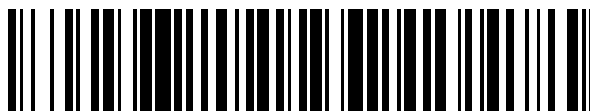


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 513**

51 Int. Cl.:

C02F 1/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2010 PCT/US2010/051832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11044369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2010 E 10822700 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2485983**

54 Título: **Un filtro de perfusión sanguínea de inmunoactivación para el tratamiento de tumores malignos**

30 Prioridad:

08.10.2009 US 249867 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
2-9, Kanda-Tsukasamachi
Chiyoda-ku, Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**NOSÉ, YUKIHIKO;
OHTA, KAZUHIDE;
MIYAMOTO, HIROSHI y
TAKABA, JUNJI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 628 513 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

Un filtro de perfusión sanguínea de inmunoactivación para el tratamiento de tumores malignos

5 **Introducción**

Los tumores malignos pueden desarrollarse en pacientes que están inmunológicamente suprimidos. Se producen grandes cantidades de células tumorales malignas dentro del organismo cada día. Afortunadamente, el sistema inmunitario las reconoce como células "no normales" o "no propias" y posteriormente las destruye cada día. Por lo tanto, si el sistema inmunitario funciona apropiadamente, las probabilidades de desarrollar cáncer son reducidas.

El sistema inmunitario puede activarse a través de vacunación. Sin embargo, el ataque resultante sobre las células cancerosas por el propio sistema inmunitario del paciente no es suficientemente fuerte cuando se usan vacunas. Se requieren exposiciones inmunológicas más eficaces y fuertes para ser capaces de destruir las células tumorales malignas, que el sistema inmunitario del paciente no ha reconocido como células a destruir. Como resultado, el tratamiento de los tumores malignos implica no solamente la eliminación quirúrgica de los focos principales del tumor, sino también terapias con fármacos y radioterapia para destruir por todo el organismo las posibles células tumorales metastásicas. Desafortunadamente, las terapias con fármacos antineoplásicos introducen diversos tipos de efectos secundarios indeseados que a menudo pueden necesitar la interrupción de las terapias con fármacos antes de conseguir los resultados terapéuticos eficaces.

En el pasado, se han usado terapias de aféresis para suprimir el sistema inmunitario del paciente para tratar enfermedades autoinmunitarias. Para estos tipos de pacientes, la eliminación de las moléculas patológicas en la sangre que causan las enfermedades autoinmunitarias mostró efectos terapéuticos. Para estos tipos de pacientes, se eliminaron los factores antitumorales tales como autoanticuerpos, inmunocomplejos, citoquinas y el complemento activado a través de aféresis, así como factores celulares, tales como leucocitos. Este tipo de terapia creó un estado inmunológicamente suprimido en el paciente, que es exactamente el efecto opuesto sobre el sistema inmunitario que se necesita para tratar a un paciente con cáncer.

30 **Sumario de la invención**

La invención proporciona una manera para activar fuertemente el sistema inmunitario de una persona usando un filtro de perfusión sanguínea extracorpórea que está presente en una columna de aféresis. La inmunoactivación resultante da lugar a la destrucción de células tumorales malignas a través de apoptosis. El método, sin embargo, causa impactos fisiológicos sustanciales sobre la persona, incluyendo baja presión sanguínea transitoria e hipoxia. Para manejar estos impactos, se realiza aféresis extracorpórea con la persona en anestesia general. La anestesia general, junto con el control cuidadoso de la presión sanguínea y la saturación de oxígeno, asegura la activación segura del sistema inmunitario de la persona y elimina cualquier malestar asociado con este procedimiento. La anestesia general se administra no solamente durante el procedimiento de aféresis, sino también durante el periodo de modulación inmunoactiva intracorpórea de 6 horas.

Es posible introducir inmunoestimulación usando un filtro de perfusión con materiales bioincompatibles. La perfusión de la sangre de los pacientes a través de una columna de aféresis que contiene dicho filtro durante una hora a la tasa de aproximadamente 100 ml/min, puede generar dicha condición. El método da lugar a inmunoactivación durante los 30 minutos iniciales de circulación extracorpórea. Este procedimiento de cirugía molecular para tratar un tumor maligno por inmunoactivación da lugar a efectos directos y controlables en los primeros 30 minutos con un retorno a la normalidad en varias horas. Estos efectos incluyen hipotensión (reducción de aproximadamente un 50% en la presión sanguínea), leucocitopenia (una reducción de aproximadamente un 70% en los leucocitos) y dificultad respiratoria que provoca hipoxia apareciendo los niveles más bajos de oxígeno en sangre 30 minutos después de que empiece el procedimiento.

Estos efectos son reversibles reduciendo el flujo de sangre a través de la columna de aféresis y proporcionando soporte fisiológico a la persona. Dicho soporte incluye anestesia general con tubo endotraqueal, control de la presión sanguínea (control continuo de la presión sanguínea) y control del suministro de oxígeno (control continuo de la saturación de oxígeno en la sangre).

A causa del síndrome de choque transitorio inducido por los sistemas de aféresis de inmunoactivación, no se proporcionaron columnas de inmunoactivación específicas o se aplicaron clínicamente en el pasado. La Food and Drug Administration de Estados Unidos ha clasificado dichos sistemas de aféresis como clínicamente inseguros a causa de los síntomas de choque asociados con su uso. El método supera este problema, proporcionando una manera para activar de forma potente el sistema inmunitario controlando de forma simultánea los síntomas de choque que acompañan al uso de un filtro de perfusión sanguínea de acuerdo con la invención.

El choque inmunológico controlado, inducido por el material bioincompatible presente en el filtro de perfusión sanguínea de la invención, produce un estado inmunoactivo en animales experimentales. Para proporcionar un resultado terapéutico seguro, indoloro, eficaz y reproducible, se proporciona anestesia general con intubación

endotraqueal no solamente durante el procedimiento de aféresis de una hora, sino también durante cinco horas adicionales. Ningún animal tratado con este procedimiento murió durante los experimentos en animales, ni se demostró ninguna anomalía física o sensorial relacionada con el procedimiento.

Proporcionar anestesia general durante aproximadamente seis horas incluye no solamente los 30 minutos iniciales de las fases de hipotensión e hipóxica del choque, sino también las fases de recuperación en que los animales llegan a estar hemodinámicamente normalizados. Después de seis horas, los leucocitos acumulados en el pulmón se liberan de nuevo a la circulación sistémica. Durante las fases iniciales de la aféresis, los granulocitos disminuyen casi un 100% mientras que los linfocitos disminuyen solamente un 40-50%, lo que crea un estado dominante de linfocitos transitorio en el sistema inmunitario de la persona. Durante las seis horas de anestesia general, las citoquinas inmunoestimuladores TNF- α e IL-6 pueden aumentar hasta 1.000 veces. Después de las 6 horas, los recuentos de leucocitos en la sangre vuelven casi a los niveles previos al procedimiento y posteriormente aumentan adicionalmente. Después de 4 días, los recuentos de leucocitos son más del doble en comparación con los niveles previos al procedimiento. La activación celular y humoral entonces se normaliza después de dos semanas.

La inmunoestimulación inducida proporcionada por el método puede tener efectos terapéuticos para tratar los tumores malignos y para tratar enfermedades infecciosas incurable incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (SIDA).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona un esquema de los efectos de inmunoactivación que se producen en el paciente como resultado del método de aféresis. No solamente se activan factores humorales, sino que también se activan factores celulares.

La figura 2 muestra los resultados de una circulación extracorpórea de 3 horas para hemodiálisis con una membrana de celofán fabricada a mano (flujos de sangre de 200 ml/min). La membrana de celofán se considera más incompatible con la sangre que las membranas sintéticas usadas para aféresis.

La figura 3 proporciona un esquema de los impactos fisiológicos introducidos por aféresis usando el filtro de inmunoactivación de la invención incluyendo la captura de leucocitos transitorios en los capilares pulmonares.

La figura 4 muestra el efecto de la aféresis sobre los recuentos de glóbulos blancos en la sangre en el tiempo usando los siguientes materiales bioincompatibles: polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA), alcohol polivinílico (PVA) y acetato de celulosa (CA).

La figura 5A proporciona un esquema de un ejemplo de una columna de aféresis de acuerdo con la invención. La figura 5B es una fotografía de una realización de la columna.

La figura 6 muestra el efecto de la aféresis sobre la activación del complemento, medida por el factor C_{3a} en sangre entrante y sangre saliente, en el tiempo usando los siguientes materiales bioincompatibles: polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA), alcohol polivinílico (PVA) y acetato de celulosa (CA).

La figura 7 proporciona un esquema de una columna de filtración de sangre en miniatura que incluye una jeringa y un material bioincompatible.

La figura 8 muestra los efectos de tratar algodón egipcio con ácido y álcali o con solución salina sobre los recuentos de ciertos tipos celulares en sangre después de filtración a través del algodón tratado: (A) glóbulos rojos (RBC), (B) glóbulos blancos (WBC), (C) plaquetas (Plt) y (D) neutrófilos y linfocitos. Las muestras "Pre" indican recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración. Para las RBC, el eje Y mide la cantidad de células x 10⁴ por microlitro de sangre filtrada. Para las WBC, el eje Y mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada. Para Plt, el eje Y mide la cantidad de células x 10⁴ por microlitro de sangre filtrada. Para los neutrófilos y los linfocitos, el eje Y mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada.

La figura 9 muestra una comparación entre la capacidad de diferentes tipos de fibras de algodón y fibras de PVA de eliminar ciertos tipos celulares de sangre completa: (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt, y (D) neutrófilos y linfocitos. Las muestras "Pre" indican recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración. Para las RBC el eje Y mide la cantidad de células x 10⁴ por microlitro de sangre filtrada. Para las WBC, el eje Y mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada. Para Plt, el eje Y mide la cantidad de células x 10⁴ por microlitro de sangre filtrada. Para los neutrófilos y los linfocitos, el eje Y mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada.

La figura 10 muestra una comparación entre la capacidad de diferentes tipos de fibras de algodón de eliminar los neutrófilos y linfocitos de la sangre completa.

La figura 11 muestra la capacidad de fibras de algodón egipcio, cuando están a una densidad de 0,125 g/ml,

para eliminar ciertos tipos celulares de diversos volúmenes de sangre completa: (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt, y (D) neutrófilos y linfocitos. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración. El eje Y de cada figura mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada. Las RBC y las Plt se midieron como la cantidad de células $\times 10^4$ por μl . Las WBC y los neutrófilos/linfocitos se midieron como la cantidad de células/ μl .

La figura 12 muestra la capacidad de fibras de algodón egipcio, cuando están a una densidad de 0,05 g/ml, para eliminar ciertos tipos de células de diversos volúmenes de sangre completa: (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt, y (D) neutrófilos y linfocitos. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración. El eje Y de cada figura mide la cantidad de células por microlitro de sangre filtrada. Las RBC y las Plt se midieron como la cantidad de células $\times 10^4$ / μl . Las WBC y los neutrófilos/linfocito se midieron como la cantidad de células/ μl .

La figura 13 muestra el efecto de la densidad de fibras de algodón egipcio sobre su capacidad de eliminar ciertos tipos celulares de diversos volúmenes de sangre completa: (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt, y (D) y neutrófilos y linfocitos. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración.

La figura 14 muestra el efecto de la biolización sobre la capacidad de fibras de algodón egipcio de eliminar (A) RBC, (B) WBC de sangre completa. Se usaron concentraciones de un 1%, 0,1% y 0% de gelatina para la biolización. Para la muestra de un 0% se usó solamente glutaraldehído. Las muestras no biolizadas se trataron con agua. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración.

La figura 15 muestra el efecto de la biolización sobre la capacidad de fibras de algodón egipcio de eliminar (A) Plt, (B) neutrófilos y linfocitos de sangre completa. Se usaron concentraciones de un 1%, 0,1% y 0% de gelatina para la biolización. Para la muestra de un 0%, solamente se usó glutaraldehído. Las muestras no biolizadas se trataron con agua. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración.

La figura 16 muestra el efecto de la biolización sobre la capacidad de fibras de seda de eliminar (A) RBC y (B) WBC de sangre completa. Se usaron concentraciones de un 1%, 0,1% y 0% de gelatina para la biolización. Para la muestra de un 0%, solamente se usó glutaraldehído. Las muestras no biolizadas se trataron con solución salina. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración.

La figura 17 muestra el efecto de la biolización sobre la capacidad de fibras de seda de eliminar (A) Plt, (B) neutrófilos y linfocitos de sangre completa. Se usaron concentraciones de un 1%, 0,1% y 0% de gelatina para la biolización. Para la muestra de un 0%, solamente se usó glutaraldehído. Las muestras no biolizadas se trataron con solución salina. Las muestras "Pre" indican los recuentos celulares recogidos de muestras de sangre antes de la filtración.

La figura 18 muestra el efecto de la biolización con irradiación de haz iónico débil sobre la capacidad de fibras de algodón egipcio de eliminar (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt y (D) neutrófilos y linfocitos de sangre completa.

La figura 19 muestra el efecto de la biolización con irradiación de haz iónico potente sobre la capacidad de fibras de algodón egipcio de eliminar (A) RBC, (B) WBC, (C) Plt y (D) neutrófilos y linfocitos de sangre completa.

La figura 20 muestra el análisis de leucocitos antes y después de la perfusión de la sangre. (A) neutrófilos y (B) linfocitos.

La figura 21 muestra la presión sanguínea y la temperatura corporal de perros que experimentan 6 horas de perfusión de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 22 muestra los niveles de WBC, RBC, Plt y fibrinógeno en perros durante y después de la perfusión de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 23 muestra la cinética de la recuperación de linfocitos, neutrófilos y monocitos en perros durante y después de la perfusión de acuerdo con una realización de la invención. El eje Y mide la cantidad de cada tipo celular presente en la sangre completa en cada punto temporal.

La figura 24 muestra la cinética de la recuperación de linfocitos, neutrófilos y monocitos en perros durante y después de la perfusión de acuerdo con una realización de la invención. El eje Y indica la presencia de cada tipo celular como un porcentaje de células totales en la sangre completa de los perros en cada punto temporal.

La figura 25 muestra los niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 6 (IL-6) en la sangre de perros durante y después de la perfusión de acuerdo con una realización de la invención. El eje Y mide la

cantidad de citoquina presente en picogramos por mililitro, mientras que el eje X representa los minutos después del inicio de la perfusión.

La figura 26 muestra un gráfico de la cinética de los leucocitos en la sangre de un destinatario de aféresis después del tratamiento por el método de la invención. El eje X muestra cada fase respecto a la cantidad de tiempo que ha pasado desde que comenzó la aféresis. El eje Y muestra las unidades relevantes de los recuentos de leucocitos, constituyendo 1,0 el nivel de leucocitos en la sangre al inicio de la aféresis.

Descripción detallada de la invención

Como se analiza anteriormente, se producen grandes cantidades de células tumorales malignas dentro del organismo de una persona cada día. Afortunadamente el sistema inmunitario las reconoce como células anormales y las destruye cada día. Si el sistema inmunitario está funcionando apropiadamente, las posibilidades de desarrollar cáncer se minimizan. Desafortunadamente, si el sistema inmunitario de la una persona está suprimido, las células cancerosas no se reconocerán como células foráneas a destruir. En esta situación, las células cancerosas quedan solitarias en un tumor maligno creciendo sin control en el hospedador.

El método seguro, eficaz y reproducible descrito en este documento de producción de un estado inmunológicamente activo del paciente permite desarrollar un tratamiento terapéutico para tumores malignos. El paciente puede ser un paciente humano. El paciente puede ser un animal no humano, en cuyo caso la invención puede usarse en un entorno veterinario. Los animales no humanos incluyen, aunque sin limitación, gatos, perros, ganado bovino y caballos. Actualmente, es posible suprimir el estado inmunológico de los pacientes por purificación de la sangre (aféresis). La eliminación de los factores plasmáticos y/o los factores celulares responsables del mantenimiento del estado activo del estado del sistema inmunitario de una persona es posible por aféresis. Véase Nosé 1995. Este método de purificación de la sangre se introdujo para el tratamiento de pacientes con enfermedad autoinmunitaria. En el pasado, los procedimientos de aféresis se introdujeron para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide o colitis ulcerante. A la inversa, se intentó la eliminación de muchos factores moleculares y celulares que causan supresión inmunológica de un paciente con cáncer, pero los efectos terapéuticos de esta aféresis, no revelaron ningún resultado positivo para pacientes con tumores malignos. Véase Tani 1998.

De hecho, como se muestra en la tabla 1, la terapia eficaz para tratar un tumor maligno implica la activación del sistema inmunitario, no la supresión del sistema inmunitario. Por tanto, las técnicas de aféresis inmunosupresora no fueron satisfactorias en el tratamiento de tumores malignos. Cuando una persona está sana y tiene un sistema inmunitario normal, las células cancerosas se destruyen y no se forman tumores. Cuando el sistema inmunitario está suprimido, las células cancerosas obtienen la oportunidad de replicarse en el organismo provocando cáncer en la persona. Cuando el sistema inmunitario de la persona está crónicamente sobreestimulado, entonces se puede producir una enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, en el caso del cáncer, la terapia satisfactoria implica la estimulación de un sistema inmunitario suprimido.

Tabla 1

	Células normales	Cuerpo foráneo y células anormales	Enfermedades	Terapia contra el cáncer	Terapia contra enfermedad autoinmunitaria
Activación del sistema inmunológico	Destruídas	Destruídas	Enfermedad autoinmunitaria		↓
Normal	<u>Mantenidas</u>	<u>Destruídas</u>	Sano	↑	↓
Sistema inmunológico suprimido	<u>Mantenidas</u>	<u>Mantenidas</u>	Infección cancerosa	↑	

Basándose en los fundamentos anteriores, el tratamiento de un tumor maligno implica la potenciación de la función inmunológica en una persona para alcanzar niveles normales. Como resultado, el organismo de la persona tratada vuelve a obtener la capacidad de reconocer las células cancerosas como células anormales y las células malignas se destruyen por el sistema inmunitario normalizado de la persona. Dicha potenciación de la función inmunitaria puede usarse para tratar cualquier enfermedad asociada con supresión inmunitaria incluyendo cánceres y enfermedades infecciosas, tales como infecciones bacterianas, fúngicas o víricas. En una realización, el cáncer se manifiesta como uno o más tumores sólidos en el organismo. En otra realización, el cáncer no se manifiesta como un tumor sólido, por ejemplo, en el caso de leucemia. En una realización, la infección vírica puede ser una infección con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o una infección con virus de la hepatitis tal como virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV) o virus de la hepatitis C (HCV).

Se describe un método de terapia activando el estado inmunológico suprimido de un paciente usando una técnica de aféresis. La vacuna con el bacilo de Calmette Guérin (BCG) se ha usado para proporcionar activación inmunológica contra bacterias de la tuberculosis (Grange 2009). Desafortunadamente, los efectos de BCG fueron muy pequeños. Se describe un método más eficaz de estimulación de la función inmunitaria de un paciente haciéndolo más eficaz para el tratamiento de enfermedades asociadas con inmunosupresión o enfermedades infecciosas.

La técnica de aféresis de la invención usa un filtro de perfusión sanguínea que comprende un material bioincompatible. Como se usa en este documento, un "material bioincompatible" es un material que activa una reacción del organismo, ya sea una reacción inmunológica o una reacción fisiológica, tal como la formación de un anticuerpo como resultado de la exposición al organismo directamente (por ejemplo, introducción en el organismo) o indirectamente (por ejemplo, a través de la circulación extracorpórea). Se han desarrollado sistemas de purificación sanguínea basados en membrana para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Véase Nosé 2000. Para estos sistemas de aféresis de purificación sanguínea, los expertos en la materia usaron filtros hechos de materiales compatibles con la sangre para evitar la activación del sistema inmunitario del paciente, aunque estos sistemas eliminaban factores celulares y moleculares subyacentes a las enfermedades autoinmunitarias.

