN J.;
TURNER, ALLEN;
BOYNTON, ALTON L. y
LODGE, PATRICIA A.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 611 772 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

Uso de un dispositivo de filtración de flujo tangencial y métodos para el enriquecimiento de leucocitos

Antecedentes de la invención

5 A menudo las poblaciones de células sanguíneas enriquecidas en leucocitos resultan recomendables para su uso en la investigación o terapia. Entre las fuentes típicas de leucocitos se incluyen la sangre periférica completa, el producto de la leucoféresis o aféresis, u otras fuentes menos comunes, tales como la sangre del cordón umbilical. El enriquecimiento de leucocitos se puede realizar de varias maneras. Entre los métodos típicos se incluyen los gradientes de densidad (por ejemplo, FICOLL-HYPAQUE®, sílice coloidal y similares), elutriación, centrifugación, lisis de eritrocitos mediante choque hipotónico y diversas combinaciones de estos métodos. Cada uno de estos métodos ofrece desventajas, siendo una de ellas la necesidad de unos laboriosos pasos de lavado tras la etapa de enriquecimiento.

10 Tras el enriquecimiento, las células se lavan típicamente mediante un proceso repetitivo. Por lo general, los pasos implican la colocación de la suspensión de células enriquecidas en un tubo centrífugo y provocar un proceso de granulación de las células en el fondo del tubo utilizando una centrifugadora. El tubo se retira de la centrifugadora y el sobrenadante se decanta separándolo de los gránulos de células. Se añade un líquido de lavado al tubo y los gránulos de células son resuspendidos. Típicamente estos pasos se repiten entre 2 y 4 veces.

15 Una desventaja de este proceso de lavado es que la resuspensión secuencial y la centrifugación pueden mermar la viabilidad de las células y potenciar su lisis. Otra desventaja del lavado mediante centrifugación es la oportunidad de que las bacterias u otros agentes infecciosos contaminen las células. Aún cuando todos los materiales se mantengan en condiciones estériles, la apertura repetida de los tubos centrífugos y la exposición al aire de las pipetas y las botellas de la solución de lavado puede provocar contaminación. El riesgo de contaminación es lo suficientemente importante como para que algunos organismos reguladores médicos exijan que solamente se utilicen sistemas "cerrados" para la manipulación de las células.

20 También se han utilizado métodos de filtración para retirar los leucocitos de la sangre, conservando al mismo tiempo otros componentes sanguíneos para su posterior uso. Por lo general, estos métodos atrapan los leucocitos sobre un filtro de forma no recuperable, al tiempo que se permite que otros componentes pasen a través del filtro, recogiendo en un recipiente. Por ejemplo, existen filtros para retirar los leucocitos de la sangre, a fin de minimizar la incidencia de las reacciones alérgicas tras una transfusión de sangre. Típicamente esto se consigue utilizando filtros fabricados en malla de fibra de plástico mateado. Por lo general, la malla mantiene una disposición apropiada para atrapar los leucocitos en una matriz reticulada con una profundidad suficiente para que las células queden atrapadas por toda la profundidad del filtro, evitando de este modo que el filtro se obstruya, tal y como ocurriría si los leucocitos fuesen atrapados sobre una superficie plana.

30 WO98/13131 divulga un método para separar los eritrocitos de los leucocitos en sangre completa, utilizando un método y un aparato que emplea un filtro con un tamaño de poro preciso, donde el aparato incluye un método para evitar la contaminación u obstrucción de la superficie del material de filtrado. Uno de los métodos para evitar la contaminación u obstrucción de la superficie de la membrana incluye hacer pasar una suspensión de células (por ejemplo, en paralelo) por la superficie de la membrana del filtro u oscilar la membrana y la suspensión entre sí.

El documento WO98/13131 divulga un método para separar los eritrocitos en sangre completa de los leucocitos, utilizando un dispositivo TFF.

45 Además de atrapar físicamente las células, los materiales y la gran superficie del filtro permiten que los leucocitos se adhieran de forma irreversible a la superficie. Muchas de estas células adherentes son precisamente las que se buscan para algunos procedimientos médicos. La combinación resultante de atrapamiento y adherencia al filtro crea un método altamente eficaz para retirar los leucocitos a desechar antes de la terapia de infusión de sangre. Sin embargo, cuando los leucocitos son las células buscadas, este método de filtración no resulta ventajoso.

50 Un método que ha resultado útil para el fraccionamiento de diversas partículas es la filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de "flujo cruzado". La TFF se basa en el movimiento de un fluido paralelo a la superficie de un filtro de membrana porosa. Los poros de la membrana permiten el paso del fluido y de las partículas que se encuentran en el fluido y que son más pequeñas que los poros. Por otra parte, el flujo cruzado (o flujo "tangencial") de fluido paralelo al filtro evita la acumulación de partículas mayores que los poros sobre la superficie del filtro.

55 La TFF se ha utilizado para la separación en bruto de diversos materiales. El uso de la filtración de flujo tangencial en el campo farmacéutico ha sido revisado por Genovesi (J. Parenter. Aci. Technol., 37:81, 1983), incluyendo la filtración de agua estéril para la inyección, clarificación de un sistema de solvente y filtración de enzimas de caldos y cultivos bacterianos. Marinaccio et al. (WO 85/03011) documenta un proceso para su uso en la extracción de la sangre de componentes sanguíneos particulados para la plasmaféresis, y Robinson et al. (Patente estadounidense 5.423.738) describe el uso de la TFF para

extraer el plasma de la sangre, permitiendo la reinfusión de células sanguíneas y plaquetas en los pacientes.

En otro uso, se ha documentado la TFF para la filtración de cerveza (EP 0 208 450), concretamente para extraer partículas como las células de levadura y otros sólidos suspendidos. Kothe et al. (Patente estadounidense 4.644.056) divulga el uso de la TFF en la purificación de inmunoglobulinas de la leche o el calostro, y Castino (Patente USA 4.420.398) describe su uso en la separación de sustancias antivirales, tales como interferones, de los caldos que contienen estas sustancias, así como células y partículas virales. De forma similar, la TFF se ha utilizado en la separación de enzimas bacterianas de los restos de células. (Quirk et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 6:201,1984) Por otra parte, las unidades de filtración de flujo tangencial se han empleado en la concentración de células suspendidas en medios de cultivo (véase, por ejemplo, Radlett, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22:495, 1972).

Recientemente, también se ha documentado el uso de la TFF para separar liposomas y partículas de lípidos en función de su tamaño. (Lenk et al., Patente USA 5.948.441.) La TFF permite la formación y el aislamiento de liposomas y partículas de lípidos con un rango de tamaño definido de poblaciones heterogéneas de tales partículas. (Véase Lenk et al., supra).

Sin embargo, a pesar de que la TFF se ha utilizado para el fraccionamiento en bruto de líquidos biológicos y la separación, por ejemplo, de liposomas, el uso de la TFF para la separación de diferentes poblaciones de células vivas que presentan unas características definidas no se ha apreciado en la técnica. En particular, no se han abordado los problemas únicos asociados con la separación selectiva de poblaciones de leucocitos (tales como monocitos, células precursoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺ o similares) de otras células sanguíneas, manteniendo la esterilidad, la viabilidad de las células, el potencial hematopoyético para diferenciarse y la actividad celular inmunoterapéutica. Por otra parte, los enfoques actuales no han resuelto la extracción de otras poblaciones de células, como poblaciones con rangos de tamaño que se solapan.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de dispositivos y métodos adicionales para el enriquecimiento selectivo de leucocitos respecto de otros componentes de la sangre, incluyendo plasma, eritrocitos y/o plaquetas, preservando al mismo tiempo la esterilidad, la viabilidad de las células, el potencial para diferenciarse y la actividad celular inmunoterapéutica. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

30 **Breve resumen de la invención**

La presente invención se refiere a la separación de leucocitos de la sangre y preparados sanguíneos conforme a las reivindicaciones. En particular, se prepara una población de células enriquecida en leucocitos mediante el uso de un dispositivo de filtración de flujo tangencial, conforme a las reivindicaciones. Se proporcionan como parte de la divulgación métodos para el uso del dispositivo en la preparación de poblaciones enriquecidas en leucocitos y poblaciones de células enriquecidas en monocitos, células precursoras y células madre CD34⁺ hematopoyéticas y similares. Las poblaciones de células enriquecidas en leucocitos y/o monocitos y similares obtenidas mediante el uso de los dispositivos y métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para preparar composiciones de células presentadoras de antígenos, como células dendríticas presentadoras de antígenos, para la administración a un individuo con miras a inducir una respuesta inmune, preparar composiciones de células madre pluripotentes, tales como macrófagos f (f-Mφ), para la inducción de la formación de células epiteliales, neuronales, endoteliales o hepatocitos, preparar composiciones que comprenden poblaciones enriquecidas de células precursoras o células madre hematopoyéticas y similares.

El dispositivo de filtración de flujo tangencial de la presente invención comprende una unidad colectora que posee una cámara de flujo cruzado cilíndrica y una cámara de filtrado separada por un filtro. El diámetro del filtro es sustancialmente igual al diámetro de la cámara de flujo cruzado. El filtro comunica el fluido de un lado, la superficie de retenido, con la cámara de flujo cruzado y del otro lado, la superficie de filtrado, con la cámara de filtrado. La cámara de flujo cruzado dispone de una entrada y una salida, y la entrada se encuentra adyacente a la superficie de filtrado del filtro para introducir una muestra de componentes sanguíneos que contiene leucocitos en la cámara de flujo cruzado en paralelo a la superficie de retenido del filtro. La salida se encuentra adyacente al centro del filtro y perpendicular a la superficie de retenido del filtro. El dispositivo comprende asimismo una bomba para bombear el fluido hacia la cámara de flujo cruzado a través de la entrada y está configurado para introducir el fluido en la cámara de flujo cruzado cilíndrica a un índice de entrada de unas 5-100 veces el índice de filtración; y esta disposición hace que el flujo de fluido se introduzca en espiral hacia el centro del filtro, generando un remolino en el fluido, y el filtro tiene un tamaño de poro medio que oscila entre 3 y 8 micrones, de forma que el flujo de la muestra que pasa por el filtro enriquece la muestra de componentes de la sangre con leucocitos. En determinadas realizaciones, el filtro tiene un tamaño medio del poro de entre unos 3 y 7 micrones, o entre unos 3 y 5,5 micrones.

El dispositivo para el uso reivindicado comprende un medio para obtener un índice de entrada predeterminado de la muestra en la entrada de la cámara de flujo cruzado, así como un medio para controlar el índice de filtración del filtrado a través del filtro y en la cámara de filtrado. El medio de control del índice de filtración limita la filtración hasta un nivel inferior al índice de filtración sin resistencia del filtro.

La muestra que contiene componentes sanguíneos puede ser proporcionada mediante un dispositivo de origen, como un dispositivo de leucoféresis o un recipiente que contiene una muestra recogida, por ejemplo, de un dispositivo de leucoféresis y similares.

5 El dispositivo de filtración de flujo tangencial para el uso reivindicado también puede comprender una unidad de recuperación. La unidad de recuperación contiene una entrada y se puede interconectar una salida en forma de bucle con la cámara de flujo cruzado de la unidad colectora. En esta realización del dispositivo, la entrada de la cámara de flujo cruzado comunica el fluido con la salida de la unidad de recuperación, y la salida de la cámara de flujo cruzado comunica el fluido con la entrada de la unidad de recuperación. La unidad de recuperación puede comprender también una entrada de la muestra y una
10 entrada de lavado. En determinadas realizaciones del dispositivo de filtración de flujo tangencial, la entrada de la muestra y la entrada de lavado son una única entrada compartida. Típicamente, la entrada de lavado comunica el fluido con una fuente de fluido de lavado o reemplazo. El fluido de lavado o reemplazo puede ser, por ejemplo, una solución tampón isotónica o medios de cultivo de tejidos.

15 La entrada de la muestra de la unidad de recuperación comunica el fluido con una fuente de componentes sanguíneos. En una realización de la presente invención la fuente de componentes sanguíneos es un dispositivo de procesamiento celular. El dispositivo de procesamiento celular puede ser un dispositivo de leucoféresis o un dispositivo capaz de producir una población de células parcialmente enriquecida en leucocitos. En un ejemplo, el dispositivo de procesamiento celular comprende un recipiente que dispone de un primer puerto y un segundo puerto, un sustrato que se adhiere a los precursores de células
20 dendríticas monocíticas que comunica el fluido con el primer puerto y el segundo puerto, un tamiz para retener el sustrato en el recipiente y con un tamaño de poro suficiente como para permitir el paso de las células dendríticas y precursores de células dendríticas monocíticas. El dispositivo comprende también una línea de drenaje que comunica el fluido con el primer o el segundo puerto y una línea colectora que comunica el fluido con el primer o el segundo puerto y que también comunica el fluido con la entrada de la muestra de la unidad de recuperación del dispositivo de filtración de flujo tangencial.
25

El dispositivo de procesamiento celular puede comprender también una pluralidad de fuentes de fluido para proporcionar medios aglutinantes, solución tampón de lavado y solución tampón de elución. El dispositivo puede comprender también una bomba para transferir los diversos fluidos dentro y fuera del dispositivo de procesamiento celular. También se puede disponer un medio de control de la temperatura,
30 como un dispositivo calentador o refrigerador. En una realización de la presente invención que dispone de un sistema cerrado, se proporciona una muestra de sangre o una preparación de un producto sanguíneo al dispositivo de procesamiento celular que contiene un material granulado capaz de adherirse a los precursores de células dendríticas monocíticas. Se permite que la muestra de sangre entre en contacto con el material granulado durante un tiempo suficiente como para adherirse a los precursores de células
35 dendríticas monocíticas y se retiran mediante lavado los demás componentes del dispositivo a través de la línea de drenaje. Se añade la solución tampón de elución al dispositivo de procesamiento celular y los precursores de células dendríticas monocíticas pasan en condiciones asépticas a través de la línea colectora hasta la entrada de la muestra de la unidad de recuperación, para el posterior enriquecimiento en monocitos de la muestra de sangre.

40 En una realización de la presente divulgación también proporciona métodos para separar los leucocitos de una muestra de componentes sanguíneos que contiene leucocitos conforme a la reivindicación 1. La muestra se puede someter a purificación parcial o a enriquecimiento por leucoféresis, centrifugación por densidad, lisis diferencial, filtración o preparación de una capa leucocitaria para su introducción en la unidad colectora. Se induce un movimiento de remolino en la muestra dentro de la cámara de flujo
45 cruzado. Adicionalmente, la población de células enriquecida en leucocitos se puede lavar con una solución de lavado.

En los métodos de la presente divulgación, los componentes sanguíneos no leucocitarios retirados de la muestra incluyen plasma y plaquetas, eritrocitos y similares. Los leucocitos del producto de los métodos de la divulgación pueden comprender una población sustancialmente enriquecida en monocitos. La población de células enriquecida puede contener aproximadamente al menos un 20% de leucocitos, aunque típicamente comprende aproximadamente al menos un 60% de leucocitos o más. En una realización del método de la presente divulgación, los pasos 1), 2) y 3) se repiten al menos dos veces para formar una población de células enriquecida en leucocitos conforme a la reivindicación 4. La población de células enriquecida en leucocitos se puede utilizar también para la preparación de precursores de células
50 dendríticas monocíticas. En una realización, la población de células enriquecidas se produce a través de un método que consiste en poner en contacto un sustrato que se adhiere a los precursores de células dendríticas monocíticas con la población de células enriquecidas en leucocitos, permitiendo que los precursores de células dendríticas monocíticas de la población de células se adhieran de forma reversible al sustrato para formar complejos compuestos por precursores de células dendríticas monocíticas y sustrato; separar los complejos de los leucocitos que no se adhieren para obtener complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas; y cultivar los precursores de células dendríticas monocíticas para que se diferencien en células dendríticas inmaduras o maduras. En una realización concreta, los precursores de células dendríticas monocíticas se eluyen del sustrato antes del cultivo. El sustrato al que se adhieren los precursores de células dendríticas monocíticas puede
60

comprender vidrio, poliestireno, plástico o microgránulos de poliestireno recubiertos de vidrio.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método para enriquecer una muestra de componentes sanguíneos en leucocitos, conforme a la reivindicación 4. El método puede proporcionar una población de células enriquecida sustancialmente libre de componentes sanguíneos no leucocitarios, incluyendo plasma, plaquetas y eritrocitos. La población de células enriquecida producida a través de este método puede comprender aproximadamente al menos un 20% de leucocitos y típicamente al menos un 60% de leucocitos o más. El método puede consistir también en tomar sangre de un sujeto y preparar la muestra de la sangre mediante leucofóresis, centrifugación por densidad, lisis diferencial, filtración o preparación de una capa leucocitaria.