En casos en los que los filtros de aféresis bioincompatibles provocan inmunoactivación, los pacientes deben padecer muchos efectos secundarios incluyendo hipotensión, insuficiencia respiratoria, náuseas, vómitos, sudoración excesiva, escalofríos y tiritones. Como se usa en este documento "inmunoactivación" o "activación del sistema inmunitario" se refiere a un aumento en la cantidad y/o función de las células del sistema inmunitario, tales como linfocitos y/o un aumento en la función humoral del sistema inmunitario respecto a las células B y la producción de anticuerpos junto con la generación de citoquinas. En una realización, dicha generación de citoquinas puede ser la producción de TNF- α y/o IL-6. A la luz de estos efectos secundarios, las agencias gubernamentales, incluyendo la FDA en Estados Unidos y el Ministerio de Salud y Bienestar en Japón, prohibieron la aplicación clínica de dichos filtros de aféresis. Como consecuencia, dichos filtros de aféresis bioincompatibles para introducir inmunoactivación eficaz para el tratamiento de tumores malignos no se aprobaron clínicamente.

Se describe un método de terapia para activar el estado inmunológico suprimido de un paciente usando materiales bioincompatibles en una técnica de aféresis. Aunque los efectos secundarios, tales como hipotensión e hipoxia, pueden producirse durante esta técnica, la invención proporciona una manera de activar el sistema inmunitario de una manera segura y controlada. Como se indica anteriormente, se han usado técnicas diferentes de la aféresis, tales como la vacuna con BCG, para proporcionar activación inmunológica contra bacterias de la tuberculosis (Grange 2009). Desafortunadamente, los efectos de BCG fueron muy pequeños. Se proporciona un método más eficaz de estimulación de la función inmunitaria de un paciente haciéndolo más eficaz para el tratamiento de enfermedades asociadas con inmunosupresión o enfermedades infecciosas.

Otros grupos han usado acetato de celulosa para estimular el sistema inmunitario en pacientes con cáncer (Yonekawa 1997). El Dr. Yonekawa utilizó columnas de perlas de acetato de celulosa (Japanese Antibody Research Institute) para los tratamientos contra el cáncer (Yonekawa 1992). En 8 de 9 pacientes, se mejoraron los síntomas subjetivos, tales como el dolor y la fatiga. Sin embargo, la eficacia de este filtro de columna de perlas de acetato de celulosa requería una cantidad sustancial de tratamientos e incluso entonces no produjo resultados claros. Se requería más inmunoactivación por más filtros bioincompatibles para un tratamiento más eficaz de pacientes con cáncer.

Otro grupo ha usado Immugard R (Terumo Co., Japón) y una columna Cellsorba de ASAHI Kasei Medical Co., Ltd., para tratar la colitis ulcerante. En comparación con filtros ASAHI, el filtro Terumo mostró mejores resultados clínicos para el tratamiento de la colitis ulcerante. La columna Cellsorba utiliza fibra de poliéster.

Existen dos columnas adicionales de aféresis que se usaron en un intento por tratar los tumores malignos de los pulmones y el tracto GI. La primera columna, conocida como Imugard, que se produce por Terumo Co. de Japón, contenía experimentalmente fibra de algodón de la planta *Gossypium barbadense* (Amano 1996). Cuando esta columna se usó para la aféresis, los pacientes experimentaron hipotensión transitoria, una reducción transitoria de los leucocitos y activación del complemento. Al inicio de la circulación extracorpórea, se producía hipotensión transitoria junto con reducción transitoria de los leucocitos. La activación del complemento también se producía de forma bastante sustancial. A causa de las complicaciones, la FDA no aprobó el uso de la columna para uso clínico. Terumo entonces intentó reducir la bioincompatibilidad del filtro cambiando las fibras de algodón a fibras sintéticas. Al hacerlo, sin embargo, la columna perdió su eficacia para el tratamiento de la infección y para los tumores malignos pero aún retenía la eficacia para la artritis reumatoide (Amano 1996). En esencia, la columna Terumo cambiaba de una columna de inmunoactivación a una columna de inmunosupresión cuando se reducía la bioincompatibilidad del filtro. Actualmente Terumo utiliza el filtro de poliuretano y su Immugard se usa principalmente para eliminar los leucocitos para trasfusión sanguínea.

La segunda columna contiene proteína A purificada de *Staphylococcus aureus*, que tiene una alta afinidad por anticuerpos IgG en inmunocomplejos. Cuando se usaba esta columna para aféresis, los pacientes experimentaban hipotensión transitoria y escalofríos. Se obtuvieron experiencias similares por la columna de proteína A. Esta columna también se ha intentado para terapia contra el cáncer (Messerschmidt 1998 y Ainsworth 1988). Sin embargo, las complicaciones, tales como hipotensión y escalofríos al inicio de la circulación extracorpórea, se producían como con columnas Terumo. De modo que la FDA de nuevo insistió en que la columna de proteína A debe hacerse más biocompatible. Después de que el fabricante de la columna de proteína A mejorara satisfactoriamente su biocompatibilidad, la columna de proteína A dejó de funcionar para el tratamiento de tumor maligno pero mantenía el tratamiento para la artritis reumatoide (Levy 2003).

En casos en los que el sistema inmunitario se activaba por estos filtros de aféresis bioincompatibles, los pacientes padecían muchos efectos secundarios incluyendo hipotensión, insuficiencia respiratoria, náuseas, vómitos, sudoración excesiva, escalofríos y tiritones. Fue natural que las agencias gubernamentales, incluyendo la FDA en Estados Unidos y el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón prohibieran la aplicación clínica de dichos filtros de aféresis. Como consecuencia, dichos filtros de aféresis bioincompatibles para introducir inmunoactivación eficaz para el tratamiento de tumores malignos no se aprobaron clínicamente. En cada caso, sin embargo, cuando se mejoraban las biocompatibilidades, los efectos sobre los tumores malignos desaparecían. Por tanto, en el proceso de reducción de estos efectos secundarios, la columna Imugard perdía su eficacia sobre las células tumorales y en lugar permanecía eficaz para el tratamiento de la artritis reumatoide o colitis ulcerante. Asimismo, la columna de proteína A también perdía su eficacia contra las células tumorales cuando se modificaba para reducir los efectos secundarios, volviéndose en su lugar eficaz para tratar la artritis reumatoide. Tanto la artritis reumatoide como la colitis ulcerante son afecciones asociadas con una respuesta inmunitaria hiperactiva, lo que demuestra que las columnas modificadas actuaban suprimiendo el sistema inmunitario del paciente.

En resumen, cuando se modifica una columna de aféresis para reducir su bioincompatibilidad, la columna resultante actúa suprimiendo el sistema inmunitario del paciente eliminando los autoanticuerpos (especialmente del subtipo IgG3), eliminando los inmunocomplejos y/o eliminando las citoquinas inmunoestimuladoras. En contraste, las columnas de aféresis que contienen material bioincompatible actúan estimulando el sistema inmunitario aumentando la producción de anticuerpos, aumentando la producción de citoquinas e inclinando la población de leucocitos en la sangre del paciente hacia un estado dominante de linfocitos.

Para proporcionar un método terapéutico clínicamente eficaz para tratar los tumores malignos y las enfermedades infecciosas, la invención induce un estado de choque controlado en los pacientes. En otras palabras, la invención proporciona una manera de usar materiales bioincompatibles en una columna de aféresis para inducir una estimulación temporal pero potente del sistema inmunitario mientras al mismo tiempo se controlan los efectos secundarios que pueden acompañar a dicha estimulación. En ausencia de aportación de dicha fuerte estimulación inmunológica, la capacidad del sistema inmunitario de eliminar las células tumorales a través de apoptosis se reduce. La aféresis actualmente proporcionada sin ninguna protección cardiovascular no es aceptable para uso clínico. Los efectos secundarios asociados con la inducción del choque inmunológico pueden controlarse usando anestesia general. Se describe un tipo de cirugía molecular en que el sistema inmunitario del paciente se cambia a nivel molecular para perseguir y eliminar las células que causan la enfermedad.

Las diferencias de la cirugía clásica realizada en el siglo 20 y la cirugía molecular propuesta en el siglo 21 se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

	Cirugía clásica siglo 20	Cirugía molecular (siglo 21)
Herramienta de eliminación	Bisturí y tijeras	Fibras de membrana y gránulos
Objetivos de eliminación	Tejidos malignos y/o dañados	Moléculas celulares y humorales de la sangre
Procedimientos	Cortar y suturar	Terapia de sangre extracorpórea
Resultado	Regeneración de nuevos tejidos	Inmunoactivación o inmunosupresión
Anestesia	General o local	General

Los procedimientos quirúrgicos del siglo 20 implican eliminar tejidos por tijeras y bisturí en anestesia general. Los procedimientos de purificación de la sangre del siglo 21 eliminan los componentes moleculares y celulares por filtros de purificación de la sangre (aféresis) en anestesia general. Para este método molecular de terapia contra el cáncer, no hay complicaciones o efectos secundarios que estén habitualmente asociados con la radioterapia o las quimioterapias actualmente usadas para la terapia contra el cáncer. No hay necesidad de dañar las células normales del paciente, sino solamente destruir las células tumorales malignas anómalas. Al mismo tiempo, es muy difícil detectar regiones metastásicas pequeñas para aplicar radioterapias eficaces. En resumen, en este momento no hay ningún régimen terapéutico eficaz para el tratamiento de los tumores malignos. Por tanto, en el siglo 21, los procedimientos terapéuticos para el cáncer deben ser cirugía molecular con anestesia general.

En el pasado, los procedimientos de aféresis clínica se realizaban en seres humanos sin anestesia general. Sin embargo, se realizaron procedimientos experimentales de aféresis en perros con anestesia general no para controlar los efectos secundarios del choque inmunológico, sino para mantener a los animales quietos durante el procedimiento. Como resultado, se empleó anestesia general durante un corto periodo de tiempo durante el propio procedimiento de aféresis. Se describe la anestesia general durante dos fases de afectación fisiológica al paciente: (1) inducción de inmunoactivación por aféresis usando un filtro bioincompatible de aféresis de la sangre durante la

primera hora y (2) mantenimiento seguro de la fase clínica inmunoactiva dominante de linfocitos transitoria durante las posteriores 5 horas para la eliminación del tumor por agentes celulares y humorales. Algunos filtros experimentales eran bioincompatibles e introducían dichos cambios hemodinámicos y respiratorios, pero no hubo incidentes mortales. Sin embargo, estos filtros no estaban pretendidos para potenciar el estado inmunoactivo, sino en su lugar estaban dirigidos a suprimir las actividades inmunológicas.

Se describen modulaciones inmunológicas mostradas en la figura 1 después de aproximadamente una hora de aféresis usando la columna de aféresis de la invención. Todos estos fenómenos se deben a la inmunoactivación de no solamente los factores humorales, sino también los factores celulares. En otras palabras, es el choque inmunológico inducido como resultado del contacto directo de la sangre del paciente con los biomateriales bioincompatible y la posterior modulación de la fase 1 (analizada a continuación) del ajuste celular y humoral autoinmunológico del paciente de forma intracorpórea durante este periodo de tiempo de 6 horas. En una realización, el proceso de inmunoactivación se completa en dos semanas.

Cuando el filtro bioincompatible de aféresis se usa para aféresis, aparece una repentina bajada de presión sanguínea y una repentina reducción de los leucocitos en circulación que se produce en el marco de trabajo de los 30 min iniciales de circulación extracorpórea (figura 2). La misma situación se producía cuando se inyectaba heparina no purificada a 100 unidades/kg. Las diferencias de la hipotensión inducida por fármaco y la hipotensión inducida por la columna bioincompatible de aféresis son que la primera no puede revertir dichos efectos secundarios después de la inyección, pero la última puede detener estos efectos secundarios reduciendo los flujos de sangre para la circulación extracorpórea.

Estos impactos fisiológicos introducidos por el filtro de perfusión sanguínea de inmunoactivación de la invención se muestran en la figura 3. La causa principal de estos impactos fisiológicos proviene de la captura de leucocitos en los capilares pulmonares. La mayoría de los granulocitos se capturan de forma transitoria dentro de los capilares pulmonares y posteriormente inducen un estado dominante de linfocitos transitorio en el paciente. Este es uno de los signos más importantes de la inmunoactivación del paciente. Por tanto, la reducción transitoria de los leucocitos en circulación junto con la hipotensión, ayudan a facilitar los efectos terapéuticos beneficiosos de la invención. Los leucocitos se capturan en los capilares pulmonares durante los 30 minutos iniciales de circulación extracorpórea. Independientemente de si la circulación extracorpórea se continúa o no, después de 30 minutos, se iniciará la liberación de estos leucocitos capturados en los capilares pulmonares. Los llamados "efectos secundarios" no seguros de la purificación bioincompatible de la sangre son realmente respuestas fisiológicas que dan lugar a los efectos terapéuticos sobre los tumores malignos.

Los aumentos transitorios en los leucocitos después de este periodo de 30 minutos de tiempo se pueden producir como se muestra en la figura 4. Dependiendo de las diferentes compatibilidades del filtro, la cinética de los leucocitos que han vuelto a la circulación es diferente después de estos 30 minutos. La captura de leucocitos después de la circulación extracorpórea durante los primeros 30 minutos es el mismo con diferentes filtros de diferente material, sin embargo, la tasa de retorno de los leucocitos a la circulación sanguínea es diferente debido a la diferente bioincompatibilidad de los materiales.

Además, el control y la prevención de los efectos secundarios son muy difíciles cuando se usa terapia de fármacos tradicional y radioterapias para los tumores malignos. Durante estas terapias, los pacientes padecen una gran cantidad de complicaciones, no solamente la pérdida del cabello, sino también muchas cuestiones fisiológicas negativas. Además, sus efectos terapéuticos no son definitivos y pueden ser caros. Contrario a las terapias tradicionales para los tumores malignos, la terapia directa de la sangre por inmunoactivación demuestra sus efectos fácilmente de una manera controlable y supervisable (tabla 3). En otras palabras, es más seguro y más fácil poner a los pacientes bajo un control apropiado de los médicos durante y después del procedimiento de perfusión sanguínea de inmunoactivación de la invención usando anestesia general con canulación intratraqueal durante 6 horas. De hecho, en el estudio descrito en el ejemplo 2, todos los perros que se sometieron a esta terapia de aféresis inmunoactiva estaban vivos y sanos durante al menos 6-12 meses después del tratamiento. Esta terapia extracorpórea que da al paciente un choque inmunológico controlado, puede realizarse en anestesia general con control apropiado de la presión sanguínea, de modo que el paciente no tiene ninguna sensación negativa o dolor durante o después del procedimiento.

Tabla 3

	Por fármacos	Por terapia sanguínea
Efectos	Indirectos	Directos
Control de los efectos	Difícil	Fácil
Control de los efectos secundarios	Difícil	Fácil
Supervisión de los efectos o efectos secundarios	Difícil	Fácil
Reversión o supresión de los efectos	Difícil	Fácil

Método

La inyección de material bioincompatible directamente en una persona es peligrosa porque es difícil de eliminar después de que tenga lugar la inmunoactivación. La inmunoactivación segura del sistema inmunitario del paciente puede conseguirse, en su lugar, a través de aféresis extracorpórea. Como se describe anteriormente, no existen filtros de aféresis inmunoactivas sin introducir el llamado síndrome de choque inmunológico a los pacientes. Desafortunadamente, en este momento no existe método para controlar este síndrome de choque inmunológico apropiadamente y de forma segura. Sin embargo, para proporcionar una inmunoactivación apropiada y clínicamente eficaz a los pacientes con cáncer, es importante inducir el choque inmunológico controlado a los pacientes.

Para proporcionar un procedimiento de aféresis seguro, el método implica realizar el procedimiento de aféresis en anestesia general. Como alternativa, la aféresis se realiza con intubación intratraqueal. Como alternativa, la presión sanguínea apropiada y los niveles apropiados de gases en la sangre se mantienen durante todo el procedimiento. Los niveles apropiados de gases en la sangre pueden mantenerse usando, por ejemplo, suministros de oxígeno administrados a través de la nariz, la boca o la tráquea. En algunos casos, se administra oxígeno a través de una máscara que cubre la nariz y la boca del paciente. En otro caso, se administró oxígeno a través de un tubo intratraqueal.

Por ejemplo, cuando un sujeto se somete a un procedimiento de aféresis con un filtro bioincompatible de perfusión sanguínea de acuerdo con la invención, puede producirse una repentina hipotensión y leucopenia durante los 15 a 30 minutos iniciales de la circulación extracorpórea. La presión sanguínea puede disminuir en más de un 50%. Este efecto puede revertirse después de 30 minutos reduciendo la tasa de flujo sanguíneo y, en general, puede volver a los niveles previos al procedimiento en el marco de una hora. En la presente invención, como se analiza a continuación, a causa de la naturaleza de la inmunoactivación que se produce durante y después de la aféresis, el sujeto se mantiene en anestesia general durante aproximadamente 6 horas.

En una implementación de la invención, la circulación extracorpórea a través de una columna de aféresis de acuerdo con la invención durante una hora con anestesia general y mantenimiento de la anestesia durante cinco horas adicionales puede proporcionar una inmunoactivación segura a los pacientes. La tasa inicial de flujo de sangre a través de la columna de aféresis puede ser de aproximadamente 100 a 200 ml/min, permitiendo el tratamiento de un volumen de sangre en aproximadamente sesenta minutos. Una tasa de circulación extracorpórea de aproximadamente 100 ml/min puede conseguirse por acceso con aguja venovenosa. En otra implementación, pueden mantenerse flujos de sangre de aproximadamente 100 ml/min durante la aféresis, sin embargo, al inicio de la circulación extracorpórea, la presión sanguínea baja hasta un nivel no seguro, por ejemplo, de menos de 50 mm Hg, después esta bajada en la presión sanguínea debe rectificarse. En una implementación, el caudal de sangre puede reducirse en un 25%. Si continúa la hipotensión, entonces el caudal de sangre puede reducirse adicionalmente en un 50% del caudal inicial de la sangre. Además, el contenido de oxígeno de la sangre arterial puede bajar junto con los recuentos de leucocitos, por ejemplo, menos de un 20% del recuento de células totales, durante este tiempo. La reducción inmediata del caudal de sangre en un 25% a un 50% también puede remediar la hipoxia y la leucopenia. En una realización, el caudal de sangre puede reducirse de aproximadamente 100 ml/min a aproximadamente 75 ml/min o a aproximadamente 50 ml/min.

En otra implementación, la inmunoactivación de los factores celulares y moleculares de la sangre se completa en seis horas (fase aguda). Durante este periodo de tiempo, la función cardiopulmonar del paciente puede mantenerse en anestesia general. Por tanto, los pacientes no sienten ningún efecto secundario desagradable de choque inmunológico inducido, incluyendo mareos, insuficiencia respiratoria, náuseas, vómitos, sudoración excesiva, fiebre, escalofríos y tiritones.

Se describe un método de tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende:

- (a) proporcionar una columna de aféresis que incluye un filtro de perfusión sanguínea que comprende al menos un material bioincompatible;
- (b) conectar la circulación sanguínea del paciente con el sistema de aféresis de modo que la sangre del

paciente pase a través del filtro de perfusión sanguínea antes de volver a entrar en el organismo del paciente;

(c) poner al paciente bajo anestesia general y proporciona soporte fisiológico al paciente;

(d) hacer circular la sangre del paciente a través del sistema de aféresis durante aproximadamente una hora; y

(e) mantener al paciente en anestesia general durante al menos 5 horas después de hacer circular la sangre del paciente a través del sistema de aféresis,

donde la circulación de la sangre del paciente a través del filtro de perfusión sanguínea activa el sistema inmunitario del paciente tratando de ese modo la enfermedad.

Se describe un método de tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende:

- (a) proporcionar una columna de aféresis que incluye un filtro de perfusión sanguínea que comprende al menos un material bioincompatible
- (b) proporcionar anestesia general con control continuo de la presión arterial y control del oxígeno de la sangre arterial a través de intubación endotraqueal;
- (c) administrar un anticoagulante al paciente;
- (d) hacer circular la sangre del paciente a través de la columna de aféresis durante aproximadamente una hora a través de perfusión venovenosa; donde el caudal de sangre a través de la columna de aféresis es de aproximadamente 100 a 200 ml/min;
- (e) controlar la presión sanguínea del paciente y los niveles de oxígeno en sangre;
- (f) mantener al paciente en anestesia general durante al menos 5 horas después de hacer circular la sangre del paciente a través del sistema de aféresis controlando al mismo tiempo los signos de inmunoactivación y estabilidad cardiopulmonar del paciente; y
- (g) retirar al paciente de la anestesia general después de confirmar la recuperación de las funciones pulmonares hasta los niveles previos a la aféresis.

Se describe el uso de:

- (a) un sistema de aféresis que incluye un filtro de perfusión sanguínea que comprende al menos un material bioincompatible, donde el sistema de aféresis se conecta a la circulación sanguínea de un paciente de modo que la sangre del paciente pueda pasar a través del filtro de perfusión sanguínea antes de volver a entrar en el organismo del paciente; y
- (b) un anestésico general para anestesiarse al paciente durante el uso del sistema de aféresis y durante al menos 5 horas después de ese uso

para tratar una enfermedad en un paciente, donde el uso del sistema de aféresis activa el sistema inmunitario del paciente tratando de ese modo la enfermedad.

El método provoca cambios significativos en la población de leucocitos en la sangre del paciente y un aumento transitorio de algunas citoquinas. Como se muestra en la figura 26, surgieron cuatro fases diferentes de cinética de los leucocitos que abarca dos semanas, como resultado del método. En la fase 1, que es de menos de 30 minutos después de iniciarse la circulación extracorpórea, se produce la reducción transitoria de los leucocitos dentro de la sangre principalmente capturándolos dentro de los capilares pulmonares. Con el uso de materiales bioincompatibles en la columna de aféresis, se puede producir más reducción de los granulocitos (casi de un 100%) en comparación con los linfocitos (aproximadamente un 40%), creando un estado dominante de linfocitos en la sangre. Después de 30 minutos, los granulocitos se liberan gradualmente del pulmón. En general, una circulación extracorpórea de una hora puede generar suficientes efectos de inmunoactivación.

En la fase 2, los leucocitos se liberan de los capilares pulmonares y los recuentos de leucocitos se quedan normalizados en aproximadamente 6 horas. Durante estas 6 horas, la mayoría de los granulocitos se liberan del pulmón. Esta es también la fase dominante de linfocitos en que se produce un aumento transitorio masivo de las citoquinas, que a su vez da lugar a la muerte de células tumorales en el organismo del paciente. Durante estas 6 horas, la función pulmonar puede requerir ayuda. La anestesia general con amplio suministro de oxígeno por intubación intratraqueal puede tratar la hipoxia durante este periodo de tiempo.

La fase 3, cuatro días después de la aféresis, los recuentos de linfocitos aumentan sustancialmente más a pesar de la notable reducción de los granulocitos durante las seis horas iniciales. Los leucocitos, incluyendo los granulocitos y los linfocitos, también pueden aumentar más de dos veces sobre los niveles previos a la aféresis. También se produce un aumento incluso más sustancial en la población de monocitos, en comparación con los granulocitos y los linfocitos durante esta fase. Durante este periodo de tiempo, estos monocitos y granulocitos aumentados deben ser capaces de eliminar las células tumorales muertas. Mientras tanto, los linfocitos aún están presentes a altos niveles.

En la fase 4, todos estos recuentos de leucocitos aumentados de forma anómala vuelven a los niveles previos a la aféresis después de dos semanas. En una realización, si se producen niveles inesperadamente más altos de inmunoactivación y posterior destrucción excesiva de células tumorales después de dos semanas, pueden aplicarse procedimientos de aféresis para eliminar estos desechos celulares y agentes inmunoactivos para mantener la

seguridad del paciente.

En una implementación, la aféresis puede administrarse al paciente una vez. En otra implementación, la aféresis puede administrarse al paciente más de una vez. En este caso, cada tratamiento de aféresis se produce cada dos semanas. En otra implementación más, se proporciona tratamiento al paciente al menos tres veces, produciéndose cada tratamiento cada dos semanas. En esta implementación, el tratamiento global del paciente se completaría en seis semanas. En otra implementación, el tratamiento de aféresis puede suplementarse por terapias antineoplásicas convencionales para aumentar los efectos de la invención de inmunostimulación.

No se requiere que la sangre del paciente viaje directamente desde la columna de aféresis de vuelta al organismo del paciente. En un ejemplo, la sangre del paciente puede fluir a la columna de aféresis de la invención y después recogerse para administración posterior al paciente. Por tanto, es posible establecer inmunostimulación exponiendo la sangre recogida del paciente al filtro con la columna de material bioincompatible y reinyección al paciente.

Las características técnicas principales de la aféresis extracorpórea de acuerdo con la invención incluyen (1) conseguir la circulación extracorpórea a través de un filtro de perfusión sanguínea bioincompatible en aproximadamente 60 minutos; (2) la inmunostimulación de la fase 2 puede completarse en seis horas durante las cuales se produce la activación celular y de citoquinas; y (3) se producen respuestas fisiológicas al tratamiento en aproximadamente 30 minutos e incluyen hipotensión, leucopenia y dificultades respiratorias tales como hipoxia. Estas respuestas fisiológicas se aceptan de forma segura e indolora por el paciente que está en anestesia general.

Ensamblajes de columna de aféresis útiles en los métodos

La figura 5A proporciona una realización de una columna de aféresis acrílica que puede usarse en el método. Una cámara acrílica pequeña (3) aloja aproximadamente 1 g de fibras lavadas de aproximadamente 5 µm o menos. Estas fibras se mantienen en la cámara pequeña por una malla no tejida de PVA (2) que es de aproximadamente 2 mm de grosor. La malla de PVA no tejida (VW100) se proporcionó por Kuraray Inc, Tokio Japón. Cada cámara pequeña que incluye las fibras preparadas y la malla de PVA constituye una unidad de filtración (4). Pueden apilarse de cinco a 10 unidades de filtración en la columna de aféresis (1). En una realización, se usan 5 unidades de filtración en cuyo caso la altura de la columna es de aproximadamente 60 mm. En otra realización, se usan 10 unidades de filtración en cuyo caso la altura de la columna es de aproximadamente 120 mm.

En una realización, las unidades de filtración pueden compactarse dentro de la cámara de tal manera que permitan aproximadamente 400 ml de volumen de cebado, el volumen de solución de cebado que se ejecuta a través de la columna antes de la introducción de sangre, en la cámara. La densidad de compactado de los filtros puede ser hasta aproximadamente un 10% (gramos/volumen).

Materiales bioincompatibles

La captura de leucocitos en los capilares pulmonares ayuda a establecer el estado dominante de linfocitos durante el que se produce la inmunostimulación. En el caso del cáncer, es durante este tiempo que las células cancerosas pueden destruirse. El material bioincompatible óptimo retirará los granulocitos de la sangre capturándolos dentro de la columna de aféresis y, para leucocitos que vuelven al organismo, la exposición al material bioincompatible puede causar que esos leucocitos queden temporalmente capturados en los pulmones. Usar fibras con un pequeño diámetro ayuda a facilitar estos efectos. En una realización, las fibras tienen un diámetro de 5 µm o menos. En otra realización, las fibras tienen un diámetro de 1-2 µm.

Las fibras naturales que son útiles con la columna de aféresis de la invención incluyen, aunque sin limitación, algodón y seda.

Fibras de algodón egipcio de diámetro más pequeño pueden facilitar la captura de leucocitos en los pulmones. Contrario a los polímeros sintéticos, las fibras naturales de algodón están compuestas por múltiples complejos moleculares y son más bioincompatibles. Entre todas las fibras de algodón, las fibras de algodón egipcio tienen diámetros más pequeños que las fibras de algodón paquistaní y algodón australiano. Por tanto, las fibras bioincompatibles que se fabrican de algodón egipcio se espera que produzcan los filtros inmunostimulantes más eficaces entre el grupo de fibras vegetales. Cada tipo de algodón se recoge en su país de origen y puede obtenerse de Marubeni America Corporation, Houston, TX.

Entre las fibras animales naturales, las fibras de seda son las más pequeñas de diámetro. Entre todas las fibras, los tamaños de fibra más pequeños se demostraron por seda "cantonesa" y seda "japonesa". La seda japonesa se produce por fabricantes japoneses mientras que la seda cantonesa se fabrica en China. Ambos tipos de seda pueden obtenerse de Marubeni America Corporation, Houston, TX. Los diámetros más pequeños de las fibras de seda son casi análogos a los diámetros de fibra de algodón egipcio. Eran de menos de 5 µm, típicamente 1-2 µm. Sin embargo, las fibras animales son estructuras más complejas con múltiples diferentes componentes bioincompatibles (particularmente grupos proteicos) sobre las anteriores fibras vegetales. Por tanto, son más bioincompatibles sobre las fibras sintéticas anteriores o las fibras vegetales naturales.

Las proteínas foráneas de los gusanos de seda pueden actuar como inmunoestimuladores, permitiendo que la seda produzca una mejor estimulación del sistema inmunitario del paciente. Por tanto, puede obtenerse un filtro de inmunoactivación óptimo usando la seda. Se espera que una columna de inmunoactivación hecha de fibras de seda sea capaz de tratar los tumores malignos por perfusión sanguínea extracorpórea.

En algunas realizaciones, las fibras naturales de la invención pueden biolizarse. Como se usa en este documento, el término "biolizado" se refiere a un procedimiento de entrecruzamiento que une proteínas homogéneas presentes en la fibra para producir una superficie constante suave sobre la fibra. Las fibras pueden biolizarse químicamente o a través de técnicas de irradiación. Las fibras pueden biolizarse químicamente usando agentes químicos incluyendo, aunque sin limitación, formaldehído y glutaraldehído. En una realización, las fibras se impregnan en formaldehído al 10% durante al menos 48 horas. En otra realización, las fibras pueden almacenarse en una solución al 0,45% de glutaraldehído más de 2 semanas y tanto como 5 años. Si el material bioincompatible dentro de la columna de aféresis se ha biolizado, la columna debe lavarse con solución salina normal para eliminar el aldehído residual antes de su uso clínico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cambio en los recuentos de células sanguíneas tras el contacto con materiales bioincompatibles

Se ensayaron tipos de algodón y seda en condiciones variables para su capacidad de filtrar diferentes tipos celulares de sangre completa humana. Para estos experimentos *in vitro*, en una jeringa de 5 ml se compactó un material bioincompatible hasta un volumen de 4 ml dentro de la jeringa, produciendo una densidad de 0,125 g/ml. Véase la figura 7. Se obtuvo sangre completa de un ser humano sano normal y se añadió 1 unidad de heparina de sodio por mililitro de sangre para reducir la coagulación. Las preparaciones de sangre se usaron en los experimentos en 30 minutos desde la recogida. Durante la filtración a 22°C, la sangre tratada se vertió en la parte superior de la jeringa, se filtró a través del material bioincompatible y después se recogió de la parte inferior de la jeringa. La sangre filtrada resultante después se analizó para la presencia de diferentes tipos celulares.

La tasa de eliminación de granulocitos de algodón egipcio tratado con una solución ácida 0,5 N y una solución alcalina 0,5 N se comparó con la tasa de eliminación obtenida con algodón egipcio tratado con solución salina (Baxter Corp. catálogo n.º 281324). El algodón egipcio sin procesar se obtuvo de Marubeni America Corporation y se preparó por inmersión sucesiva con NaOH 0,5 N (S320-500 Fisher Scientific), agua, HCl 0,5 N (SA48-500, Fisher Scientific), agua y solución salina normal durante aproximadamente 30 minutos en cada solución. El algodón egipcio también se impregnó en solución salina normal en solitario. Después del tratamiento del algodón, se pusieron 0,5 g del algodón tratado con ácido/álcali o el algodón tratado con solución salina en la jeringa en un volumen de 4 ml, produciendo una densidad de fibra de 0,125 g/ml. Se vertieron ocho mililitros de sangre en la columna en miniatura de la jeringa. Los primeros 4 ml de sangre filtrada se desecharon para evitar la dilución por solución salina normal. Los 4 ml restantes de sangre filtrada se recogieron y compararon con sangre prefiltrada para los recuentos de WBC y RBC.

Como se muestra en la figura 8, no hubo diferencias entre la tasa de eliminación del algodón egipcio tratado con ácido/álcali y el algodón tratado con solución salina. Ambos tratamientos produjeron eliminación comparable de glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y plaquetas. Más específicamente, también se eliminaron los neutrófilos y linfocitos a tasas comparables entre los dos grupos de tratamiento de algodón. La cantidad de linfocitos se redujo ligeramente en comparación con la cantidad de linfocitos en sangre prefiltrada (figura 8D). Estos resultados demuestran que el algodón egipcio mantenía su capacidad de eliminar los granulocitos, medida por la reducción en el recuento de neutrófilos, en presencia de tratamientos químicos que pueden usarse en la preparación del algodón (es decir, para eliminar grasa, esterilizar y/o neutralizar el algodón).

Se ensayaron cuatro tipos de algodón y fibras de PVA como control negativo, para la tasa de eliminación más eficaz de los granulocitos medida por la eliminación de neutrófilos de sangre filtrada. Los cuatro tipos de algodón ensayados fueron algodón paquistaní (Marubeni America Corporation), algodón australiano (Marubeni America Corporation), y algodón egipcio. Tanto el algodón como el PVA se aclararon en solución salina normal antes de poner 0,5 g de cada tipo de algodón y PVA en la jeringa de 5 ml en un volumen de 4 ml, produciendo una densidad de fibra de 0,125 g/ml. Se filtraron ocho mililitros de sangre completa a través de las jeringas y se recogieron los segundos 4 ml para el análisis.

Como se muestra en la figura 9, se demostró casi un 100% de eliminación de granulocitos por cada uno de los algodones ensayados en comparación con el control negativo de PVA, proporcionando el algodón egipcio el mejor resultado. Véase la figura 9D. Véase también la figura 10. Además, las RBC no se filtraron por ninguno de los tipos de algodón mientras que la mayoría de las plaquetas se eliminaron. Véanse las figuras 9A y 9C. Respecto a los linfocitos, cada tipo de algodón mostró niveles ligeramente diferentes de eliminación de linfocitos, eliminando el algodón australiano la mayoría de los linfocitos.

El efecto de la densidad de fibra sobre la tasa de eliminación de granulocitos también se evaluó usando algodón

egipcio tratado con solución salina como se describe anteriormente. Se compactó algodón egipcio en jeringas a densidades de 0,125 g/ml y 0,05 g/ml. Para la densidad de 0,05 g/ml se compactaron 2 gramos de algodón egipcio en una jeringa de 4 ml. Las columnas de densidad de 0,125 g/ml se prepararon como se describe anteriormente. Para la densidad de 0,125 g/ml, se filtraron diferentes volúmenes de sangre que varían de 20 ml a 80 ml, usando una minicolumna reciente para cada volumen de sangre que se ensayó. Para la densidad de 0,05 g/ml, se ensayaron volúmenes de sangre que varían de 5 a 15 ml. Para cada densidad, los primeros 4 ml de sangre filtrada se desecharon para evitar la dilución por la solución salina normal y, después de ello, la sangre filtrada se recogió en lotes de 2 ml. Como se muestra en la figura 11D, el algodón egipcio, cuando estaba a una densidad de 0,125 g/ml, era capaz de eliminar algunos granulocitos, que se mide por la eliminación de neutrófilos, incluso cuando se filtraban 80 ml de sangre completa, aunque la eliminación fue más eficaz cuando se filtraron 20 ml de sangre completa. La eficacia de la eliminación de granulocitos disminuyó con el volumen creciente de sangre. El volumen de sangre no afectó a la tasa de eliminación de las RBC o las plaquetas entre los volúmenes de sangre ensayados a la densidad de 0,125 g/ml. A la densidad de 0,125 g/ml, el algodón egipcio pudo mantener la eliminación en aproximadamente un 70% de los neutrófilos hasta 80 ml de volumen de sangre procesada. La figura 12D muestra que para densidad de 0,05 g/ml, la eficacia de eliminación de WBC disminuía con un volumen creciente de sangre. A un volumen de 11 a 13 ml de sangre filtrada, la eliminación de granulocitos era la más óptima, reteniendo al mismo tiempo la presencia de linfocitos en la sangre filtrada. En tan poco como los primeros 5 a 7 ml, la minicolumna era capaz de eliminar los granulocitos, que se mide por la eliminación de neutrófilos.

En la figura 13, se ensayaron tres densidades de fibra para la eficacia de la eliminación de granulocitos a un único volumen de sangre. Se compararon las densidades de fibra de 0,05 g/ml, 0,125 g/ml y 0,2 g/ml. Se prepararon minicolumnas de densidad de 0,05 g/ml y 0,125 g/ml como se describe anteriormente. Para la columna de densidad de 0,2 g/ml, se compactaron 0,2 gramos de algodón egipcio en un volumen de un 1 ml en una jeringa de 4 ml. Cuando se ensaya la columna de densidad de 0,05 g/ml, se filtraron 7 ml de sangre completa tratada con heparina a través de la columna. Los primeros 5 ml se descartaron y se recogieron los 2 ml restantes para el análisis. Para la densidad de 0,125 g/ml, se filtraron 22 ml de sangre completa tratada con heparina a través de la columna. Los primeros 20 ml se descartaron y se recogieron los 2 ml restantes para el análisis. Para la columna de densidad de 0,2 g/ml, se filtraron 5 ml de sangre completa tratada con heparina a través de la columna. Los primeros 3 ml de sangre filtrada se descartaron y se recogieron los 2 ml restantes para el análisis. La diferencia en las densidades de fibra produjo niveles comparables de eliminación de RBC. Para WBC en general, sin embargo, una densidad de 0,05 g/ml no eliminó la WBC, así como densidades de 0,125 y 0,2 g/ml. Asimismo, las densidades de fibra de 0,125 g/ml y 0,2 g/ml funcionaron mejor para eliminar los granulocitos, que se demuestra por los recuentos de neutrófilos, permitiendo al mismo tiempo que algunos linfocitos pasen a través de la minicolumna. Por tanto, una densidad de fibra de al menos 0,125 g/ml funcionaba bien para eliminar los granulocitos.

Se evaluó el efecto de la biolización en fibras de algodón egipcio sobre la eficacia de eliminación de granulocitos. Las fibras de algodón se biolizaron usando tres tipos de tratamientos de combinación: entrecruzamientos con glutaraldehído al 0,4% seguido por recubrimiento de las fibras con gelatina al 1%, 0,1% o 0%. En el caso de gelatina al 0%, las fibras se biolizaron con glutaraldehído solamente. Para la biolización, las fibras se impregnaron en glutaraldehído durante más de 24 horas. Las fibras después se recubrieron en una solución de gelatina (Fisher Scientific; n.º de catálogo G7-500). Las fibras de algodón también se impregnaron en agua en solitario, y actuaron como control positivo. Como se muestra en la figura 14, los tres tratamientos produjeron eliminación comparable de RBC entre las muestras. Para las WBC, los tres tratamientos produjeron eliminación significativa de las WBC de la sangre filtrada. Véase la figura 14. La figura 15 muestra que los tres tratamientos produjeron una eliminación muy buena de las plaquetas y eliminación completa de los granulocitos, permitiendo al mismo tiempo que algunos linfocitos pasen a través de la minicolumna. Se realizó un estudio similar usando fibras de seda en lugar de algodón egipcio, produciendo resultados similares. Véanse las figuras 16 y 17.

También se ensayó la biolización de algodón egipcio por irradiación en lugar de tratamiento químico. Las fibras de algodón se irradiaron usando un dispositivo de implante de iones basado en plasma de argón establecido a 5 kilovoltios durante 0,5 horas (figura 18) o 1 hora (figura 19) antes de prepararse con solución salina como se describe anteriormente. La irradiación durante 1 hora funcionó mejor que la irradiación durante 0,5 horas para filtrar los granulocitos. Basándose en estos datos, la incorporación de iones basada en plasma podría usarse para regular la proporción de neutrófilos que se eliminan de la sangre. Compárese los recuentos de neutrófilos en las figuras 18D y 19D.