Una vez que la población de células ha sido enriquecida en leucocitos, el método puede consistir también en preparar un tipo de célula concreto que se pueda inducir a partir de los leucocitos, tales como precursores de células dendríticas, células madre hematopoyéticas CD34⁺, células madre pluripotentes, tales como macrófagos f, y similares. En una realización concreta, las células dendríticas se pueden preparar a partir de la población de células enriquecida. En este método, las células dendríticas se preparan como sigue: poniendo en contacto un sustrato que se adhiere a los precursores de células dendríticas monocíticas con una población de células enriquecida; permitiendo que los precursores de células dendríticas monocíticas de la población de células enriquecida se adhieran de forma reversible al sustrato para formar complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas y sustrato; separando los complejos de los leucocitos que no se adhieren para obtener complejos que contienen precursores de células dendríticas monocíticas; y cultivando los precursores de células dendríticas monocíticas para que los precursores se diferencien en células dendríticas inmaduras o maduras. El sustrato puede contener vidrio, poliestireno, plástico o microgránulos de poliestireno recubiertos de vidrio. Por otra parte, los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden cultivar con citoquinas que promuevan la diferenciación de los monocitos en células dendríticas. En una realización concreta, las citoquinas son GM-CSF e IL-4. Por otra parte, las células dendríticas pueden evolucionar a células dendríticas maduras.

Una vez que se han aislado los precursores de las células dendríticas, estas se pueden cultivar con un antígeno en condiciones conducentes al procesamiento del antígeno para formar células dendríticas cargadas de antígeno. A continuación, las células dendríticas cargadas de antígeno se pueden administrar a un individuo o bien cultivarse in vivo o ex vivo con células T, a fin de inducir la formación de células T citotóxicas específicas de antígeno. Las células T citotóxicas se pueden administrar a un individuo que precise una respuesta inmune específica de antígeno inducida, como en el tratamiento del cáncer y de una infección bacteriana o viral.

Se puede producir una población de células enriquecida en células madre hematopoyéticas. En una realización de la divulgación, al individuo se le puede proporcionar un agente movilizador de las células madre, como, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, AMD3100 (u otros agentes que inhiben la función de CXCR-4), con una dosis alta o baja de ciclofosfamida y similares. El agente movilizador de las células madre induce la proliferación de células madre CD34⁺ liberadas en el torrente sanguíneo periférico. Una muestra de leucofóresis del individuo se introduce en una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF), donde la unidad TFF comprende una cámara de flujo cruzado, una cámara de filtrado y un filtro que comunica la cámara de flujo cruzado con la cámara de filtrado, donde el filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente entre 3 y 5,5 micrones; (2) se hace recircular la muestra a través de la unidad TFF a un índice de entrada predeterminado y a un índice de filtración predeterminado, siendo el índice de entrada predeterminado al menos cinco veces mayor que el índice de filtración predeterminado; donde el índice de filtración predeterminado es inferior al índice de filtración sin resistencia del filtro; y (3) se aísla una población de células enriquecida en leucocitos CD34⁺. El método puede proporcionar una población de células enriquecida que está sustancialmente libre de componentes sanguíneos no leucocitarios, incluyendo plasma, plaquetas y eritrocitos. La población de células enriquecida por este método puede aumentar el porcentaje de células CD34⁺ entre 2 y 5 veces, aproximadamente un 1% - 5% del material de la leucofóresis y un 10% - 40% de las células en una población de células enriquecida.

Por otra parte, los monocitos aislados tal como se ha descrito anteriormente se pueden cultivar en un medio que contiene M-CSF en un recipiente de cultivo de células no adhesivo, como una bolsa de cultivo de Teflon. El cultivo de los monocitos en M-CSF permite producir un importante número de células CD34⁺. Las poblaciones de células enriquecidas en leucocitos o monocitos anteriormente descritas también se pueden cultivar en presencia de varias otras citoquinas y leucoquinas conocidas en la técnica para inducir la producción de varios otros tipos de células progenitoras. Por ejemplo, la población de células enriquecida en leucocitos y/o monocitos se puede cultivar en presencia de VEGF, bFGF, IGF-1, EGF y suero fetal en una superficie recubierta de fibronectina y desechando las células no adherentes de las células angiogénicas circulantes similares a las endoteliales obtenidas, o los f-Mφ se pueden diferenciar en células epiteliales mediante cultivo en EGF, diferenciarse en células neuronales y endoteliales mediante incubación en NGF o VEGF, respectivamente, o diferenciarse en hepatocitos mediante incubación en presencia de HGF y similares.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A a 1C ilustran realizaciones del dispositivo de filtración de flujo tangencial para la separación de leucocitos y también de monocitos de una muestra de productos sanguíneos. La Figura 1A proporciona una realización del dispositivo para el enriquecimiento de leucocitos donde la cámara de flujo cruzado se encuentra por encima de la cámara de filtración. La Figura 1B ilustra una vista frontal del dispositivo, donde la entrada de la muestra se encuentra por debajo del filtro y el filtrado pasa hacia arriba a través del filtro para el enriquecimiento de monocitos. La Figura 1C es una vista superior del dispositivo ilustrado en la Figura 1B.

La Figura 2 ilustra un ejemplo de filtración de flujo tangencial (TFF) realizada con muestras de productos de la leucoféresis en diversas condiciones. Las muestras de 10 ml de producto de la leucoféresis, diluidas en una proporción de 1:5 en una solución tampón de PBS + heparina + DNasa I se sometieron a TFF utilizando un filtro de 3 micrones con un índice de filtración de 15 ml/min. Se muestra el porcentaje de leucocitos (WBC) en el material retenido (denominado "retenido", barras rayadas) y en el material filtrado (denominado "filtrado", barras negras) tras la TFF. Los índices de recirculación (entrada) para Máx., 10, 9, 8, 7, y 6 correspondieron a 1680, 1380, 1080, 870, y 540 ml/min, respectivamente.

La Figura 3 ilustra los resultados de un estudio de TFF realizado con el producto de la leucoféresis en un dispositivo TFF utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de recirculación (entrada) de 1080 ml/min., a tres índices de filtración diferentes (11, 15, y 19,6 ml/min). Se muestra el porcentaje de leucocitos (denominados "WBC") en el retenido (barras rayadas) y en el filtrado (denominado "filtrado", barras negras).

La Figura 4 ilustra resultados adicionales de la TFF realizada con muestras del producto de la leucoféresis para el estudio que se describe en la Figura 1. Las muestras de 10 ml del producto de la leucoféresis, diluidas a una proporción de 1:5, se sometieron a TFF utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de filtración de 15 ml/min. Se muestra el porcentaje de eritrocitos (denominados "RBC") en el retenido (recuadros rayados) y el filtrado (recuadros negros) tras la TFF. Los índices de recirculación (entrada) para Máx., 10, 9, 8, 7, y 6 correspondieron a 1680, 1380, 1080, 870, y 540 ml/min, respectivamente.

La Figura 5 ilustra resultados adicionales de la TFF realizada con muestras del producto de la leucoféresis para el estudio descrito en la Figura 2. Las muestras de 10 ml del producto de la leucoféresis, diluidas a una proporción de 1:5, se sometieron a TFF utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de recirculación (entrada) de 1080 ml/min, a tres índices de filtración diferentes (11, 15, y 19,6 ml/min). Se muestra porcentaje de eritrocitos (denominados "RBC") del retenido (barras rayadas) y del filtrado (denominado "filtrado", barras negras).

La Figura 6 ilustra un ejemplo de los efectos del incremento de la concentración de material de la leucoféresis en la muestra. Se sometieron a TFF 50 ml de material de la leucoféresis, diluidos a una proporción de 1:5 en PBS + heparina + DNasa I, utilizando un dispositivo con un tamaño de poro del filtro de 3 micrones. Se muestra el porcentaje de eritrocitos (denominados "RBC") y leucocitos (denominados "WBC") en el retenido ("denominado "retenido") como una función del índice de filtración.

La Figura 7 ilustra un ejemplo de la separación del producto de la leucoféresis entre filtros de 3 micrones y 5 micrones tras incrementar el producto de la leucoféresis (120 ml en 1/2 de una unidad entera). El índice de recirculación (entrada) fue de 1680 ml/min y el índice de filtración fue de 15 ml/min. En el caso de la TFF realizada con un filtro de 5 micrones, aproximadamente el 80% de los eritrocitos (denominados "RBC", barras negras) se extrajo del retenido, mientras que se retuvo aproximadamente el 62% de los leucocitos introducidos (denominados "WBC", barras rayadas claras) o más de aproximadamente el 70% de los monocitos introducidos. Por el contrario, utilizando el filtro de 3 micrones, se retuvo aproximadamente el 65% de los leucocitos en el retenido, pero solamente se extrajo el 3% de los eritrocitos.

La Figura 8 ilustra una comparación de la separación del producto de la leucoféresis a través de filtros de aproximadamente 4,5 y 8 micrones, tras aumentar la cantidad del producto de la leucoféresis proporcionado como muestra. El índice de recirculación (entrada) fue de 1680 ml/min y el índice de filtración fue de 15 ml/min. En el caso de la TFF realizada utilizando un filtro de 4,5 micrones, se extrajo aproximadamente el 99% de los eritrocitos (denominados "RBC", barras negras) del retenido, mientras que se retuvo aproximadamente el 90% de los leucocitos introducidos (denominados "WBC", barras rayadas laras). Por el contrario, con el filtro de 8 micrones, se extrajo aproximadamente el 98% de los eritrocitos introducidos, pero solamente se retuvo el 4% de los leucocitos.

La Figura 9 ilustra un ejemplo de la separación con filtros de 4,5 micrones, tras incrementar el producto de la leucoféresis procesado (250 ml o una unidad completa). El índice de recirculación (entrada) fue de 1680 ml/min y el índice de filtración fue de 15 ml/min. En el caso de la TFF realizada con filtros de 4,5 micrones durante 90 minutos con tres productos de la leucoféresis distintos, entre el 80 y el 95% de los eritrocitos se extrajeron del retenido, mientras que se retuvo aproximadamente entre el 80 y el 100% de los monocitos introducidos. Tras la TFF de una muestra de leucoféresis, el retenido también se sometió a ensayo y se averiguó que solamente contenía aproximadamente el 2% de las plaquetas introducidas y el 3% del plasma introducido (denominado Exp 7 en la Tabla 1).

Descripción de las realizaciones específicas

La presente invención establece el uso de dispositivos para el procesamiento de una mezcla heterogénea de componentes de la sangre para obtener una población de leucocitos enriquecida. En un aspecto de la invención, se establece el uso de dispositivos para el enriquecimiento de leucocitos a través de la eliminación selectiva de componentes sanguíneos no leucocitarios, tales como plasma, plaquetas y/o eritrocitos y similares. En otro aspecto, se establece el uso de dispositivos para el enriquecimiento de monocitos mediante la eliminación selectiva de los componentes sanguíneos no monocíticos, incluyendo, por ejemplo, la eliminación de linfocitos, eritrocitos, plaquetas y similares de la muestra.

Una población de leucocitos enriquecida se prepara típicamente a partir de una muestra o una mezcla fluida que contiene componentes sanguíneos. Para los fines del presente, por "componentes sanguíneos" se entenderá cualquier material típicamente presente en la sangre, incluyendo el material típicamente presente tanto en estado sano como de enfermedad. Entre los componentes sanguíneos se incluyen leucocitos y se pueden incluir, por ejemplo, linfocitos, monocitos, eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK) y/o plaquetas, proteínas solubles o insolubles o complejos de proteínas (por ejemplo, enzimas, inmunoglobulinas o complejos de inmunoglobulina-antígeno), otros componentes macromoleculares, tales como lípidos, o cualquier otra parte de la sangre completa que se pueda separar físicamente, con independencia de su composición celular o molecular precisa, incluyendo, por ejemplo, plasma o suero.

La muestra o la mezcla fluida se puede enriquecer parcialmente con leucocitos antes de aplicar los métodos de la presente invención. El término "leucocito" se utiliza de forma intercambiable con el término "glóbulo blanco" ("WBC", por sus siglas en inglés). Estos términos incluyen agranulocitos mononucleares, entre los que se incluyen, por ejemplo, monocitos, precursores de células dendríticas y linfocitos, así como granulocitos polimorfonucleares con núcleo segmentado y gránulos citoplásmicos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos. "Monocito" se refiere a un tipo de leucocitos procedentes de las células mieloides, por lo general de mayor tamaño que los linfocitos, con un núcleo ovoide o en forma de riñón, que contiene típicamente gránulos lisosomales y que expresa típicamente CD14.

En determinados aspectos de la presente invención, los linfocitos son separados de los leucocitos. "Linfocitos" se refiere a las células procedentes de las células progenitoras linfoides e incluye linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK). El término "linfocitos pequeños" se refiere a los linfocitos que tienen aproximadamente 7-8 micrones de diámetro.

Para los fines del presente, el término "población de leucocitos" se refiere a cualquier grupo de células que incluye leucocitos. Una población de leucocitos puede incluir una gran variedad de subtipos de leucocitos o subtipos particulares, como monocitos y/o células precursoras dendríticas monocíticas. Los términos "enriquecimiento", "enriquecer" y "enriquecido" significan que el procesamiento de una muestra de productos sanguíneos, empleando los dispositivos de la presente invención, obtiene una población de células que tiene un mayor porcentaje de leucocitos viables, en relación con otros componentes, que la mezcla inicial (es decir, antes del enriquecimiento). Para los fines del presente, el término "viable" se refiere a un leucocito que es capaz de diferenciación en condiciones de cultivo adecuadas.

Los dispositivos empleados conforme a la presente invención utilizan la filtración de flujo tangencial para enriquecer una población de leucocitos. Los términos "filtración de flujo tangencial" y "filtración cruzada" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a la separación de partículas suspendidas (por ejemplo, células) de una mezcla fluida, incluyendo la separación de partículas de una característica definida (por ejemplo, un rango de tamaño deseado) de una mezcla heterogénea de partículas de la mezcla fluida. Las partículas se separan derivando o haciendo circular la mezcla fluida (por ejemplo, un fluido de muestra) por una cámara de muestra sustancialmente paralela o tangencial a un filtro (por ejemplo, la superficie del filtro que mira hacia el fluido de muestra), típicamente bajo cierta presión positiva, donde la mezcla fluida comprende las partículas concentradas, o leucocitos, que mantienen un flujo tangencial a la superficie de la membrana.