Ejemplo 2: Inmunoactivación en perros mestizos

Seis perros mestizos macho normales de 20-30 kg se sometieron a experimentos de aféresis usando una columna de aféresis bioincompatible que contiene fibras no vegetales no sintéticas naturales (fibras obtenidas de forma natural ACS-A1 de 1-2 μm de diámetro) proporcionadas por Marubeni International Inc. Houston, Texas. Véase la figura 5B. La columna contenía cinco gramos de fibras ACS biolizadas. Estas fibras eran un filtro eficaz de leucocitos, pero aún funcionaban como material bioincompatible. Se incorporaron cinco gramos en total de dichas fibras dentro de la columna. Específicamente, un gramo de fibras bien lavadas estaba contenido en una cámara separada y tenía soporte de PVA no tejido (alcohol polietilenvinílico) proporcionado por Kuraray Inc, Houston, Texas en la parte superior y parte inferior de la cámara para preparar una unidad de filtración. Véase la figura 5A. Se

incorporaron cinco unidades de filtración dentro de la columna.

Las fibras se prepararon por tratamientos sucesivos con NaOH 0,5 N, HCl 0,5 N, alcohol isopropílico al 70%. Las fibras estuvieron aproximadamente 30 minutos en cada solución con una etapa de aclarado con agua entre las soluciones. El cartucho se lavó y se biolizó procesando una solución de formaldehído al 10% a través de la columna durante 48 horas. Antes del experimento, las fibras procesadas se compactaron en la columna y después se estableció el circuito de sangre.

El circuito de sangre comprendía una bomba de rodillo, un conjunto de tubos, una unidad de calentamiento y una columna de aféresis. Antes del inicio de un experimento el circuito de sangre se aclaró por solución salina normal hasta que la concentración de formaldehído residual en la solución aclarada llegó a ser de menos de 5 ppm. El caudal de sangre a través de la columna se estableció a 3 ml/kg. Se midieron las presiones en la entrada y la salida de la columna por los manómetros.

La columna de aféresis se conectó a los perros para completar el circuito completo de la circulación extracorpórea por tubos de PVC (cloruro de polivinilo) junto con una bolsa más caliente y una cámara de eliminación de aire. La columna de aféresis extracorpórea se desinfectó con formaldehído al 4% durante una noche, mientras que el resto de los componentes del circuito se esterilizaron previamente antes de su uso.

Antes de la aféresis extracorpórea, los perros se anestesiaron usando una combinación de xilacina por vía intramuscular y ketamina por vía intramuscular para la inducción de anestesia, seguido por gas isoflurano al 2,5% para su mantenimiento. Se añadieron 3 l de oxígeno, 5 l de aire con isoflurano al 2% al gas de respiración. Como inducción anestésica alternativa, se usó atropina. La anestesia general se administró en 60 minutos desde el inicio del tratamiento de aféresis.

La sangre de los perros se trató con heparina administrando inicialmente un bolo de 200 unidades/kg por vía intravenosa y después durante la aféresis, los perros siguieron recibiendo 100 unidades/kg de heparina y después la sangre de los perros se hizo circular a través de la columna de aféresis durante una hora a un caudal de 3,3 ml/kg como se indica anteriormente. Después de una hora de aféresis, los perros permanecieron con anestesia general durante cinco horas adicionales, haciendo una duración total de seis horas de anestesia general desde el momento en que empezó la aféresis extracorpórea.

Como se muestra en la figura 20, este tratamiento produjo la eliminación *ex vivo* de los leucocitos. En esta figura, la barra más oscura indicó los leucocitos (representados por neutrófilos y linfocitos en esta figura) presentes en la sangre de entrada, la sangre que estaba viajando a la columna de aféresis. La barra de color medio representa la cantidad de leucocitos presentes en la sangre que sale de la columna de aféresis y que viaja de vuelta al perro. La barra de color más claro representa la cantidad de leucocitos presentes en la sangre residual capturada dentro de la columna. Casi todos los granulocitos se eliminaron, mientras que se eliminó solamente el 60% de los linfocitos, produciendo de este modo un estado dominante de linfocitos en los perros.

Como se muestra en la figura 21, las presiones sanguíneas tuvieron una tendencia a bajar transitoriamente aproximadamente 30 minutos después del inicio de la aféresis. Sin embargo, la presión sanguínea posteriormente aumento después de estas bajadas transitorias. Durante la anestesia, los gases de la sangre se mantuvieron mientras las temperaturas corporales tendieron a aumentar durante las seis horas de anestesia general.

La figura 22 muestra que los recuentos de WBC y los niveles de fibrinógeno inicialmente disminuían durante la perfusión, pero posteriormente se recuperaban en horas desde la aféresis. Los recuentos de plaquetas, sin embargo, también bajaron durante la aféresis y permanecieron en cantidades relativamente bajas durante aproximadamente cuatro días. Los recuentos de RBC permanecieron casi constantes durante y después del tratamiento de aféresis de una hora.

Los granulocitos volvieron a la circulación en el marco de 6 horas junto con los monocitos (figura 23), mientras que los linfocitos permanecieron reducidos (figura 23B) durante estas seis horas. A corto plazo, sin embargo, se estableció un estado transitorio de dominancia de linfocitos en los perros. Específicamente, el porcentaje de granulocitos y el porcentaje de linfocitos en la sangre de los perros cambió después de 15 minutos de circulación extracorpórea. El porcentaje de neutrófilos en la sangre de los perros fue solamente de un 20% mientras que los linfocitos constituían un 80% de las WBC en la sangre. En puntos temporales posteriores, el porcentaje de neutrófilos y monocitos volvió a los niveles previos a la operación después de 6 horas, pero el porcentaje de linfocitos permaneció bajo durante 6 horas a 4 días después del tratamiento (figura 24).

Además del estado dominante de linfocitos transitorio del sistema inmunitario de los perros como resultado de la aféresis extracorpórea, también hubo un aumento transitorio de TNF- α de aproximadamente 1.000 veces durante los 30 a 90 minutos después de que comenzara la aféresis (figura 25). También hubo un aumento transitorio en IL-6 de aproximadamente 1.000 veces durante los 60 a 200 minutos después de que comenzara la aféresis (figura 25). En contraste, el interferón gamma (IFN- γ) y la interleuquina 2 (IL-2) permanecieron inalterados como los niveles de anticuerpos durante las dos semanas después del tratamiento.

El choque inmunológico asociado con la aféresis usando materiales bioincompatibles incluye mareos debido a hipotensión, dificultad respiratoria, náuseas y vómitos, sudoración excesiva, fiebre, escalofríos y tiritones. Para tratar de forma segura estos efectos fisiológicos, el método se realiza en anestesia general. Haciéndolo así, el paciente puede someterse a terapia de aféresis de inmunoactivación reproducible y eficaz para el tratamiento de tumores malignos y enfermedades infecciosas. La aféresis de inmunoactivación que induce choque inseguro y peligroso, ahora se ha convertido en un procedimiento quirúrgico molecular terapéutico seguro, eficaz e indoloro a causa de la invención.

En una realización, la terapia de inmunoactivación eficaz y segura puede describirse en las siguientes ocho características: (1) anestesia general con intubación intratraqueal; (2) control cuidadoso de la presión sanguínea y los contenidos de oxígeno en sangre arterial; (3) suministro suficiente de oxígeno; (4) controles cuidadosos del flujo durante la circulación extracorpórea y reducción automática del flujo de sangre siempre que aparezca hipotensión e hipoxia mayor de los niveles esperados; (5) circulación extracorpórea que dura aproximadamente 60 minutos o menos; (6) mantenimiento de anestesia intratraqueal durante al menos 6 horas, durante las cuales el paciente recibe soporte fisiológico mientras está en anestesia general; (7) después de cuatro días de inmunoactivación, se produce aumento transitorio en los recuentos de leucocitos; y (8) control de seguimiento de las repuestas inmunológicas celulares y humorales durante dos semanas después de completarse el tratamiento de aféresis.

Fue posible producir un estado activo inmunológico el paciente sometiendo al paciente durante una hora a un procedimiento de aféresis con biomateriales bioincompatibles. El estado inmunoactivo inducido del paciente entonces daría lugar a apoptosis de las células tumorales o células infectadas sin ningún daño a las células naturales y sanas del paciente.

Referencias citadas

Ainsworth S.K., *et al.* Toxicity following protein A treatment of Metastatic breast adenocarcinoma cancer 61:1495-1500, 1988.

Amano K. *et al.* Filter leucopheresis for patients with ulcerative colitis; clinical results and the possible mechanism. *Therapeutic Apheresis* 2(2) 97-100, 1998.

Amano K. *et al.*, Four year study of Leukapheresis with Gossypium barbadense cotton for Rheumatoid Arthritis *Japanese Journal for Apheresis* 15(1) 103-104, 1996.

Grange J.M. *et al.*, Immunotherapy for malignant melanoma - Tracing Ariadne's thread through the labyrinth, *European Journal of Cancer* 45(13), 2266-73, 2009.

Levy J. *et al.*, Correcting immune imbalance: The use of prosorba column treatment for immune disorders. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 7(2) 197-203, 2003.

Messerschmidt G.L. *et al.*, Protein A immunoadsorption in the treatment of malignant disease *J. Clinical Oncology* (12) 203-212, 1988.

Nosé Y., *et al.* Therapeutic Membrane Plasmapheresis. *Therapeutic apheresis* 4(1) 3-9, 2000 (originalmente publicado en 1981).

Nosé Y. Blood purification procedures and their related short and long term effects on patients. *Therapeutic apheresis* 6(5), 333-347, 2002.

Nosé Y. Congress presidential address: 5th WAA congress, *Therapeutic Artificial Organs: 10 years after, Artificial Organs* 1995.

Tani, T. *et al.* Blood purification therapy in cancer treatment, *Therapeutic apheresis* 2(3) 182-184, 1998.

Yonekawa M., granulocyte removal therapy for cancer *Tissue Culture Engineering* [texto japonés] 23(12) 481-485, 1997.

Yonekawa M. Granulocytopheresis in Cancer *Tissue Culture Engineering* (texto japonés) 23 (12) 481-485, 1997.

Yonekawa M., Kamii N., Onodera K. *et al.* Basic Study of Extracorporeal Granulocyte/Lymphocyte Regulation System *Therapeutic Plasmapheresis* (X) ICAOT Press, Cleveland págs. 37-42, 1992.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de aféresis para su uso en el tratamiento de un tumor maligno o una enfermedad infecciosa en un paciente:
- 10 en el que el sistema de aféresis incluye un filtro de perfusión sanguínea que comprende al menos un material bioincompatible, en el que el al menos un material bioincompatible es una fibra de algodón o animal, en el que el sistema de aféresis está configurado para conectarse a la circulación sanguínea de un paciente de modo que la sangre del paciente pueda pasar a través del filtro de perfusión sanguínea antes de volver a entrar en el organismo del paciente; en el que uso del sistema de aféresis activa el sistema inmunitario del paciente tratando de ese modo la enfermedad.
- 15 2. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad es un tumor maligno.
3. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad es una enfermedad infecciosa.
4. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad infecciosa es síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o hepatitis.
- 20 5. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema de aféresis comprende adicionalmente una cámara de aire y/o una bolsa de calentamiento.
6. El sistema de aféresis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que
- 25 (a) el material bioincompatible es algodón seleccionado de algodón egipcio, algodón australiano y algodón paquistaní; o
- (b) el material bioincompatible es seda seleccionada de seda japonesa y seda cantonesa.
- 30 7. El sistema de aféresis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el material bioincompatible está biolizado.
8. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el material bioincompatible está biolizado con formaldehído o glutaraldehído.
- 35 9. El sistema de aféresis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el paciente es un paciente humano.
- 40 10. El sistema de aféresis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el paciente es un animal no humano.
11. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 1, configurado adicionalmente para administrar un anticoagulante al paciente antes de hacer circular la sangre del paciente a través del sistema de aféresis.
- 45 12. El sistema de aféresis de acuerdo con la reivindicación 11, que usa como anticoagulante heparina.
13. El sistema de aféresis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, configurado para hacer circular la sangre del paciente a través del sistema de aféresis a una tasa de aproximadamente 100 a 200 ml/minuto.

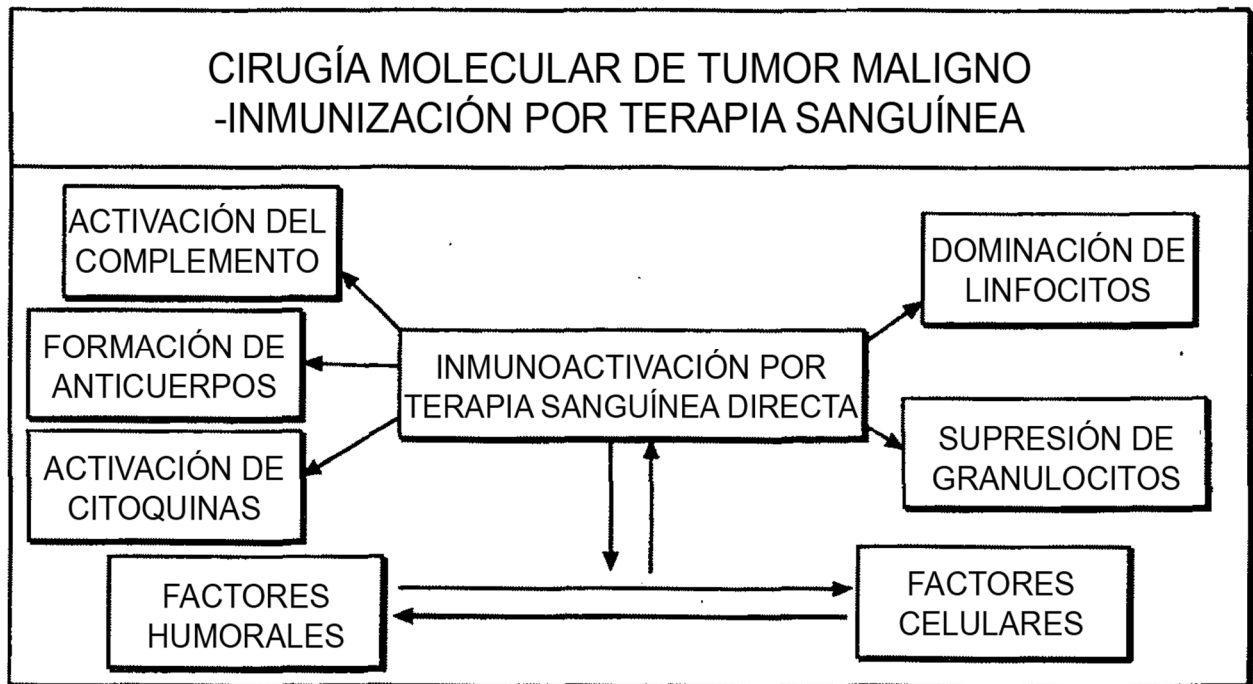


FIG. 1

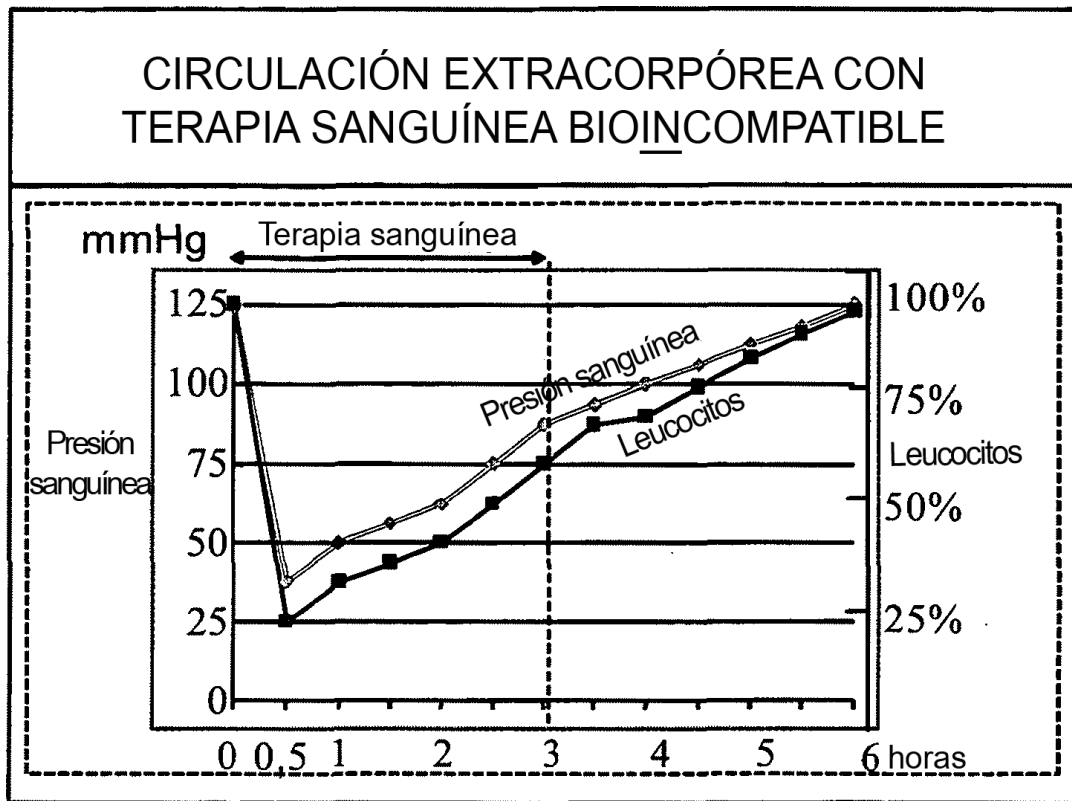


FIG. 2

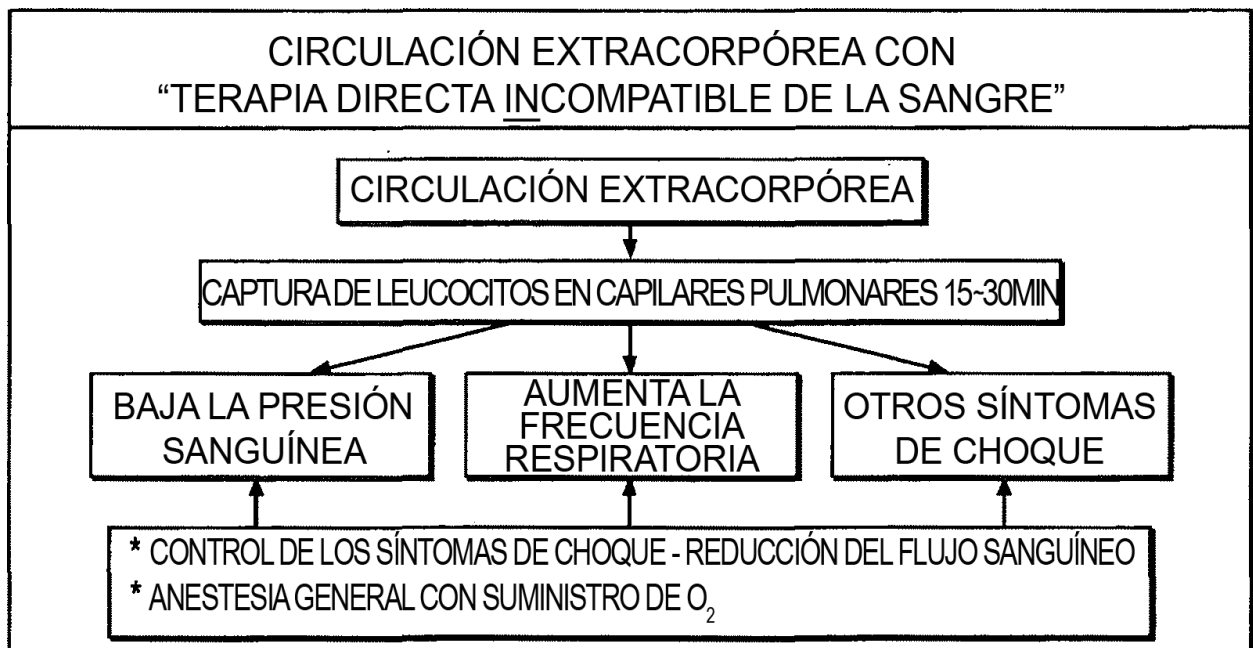


FIG. 3

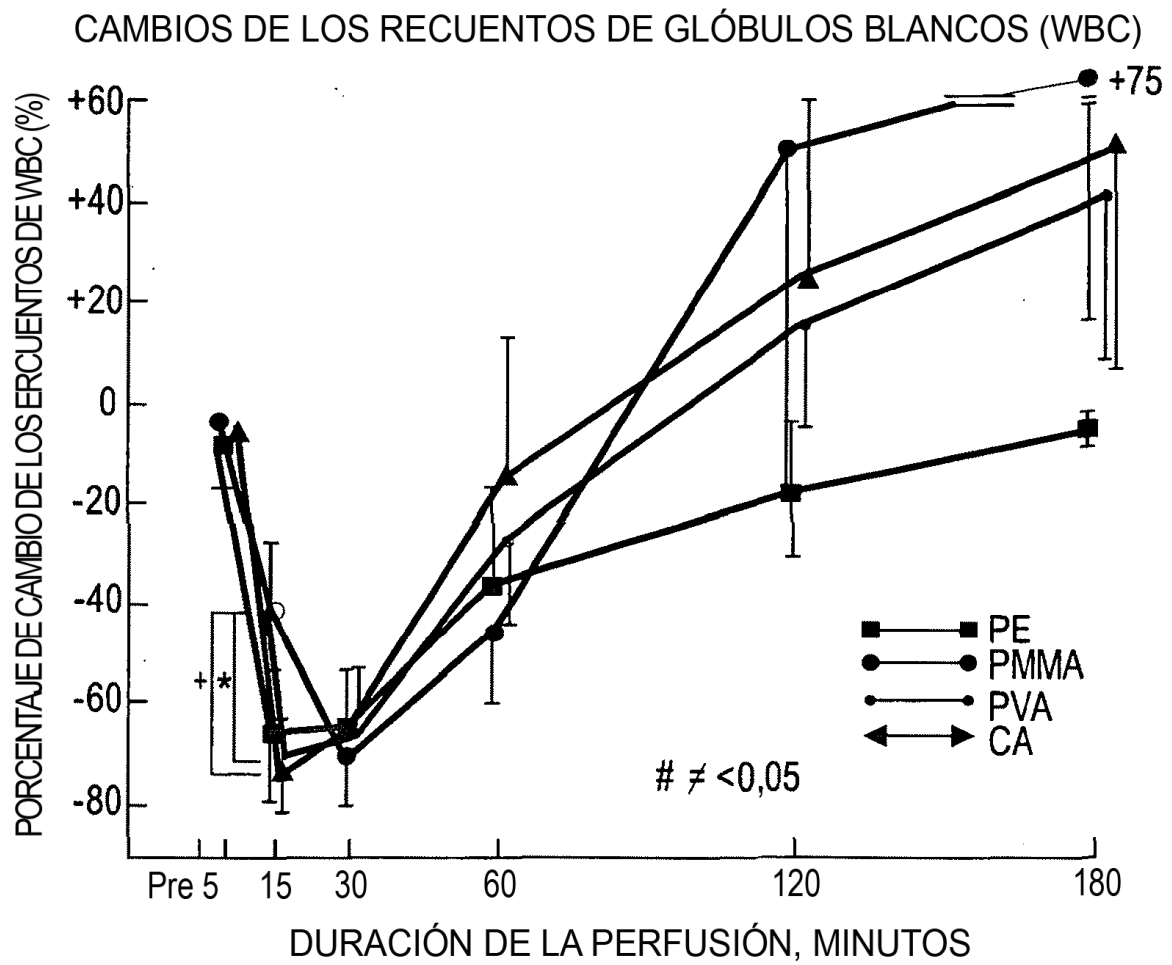


FIG. 4

UNA UNIDAD DE UNIDAD DE CÁMARA DE FILTRO

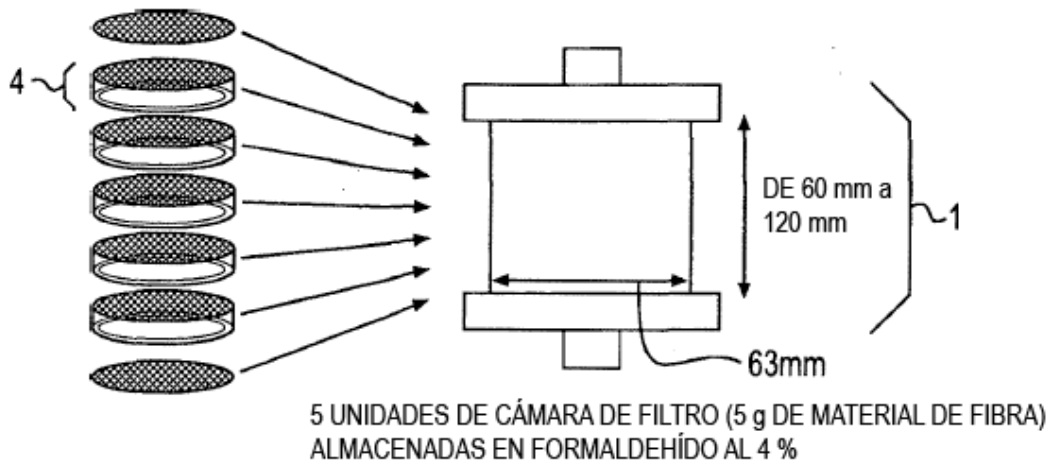
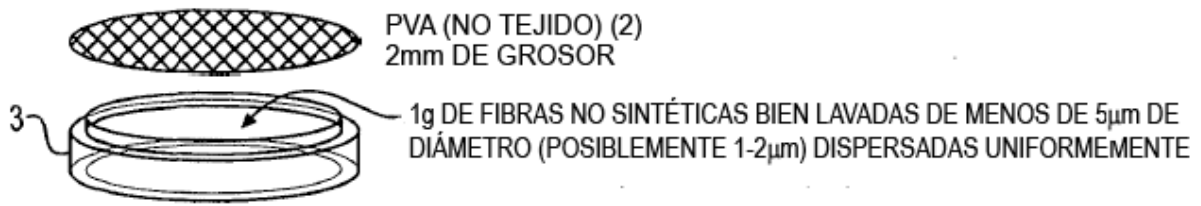
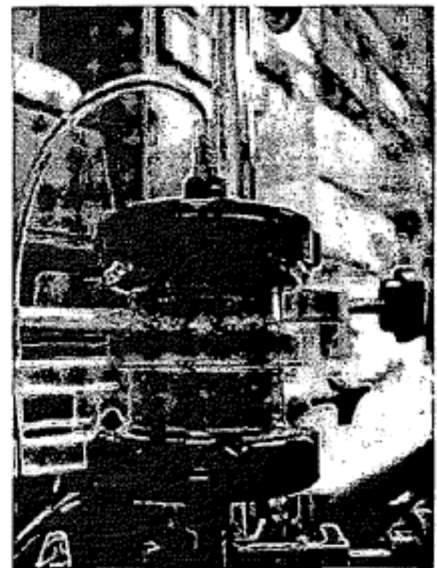
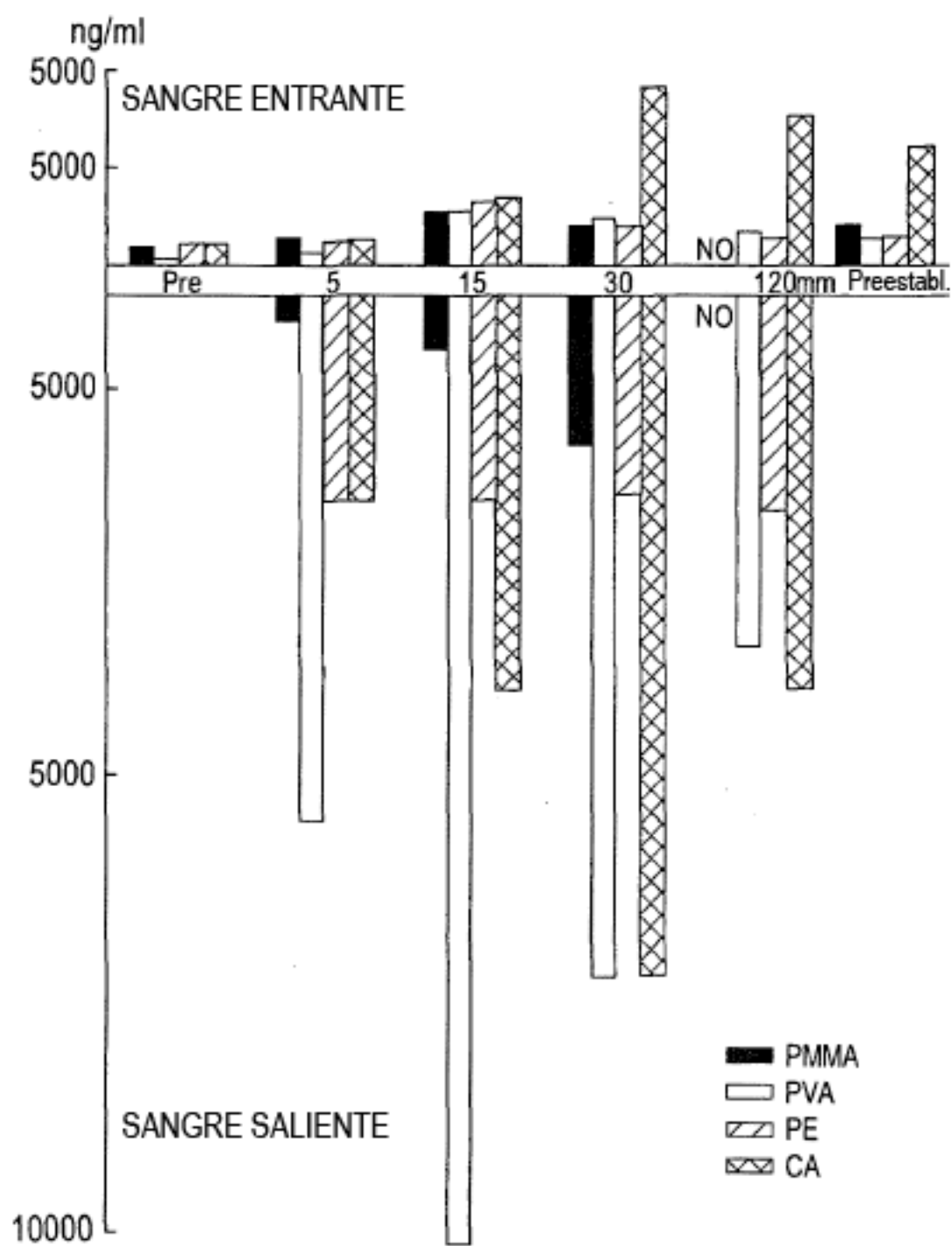