Por lo general, la determinación de las partículas que se eliminan en el "filtrado", es decir, la proporción de fluido que pasa a través del filtro, y las partículas retenidas en el "retenido" dependerá de diversos factores. Entre estos factores se incluyen, por ejemplo, el tamaño del poro del filtro, el índice de entrada, el índice de filtración, la concentración de partículas en la mezcla fluida, la temperatura y la viscosidad de la mezcla fluida. Para los fines del presente, "tamaño del poro" se refiere al tamaño medio de los poros del filtro. "Índice de entrada" se refiere a la velocidad a la que una muestra (por ejemplo, una mezcla fluida) se introduce en la cámara que contiene el filtro. Cuando la muestra recircula en múltiples ocasiones a través de un filtro (por ejemplo, en un dispositivo conforme a la presente invención), el índice de entrada también se denomina "índice de recirculación". "Flujo cruzado" se refiere al flujo sustancialmente paralelo (es decir, paralelo a la superficie del filtro en cualquier dirección) de la mezcla fluida que pasa a través del filtro. "Índice de flujo cruzado" se refiere al índice de flujo de la muestra, o de la mezcla fluida, sobre el filtro y sustancialmente paralelo a este. Por lo general, el índice de flujo cruzado de la mezcla fluida depende de diversos parámetros, incluyendo, por ejemplo, el índice de entrada y el tamaño y la forma de la cámara que contiene el filtro. "Índice de filtración" se refiere al índice de flujo de la mezcla fluida a través del filtro. El índice de filtración para un dispositivo conforme a la presente invención es típicamente inferior al índice de filtración sin resistencia (es decir, de tubo abierto). "Índice de salida" se refiere al índice de salida de la mezcla fluida de la cámara de flujo cruzado, salvo por la mezcla fluida que pasa a través del filtro (es

decir, el filtrado). Por lo general, el índice de salida es igual al índice de entrada menos el índice de filtrado.

Por los fines del presente, el término "filtro" se refiere a cualquier artículo fabricado en cualquier material o combinación de materiales que dispone de una pluralidad de poros para permitir que uno o más componentes (por ejemplo, componentes sanguíneos) de una muestra o mezcla fluida sometida a flujo cruzado a través del artículo pase de un lado a otro del mismo, separando así dichos componentes (por ejemplo, productos sanguíneos no leucocitarios) de otros componentes (por ejemplo, leucocitos). La superficie de un filtro puede tener cualquier área adecuada, como, por ejemplo, entre aproximadamente 42 y 145 mm de diámetro, aunque se pueden utilizar filtros con una superficie mayor y menor. En determinadas realizaciones, solamente se utiliza un filtro en un dispositivo TFF. En otras realizaciones, se pueden utilizar filtros adicionales en el dispositivo TFF.

El filtro típicamente empleado en el dispositivo TFF empleado en la presente invención se puede seleccionar entre una amplia gama de filtros poliméricos orgánicos. Entre estos filtros se incluyen, a título meramente enunciativo, membranas microporosas de nylon, fluoruro de polivinilideno (PVDF), nitrato/acetato de celulosa, polisulfona, policarbonato, polietileno, poliéster, polipropileno y poliamida. También se pueden utilizar otros filtros, como filtros cerámicos y metálicos. Se pueden emplear tanto filtros hidrófilos como hidrófobos, cargados y no cargados. En terminadas aplicaciones pueden ser preferibles los filtros hidrófilos.

Un filtro de la presente invención típicamente comprende un número de poros distribuidos a través de la superficie del filtro. En determinadas realizaciones, el filtro tiene un tamaño de poro con una pequeña variación. Por ejemplo, la variabilidad del tamaño del poro puede ser aproximadamente del +/-20% o encontrarse en un rango de aproximadamente +0 a 20%. En una realización típica, se emplean filtros "nucleopore" u obtenidos por el método de revelado de trazas nucleares ("*track etched*") (por ejemplo, membranas de filtro *track-etched* de policarbonato o polietileno Poxetics® (Osmonics, Minnetonka, MN)). Estos filtros disponen típicamente de una superficie lisa con tamaños de poro estrictamente controlados en el material. Los filtros se preparan típicamente exponiendo una lámina plana de plástico no poroso a una fuente de partículas radiactivas, que tienen una energía suficiente para atravesar la lámina de plástico. A continuación se aumenta el diámetro de las "trazas" mediante exposición a solventes químicos o agentes corrosivos. El tamaño de los poros se puede controlar a través de las condiciones del revelado de trazas nucleares.

La presente invención se beneficia de las diferencias entre los diversos tipos de células sanguíneas para enriquecer los leucocitos (por ejemplo, monocitos, precursores de células dendríticas y similares). Estas diferencias pueden incluir, por ejemplo, diferencias de tamaño, de forma y/o su capacidad de deformación. El tamaño y la capacidad de deformación de las células de la sangre humana típicamente varían en los distintos tipos de células. Los eritrocitos (glóbulos rojos) tienen típicamente la forma de un disco bicóncavo, son enucleados, miden unos 7 micrones de diámetro en su parte central y son relativamente deformables. Los leucocitos polimorfonucleares son típicamente esféricos, también miden unos 7 micrones, pero son menos deformables que los eritrocitos. De las células mononucleares, los linfocitos tiene típicamente entre 7 y 10 micrones, mientras que los monocitos se encuentran normalmente en un rango de 10 a 15 micrones.

En diversas realizaciones, el tamaño del poro del filtro se selecciona para el enriquecimiento de leucocitos y/o para fraccionar los componentes sanguíneos, consiguiendo así el enriquecimiento de los leucocitos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se pueden separar mediante TFF los monocitos que tienen un diámetro nominal de 10 a 1,5 micrones y los eritrocitos que tienen un diámetro nominal de 7 micrones, utilizando un filtro con un tamaño de poro de entre 5 y 5,5 micrones aproximadamente. En una realización concreta, se utilizó un filtro de 4,5 micrones para separar con éxito los monocitos de los demás componentes celulares de una muestra obtenida de la leucoféresis.

El tamaño de poro del filtro se puede encontrar en un rango de entre 3 y 8 micrones aproximadamente o entre 3 y 5 micrones aproximadamente. Un tamaño de poro del filtro en un rango de unos 3 micrones puede retener más leucocitos y retirar los eritrocitos de los leucocitos de forma menos eficaz. Por lo contrario, un tamaño de poro del filtro en un rango de unos 8 micrones puede retirar los eritrocitos de forma más eficaz, aunque incrementa la pérdida de leucocitos en el filtrado. Se puede utilizar un tamaño de poro del filtro de entre 3 y 5,5 micrones aproximadamente para el enriquecimiento de células madre hematopoyéticas CD34⁺.

El enriquecimiento de leucocitos respecto de otros componentes sanguíneos también se puede ver afectado por el índice de entrada, el índice de filtración y/o la concentración de células en la muestra o mezcla fluida. Por ejemplo, los eritrocitos son más deformables que los leucocitos y, por tanto, pueden pasar más fácilmente a través de un tamaño de poro del filtro menor que el diámetro máximo de los eritrocitos (por ejemplo, inferior a 7 micrones). En un ejemplo, específico, los eritrocitos se pueden separar de los leucocitos utilizando filtros con un tamaño de poro de unos 5 micrones. En otras realizaciones, el tamaño de poro del filtro se reduce en unos 3 micrones y la concentración de células se incrementa (supra) para separar de forma eficiente los eritrocitos de los leucocitos.

El enriquecimiento de los leucocitos respecto de otros componentes sanguíneos se puede realizar

también manteniendo un índice de filtración inferior al índice de filtración sin resistencia (es decir, de tubo abierto), bajo el mismo índice de entrada o índice de recirculación. En otras realizaciones, la pérdida de leucocitos del filtrado se puede reducir manteniendo un índice de entrada o recirculación superior al índice de filtración. En algunos ejemplos de realizaciones, el índice de entrada o recirculación puede ser al menos unas cinco veces, al menos unas 10 veces, al menos unas 20 veces, al menos unas 50 veces o al menos unas 100 veces el índice de filtración.

Se puede obtener una muestra, o una mezcla fluida, que comprende diversos componentes celulares para el fraccionamiento celular mediante TFF a partir de diversas fuentes y pueden incluir mezclas de productos sanguíneos en cualquiera de las diversas fases de procesamiento. Por ejemplo, la sangre puede ser de origen humano o no humano. Por otra parte, las mezclas fluidas pueden ser, por ejemplo, sangre completa, diversas diluciones de sangre completa, o sangre completa o una dilución de sangre que haya sido sometida a algún procesamiento, por ejemplo, eliminación del plasma u otros componentes sanguíneos. De este modo, la mezcla fluida puede incluir, por ejemplo, una población de células sanguíneas al menos parcialmente enriquecida en leucocitos.

Los componentes sanguíneos o poblaciones de leucocitos se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen típicamente la recogida de sangre heparinizada, aféresis o leucoféresis, preparación de una capa leucocitaria, roseteo, centrifugación, centrifugación a gradientes de densidad (por ejemplo, FICOLL-HYPAQUE®), PERCOLL®, sacarosa y similares), lisis diferencial de células no leucocitarias, filtración y similares. También se puede preparar una población de leucocitos recogiendo sangre de un sujeto, desfibrinando para eliminar las plaquetas y apartando la mayoría de los glóbulos rojos. La población de leucocitos se puede enriquecer opcionalmente en monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL®.

Opcionalmente, la mezcla fluida que contiene los componentes sanguíneos se puede diluir o concentrar, como convenga. Por ejemplo, en determinadas realizaciones los componentes de la sangre se diluyen en una proporción de 1:2, 1:5, 1:10 o cualquier otra que resulte apropiada. Los componentes de la sangre se pueden diluir, por ejemplo, en soluciones tampón isotónicas (por ejemplo, PBS o solución tampón HEPES), medios de cultivo de tejidos y similares. Típicamente, la muestra de los componentes sanguíneos sometida a TFF presenta una concentración de células de entre 10^6 y 10^8 por ml, aproximadamente

Se pueden obtener poblaciones de células sanguíneas de diversos tipos de sujetos, en función del uso deseado de la población enriquecida en leucocitos. El sujeto puede ser un sujeto sano. Alternativamente, las células sanguíneas se pueden obtener de un sujeto que requiere inmunostimulación, tales como, por ejemplo, un paciente con cáncer u otro paciente para el que la inmunostimulación pueda resultar beneficiosa. Del mismo modo, las células sanguíneas se pueden obtener de un sujeto que requiere inmunosupresión, como, por ejemplo, un paciente con un trastorno autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes, lupus, esclerosis múltiple y similares). También se puede obtener una población de células sanguíneas de un individuo sano con HLA compatible para su administración a un paciente con HLA compatible que lo necesite. Asimismo, se puede obtener una población de células sanguíneas de un individuo al que se le haya administrado un agente movilizador de células madre, como, por ejemplo GM-CSF, G-CSF, AMD3100 (u otro agente que inhiba la función de CXCR-4), o una dosis baja o alta de ciclofosfamida (Delilliers et al., Leuk, Lymphoma 43:1957, 2002) y similares. El individuo puede ser un paciente al que se le administrará una población enriquecida, un familiar o un individuo con HLA compatible.

En determinadas realizaciones, la población enriquecida en leucocitos puede ser recogida en el retenido, mientras que los demás componentes sanguíneos pasan al filtrado. Por ejemplo, para el enriquecimiento de una población en leucocitos (por ejemplo, incluyendo monocitos y linfocitos), otros componentes sanguíneos, como plasma, plaquetas y eritrocitos, se pueden encontrar entre los componentes retirados selectivamente en el filtrado. En otras realizaciones, los linfocitos o pequeños linfocitos se pueden extraer selectivamente y pasar al filtrado.

Los dispositivos empleados conforme a la presente invención ilustrados en las Figuras 1A a 1C comprenden típicamente una cámara de flujo cruzado (3) y una cámara de filtrado (4). Hay un filtro (5) posicionado entre ellas con una superficie que comunica el fluido con la cámara de flujo cruzado (la superficie de retenido y la otra superficie que comunica el fluido con la cámara de filtrado (la superficie de filtrado). La cámara de flujo cruzado, la cámara de filtrado y el filtro comprenden una unidad colectora (1). En una realización, la cámara de flujo cruzado típicamente tiene una capacidad de unos 55 ml y la cámara de filtrado una capacidad de unos 25 ml. Típicamente el diámetro del filtro es sustancialmente el mismo que el diámetro de la cámara de flujo cruzado. En determinadas realizaciones empleadas para demostrar la utilidad de la presente invención, el filtro tiene aproximadamente entre 140 y 143 mm de diámetro.

La mezcla fluida entra en la cámara de flujo cruzado (3) a través de una entrada de fluido (6) que se encuentra típicamente situada adyacente a la superficie de retenido del filtro y de forma que la mezcla fluida (por ejemplo, una muestra) entra en la cámara sustancialmente paralela a la superficie de retenido del filtro. Típicamente, el fluido se retira de la cámara de flujo cruzado (3) a través de una salida de fluido (7), que se encuentra habitualmente en una parte de la cámara de flujo cruzado perpendicular a la

superficie de retenido del filtro. En determinados ejemplos de realizaciones, el diámetro de la entrada de la cámara de flujo cruzado (6) tiene aproximadamente entre 7 mm y 8 mm, y el diámetro de la salida de la cámara de flujo cruzado (7) tiene aproximadamente entre 8 mm y 10 mm. El filtrado se retira a través de una salida (8) de la cámara de filtrado (4).

5 Típicamente, la mezcla fluida se introduce en la cámara de flujo cruzado a un índice de entrada suficiente, de forma que el flujo cruzado de la mezcla fluida a través de la superficie del filtro (superficie de retenido) alcanza una velocidad lo suficientemente alta como para alterar suavemente y mezclar el fluido y las células en la superficie de contacto del filtro, es decir, la capa límite. Para los fines del presente, por "capa límite" se entiende la capa de fluido adyacente a la superficie de retenido del filtro que deja típicamente el fluido que pasa a través del filtro. Esta alteración de la capa límite facilita la filtración eficaz evitando que el material de la superficie de contacto del filtro se una al filtro o se estanque, lo que podría impedir una filtración eficaz. El índice de entrada de la mezcla fluida habitualmente no es suficiente, sin embargo, para causar la lisis de un número sustancial de leucocitos.

10 En determinadas realizaciones, los componentes sanguíneos se pasan a través de la superficie de retenido del filtro, bombeando la mezcla fluida hacia la cámara de flujo cruzado (3). La bomba empleada para impulsar el flujo cruzado de fluido a través del filtro se denomina "bomba de flujo cruzado" o "bomba de recirculación" (14). La bomba de flujo cruzado puede incluir cualquier dispositivo de bombeo que comunica el fluido con la cámara de flujo cruzado (3) suficiente para introducir el flujo de fluido en la cámara y a través del filtro al índice de entrada especificado, sin causar un daño sustancial a las células (por ejemplo, la lisis celular). Una bomba de flujo cruzado adecuada para su uso en la presente invención puede incluir, por ejemplo, una bomba peristáltica, una bomba de pistón, una bomba de diafragma o una bomba de rodillo. Se puede utilizar una bomba peristáltica, por ejemplo, cuando se desea mantener el dispositivo TFF como parte de un sistema "cerrado".

15 La mezcla fluida se bombea típicamente hacia la cámara de flujo cruzado (3) a un índice de entrada superior al índice de filtración. En un ejemplo de realización, el índice de entrada es aproximadamente de 1680 ml/minuto y el índice de filtración es de unos 15 ml/minuto. En otros ejemplos de realizaciones, el índice de entrada es aproximadamente de entre 1600 y 1800 ml/minuto, mientras que el índice de filtración es de entre unos 10 y 20 ml/minuto. El material no leucocitario (por ejemplo, eritrocitos, complejos inmunitarios, proteínas y similares) pasa a través del filtro (5) hacia una cámara de filtrado (4).

20 Como se ha debatido anteriormente, el índice de filtración es típicamente inferior al índice de filtración sin resistencia (es decir, de tubo abierto). El índice de filtración se puede controlar, por ejemplo, reduciendo o limitando el tamaño de la salida de la cámara de filtrado, mediante el uso de un segundo medio de bombeo (por ejemplo, una "bomba de filtración") para limitar el flujo, o similares.