FIG. 5A

FIG. 5B



**FIG. 6**

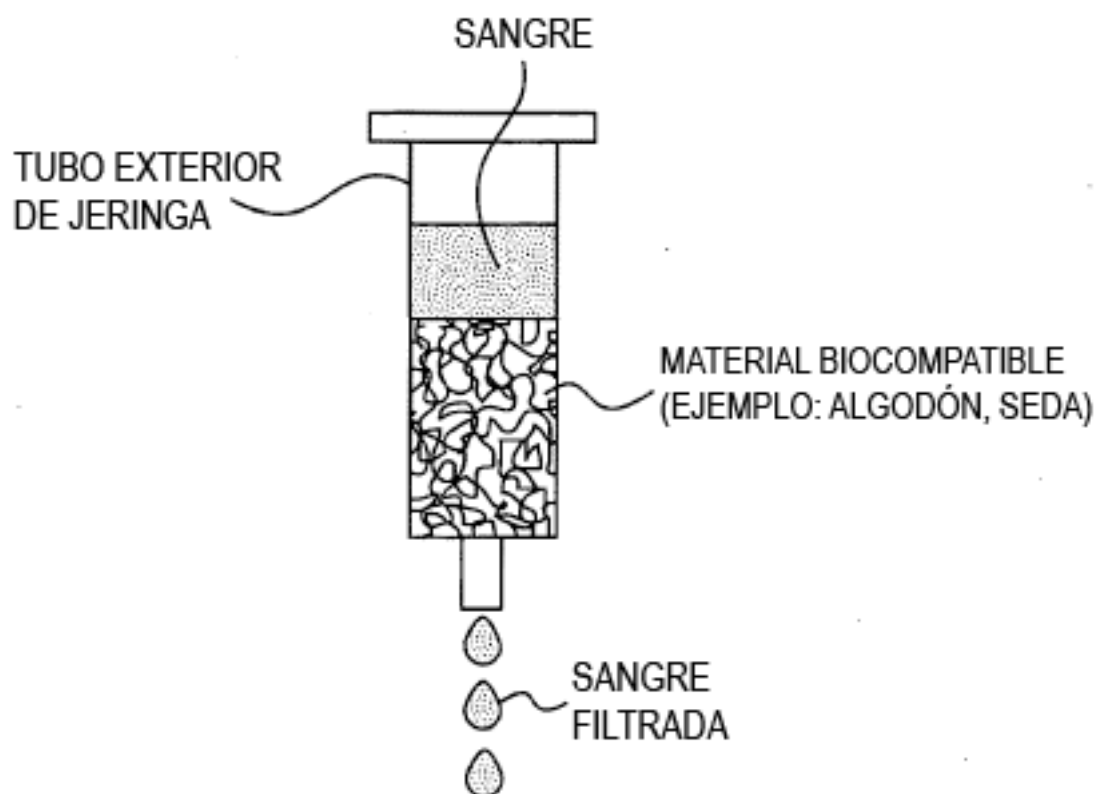


FIG. 7

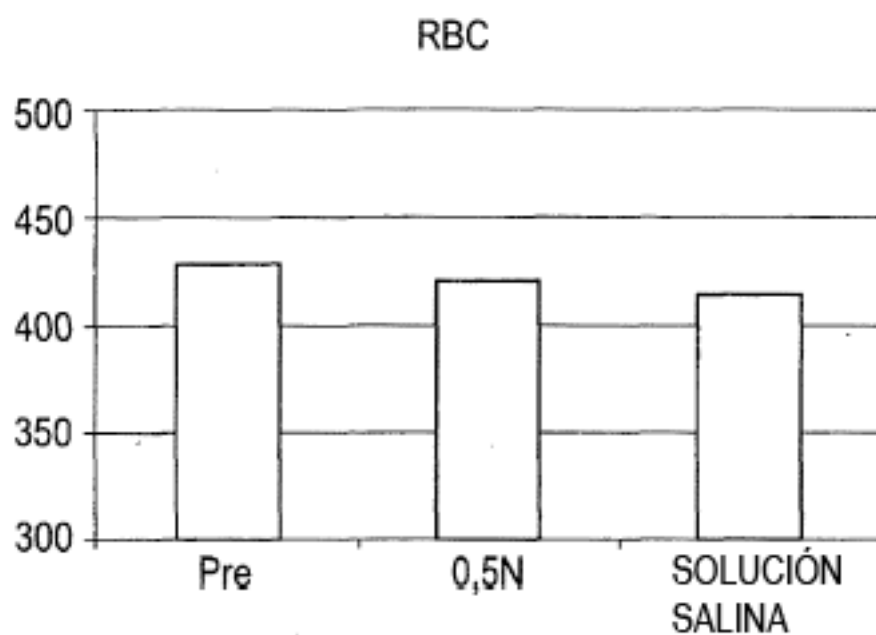


FIG. 8A

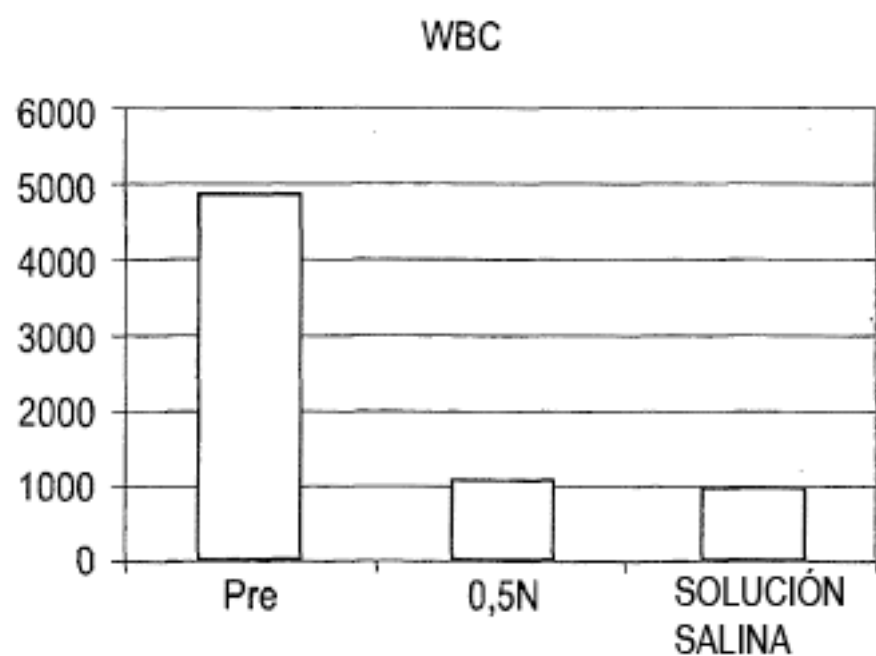


FIG. 8B

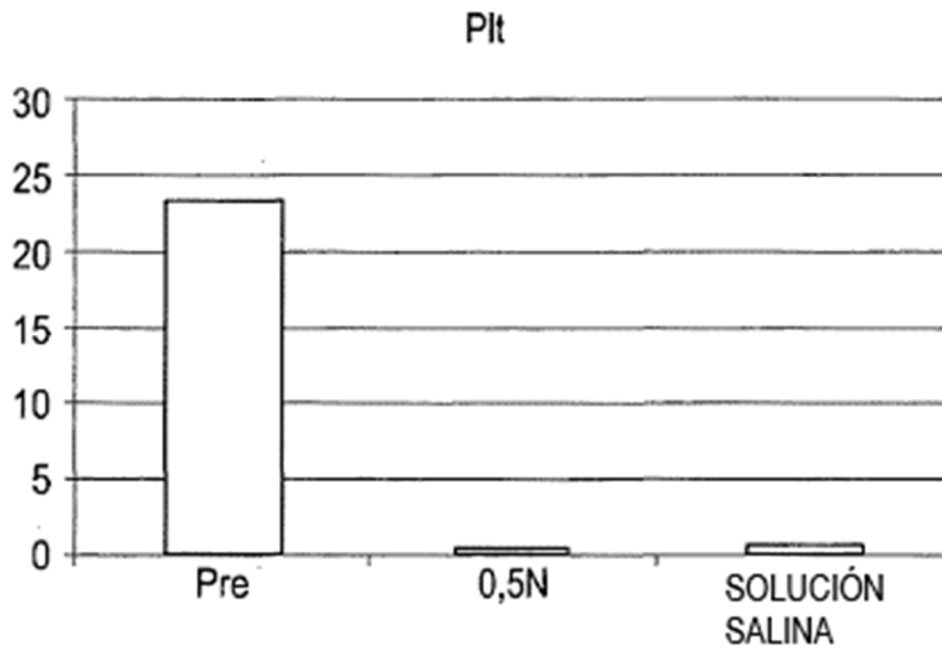


FIG. 8C

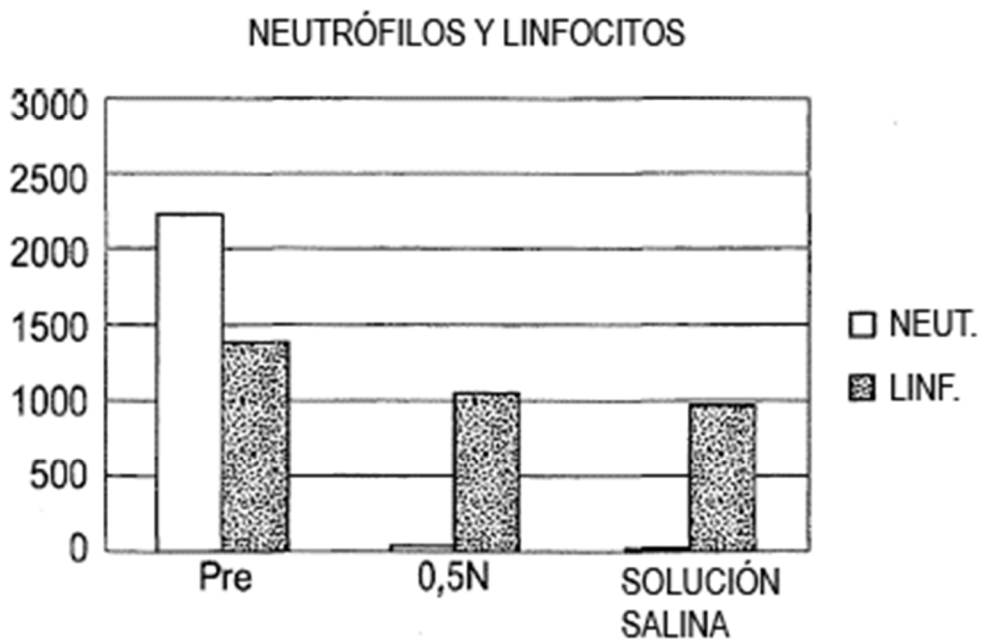


FIG. 8D

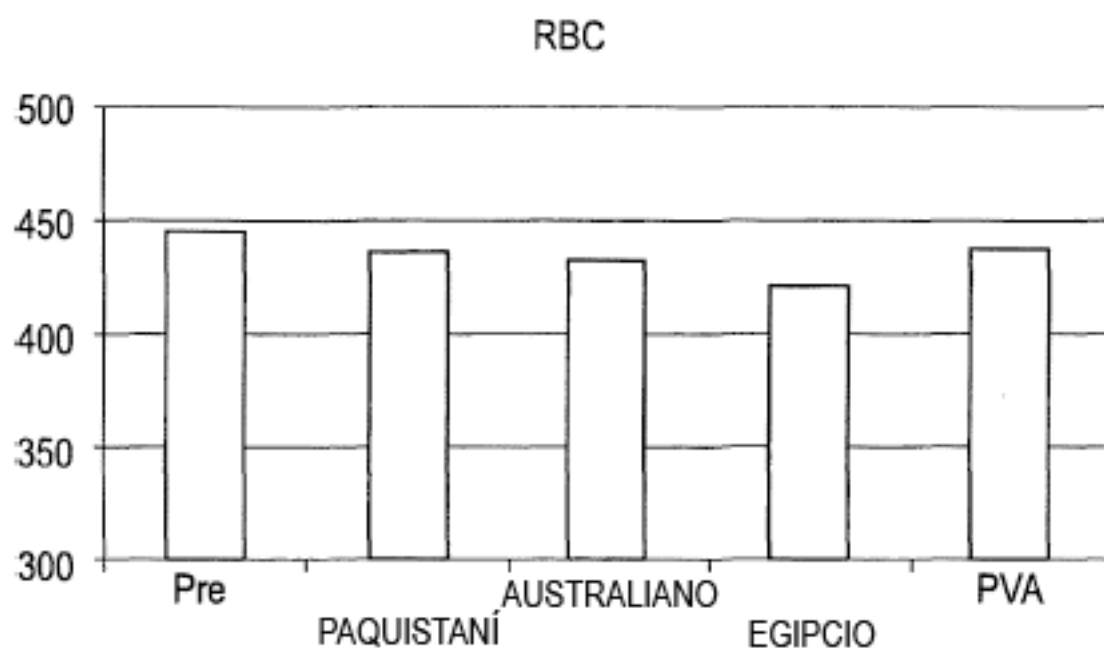


FIG. 9A

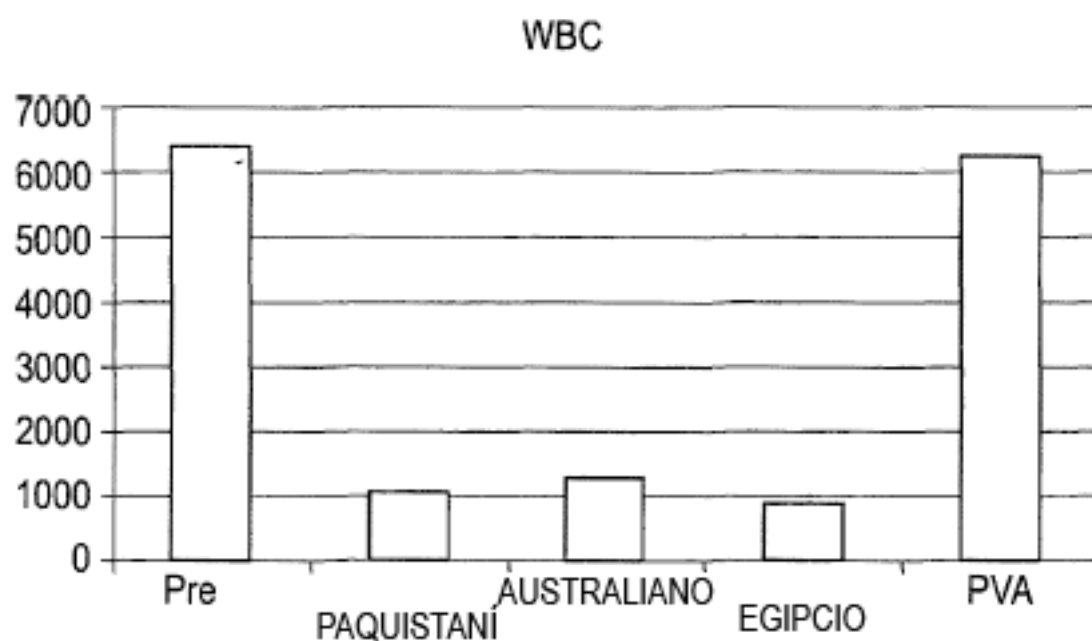


FIG. 9B

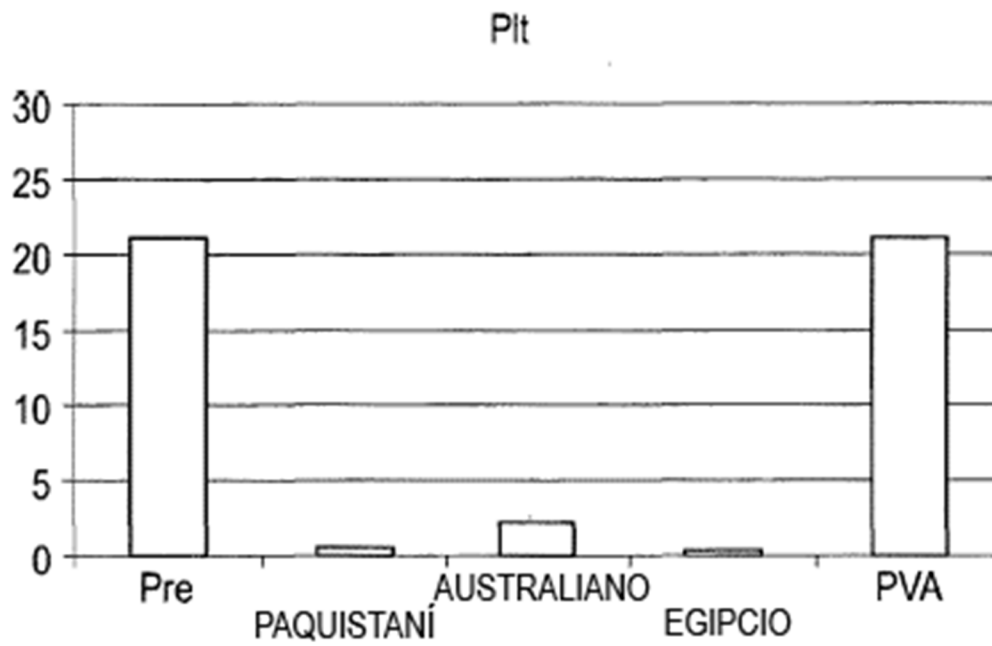


FIG. 9C

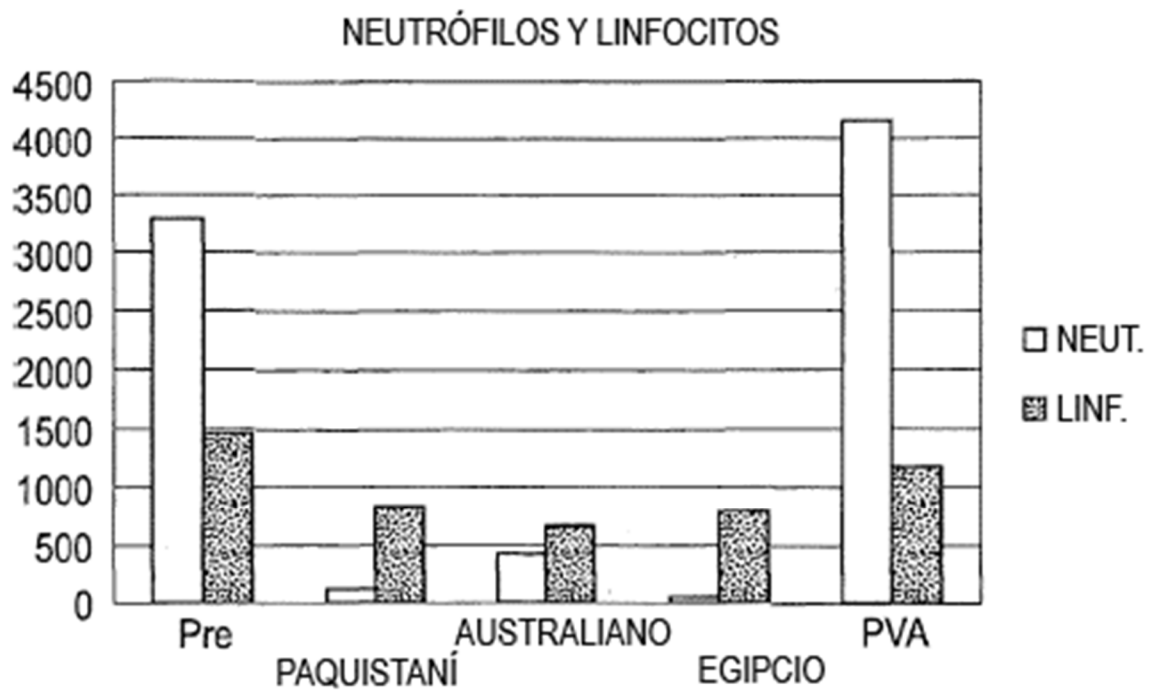


FIG. 9D

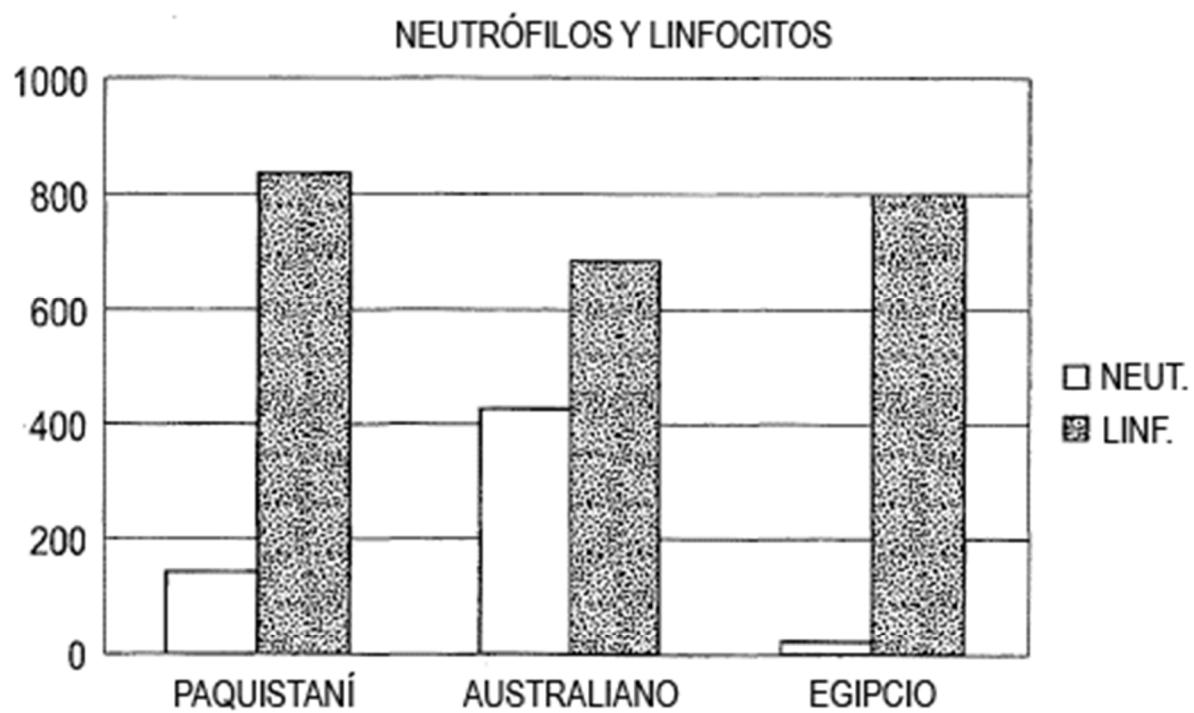


FIG. 10

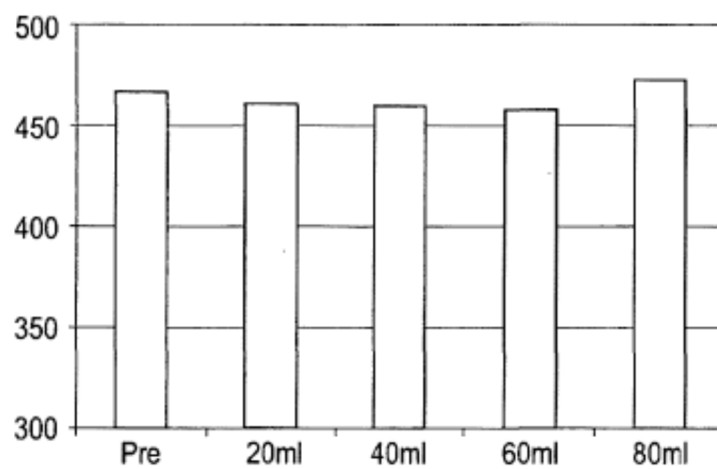


FIG. 11A

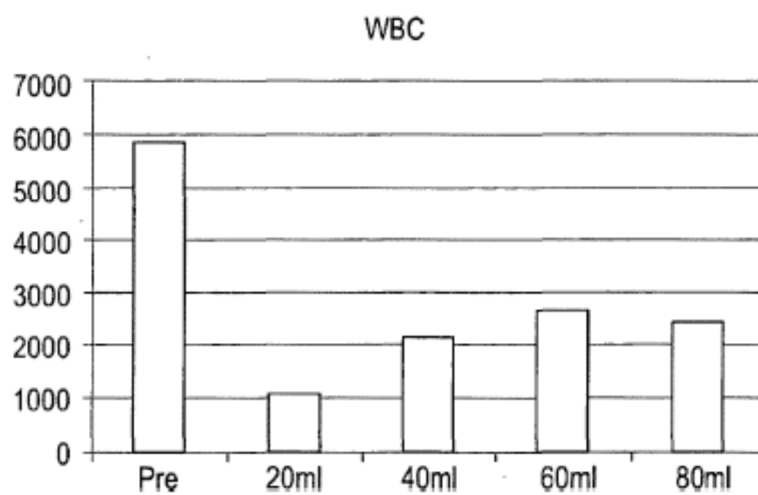


FIG. 11B