25 La introducción de una mezcla fluida en el dispositivo genera un movimiento en remolino dentro del fluido. Esto se consigue introduciendo la mezcla fluida, por ejemplo sustancialmente paralela a un filtro circular de una cámara de flujo cruzado cilíndrica, a un índice de entrada entre 5 o 10 y hasta 100 veces superior al índice de filtración. El flujo se elimina a través de una salida (7) que se encuentra en la cámara cilíndrica, perpendicular al filtro y típicamente adyacente al centro de la superficie del filtro. Esta disposición provoca un flujo en espiral interior hacia el centro del filtro. Típicamente el flujo no es turbulento ni presenta una velocidad tan elevada como para provocar una lisis sustancial de los leucocitos. Como se ha debatido anteriormente, el flujo también puede "frotar" la superficie del filtro, para evitar la adherencia o el estancamiento en la capa límite. Al calibrar el índice de entrada de forma que sea elevado (por ejemplo, al menos unas cinco veces superior) con respecto al índice de filtración, la población enriquecida en leucocitos resultante puede presentar al menos aproximadamente un 20% o al menos aproximadamente un 40% o más de leucocitos.

30 En otro ejemplo de realización, se recircula el retenido para incrementar la eficacia de la separación. Por ejemplo, una mezcla fluida que comprende componentes sanguíneos se puede introducir en la cámara de flujo cruzado y, a continuación, se puede extraer el retenido a través de la salida de fluido (7) de la cámara de flujo cruzado a otra cámara, como, por ejemplo, una cámara desde la que el fluido se suministró inicialmente (una "unidad de recuperación" (2)). La mezcla fluida de la unidad de recuperación se puede reintroducir entonces en la unidad de flujo cruzado. Al conectar la unidad de recuperación (2) y la unidad colectora (1) en "forma de bucle", se puede conseguir la recirculación y filtración continuas de la mezcla fluida. Alternativamente, el retenido se puede extraer a través de la salida de fluido (7) de la cámara de flujo cruzado (3) y reintroducirse directamente en la entrada de la cámara de flujo cruzado (es decir, sin pasar por una unidad de recuperación ni por otra cámara). La mezcla fluida se puede pasar a través de la unidad de flujo cruzado durante cualquier periodo adecuado de tiempo. En determinadas realizaciones, se puede recircular la mezcla fluida entre unos 5 y unos 60 minutos, o más, a fin de conseguir el enriquecimiento o la pureza de células leucocitarias deseada.

35 En otra realización más, se puede ajustar el volumen de la mezcla fluida añadiendo una solución tampón, una solución de lavado u otra solución (denominadas colectivamente "líquido de reemplazo"). La solución de lavado se puede combinar, por ejemplo, con una mezcla fluida en una unidad de recuperación (por ejemplo, a través de una entrada de la solución (13)), en una unidad colectora, en una bomba (14), en un tubo que sale de la unidad colectora o que se dirige a la misma, o en cualquier otro lugar conveniente. Por

tanto, las células del retenido se pueden enriquecer y lavar en la misma operación. Típicamente, la solución de lavado es isotónica con las células. Las soluciones tampón y de lavado adecuadas pueden incluir diversas soluciones tampón (por ejemplo, solución tampón de fosfatos (PBS) o solución tampón HEPES), medios para el cultivo de tejidos y similares.

5 En determinadas realizaciones, las poblaciones de células son enriquecidas en una población de leucocitos en un sistema cerrado y aséptico. Para los fines del presente, los términos "sistema cerrado y aséptico" o "sistema cerrado" se refieren a un sistema en el que se minimiza la exposición a condiciones no estériles, ambiente, con circulación de aire u otras condiciones no estériles. Por lo general, los sistemas cerrados para el enriquecimiento de poblaciones de células excluyen la centrifugación en tubos
10 abiertos por la parte superior, la transferencia de células al aire libre, el cultivo de células en placas de cultivo de tejidos o matraces no herméticos y similares. El conjunto del sistema de filtración, incluyendo, por ejemplo, cualesquiera contenedores de células, incubadoras, recipientes para el cultivo de tejidos u otros aparatos para el procesamiento celular (infra) se puede mantener como un sistema "cerrado". En una realización típica, el sistema cerrado permite el enriquecimiento en leucocitos y, opcionalmente, la
15 transferencia desde un recipiente colector inicial a un recipiente para el cultivo de tejidos hermético, sin exposición a una atmósfera no estéril. Típicamente, en un sistema cerrado se utiliza una bomba peristáltica (Figura 1A y 1C (15)).

En otro aspecto de la invención, una mezcla heterogénea de componentes sanguíneos es sustancialmente enriquecida en leucocitos mediante la eliminación selectiva de la mezcla de los
20 componentes sanguíneos no leucocitarios, incluyendo, por ejemplo, plaquetas, eritrocitos y similares. Para los fines del presente, el término "sustancialmente enriquecida" significa que la población de células recuperada en el retenido, después del número de ciclos de recirculación deseado, contiene al menos aproximadamente un 20% o al menos aproximadamente un 40% o al menos aproximadamente un 60% del tipo de célula deseado (por ejemplo, leucocitos). En otras realizaciones, una mezcla heterogénea de
25 componentes sanguíneos es enriquecida en leucocitos para formar una población enriquecida en leucocitos sustancialmente libre de componentes sanguíneos no leucocitarios. Para los fines del presente, el término "sustancialmente libre" significa que la población enriquecida en leucocitos comprende al menos un 50% de leucocitos.

En un ejemplo de realización de este aspecto de la presente divulgación, el dispositivo TFF comprende
30 una cámara de flujo cruzado (3) con una capacidad de unos 55 ml y una cámara de filtrado (4) con una capacidad de unos 25 ml. Además el dispositivo comprende lo siguiente: un tamaño de poro del filtro de entre aproximadamente 1 y 10 micrones, o aproximadamente 2 y 8 micrones, o aproximadamente 3 y 5 micrones; un índice de entrada de entre aproximadamente 1600 y 1800 ml/min; un índice de filtración de entre aproximadamente 12 y 17 ml/min, y un diámetro del filtro de aproximadamente 142 mm. La mezcla
35 fluida inicial tiene típicamente una concentración de células de aproximadamente al menos 10^7 células por ml (por ejemplo, leucocitos y otras células).

En otro aspecto de la divulgación, una mezcla heterogénea de componentes sanguíneos es sustancialmente enriquecida en monocitos mediante la eliminación selectiva de componentes sanguíneos no monocíticos, incluyendo, por ejemplo, la eliminación de linfocitos de la mezcla. Para los fines del
40 presente, los términos "eliminación selectiva" o "eliminación de forma selectiva" y "eliminando de forma selectiva" se refieren a la eliminación preferente de un tipo de célula y el enriquecimiento en otro tipo de célula. En un ejemplo de realización del presente aspecto, el dispositivo TFF comprende una cámara de flujo cruzado (3) con una capacidad de aproximadamente 55 ml y una cámara de filtrado (4) con una capacidad de aproximadamente 25 ml. Además, el dispositivo comprende lo siguiente: un tamaño de poro
45 del filtro de aproximadamente entre 3 y 8 micrones, o aproximadamente entre 3 y 5 micrones; un índice de entrada de aproximadamente entre 1.600 y 1.800 ml/min, un índice de filtración de aproximadamente entre 12 y 17 ml/min, y un diámetro del filtro de unos 142 mm. Típicamente, la mezcla fluida inicial tiene una concentración de células de al menos unas 10^7 células por ml (por ejemplo, monocitos y otras células). En esta realización, el dispositivo se utilizó de manera invertida.

50 **Cultivo, expansión y diferenciación de poblaciones de células enriquecidas**

Tras el enriquecimiento de una población de células en leucocitos como se ha descrito supra, opcionalmente los leucocitos se pueden cultivar para que mantengan su viabilidad, incrementar el número de células y/o diferenciar las células en otro tipo de célula. Entre los recipientes para el cultivo de tejidos adecuados se incluyen, por ejemplo, matraces para el cultivo de tejidos, bolsas, placas, biorreactores
55 (incluyendo un fermentador) y similares.

En un ejemplo de realización, la población enriquecida en leucocitos se puede cultivar en un sistema cerrado y aséptico, como un biorreactor, una bolsa para el cultivo de tejidos y similares. El sistema cerrado puede tener una entrada y/o salida para la introducción o extracción controlada y aséptica de fluidos (por ejemplo, medios para el cultivo de tejidos, soluciones tampón de lavado), gases, células y
60 similares.

En otro ejemplo de realización, se puede transferir una población enriquecida en leucocitos a un biorreactor. El biorreactor puede estar dotado de entradas y/o salidas apropiadas para la introducción de células, gas estéril (por ejemplo, oxígeno, dióxido de carbono y/o aire), medios para el cultivo de tejidos y

similares. El biorreactor también puede disponer de medios para el control de la temperatura. Típicamente el biorreactor se utiliza a unos 37°C. También puede incluir medios para agitar las células y/o el medio de cultivo en su interior. Los medios de agitación pueden incluir, por ejemplo, una pala o filtro de rotación (que también puede funcionar como salida para los medios).

- 5 En otro ejemplo de realización, se puede transferir una población enriquecida en leucocitos a un sistema cerrado, como una bolsa para el cultivo de tejidos. Entre las bolsas para el cultivo de tejidos adecuadas se incluyen, por ejemplo, los contenedores de cultivo STERICELL® (Nexell Therapeutics Inc.) o las bolsas de cultivo TEFLUN® (American Fluoroseal Corp.) El sistema cerrado puede tener cualquier tamaño o capacidad adecuada, tal como apreciará un experto en la técnica. Entre los volúmenes adecuados se incluyen, por ejemplo, entre unos 0,01 litros y unos 5 litros, o entre unos 0,01 litros y unos 0,05 litros, aunque también resulta posible emplear capacidades mayores o inferiores sin desviarse del ámbito de aplicación de la presente invención.

- 10 En determinadas realizaciones, de acuerdo con la presente invención, opcionalmente las poblaciones de células enriquecidas en leucocitos (por ejemplo, incluyendo monocitos, precursores de células dendríticas monocíticas, células madre hematopoyéticas CD34⁺ u otras células precursoras) se pueden cultivar y diferenciar mediante la adición de un agente de inducción apropiado para obtener células de un determinado tipo concreto, incluyendo, por ejemplo, células dendríticas inmaduras o maduras, macrófagos f, células precursoras o células madre hematopoyéticas CD34⁺ u otras células precursoras. Entre los medios para el cultivo de tejidos adecuados se incluyen, por ejemplo, AIM-V, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15™ y similares. El medio para el cultivo de tejidos se puede complementar, si se desea, con aminoácidos, vitaminas, citoquinas, como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y/o interleuquina 4 (IL-4), cationes divalentes y similares, con el objeto de promover la diferenciación de las células en células dendríticas inmaduras, por ejemplo. Una combinación de citoquinas típica es la formada por unas 500 unidades/ml de GM-CSF y de IL-4.

- 15 La población enriquecida en leucocitos se puede cultivar durante cualquier periodo de tiempo adecuado. En determinadas realizaciones, los tiempos de cultivo adecuados para la diferenciación de las células en células dendríticas inmaduras pueden ser de entre unos cuatro y siete días. La diferenciación en células dendríticas inmaduras a partir de los precursores se puede controlar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, por la presencia o ausencia de marcadores de superficie celulares (por ejemplo, CD14, CD11c⁺, CD83¹⁰, HLA-DR⁺). Las células dendríticas inmaduras también se pueden cultivar en un medio para el cultivo de tejidos apropiado, a fin de expandir la población de células y/o mantener las células dendríticas inmaduras en un estado para su posterior diferenciación o absorción de antígeno, procesamiento y presentación. Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras se pueden mantener en presencia de GM-CSF e IL-4.

- 20 En determinadas realizaciones, las células dendríticas inmaduras son preferibles para la presentación de antígeno óptima, debido a que conservan su capacidad para procesar un nuevo antígeno (véase, por ejemplo, Koch et al., J Immunol. 155: 93-100, 1995.) Por lo contrario, en el caso de las células dendríticas maduras (por ejemplo, CD14⁻, CD11c⁺, CD83⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺), aquellas células que han estado expuestas a antígeno y lo han procesado y han estado expuestas a agentes de maduración apropiados pierden típicamente su capacidad para procesar eficazmente nuevos antígenos.

- 25 Durante el cultivo, opcionalmente las células dendríticas inmaduras pueden ser expuestas a un antígeno predeterminado. Entre los antígenos predeterminados adecuados se puede incluir cualquier antígeno para la presentación a linfocitos T (por ejemplo, para la activación, estimulación de la proliferación, inducción de anergia y similares). En una realización, las células dendríticas inmaduras se cultivan en presencia de un antígeno asociado a un tumor, como, por ejemplo, el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (por ejemplo, para la inmunoterapia para el cáncer y/o la inhibición del crecimiento del tumor). Otros antígenos pueden incluir, por ejemplo, antígenos bacterianos y virales, antígenos específicos o asociados a un tumor (por ejemplo, lisado de células tumorales, preparación de la membrana de células tumorales, antígenos aislados de tumores, proteínas de fusión, liposomas y similares) y cualquier otro antígeno. Tras el contacto con el antígeno, las células se pueden cultivar durante cualquier periodo de tiempo apropiado, para permitir la absorción y el procesamiento del antígeno, para expandir la población de células dendríticas específicas de antígeno y similares. Las células dendríticas inmaduras también se pueden madurar a células dendríticas maduras que presentan antígeno, en el contexto de moléculas del MHC. Esta maduración se puede realizar, por ejemplo, mediante cultivo en presencia de factores de maduración, tales como citoquinas (por ejemplo, TNF-alfa), productos bacterianos (por ejemplo, BCG) y similares.

- 30 En otro aspecto más de la invención, una mezcla heterogénea de componentes sanguíneos es sustancialmente enriquecida en células precursoras dendríticas monocíticas. Tras el enriquecimiento de una población de células en leucocitos o monocitos, tal como se ha descrito supra, los precursores de células dendríticas monocíticas, como los de la sangre periférica, se pueden aislar de la población enriquecida, mediante adherencia selectiva a un sustrato (por ejemplo, un sustrato de unión a precursores de células dendríticas monocíticas). Este sustrato se puede proporcionar, por ejemplo, en un matraz o placa de cultivo. Alternativamente, se puede utilizar un sustrato que presenta un elevado ratio de área de la superficie/volumen, como un sustrato particulado o fibroso, tal y como se divulga en WO 03/010292.

- Los precursores de células dendríticas monocíticas pueden ser monocitos que se adhieren selectivamente al sustrato para formar complejos de precursores de células dendríticas monocíticas y sustrato, mientras que otros leucocitos se mantienen sin unirse ("no adherentes"). Los leucocitos unidos son posteriormente separados de los leucocitos no unidos para formar una población de células enriquecida en precursores de células dendríticas monocíticas sobre el sustrato. Los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden cultivar y diferenciar sobre el sustrato o pueden ser eluidos del sustrato y posteriormente cultivados y diferenciados por separado, a fin de obtener células dendríticas presentadoras de antígeno inmaduras y/o maduras. Según este aspecto, opcionalmente los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden aislar y diferenciar en un sistema cerrado y aséptico.
- Según otro aspecto, se pueden emplear células dendríticas expuestas a un antígeno predeterminado para activar los linfocitos T *in vitro* o *in vivo* frente al antígeno. Opcionalmente, las células dendríticas se pueden utilizar inmediatamente después de la exposición al antígeno para estimular los linfocitos T. Alternativamente, las células dendríticas se pueden mantener en presencia de una combinación de citoquinas (por ejemplo, GM-CSF e IL-4) antes de la exposición a antígeno y linfocitos T. En una realización concreta, se utilizan células dendríticas humanas para estimular los linfocitos T humanos *in vitro* o *in vivo*.
- Los linfocitos T o un subconjunto de linfocitos T se pueden obtener a partir de diversos tejidos linfoides. Entre estos tejidos se incluyen, a título meramente enunciativo, el bazo, los nódulos linfáticos y la sangre periférica. La purificación de linfocitos T se puede conseguir, por ejemplo, mediante selección positiva o negativa, incluyendo, a título meramente enunciativo, el uso de anticuerpos dirigidos a CD2, CD3, CD4, CD5, y/o CD8.
- Los linfocitos T se pueden cultivar conjuntamente con células dendríticas expuestas al antígeno predeterminado, como una población de linfocitos T heterogénea o como un subconjunto de linfocitos T purificado. Por ejemplo, se pueden cultivar conjuntamente linfocitos T CD8⁺ con células dendríticas expuestas a antígeno para obtener CTL específico de antígeno. En determinadas realizaciones, la eliminación temprana de linfocitos T CD4⁺ puede impedir el sobrecrecimiento de células CD4⁺ en un cultivo heterogéneo de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. Alternativamente, se pueden cultivar conjuntamente poblaciones heterogéneas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T con células dendríticas para obtener una respuesta específica a un antígeno que comprende tanto una respuesta citotóxica como inmune a TH.
- Opcionalmente, estos linfocitos T estimulados se pueden volver a infundir en los sujetos. (Véase, por ejemplo, Riddle and Greenberg, J. Antimicrobial Chemotherapy 45:35-43, 2000; Correale et al., J. Neuroimmunology 107:130-39, 2000.) Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con un antígeno (por ejemplo, PSMA) y madurarse para formar células dendríticas maduras. Los linfocitos T pueden ser aislados de un sujeto, ponerse en contacto con células dendríticas maduras *ex vivo* para, a continuación, administrárselas de nuevo al sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar dosis de unos 1×10^7 a 5×10^9 linfocitos T CD8⁺ a un sujeto semanalmente, o cada dos semanas, durante un periodo de 1-4 meses, o más. Alternativamente, las células dendríticas maduras se pueden administrar directamente al sujeto. Típicamente, se utilizan aproximadamente 1×10^7 células dendríticas por administración y paciente.
- Típicamente, un producto de la leucoféresis de un donante tratado con un agente movilizador de células madre comprende entre aproximadamente un 1 y un 5% de células, entre aproximadamente un 5 y un 20% de granulocitos, entre aproximadamente un 40 y un 60% de linfocitos, alrededor de aproximadamente un 10 y un 25% de monocitos con cantidades significativas de glóbulos rojos y plaquetas. El uso de un dispositivo TFF de la presente invención con un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente entre 3 y 5,5 micrones proporciona una población enriquecida en leucocitos que comprende aproximadamente entre un 60 y un 70% de monocitos, casi ningún granulocito, aproximadamente un 14% de linfocitos y aproximadamente entre un 10 y un 40% de células CD34⁺. Esta población enriquecida en leucocitos se puede utilizar como se expone más adelante.
- En otras realizaciones, los métodos de la presente divulgación se utilizan para obtener un subconjunto de células distintas de monocitos o precursores de células dendríticas monocíticas. Por ejemplo, se puede utilizar una población enriquecida en leucocitos como fuente de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, trasplante alogénico o autólogo. En determinadas realizaciones de la divulgación, la población enriquecida en leucocitos es posteriormente enriquecida en células madre, tras el procedimiento de separación por flujo tangencial. Los métodos para el enriquecimiento en células madre hematopoyéticas a partir de una fuente de leucocitos de sangre periférica son conocidos en la técnica y se pueden adaptar para su uso con una población enriquecida en leucocitos aislados tal y como se describe en el presente. Por ejemplo, una población enriquecida en leucocitos se puede enriquecer posteriormente en células CD34⁺, utilizando, por ejemplo, técnicas de separación inmunomagnética (véase, por ejemplo, Rowley et al., Bone Marrow Transplant. 21:1253, 1998 ; Denning-Kendall et al., Br. J. Haematol 105:780, 1999). Por otra parte, para incrementar más los rendimientos de células madre, una población enriquecida en monocitos tras la TFF descrita en la presente divulgación se puede cultivar en presencia de, por ejemplo, unos 50 ng/ml de M-CSF en un medio que contiene suero fetal para obtener células CD34⁺. El cultivo se debe realizar en un recipiente para el cultivo de células no adhesivo, como una bolsa de cultivo de TEFLON®. Por otra parte, los donantes de sangre periférica se pueden someter a un régimen de

movilización de células madre, antes de la extracción de la sangre periférica y de la separación de los leucocitos mediante TFF. Son varios los agentes movilizadores conocidos en la técnica para incrementar la eficacia del cultivo de células madre. Por ejemplo, los donantes se pueden tratar con GM-CSF, G-CSF, AMD3100 (u otro agente que inhiba la función de CXCR-4), y/o agentes quimioterapéuticos movilizadores, como, por ejemplo, una dosis alta o baja de ciclofosfamida (véase, por ejemplo, Deliliers et al., *Leuk Lymphoma*, 43:1957, 2002). El donante de sangre puede ser el paciente que va a recibir el trasplante, un familiar cercano, un individuo con HLA compatible o similares.

En otra realización, los métodos de la presente divulgación también son utilizados para obtener un subconjunto de células diferentes de células madre, como, por ejemplo, una población de células enriquecida en células progenitoras (por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas o endoteliales) o células que secretan un factor de interés (por ejemplo, factores de crecimiento angiogénicos o hematopoyéticos). Por ejemplo, las células progenitoras endoteliales circulantes (CEP) se pueden identificar como un subconjunto de las células CD34⁺ circulantes mediante, por ejemplo, expresión conjunta de VEGFR-2 y AC133 (así como, por ejemplo, cadherina VE y selectina E). (Véase, por ejemplo, Peichev et al., *Blood* 95:952, 2000 .) Una población enriquecida en leucocitos se puede enriquecer también en CEP, utilizando, por ejemplo, técnicas de separación inmunomagnética con anticuerpos dirigidos a VEGFR-2 y AC133. Por otra parte, los CEP se pueden movilizar antes de la TFF mediante tratamiento con citoquinas, tales como VEGF (véase, por ejemplo, Gill et al., *Circ Res.*, 88:167, 2001). Además, en otras realizaciones de la divulgación se obtienen células angiogénicas circulantes (CAC) similares a las endoteliales (que secretan, por ejemplo, VEGF, HGF, G-CSF, y GM-CSF) cultivando una población enriquecida en leucocitos con, por ejemplo, VEGF, bFGF, IGF-1, EGF, y FBS sobre una superficie recubierta con fibronectina y, a continuación, descartando las células no adherentes (véase, por ejemplo, Rehman et al., *Circulation* 107:1164, 2003).

Por otra parte, la población enriquecida en leucocitos se puede cultivar para inducir la expansión de células madre o progenitores pluripotentes. Por ejemplo, las células madre CD34⁺ se pueden expandir mediante cultivo con factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como, por ejemplo, una combinación de IL-1, IL-3, IL-6, factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF) y G-CSF (véase, por ejemplo, Sun et al., *Haematologica* 88:561, 2003). Alternativamente, por ejemplo, se puede tratar una población enriquecida en monocitos con, por ejemplo, M-CSF, LIF y/o IL-6, con el objeto de obtener "macrófagos" pluripotentes (f-M ϕ), que morfológicamente recuerdan a los fibroblastos y que, a diferencia de los macrófagos estándar, presentan elevados niveles de CD34 (véase Zhao et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100:2426, 2003.) Los progenitores o células madre se pueden tratar posteriormente con diversas citoquinas y factores de crecimiento, a fin de inducir la diferenciación en líneas hematopoyéticas o no hematopoyéticas.

En otras realizaciones de la divulgación, se puede cultivar una población enriquecida en leucocitos en determinadas condiciones adecuadas para inducir la diferenciación (por ejemplo, diferenciación de células progenitoras o transdiferenciación de tipos de células más diferenciados, como, por ejemplo, monocitos o células dendríticas obtenidas de monocitos). (Para los fines del presente, por "transdiferenciación" se entiende un proceso de modulación fenotípica de una célula diferenciada, por lo general sin necesidad de ninguna división celular, por la que la célula diferenciada se diferencia en un tipo de célula morfológica y/o funcionalmente diferente.) Por ejemplo, además de la diferenciación en células dendríticas, los monocitos se pueden transformar en otros tipos de células hematopoyéticas o no hematopoyéticas, incluyendo, por ejemplo, macrófagos, osteoclastos y células similares a las endoteliales, dependiendo de las condiciones de cultivo (véase, por ejemplo, Becker et al., *J Immunol.* 139:3703, 1987 ; Nicholson et al, *Clin Sci.* 99:133, 2000 ; Havemann et al., en *Novel Angiogenic Mechanisms: Role of Circulating Progenitor Endothelial Cells* 47-57 (Nicanor I. Moldovan eds., 2003)). En una realización, una población enriquecida en monocitos o células dendríticas obtenidas de monocitos es transdiferenciada en células similares a las endoteliales, mediante cultivo con, por ejemplo, VEGF, bFGF, IGF-1, hidrocortisona y FCS sobre una superficie recubierta de fibronectina. (Véase Havemann et al., *supra.*) Además, una población enriquecida en leucocitos se puede cultivar en condiciones que inducen la diferenciación de subconjuntos de células relativamente no diferenciadas (por ejemplo, células madre y progenitores pluripotentes) en líneas de células hematopoyéticas o no hematopoyéticas, utilizando diversas citoquinas o factores de crecimiento. Por ejemplo, se puede inducir la diferenciación de células madre pluripotentes obtenidas de monocitos (f-M ϕ) en macrófagos estándar, linfocitos T, células epiteliales, células neuronales, células endoteliales o hepatocitos, mediante tratamiento con LPS, IL-2, EGF, NGF, VEGF, o HGF, respectivamente. (Véase Zhao et al., *supra.*) Esta diferenciación se puede inducir antes o después de la expansión celular, por ejemplo, la anteriormente descrita

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo de diversos aspectos de la invención y no se deberá considerar que limitan su alcance en modo alguno. Cualquier ejemplo no perteneciente al ámbito de aplicación de las reivindicaciones se ofrece exclusivamente con fines comparativos.

Ejemplo 1: Dispositivo TFF con unidad colectora y unidad de recuperación en configuración de bucle

Este ejemplo comprende una configuración que dispone de una unidad colectora (1) y una unidad de recuperación (2) en una configuración de bucle del dispositivo de filtración de flujo tangencial. (Figura 1A)

La unidad colectora incluía una cubierta con dos cámaras (una cámara de flujo cruzado (3) y una cámara de filtrado (4)), separadas por un filtro microporoso (5) (142 mm de diámetro) con un tamaño de poro de aproximadamente entre 1 y 10 micrones. La cámara de flujo cruzado incluía una entrada de fluido (6) y una salida de fluido (7). La cámara de filtrado incluía una salida de filtrado (8). La unidad de recuperación incluía una cubierta (9) que incluía una entrada de retorno (10), una salida de retorno (11), una entrada de muestra (12) y una entrada de la solución (13). En determinadas realizaciones, la entrada de la muestra y la entrada de la solución son la misma, aunque pueden estar separadas. La muestra (por ejemplo, sangre, preparados de sangre o una población preparada de leucocitos) se introdujo en la unidad de recuperación por la entrada de la muestra (12) y se extrajo a través de la salida de retorno (11) a la unidad colectora mediante la actuación de una bomba de recirculación (14). La muestra se introdujo en la unidad colectora a través de la entrada del fluido (6) y fluyó a través de la membrana microporosa (5), de forma que el movimiento del fluido se dirigía tangencialmente a la dirección de filtración. Por lo general, la entrada del fluido (6) estaba posicionada perpendicularmente al radio del filtro. Los índices relativos de entrada, filtración y salida indujeron un movimiento en remolino, cuyo centro extrajo los componentes de la preparación de la sangre que no atravesaron el filtro hacia la salida del fluido (7) y de vuelta a la unidad de recuperación (2). El flujo de fluido entre la unidad de recuperación y la unidad colectora se controló mediante la bomba de recirculación (14). La extracción del filtrado de la unidad colectora se controló mediante una bomba de filtrado (15).

Ejemplo 2: Retención de leucocitos tras la TFF: Efectos del índice de recirculación y del índice de filtración sobre la eficacia de la retención

En este ejemplo, se demostró el enriquecimiento en leucocitos utilizando un dispositivo TFF como el descrito en el Ejemplo 1, que contenía membranas de poliéster de 142 mm. Una muestra del producto de la leucoféresis se sometió a TFF en un dispositivo en diversas condiciones y se evaluó la retención selectiva de leucocitos. En un conjunto de estudios, la TFF se realizó con 10 ml de producto de la leucoféresis utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de filtración de 15 ml/min (durante 17 min) y a diversos índices de recirculación (entrada) (por ejemplo, 1.680, 1.380, 1.080, 870, y 540 ml/min). Por lo general, la mayoría de los leucocitos se retuvieron en el retenido (es decir, menos de aproximadamente el 10% de los leucocitos en el filtrado), a menos que el índice de recirculación fuese inferior a 1080 ml/min (Figura 2; nota: los índices de recirculación reales correspondientes designados Máx, 10, 9, 8, 7, y 6 fueron 1680, 1380, 1080, 870, and 540 ml/min, respectivamente).

En otra serie de estudios, la TFF se realizó con 10 ml de producto de la leucoféresis en el dispositivo TFF del Ejemplo 1, utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de recirculación (entrada) de 1080 ml/min a tres índices de filtración diferentes (11, 15, y 19,6 ml/min) Se recogieron unos 250 ml de filtrado por estudio. Ni el índice de filtración de 19,6 ml/min ni el de 11 ml/min fueron sustancialmente más beneficiosos que el índice de filtración de 15 ml/min para la retención de leucocitos (Figura 3).

Ejemplo 3: Eliminación selectiva de eritrocitos del producto de la leucoféresis

En este ejemplo, se demostró la eliminación selectiva de eritrocitos y los efectos del índice de recirculación, el índice de filtración y la concentración de la muestra sobre la eficacia de la separación utilizando el dispositivo TFF del Ejemplo 1. Las muestras del producto de la leucoféresis se sometieron a TFF en las condiciones establecidas en el Ejemplo 2 y se evaluó la eliminación selectiva de eritrocitos. Al igual que en el Ejemplo 2, la TFF se realizó con 10 ml de producto de la leucoféresis, utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de filtración de 15 ml/min (durante 17 minutos) y a diversos índices de recirculación (entrada) (por ejemplo, 1680, 1380, 1080, 870, y 540 ml/min). Se determinó que, por lo general, la reducción del índice de recirculación favorecía el paso de un mayor número de eritrocitos al filtrado (Figura 4, nota: los índices de recirculación reales correspondientes para Máx, 10, 9, 8, 7, y 6 fueron 1680, 1380, 1080, 870, y 540 ml/min, respectivamente). Se puede apreciar que, a pesar de que al descender el índice de recirculación aumentó la eliminación de eritrocitos del retenido, a un índice de recirculación inferior a 1.080 ml/min se redujo el rendimiento de leucocitos en el retenido (Figura 4).

Al igual que en el Ejemplo 2, la TFF se realizó con 10 ml de producto de la leucoféresis en el mismo dispositivo TFF, utilizando un filtro de 3 micrones, con un índice de recirculación (entrada) de 1080 ml/min a tres índices de filtración diferentes (11, 15 y 19,6 ml/min). Se recogieron unos 250 ml de filtrado por estudio. Ni el índice de filtración de 19,6 ml/min ni el de 11 ml/min fueron sustancialmente más beneficiosos que el índice de filtración de 15 ml/min para la eliminación selectiva de eritrocitos (Figura 5). El índice de filtración de 19,6 ml/min redujo los eritrocitos en el retenido en mayor medida que el de 15 ml/min, aunque, tal como se puede apreciar en el Ejemplo 2, el índice de filtración de 15 ml/min proporcionó un mayor rendimiento de leucocitos en el retenido (Figura 3).