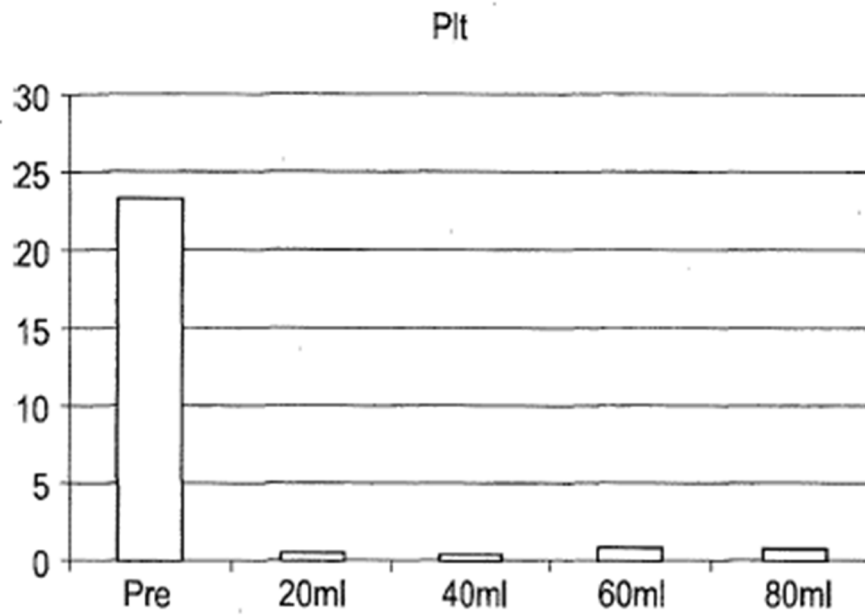


FIG. 11C

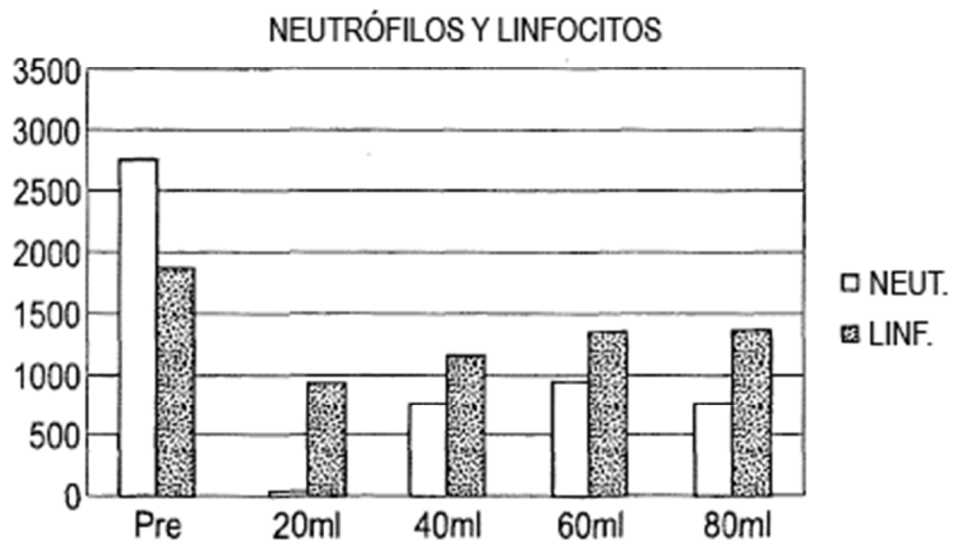


FIG. 11D

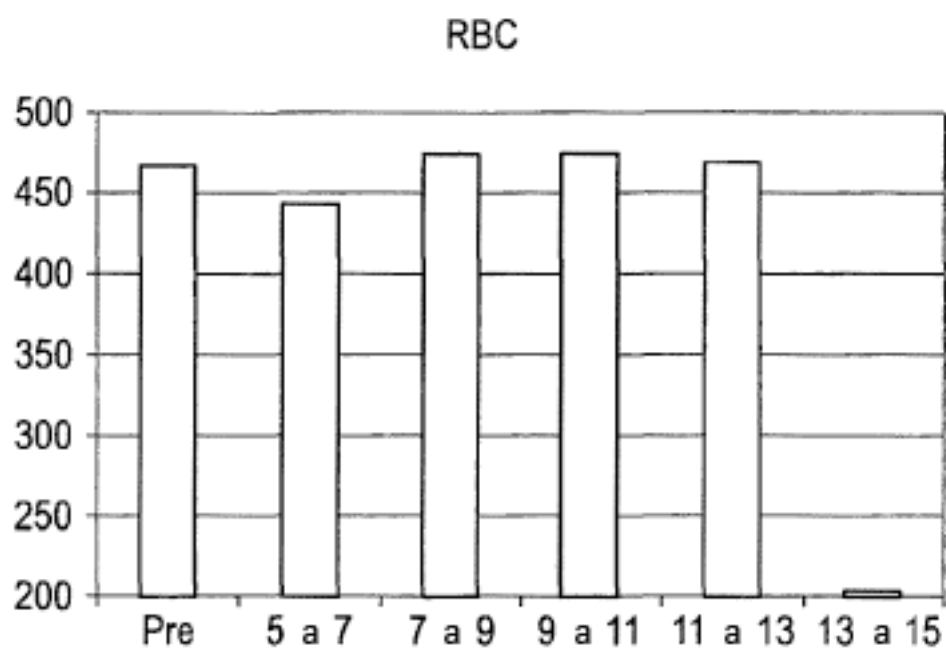


FIG. 12A

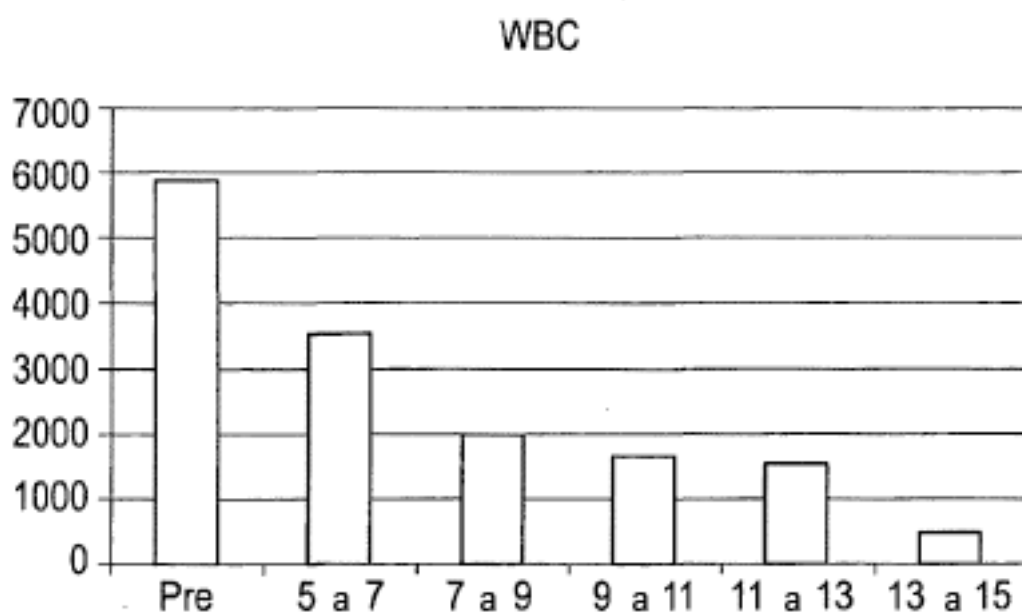


FIG. 12B

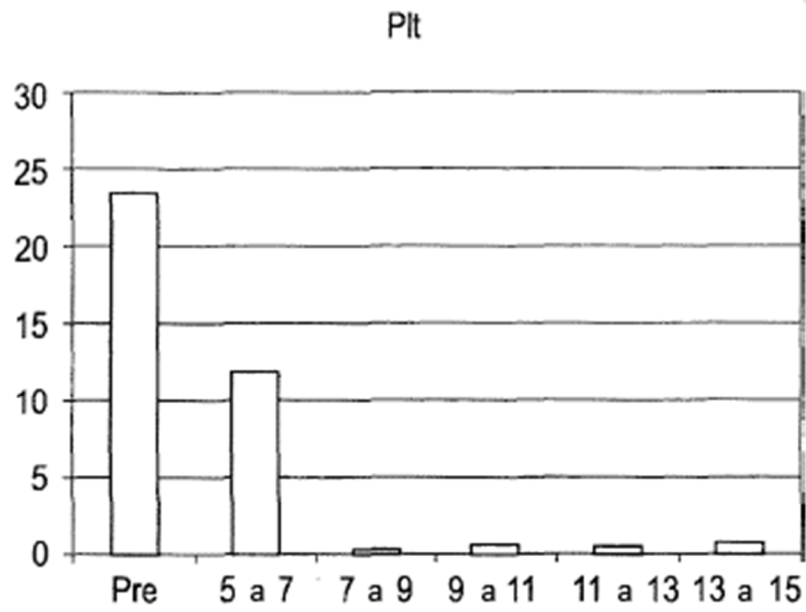


FIG. 12C

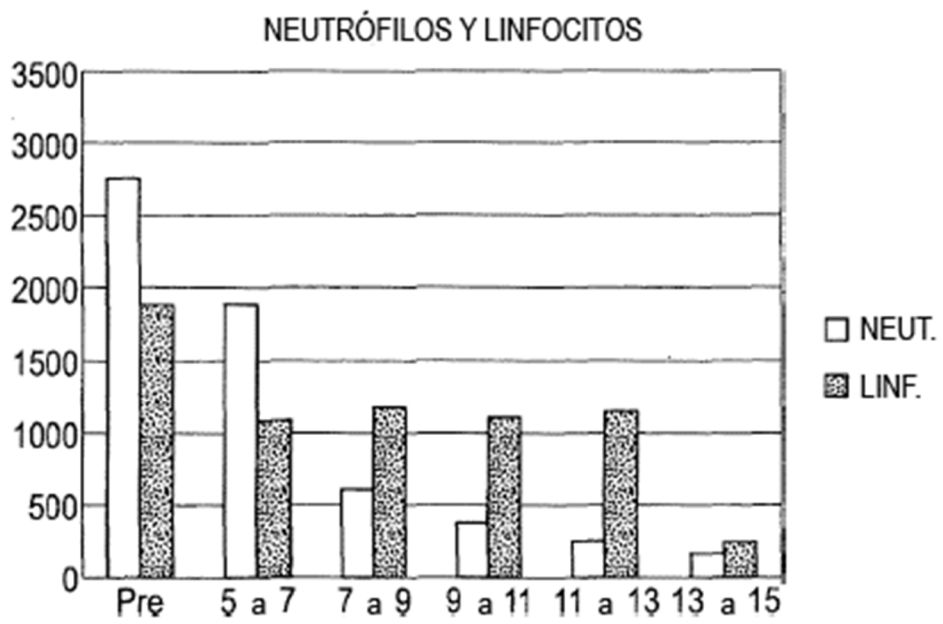


FIG. 12D

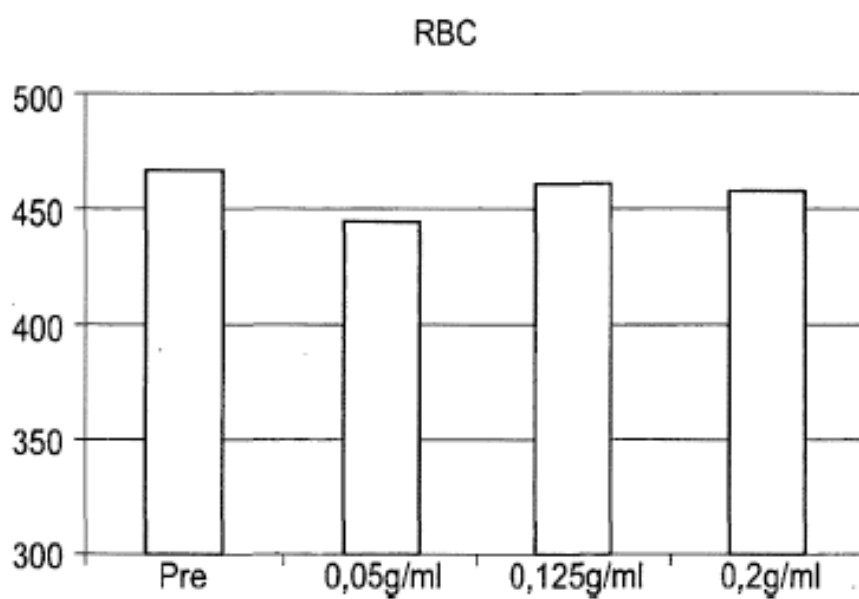


FIG. 13A

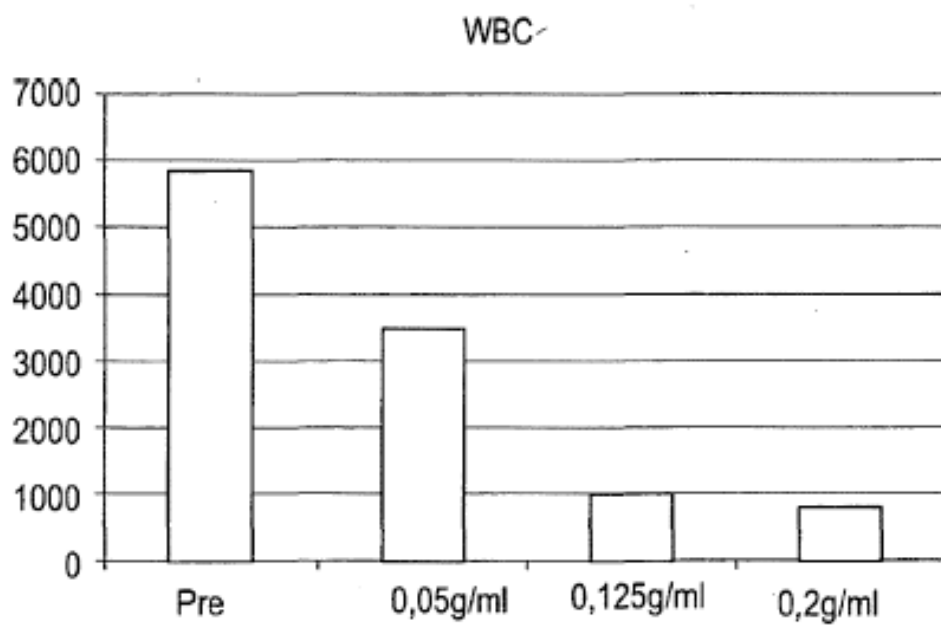


FIG. 13B

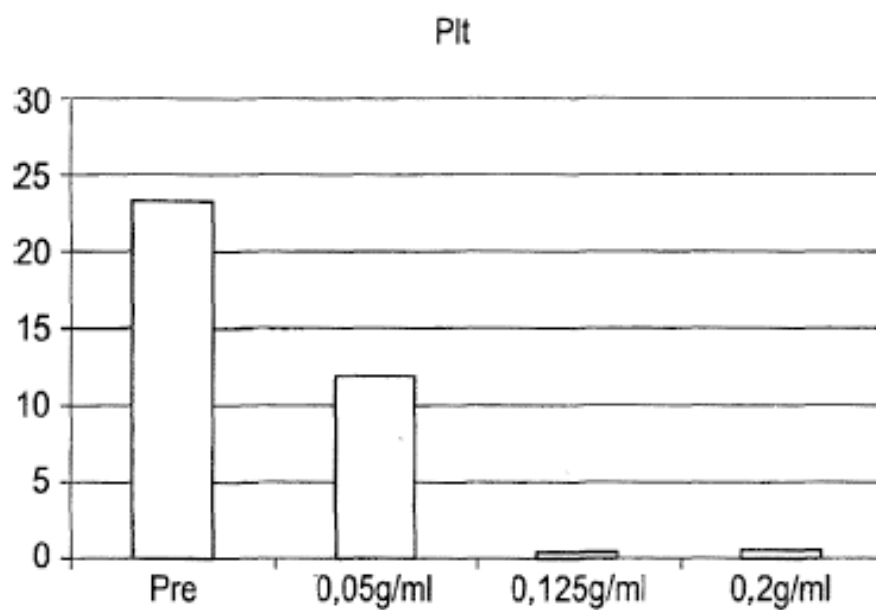


FIG. 13C

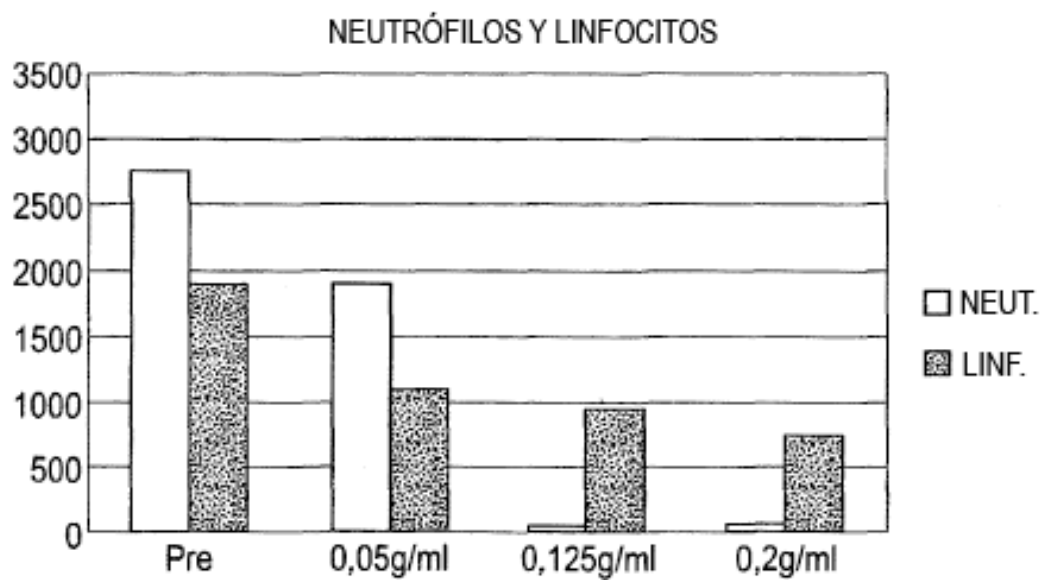


FIG. 13D

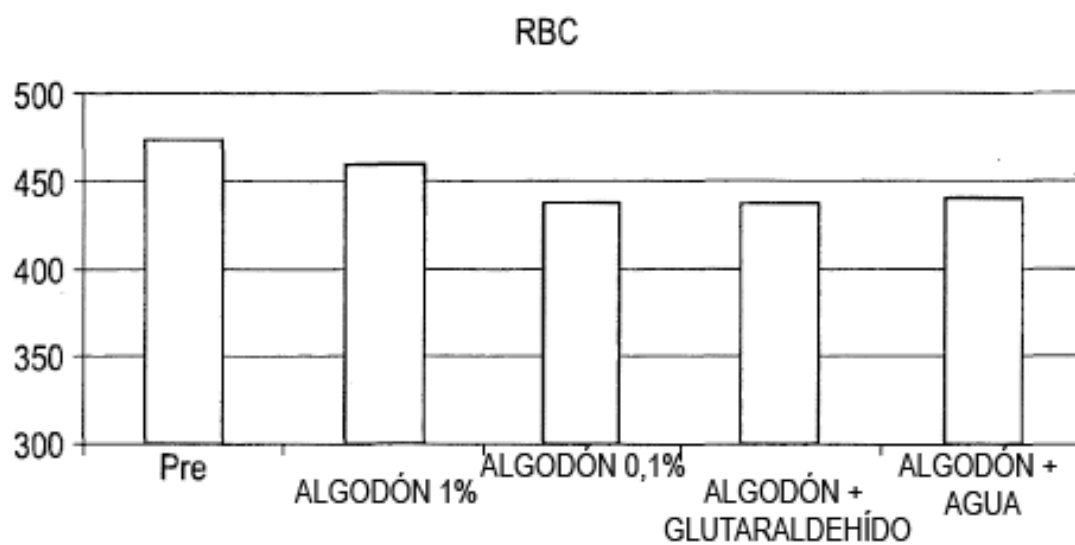


FIG. 14A

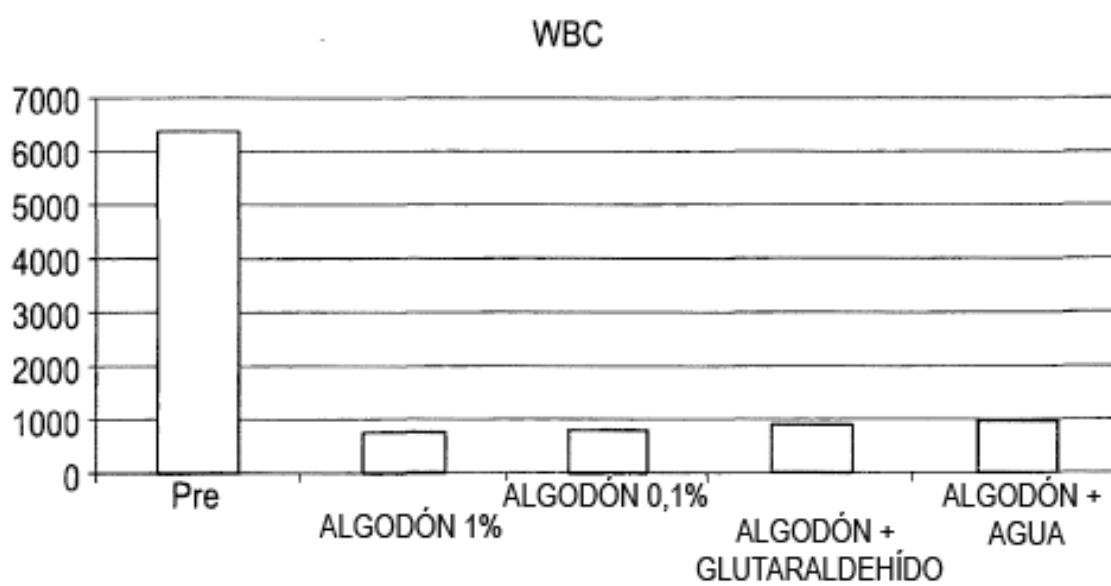


FIG. 14B

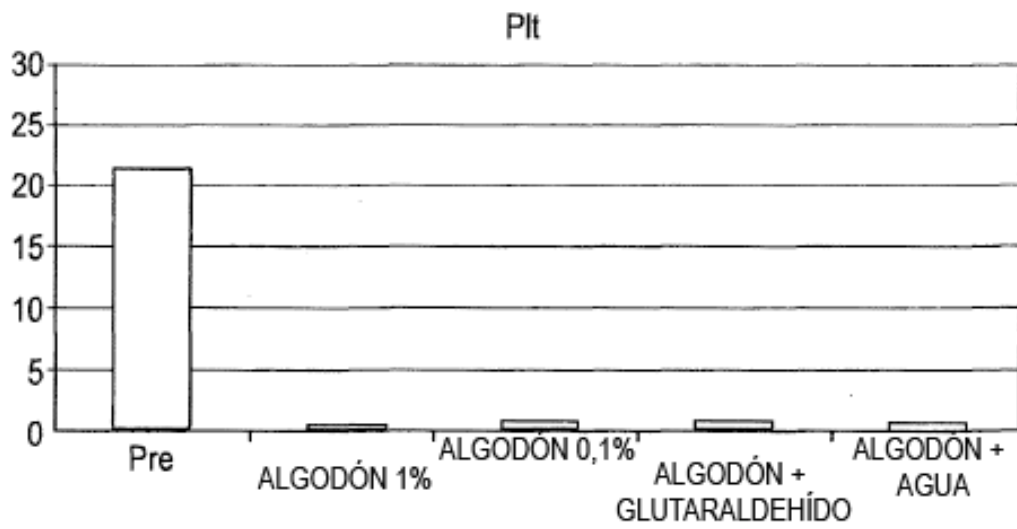