Con respecto a la Figura 6, también se estudió el efecto de incrementar la concentración de material de la leucoféresis en la muestra. Cincuenta mililitros (50 ml) de material de la leucoféresis, diluidos en una proporción de 1:5 de PBS + heparina + DNasa I, se sometieron a TFF utilizando un dispositivo con un filtro que tenía un tamaño de poro de 3 micrones. El porcentaje de eritrocitos (designado "RBC) en el retenido fue más o menos el mismo, aproximadamente el 100% de la entrada, cuando el índice de filtración era de unos 15 ml/min o 19,6 ml/min. Sin embargo, cuando los 50 ml de producto de la leucoféresis se diluyeron en una proporción de 1:2 de la misma solución tampón, solamente se retuvo el 40% de los eritrocitos

introducidos en el retenido, lo que demuestra que la carga de mayores concentraciones en la muestra también puede promover la separación de eritrocitos de los leucocitos (designados "WBC").

Ejemplo 4: Eliminación selectiva de eritrocitos del producto de la leucoféresis: Efecto del tamaño del poro sobre la eliminación de eritrocitos

5 Para confirmar que la realización del dispositivo TFF presentada en el Ejemplo 1 obtendría unos resultados similares a niveles superiores, se comparó la TFF de 120 ml de producto de la leucoféresis (1/2 de una unidad entera) en dispositivos que contenían filtros con un tamaño de poro de 3 micrones y 4,5 micrones. El índice de recirculación (entrada) fue de 1680 ml/min y el índice de filtración fue de 15 ml/min. Con respecto a la Figura 7, en la TFF realizada utilizando un filtro de 4,5 micrones se eliminó aproximadamente el 80% de los eritrocitos (denominados "RBC", barras negras) del retenido, mientras que se retuvo aproximadamente el 62% de los leucocitos introducidos (designados "WBC", barras rayadas claras), o más de aproximadamente el 70% de los monocitos introducidos. Por el contrario, utilizando el filtro de 2 micrones, se retuvo en el retenido aproximadamente el 65% de los leucocitos introducidos, pero solamente se eliminó el 3% de los eritrocitos.

15 Con respecto a la Figura 8, la TFF de 45 ml de producto de la leucoféresis se comparó en dispositivos que tenían filtros con un tamaño de poro de 4,5 micrones frente a los de 8 micrones. El índice de recirculación (entrada) fue de 1680 ml/min, el índice de filtración fue de 15 ml/min y el tiempo fue de 60 minutos. En el caso de la TFF realizada utilizando un filtro de 4,5 micrones, aproximadamente el 99% de los eritrocitos (designados "RBC", barras negras) se eliminó del retenido, mientras que se retuvo aproximadamente el 90% de los leucocitos introducidos (designados "WBC", barras rayadas claras). En el caso del filtro de 8 micrones, se eliminó aproximadamente el 98% de los eritrocitos introducidos, pero solamente se retuvo el 4% de los leucocitos, lo que demuestra que el uso de un filtro de 4,5 micrones promovió una eliminación de eritrocitos equivalente a la del filtro con un tamaño de poro de 8 micrones, aunque se produjo una mayor retención de leucocitos (designados "WBC").

25 **Ejemplo 5:** Enriquecimiento selectivo de leucocitos con eliminación de plaquetas y plasma

En este ejemplo, se sometieron a TFF las muestras del producto de la leucoféresis en el dispositivo que se describe en el Ejemplo 1 a diversas condiciones y se evaluó la eliminación selectiva de plaquetas y plasma. Con respecto a la Tabla 1, experimentos 1 a 6, se sometieron 45 ml de producto de la leucoféresis a TFF con un tamaño de poro del filtro de 4,5 micrones o de 8 micrones, siendo el índice de recirculación (índice de entrada) de 1690 o 1880 ml/min y el índice de filtración de 15 ml/min. La filtración se realizó durante 60 o 90 minutos, según lo indicado. Tras la TFF, el retenido se sometió a ensayo para determinar la presencia de leucocitos, plaquetas y plasma. En todos los experimentos, entre aproximadamente el 2 y el 100% de las plaquetas introducidas y entre aproximadamente el 97 y el 99% del plasma introducido se eliminaron del retenido, con independencia del tamaño de poro (4,5 micrones u 8 micrones), del índice de recirculación (entrada) (1690 o 1880 ml/min), y del tiempo (60 min o 90 min) En el caso del experimento 7, se sometió un producto completo de la leucoféresis (250 ml) a TFF utilizando un tamaño de poro de 4,5 micrones, un índice de recirculación (entrada) de 1690 ml/min y un índice de filtración de 15 ml/min, durante 90 minutos. Tras la TFF se sometió a ensayo el retenido y se concluyó que contenía aproximadamente el 84% de los leucocitos introducidos, pero solamente el 2% de las plaquetas introducidas y el 3% del plasma introducido.

Tabla 1: Efecto del tamaño de los poros del filtro sobre la retención de PBMC

	Entrada de leucoféresis	Poro Tamaño	Índice de recirculación	Tiempo	% Entrada de WBC en retenido	% Entrada de plaquetas en retenido	% Entrada de plasma en retenido
Exp 1	45 ml	4,5 µm	1690ml/min	60 mm	88	2,0	2,0
Exp 2	45 ml	4,5 µm	1690 ml/min	60 min	67	8,0	20
Exp 3	45ml	4,5 µm	1690 ml/min	60 min	79	3,0	1,0
Exp 4	45 ml	4,5 µm	1888ml/min	60 min	92	0,0	1,0
	45 ml	8 µm	1888 ml/min	60 min	4	0,0	1,0
Exp 5	45 ml	4,5 µm	1690 ml/min	60 min	130	3,0	3,0
	45 ml	4,5 µm	1880 ml/min	60min	47	3,0	2,0
Exp 6	45 ml	4,5 µm	1690 ml/min	60 min	80	1,0	2,0
	45 ml	4,5 µm	1690 ml/min	90 min	72	0,2	2,0
Exp 7	250 ml	4,5 µm	1690 ml/min	90 min	84	2,0	30

Estos experimentos demuestran que la TFF elimina la mayor parte de las plaquetas y el plasma con múltiples tamaños de poro (4,5 micrones u 8 micrones), índices de recirculación (entrada) (1690 o 1880 ml/min), volúmenes de la muestra de leucofóresis (45 ml a 250 ml) y tiempos (60 min a 90 min).

5 **Ejemplo 6:** Enriquecimiento selectivo en leucocitos de productos de la leucofóresis enteros

Para confirmar que esta realización del dispositivo TFF obtendría unos resultados reproducibles utilizando unos volúmenes de muestra mayores, se utilizó un dispositivo TFF designado dispositivo 5X con 250 ml de producto de la leucofóresis (una unidad entera), utilizando un filtro con un tamaño de poro de 4,5 micrones, un índice de recirculación de 1680 ml/min y un índice de filtración de 15 ml/min y se comparó con el volumen inferior introducido. Con respecto a la Figura 9, la TFF se realizó durante 90 minutos con tres productos de la leucofóresis distintos y en días diferentes. Entre el 80 y el 95% de los eritrocitos se eliminó del retenido y se retuvo entre aproximadamente el 80 y el 100% de los monocitos introducidos. Tras la TFF de Exp 1 en la Figura 9, el retenido también se sometió a ensayo y se concluyó que contenía aproximadamente tan solo el 2% de las plaquetas introducidas y el 3% del plasma introducido (designado Exp 7 en la Tabla 1). Estos datos demostraron que la TFF puede enriquecer en leucocitos de forma reproducible y preferiblemente eliminar los eritrocitos, las plaquetas y el plasma del retenido.

Ejemplo 7: Dispositivo TFF para enriquecer selectivamente en monocitos una preparación de sangre

Además del enriquecimiento en leucocitos, se testó el enriquecimiento selectivo en monocitos de preparaciones de sangre utilizando un aparato de TFF. Esta realización concreta del dispositivo comprendía una configuración invertida ("tipo IV") diseñada para modificar la dinámica del flujo, alterando la dirección de la fuerza gravitacional a través de la membrana (Figura 1C). Se sometieron 235 ml de producto de la leucofóresis a TFF durante 90 minutos, utilizando un filtro con un tamaño de poro de 4,5 micrones, un índice de recirculación (entrada) de 1.680 ml/min y un índice de filtración de 15 ml/min. Tras 60 minutos de TFF, con el objeto de incrementar el filtrado efectivo, el volumen no válido se redujo a unos 120 ml. La muestra introducida, el retenido y el filtrado se sometieron a ensayo para determinar el contenido celular. Mientras que la muestra introducida contenía un 32% de monocitos y un 65% de linfocitos, se averiguó que el retenido contenía aproximadamente un 71% de monocitos frente a un 22% de linfocitos. El filtrado contenía un 15% de monocitos frente a un 83% de linfocitos. (Véase la Tabla 2)

Tabla 2: Enriquecimiento de monocitos utilizando la configuración de TFF de tipo IV (invertida)

	Entrada	Retenido	Filtrado
Nº monocitos.(x 10 ⁹)	2,85	1,37	0,861
Nº linfocitos (x 10 ⁹)	5,67	0,428	4,86
Nº granulocitos (x 10 ⁹)	0,133	0,0571	0,0797
Nº RBC (x10 ⁹)	64,6	1,37	78,9
Nº WBC (x10 ⁹)	8,78	1,93	5,86
% Monocitos	32,46	71,1	14,7
% Linfocitos	64,54	22,17	82,88
% Granulocitos	0,0151	2,96	1,36
No lisados (x 10 ⁹)	73,4	3,30	84,8

Ejemplo 8: Generación de células dendríticas a partir de células aisladas mediante TFF.

En este ejemplo, la población de células que se aisló y purificó mediante TFF se cultivó en condiciones estándar para la maduración de células dendríticas a partir de precursores de células dendríticas monocíticas. La población de células aisladas mediante TFF contenía aproximadamente un 58,6% de monocitos, un 22% de linfocitos y un 12,5% de granulocitos. Esta mezcla de células se introdujo en una bolsa para el cultivo de tejidos en medios X-Vivo15 y 500 U de IL-4 y de GM-CSF. Después de cinco días, se recogió aproximadamente el 50% de las células, se tiñó para detectar los marcadores DC y se analizó mediante citometría de flujo. El otro 50% aproximadamente de las células se expuso a agentes de maduración, BCG (2,8 x 10⁵ pfu/ml) e IFN γ (1000 U/ml). Después de 24 h también se recogieron y analizaron esas células de la misma manera. La Tabla 3 muestra los resultados de estos análisis. Los valores proporcionados representan el porcentaje de células positivas entre las células dendríticas, es decir tras la captura de las células grandes.

Tabla 3. Detección de marcadores de superficie celular sobre células dendríticas inmaduras y maduras.

Marcador	Dendríticas inmaduras (% positivo)	Dendríticas maduras (% positivo)
CD14	10	2
CD11c	99	96
CD1a	70	69
CD80	75	74
CD83	7	34
CD86	90	89
CD54 ¹	100	98
MHC II¹	56	72

- 5 Estos marcadores demuestran un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) entre las células positivas después de la maduración.

Basándose en los parámetros de la dispersión frontal y la dispersión lateral del análisis de la citometría de flujo, se determinó que la población de células dendríticas inmaduras contenía aproximadamente el 71% de DC vivas, el 21% de los linfocitos y el 7% de otras células (fundamentalmente células muertas de origen desconocido). La población de células dendríticas maduras contenía un 61% de DC vivas, un 21% de linfocitos y un 15% de otras células. Estos resultados demostraron que los monocitos purificados directamente del material de la leucoféresis mediante TFF se pueden convertir eficazmente en DC utilizando condiciones de cultivo estándar para la maduración de las células dendríticas.

Ejemplo 8: Aislamiento de monocitos sobre gránulos de vidrio

15 Una población enriquecida en leucocitos es aislada mediante TFF conforme a cualquiera de los ejemplos anteriores. Durante la TFF, la solución tampón es sustituida por medios AIM-V (Gibco-Life Science) que contienen un 1% de plasma autólogo inactivado por calor (medios de unión). Los gránulos de vidrio (20 gramos) se preparan mediante un doble lavado en medios de unión y posteriormente se colocan en una jeringa de 60 ml dotada de un material sinterizado para retener los gránulos a fin de que formen un lecho de columna. (Alternativamente, se pueden utilizar gránulos microportadores Plastic Plus (gránulos de copolímero de estireno tratado de SoloHill Engineering, Inc.) o gránulos microportadores HilleX (gránulos de copolímero de estireno de SoloHill Engineering, Inc.). A continuación, se retiran los medios de unión del lecho de columna por flujo por gravedad. La población enriquecida en leucocitos de la TFF se aplica a la columna y se recoge cualquier flujo resultante. Se añaden medios de unión para proporcionar una pequeña capa de líquido por encima del lecho de columna. La columna con las células se incuba a 37°C durante 30 minutos.

Tras la incubación, se abre el puerto de la columna y se recoge el flujo resultante. A continuación, se lava el lecho de columna en seis ocasiones con medios de unión (35 ml/lavado) administrados y retirados varias veces a través del puerto de la columna, para permitir una suave resuspensión de los gránulos. Estos lavados van seguidos de dos lavados con solución tampón de fosfato ("PBS"). Se obtuvieron los recuentos de células para todos los lavados y el flujo original, y se analizaron utilizando los parámetros de dispersión frontal y dispersión lateral de la citometría de flujo (FACS) para determinar el porcentaje de monocitos presente. Tras completar los lavados, los monocitos unidos se eluyeron de los gránulos utilizando PBS/0,4 % EDTA (en peso), seguido de un lavado más con PBS. Las células que se obtienen en estas fracciones son analizadas de la misma manera que en los lavados. Las fracciones ricas en monocitos se agrupan.

Ejemplo 9: Diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos eluidos de gránulos de vidrio

Los monocitos se lavan en dos ocasiones con 30 ml de PBS y se resuspenden en medios de cultivo (X-VIVO 15 (Biowhittaker Corp.) con 500 U de GM-CSF/ml y 500 U de interleuquina 4/ml). Una parte (2/3) de la suspensión de células es transferida posteriormente a un biorreactor giratorio (Synthecon) y se cultiva durante 6 días a 37°C en un entorno humidificado conteniendo un 5% de CO². Tras el cultivo, la población de células comprende aproximadamente un 70% de células dendríticas inmaduras, en base al tamaño de las células, su granularidad y los marcadores de la superficie celular.

Ejemplo 10: Activación de células dendríticas inmaduras con antígeno prostático específico

45 Los monocitos son aislados de un paciente con cáncer de próstata, tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Los monocitos se cultivan en bolsas para el cultivo de tejidos en medios de cultivo

para tejidos X-VIVO 15 complementados con GM-CSF e interleuquina 4 (500 U/ml de cada) durante seis días a 37°C. A continuación, las células dendríticas inmaduras resultantes se exponen a antígeno prostático específico (PSMA) (aislado tal y como se describe en la Patente estadounidense nº 5.788.963) añadido a los medios de cultivo. Después las células dendríticas inmaduras se diferencian para formar células dendríticas maduras utilizando un agente de maduración. Las células dendríticas maduras (activadas) se añaden a un ensayo de proliferación de linfocitos T. Los cultivos de linfocitos T son incubados en una incubadora humidificada a 37°C complementada con un 5% de CO₂ durante cinco días, antes de añadir 1 µCi ³H-timidina/por pocillo de una placa de microtitulación. Tras una incubación durante 24 horas, las células se recogen en una cosechadora de células semiautomática (Skatron, Stevina, Va.) y se determina la radiactividad de las células cosechadas. Se evalúa la proliferación de linfocitos T mediante la medición de la incorporación media de ³H-TdR.

Ejemplo 11: Capacidad de las células dendríticas maduras cultivadas para presentar antígeno

Para evaluar la capacidad de las células dendríticas maduras cultivadas para presentar antígeno y estimular linfocitos T autólogos del mismo paciente, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos T, tal y como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 10). En estos experimentos se seleccionó el toxoide tetánico como antígeno representativo, con el fin de determinar si los linfocitos T de memoria de los pacientes se pueden activar *in vitro*. Los linfocitos T autólogos cultivados con las células dendríticas del paciente y el toxoide tetánico proliferarán a niveles significativamente mayores que los niveles de partida (en ausencia de células dendríticas) y a unos niveles significativamente mayores que los linfocitos T cultivados con células dendríticas maduras (activadas) sin toxoide tetánico (es decir, mostrando una reacción leucocitaria mixta autóloga). Por tanto, la presentación de toxoide tetánico por las células dendríticas resulta útil para la proliferación de linfocitos T.

Ejemplo 12: Estimulación de linfocitos T autólogos

Las células dendríticas maduras (activadas) específicas para el cáncer de próstata se utilizaron para estimular los linfocitos T autólogos de un paciente con cáncer de próstata. Se utilizó un lisado celular crudo de células LNCaP, una línea de células de cáncer de próstata metastásico, como antígeno del cáncer de próstata representativo en un ensayo de proliferación de linfocitos T, descrito en términos generales en la Patente USA nº 5.788.963. Se observó un incremento significativo en la incorporación de ³HTdR cuando se incluyeron tanto células dendríticas maduras activadas como lisados de LNCaP en los cultivos de linfocitos T.

Ejemplo 13: Administración de linfocitos T autólogos estimulados a un sujeto

Los linfocitos T se prepararon mediante leucoféresis de un sujeto. Los linfocitos T se pusieron en contacto con células dendríticas maduras activadas. Las células dendríticas maduraron después de entrar en contacto con un lisado celular crudo de células LNCaP, una línea de células de cáncer de próstata metastásico. Tras el contacto, los linfocitos T y las células dendríticas se cultivaron y expandieron. Los linfocitos T activados y expandidos se administraron al sujeto a una dosis aproximada de entre 10⁷ y 5 x 10⁹ células por dosis.

Ejemplo 14: Conversión de monocitos en células madre CD34⁺

El porcentaje de células CD34⁺ en la sangre periférica es extremadamente bajo, oscilando aproximadamente entre un 0,01% y un 0,1%. Las células CD34⁺ fueron reconocidas como el tipo de células necesario para el trasplante de la función hematopoyética. Los monocitos se pueden aislar de la sangre periférica, utilizando el dispositivo y los métodos anteriormente descritos, produciendo entre 1 y 2 X 10⁹ monocitos. A continuación, estas células se pueden cultivar en 50 ng/ml de M-CSF en un medio conteniendo suero fetal bovino para obtener células CD34⁺. Los cultivos se deben realizar en un entorno no adhesivo, como las bolsas de cultivo de TEFLON®. Los cultivos en matraces para el cultivo de tejidos estándar fabricados en poliestireno no evolucionan a células CD34⁺. El análisis de las células grandes del cultivo reveló que las células CD34⁺ se encontraban en el rango de tamaño más grande.

Tabla 4. Expresión de CD34 sobre monocitos tras cultivo en M-CSF

	Porcentaje de células CD34 ⁺
Cultivo en bolsa de cultivo	21
Captura de células grandes	58
Cultivo en matraz	6
Captura de células grandes	11

Las células CD34⁺ preparadas con este método se pueden utilizar en trasplantes para reconstituir la médula ósea del receptor o se pueden cultivar posteriormente en presencia de otras citoquinas con el fin de generar células endoteliales para su uso en el tratamiento, por ejemplo, del infarto de miocardio y

similares.

Los ejemplos proporcionados en el presente se ofrecen con miras a ilustrar, sin carácter limitador, el ámbito de aplicación de la invención reivindicada. Otras variantes de la invención resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y están incluidas en las reivindicaciones adjuntas.

5

REIVINDICACIONES

- 1.Un dispositivo de filtración de flujo tangencial para preparar una población de células enriquecida en leucocitos, eliminando de forma selectiva componentes sanguíneos como el plasma, las plaquetas y eritrocitos, que se compone de:
- 5 una unidad colectora (1) que dispone de una cámara de flujo cruzado cilíndrica (3) y una cámara de filtrado (4) separada por un filtro circular (5) dispuesto entre ellas, donde el filtro (5) comunica el fluido con la cámara de flujo cruzado (3) y la cámara de filtrado (4);
- el diámetro del filtro es sustancialmente igual al diámetro de la cámara de flujo cruzado;
- 10 la cámara de flujo cruzado cilíndrica (3) tiene una entrada (6) y una salida (7), donde la entrada (6) se encuentra adyacente a la superficie de retenido del filtro para introducir una muestra de componentes sanguíneos que contiene leucocitos en la cámara de flujo cruzado (3) y en paralelo a la superficie de retenido del filtro (5); y la salida (7) se encuentra adyacente al centro del filtro (5) y perpendicular a la superficie de retenido del filtro (5);
- 15 una bomba (14) para bombear el fluido hasta la cámara de flujo cruzado (3) a través de la entrada (6) y configurada para introducir el fluido en la cámara de flujo cruzado cilíndrica a una velocidad entrada de entre 5 y 100 veces la velocidad de filtración;
- donde esta disposición hace que el flujo de fluido entre en espiral hacia el centro del filtro generando un remolino en el fluido y el filtro (5), que tiene un tamaño de poro medio de entre 3 y 8 micrones, de forma
- 20 que el flujo de la muestra que pasa a través del filtro (5) enriquece la muestra de componentes sanguíneos en leucocitos.
- 2.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 1 que comprende también:
- una unidad de recuperación (2) que comprende una entrada (10) y una salida (11), la cámara de flujo cruzado (3) y la unidad de recuperación (2) se encuentran interconectadas en forma de bucle, donde la
- 25 entrada (6) de la cámara de flujo cruzado comunica el fluido con la salida (11) de la unidad de recuperación, y la salida (7) de la cámara de flujo cruzado comunica el fluido con la entrada (10) de la unidad de recuperación.
- 3.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 2, donde la unidad de recuperación comprende asimismo una entrada de la muestra (12) y una entrada de lavado (13).
- 30 4.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 3 que comprende asimismo una fuente de fluido de sustitución que comunica el fluido con la entrada de lavado (13).
- 5.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 4, donde el fluido de reemplazo es una solución tampón isotónico o medios de cultivo de tejidos.
- 35 6.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende también un dispositivo de procesamiento celular que comunica el fluido con la unidad colectora.
- 7.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 6, donde el dispositivo de procesamiento celular contiene gránulos.
- 8.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 6 o 7, donde el dispositivo de procesamiento celular comprende un medio para el cultivo de una población de células enriquecida en leucocitos.
- 40 9.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 8, donde el medio para el cultivo comprende:
- un recipiente que contiene un primer puerto y un segundo puerto;
- un sustrato que se adhiere a los precursores de células dendríticas monocíticas, que comunica el fluido con el primer puerto y el segundo puerto;
- 45 un tamiz para retener el sustrato en el recipiente y que tiene un tamaño de poro suficiente para permitir el paso de los precursores de células dendríticas monocíticas y células dendríticas;
- una línea de drenaje que comunica el fluido con el primer puerto y una línea colectora que comunica el fluido con el primer puerto.
- 10.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 9 que comprende asimismo una pluralidad de fuentes de fluido que comunican el fluido con el primer puerto o el segundo puerto.
- 50 11.El dispositivo de conformidad con las reivindicaciones 9 o 10 que comprende asimismo un recipiente de cultivo de tejidos cerrado y adaptado para recibir de asépticamente los precursores de las células dendríticas monocíticas.
- 12.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 11, donde el recipiente de cultivo de tejidos cerrado es una bolsa de cultivo, un matraz o un biorreactor.

- 13.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde las fuentes de fluido comprenden medios aglutinantes, solución tampón de lavado y solución tampón de elución.
- 14.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 que comprende asimismo una bomba que comunica el fluido con la pluralidad de fuentes de fluido y el primer puerto.
- 5 15.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende también un medio de control de temperatura para mantener el sustrato a una temperatura predeterminada.
- 16.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 15, donde el medio de control de temperatura es un calentador.
- 10 17.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el tamaño de poro del filtro es de entre unos 3 y 7 micrones, o de entre unos 3 y unos 5,5 micrones.
- 18.El dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende también una fuente de componentes sanguíneos que comunica el fluido con la entrada de la cámara de flujo cruzado.
- 15 19.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 18, donde la fuente de componentes sanguíneos es un dispositivo de leucoféresis.
- 20.Un dispositivo de flujo tangencial de conformidad con la reivindicación 1 para enriquecer una muestra de componentes sanguíneos con leucocitos, donde el dispositivo comprende un medio para reducir la velocidad de filtración (15) a través del filtro; y
donde el filtro (5) tiene un tamaño de poro de entre 3 y 7 micrones.
- 20 21.El dispositivo de conformidad con la reivindicación 20, que comprende también un medio para proporcionar una concentración predeterminada de células sanguíneas en la muestra, donde la concentración predeterminada de células sanguíneas es de 10^7 a 10^{10} células por milímetro.
- 22.El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde la cámara de flujo cruzado se encuentra por encima del filtro y la cámara de filtrado.
- 25 23.El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde la cámara de flujo cruzado se encuentra por debajo del filtro y la cámara de filtrado.
- 24.Un método para separar leucocitos de una muestra de componentes sanguíneos de un sujeto, donde la muestra contiene leucocitos, y el método consiste en lo siguiente:
- 30 (i)introducir la muestra en una unidad colectora (1) del dispositivo como la mencionada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, a través de una entrada (6) de la unidad colectora;
- (ii)someter la muestra a flujo cruzado de forma sustancialmente paralela a un filtro (5) que tiene un tamaño de poro de entre unos 3 y 8 micrones;
- (iii)someter el fluido a filtración a través del filtro (5); y
- 35 (iv)eliminar de forma selectiva los componentes sanguíneos no leucocitarios de la muestra para formar una población de células enriquecida en leucocitos.
- 25.El método de acuerdo con la reivindicación 24, que consiste también en lo siguiente:
preparar la muestra del sujeto por leucoféresis, centrifugación por densidad, lisis diferencial, filtración o preparación de una capa leucocitaria para su introducción en la unidad colectora (1).
- 40 26.El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25, donde los componentes sanguíneos no leucocitarios incluyen plasma, plaquetas y/o eritrocitos.
- 27.El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, que consiste asimismo en repetir los pasos (i), (ii) y (iii) al menos dos veces para formar la población de células enriquecida en leucocitos.
- 28.El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde la población de células enriquecida comprende al menos un 20% de leucocitos o al menos un 60% de leucocitos.
- 45 29.El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, que consiste asimismo en lavar la población de células enriquecida en leucocitos con una solución de lavado.
- 30.El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, que consiste asimismo en preparar precursores de células dendríticas monocíticas de la población de células enriquecida en leucocitos.
- 50 31. El método de conformidad con la reivindicación 30, donde el aislamiento de precursores de células dendríticas monocíticas consiste en lo siguiente:
poner en contacto un sustrato que se adhiere a los precursores de células dendríticas monocíticas con la población de células enriquecida en leucocitos;

permitir que los precursores de células dendríticas monocíticas de la población de células se adhieran de forma reversible al sustrato para formar complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas y sustrato;

- 5 separar los complejos de los leucocitos no adherentes para obtener complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas; y
- cultivar los precursores de células dendríticas monocíticas para la diferenciación de los precursores que forman células dendríticas inmaduras o maduras.
- 32.El método de conformidad con la reivindicación 31, donde los precursores de células dendríticas monocíticas se eluyen del sustrato antes de proceder al cultivo o se cultivan sobre el sustrato.
- 10 33. El método de conformidad con la reivindicación 32, donde el sustrato comprende vidrio, poliestireno, plástico o microgránulos de poliestireno recubiertos de vidrio.
34. Un método para enriquecer una muestra de componentes sanguíneos en leucocitos, que consiste en:
- 1)introducir la muestra en un dispositivo de filtración de flujo tangencial (TFF), como el mencionado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21;
- 15 2)hacer recircular la muestra a través de la unidad TFF a una velocidad de entrada predeterminada y a una velocidad de filtración predeterminada, siendo la velocidad de entrada predeterminada al menos cinco veces superior a la velocidad de filtración predeterminada, y donde la velocidad de filtración predeterminada es inferior a la velocidad de filtración sin resistencia del filtro; y
- 3)aislar una población de células enriquecida en leucocitos.
- 20 35. El método de conformidad con la reivindicación 34, donde la población de células enriquecida se encuentra sustancialmente libre de componentes sanguíneos no leucocitarios.
36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, que consiste también en lo siguiente:
- extraer sangre de un sujeto y preparar la muestra de sangre mediante leucoféresis, centrifugación por densidad, lisis diferencial, filtración o preparación de una capa leucocitaria.
- 25 37. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, donde los componentes sanguíneos no leucocitarios incluyen plasma, plaquetas y/o eritrocitos.
- 38.El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, donde la población de células enriquecida comprende aproximadamente al menos un 20% de leucocitos o al menos un 60% de leucocitos.
- 30 39. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 38, que consiste asimismo en lavar la población de células enriquecida con una solución de lavado.
40. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, que consiste asimismo en preparar células dendríticas a partir de la población de células enriquecida.
- 35 41. El método de conformidad con la reivindicación 40, donde las células dendríticas se preparan como sigue:
- poner en contacto un sustrato que se adhiere a los precursores de células dendríticas monocíticas con la población de células enriquecida;
- 40 permitir que los precursores de células dendríticas monocíticas de la población de células enriquecida se adhieran de forma reversible al sustrato para formar complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas y sustrato;
- separar los complejos de los leucocitos no adherentes para obtener complejos que comprenden precursores de células dendríticas monocíticas; y
- cultivar los precursores de células dendríticas monocíticas para la diferenciación de los precursores en células dendríticas inmaduras o maduras.
- 45 42. El método de conformidad con la reivindicación 41, donde el sustrato comprende vidrio, poliestireno, plástico o microgránulos de poliestireno recubiertos de vidrio.
43. El método de conformidad con las reivindicaciones 41 o 42, que consiste también en aislar las células dendríticas inmaduras o maduras.
- 50 44. El método de conformidad con la reivindicación 37, donde los monocitos se cultivan con citoquinas que promueven la diferenciación de monocitos en células dendríticas.
45. El método de conformidad con la reivindicación 44, donde las citoquinas son GM-CSF, GM-C-SF e IL-4.
- 46.El método de conformidad con las reivindicaciones 44 o 45, donde las células dendríticas maduran

para ser células dendríticas maduras.

47. El método de conformidad con la reivindicación 45, donde las células dendríticas se cultivan con un antígeno en condiciones conducentes al procesamiento del antígeno para formar células dendríticas cargadas de antígeno.

- 5 48. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 47, donde el filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente entre 3 y 5,5 micrones.
49. El método de conformidad con la reivindicación 48, donde los leucocitos comprenden células CD34+.
50. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 o 49, donde la muestra de componentes sanguíneos procede de un donante que ha sido tratado con al menos un agente movilizador de células madre.
- 10 51. El método de conformidad con la reivindicación 50, donde el agente movilizador de células madre es G-CSF o ciclofosfamida.
52. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 a 51, que consiste asimismo en el enriquecimiento de los leucocitos en células CD34+.
- 15 53. El método de conformidad con la reivindicación 52, donde el enriquecimiento de leucocitos en células CD34+ comprende el uso de un anticuerpo anti-CD34 conjugado con gránulos magnéticos.
54. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 a 53, que consiste también en la expansión de las células CD34+ *ex vivo*.
- 20 55. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 a 51, que consiste asimismo en la preparación de células madre pluripotentes obtenidas de monocitos a partir de la población de células enriquecida en leucocitos.
56. El método de conformidad con la reivindicación 55, que consiste asimismo en inducir la diferenciación de un progenitor o célula madre.
- 25 57. El método de conformidad con la reivindicación 48, que consiste asimismo en inducir la transdiferenciación de una célula diferenciada.
58. El uso de un dispositivo de filtración de flujo tangencial de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para preparar una población de células enriquecida en leucocitos mediante la eliminación selectiva de componentes sanguíneos como plasma, plaquetas y eritrocitos.

30

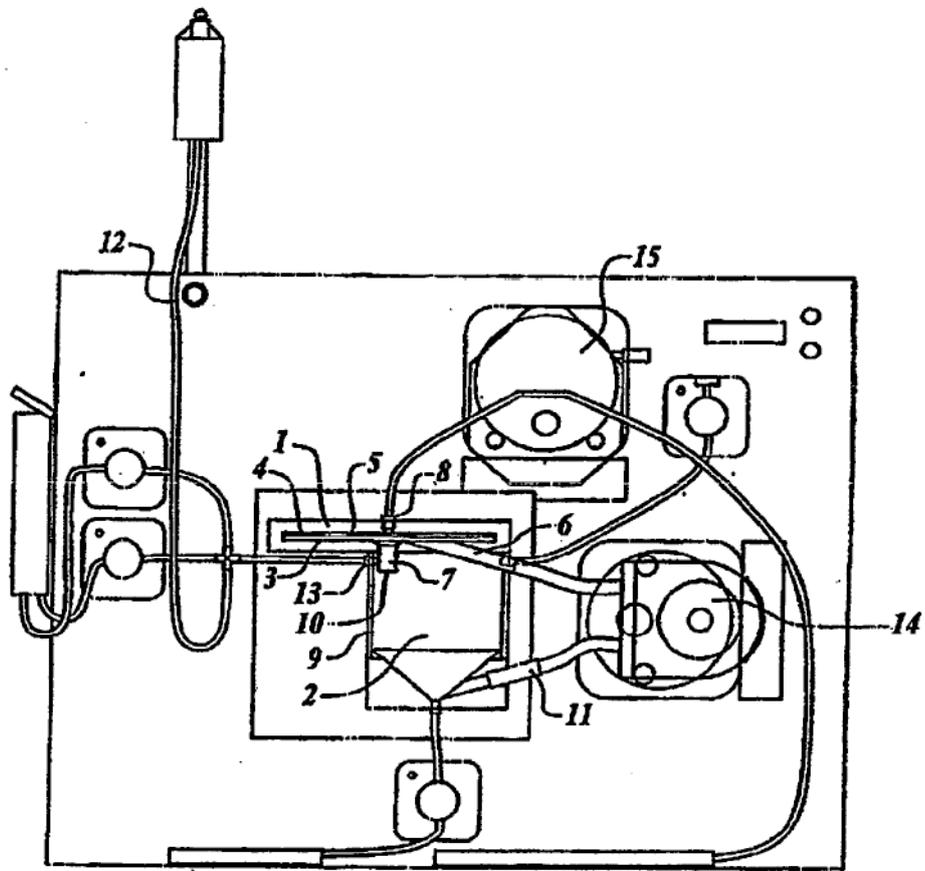


Figura1B

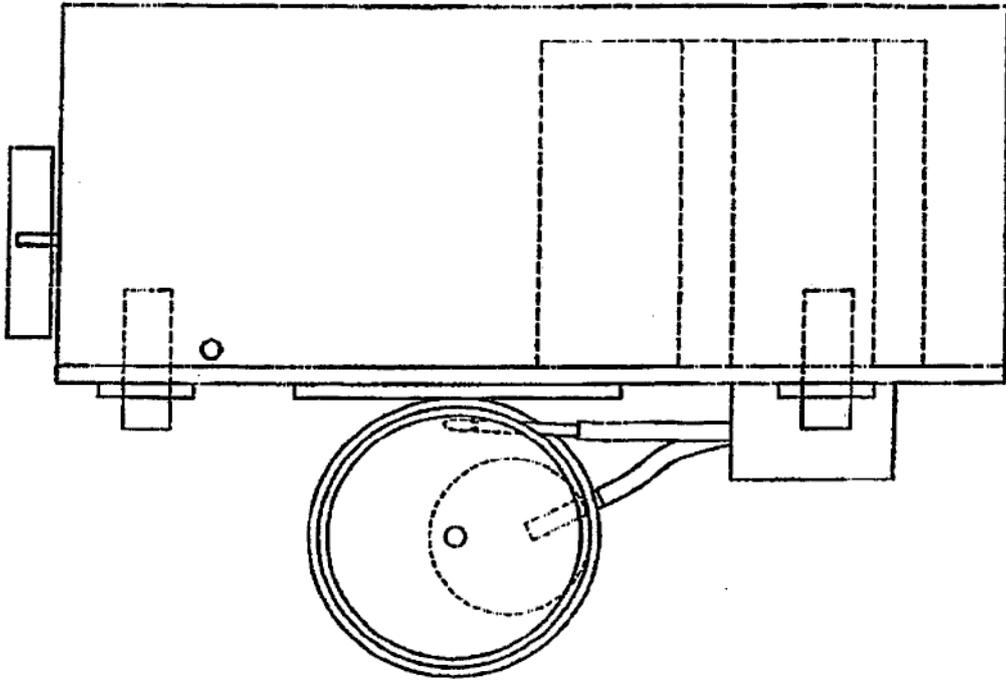


Figura 1C

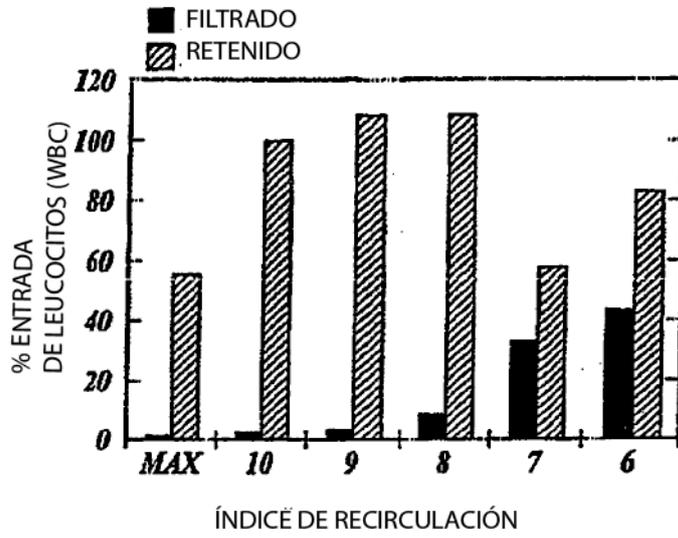


Figura 2

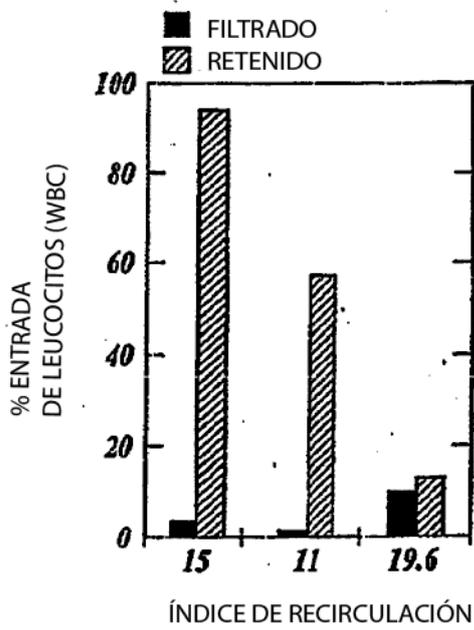


Figura 3

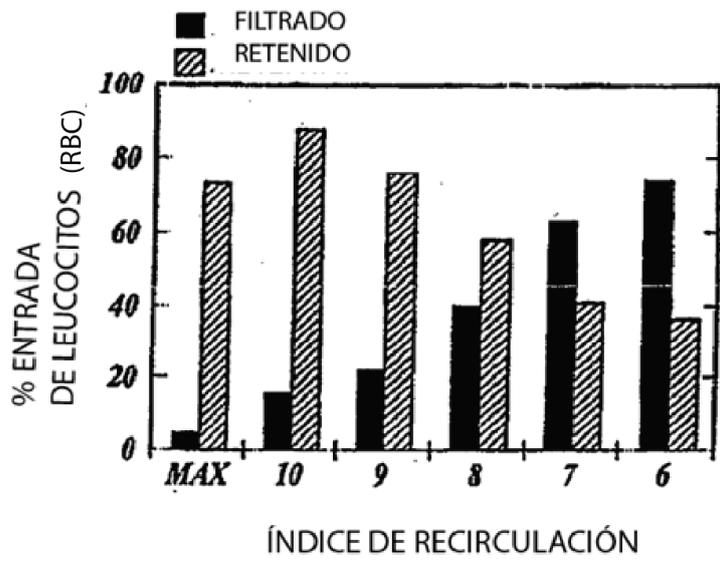


Figura 4

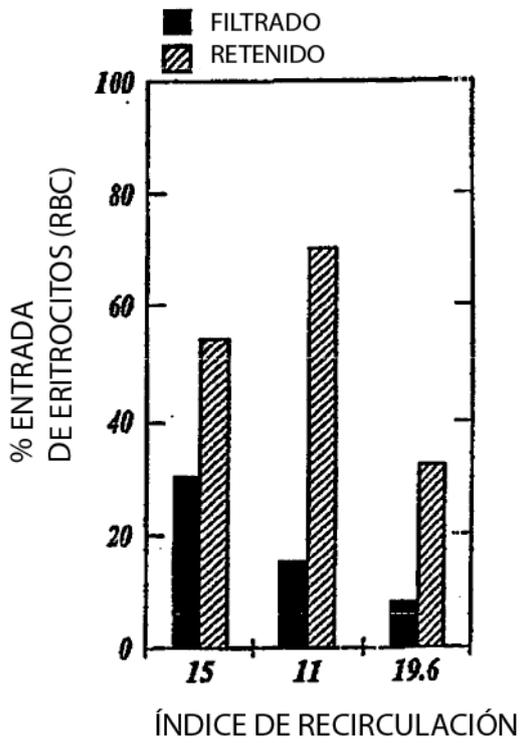


Figura 5

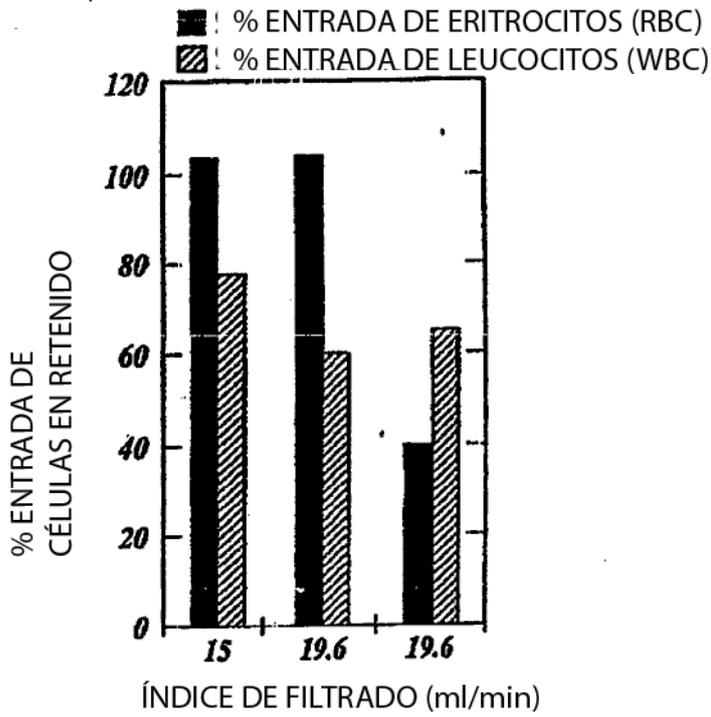


Figura 6

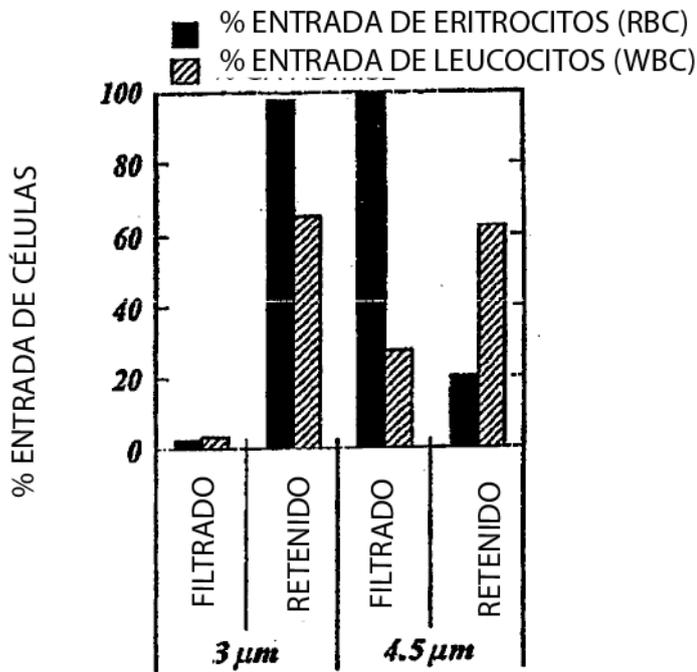


Figura 7

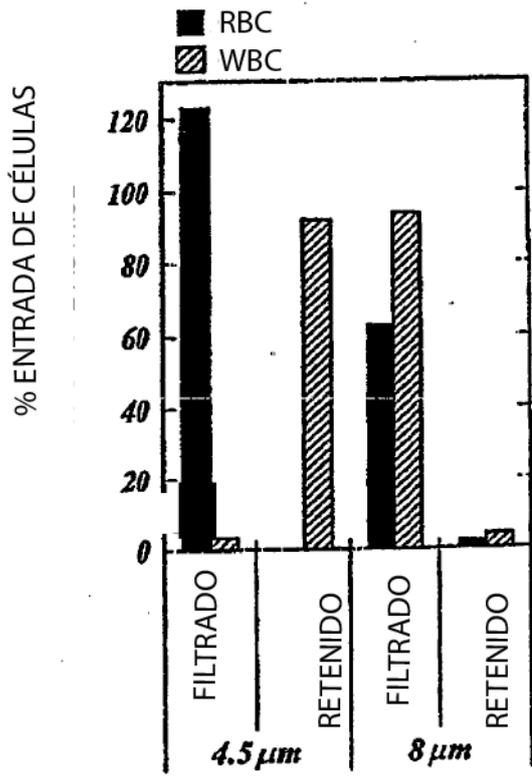


Figura 8

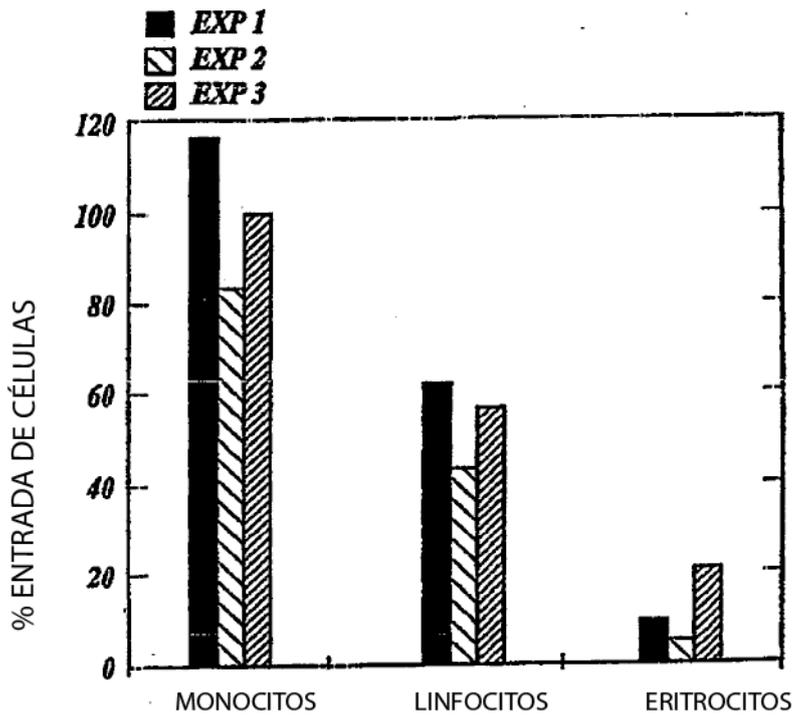


Figura 9