FIG. 15A

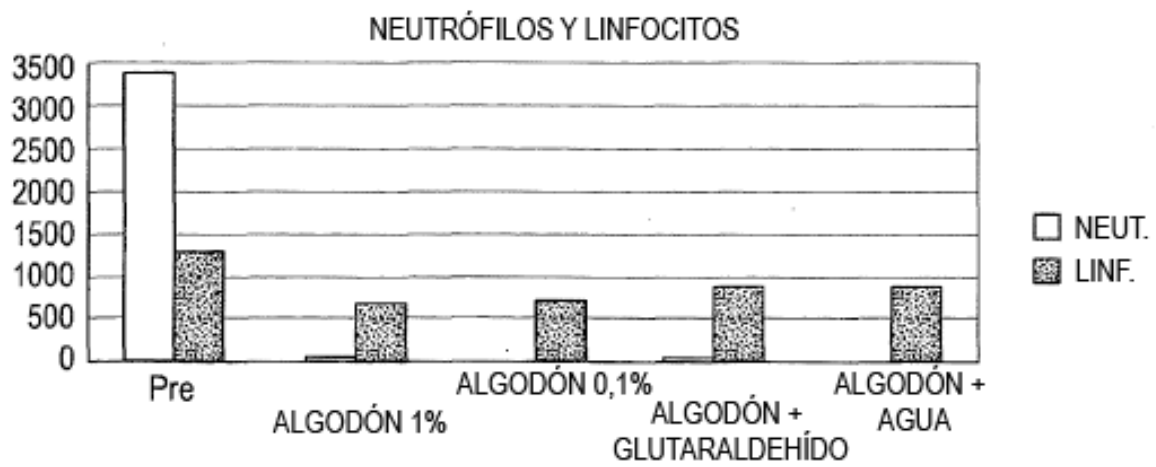


FIG. 15B

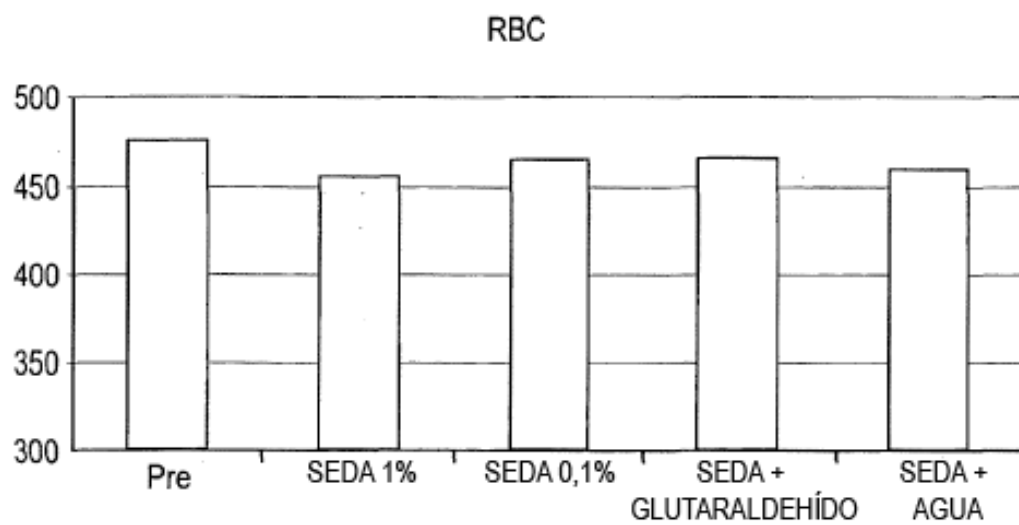


FIG. 16A

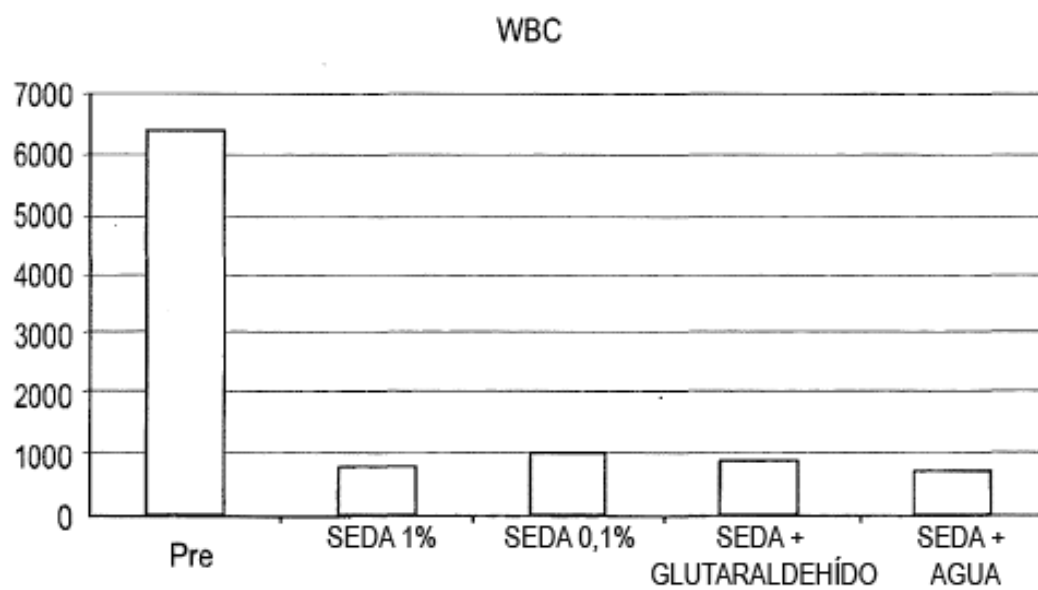


FIG. 16B

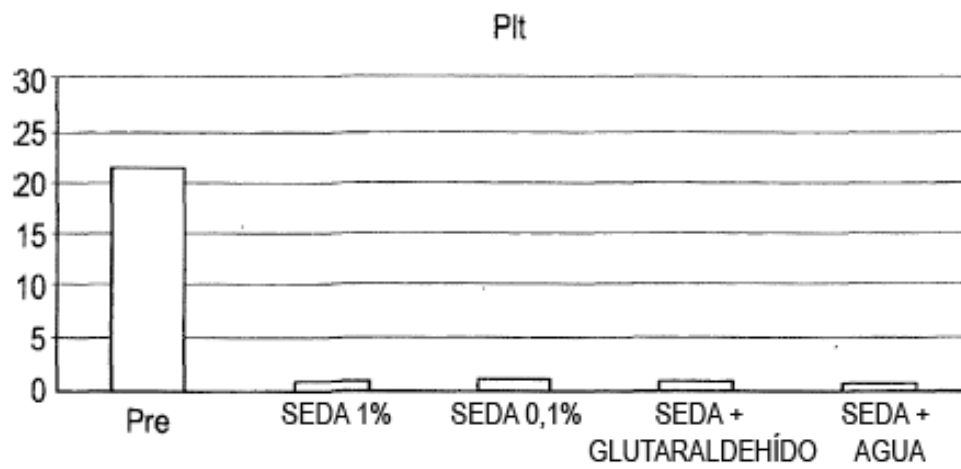


FIG. 17A

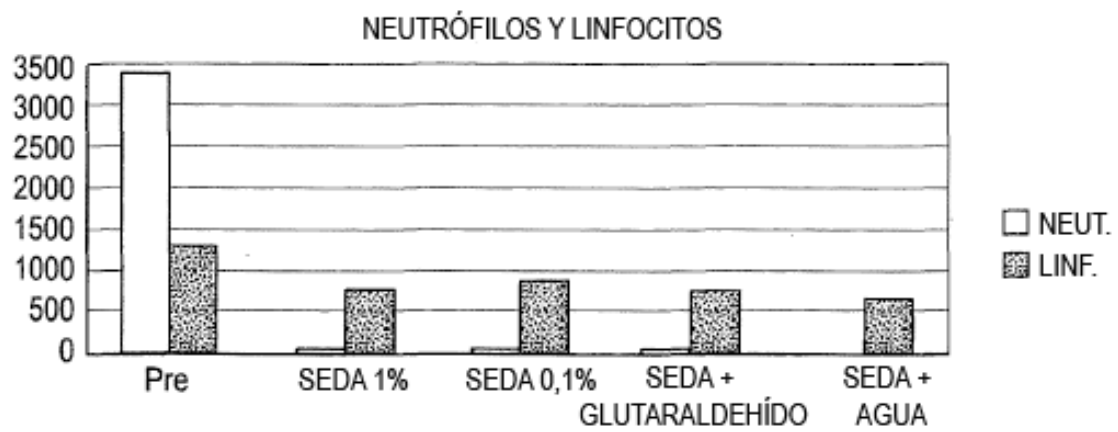


FIG. 17B

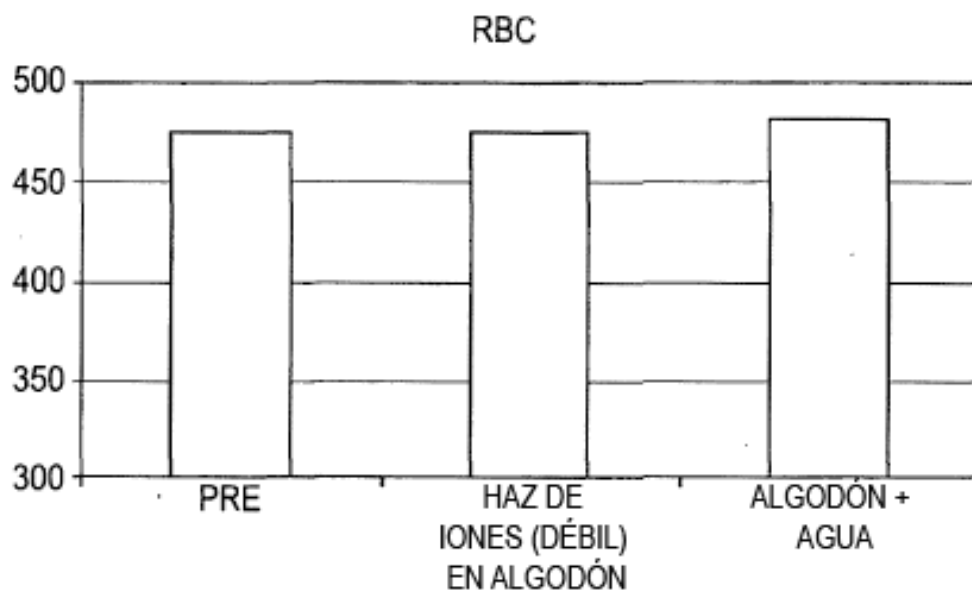


FIG. 18A

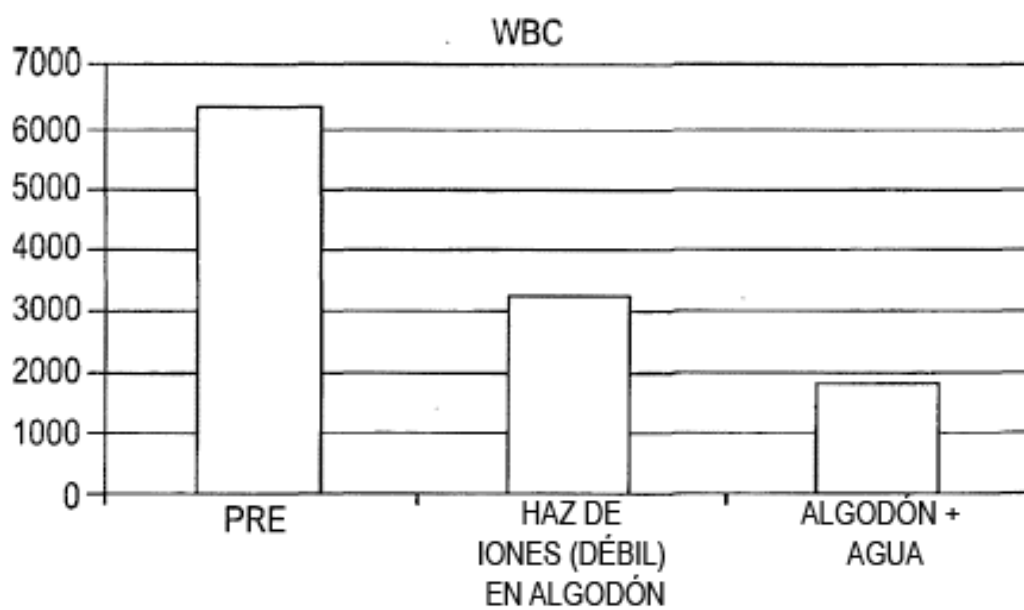


FIG. 18B

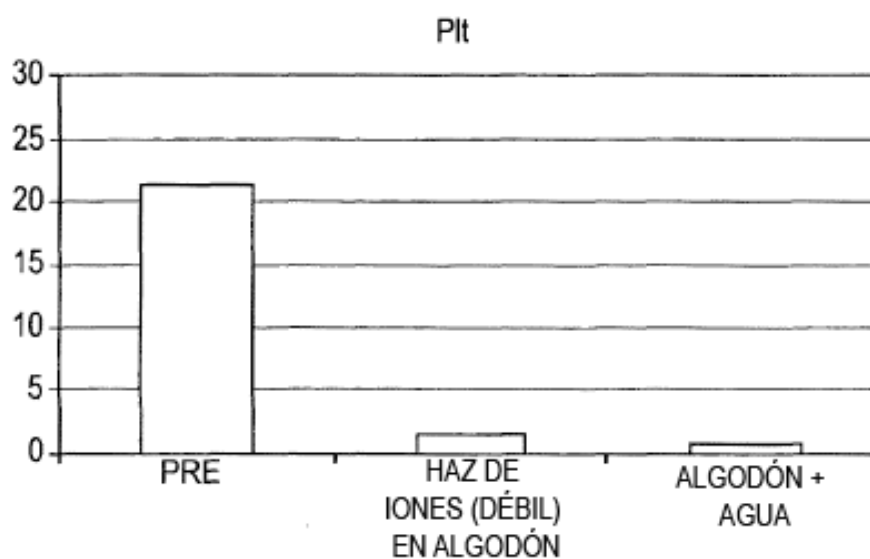


FIG. 18C

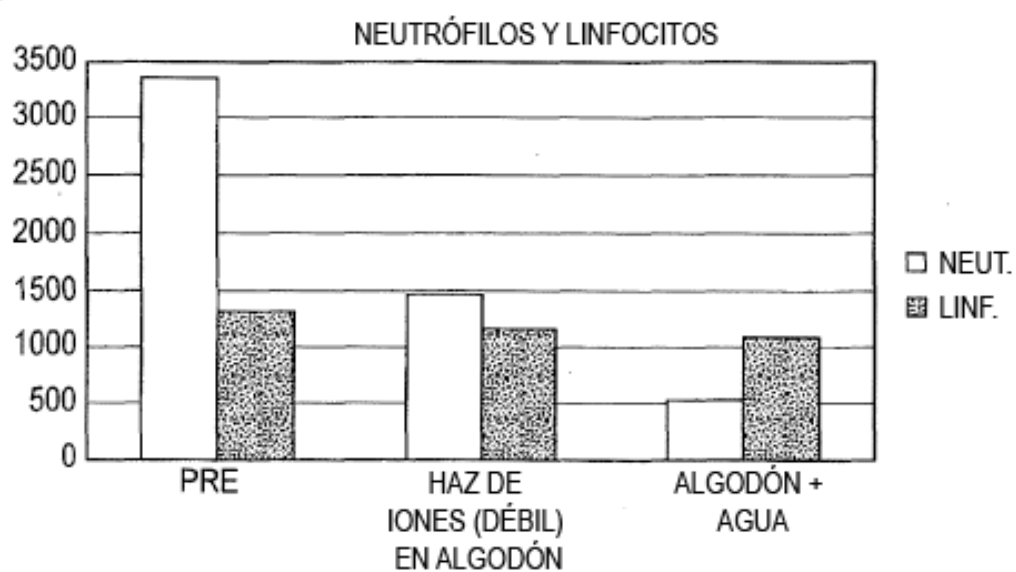


FIG. 18D

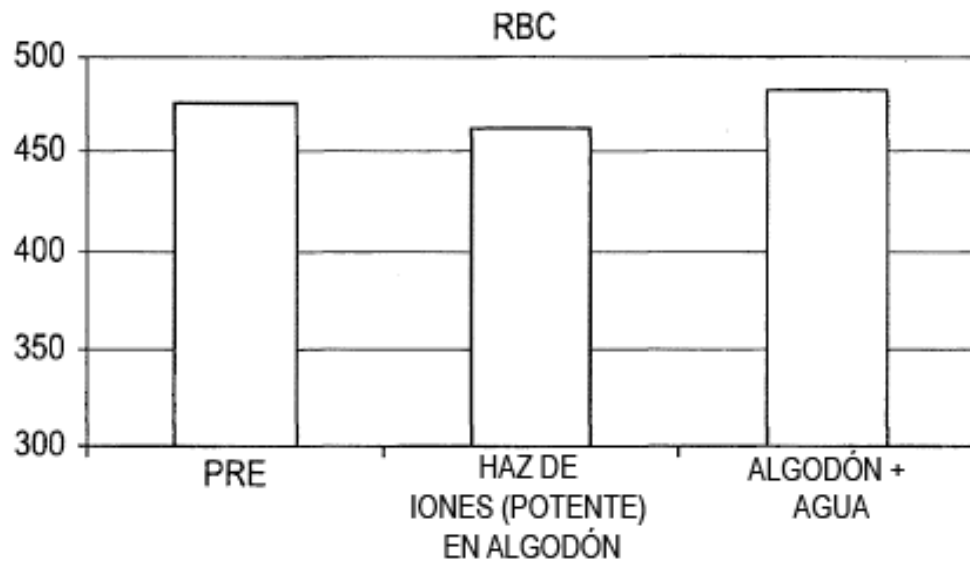


FIG. 19A

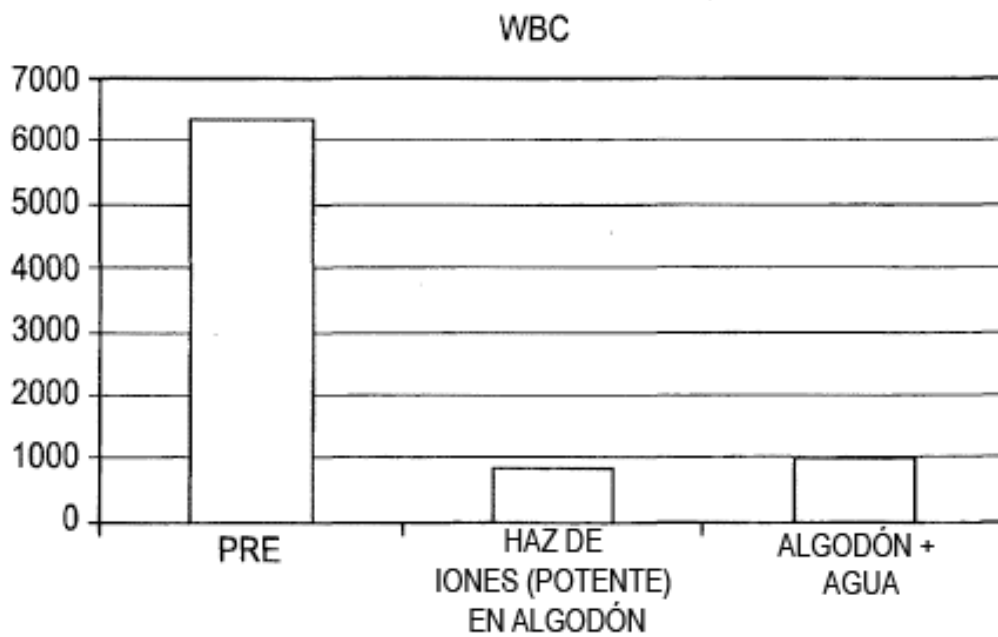


FIG. 19B

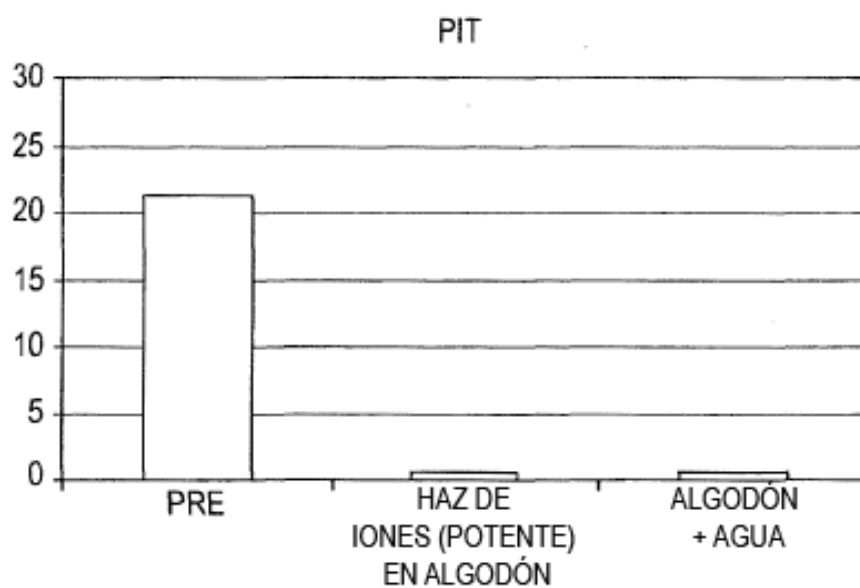


FIG. 19C

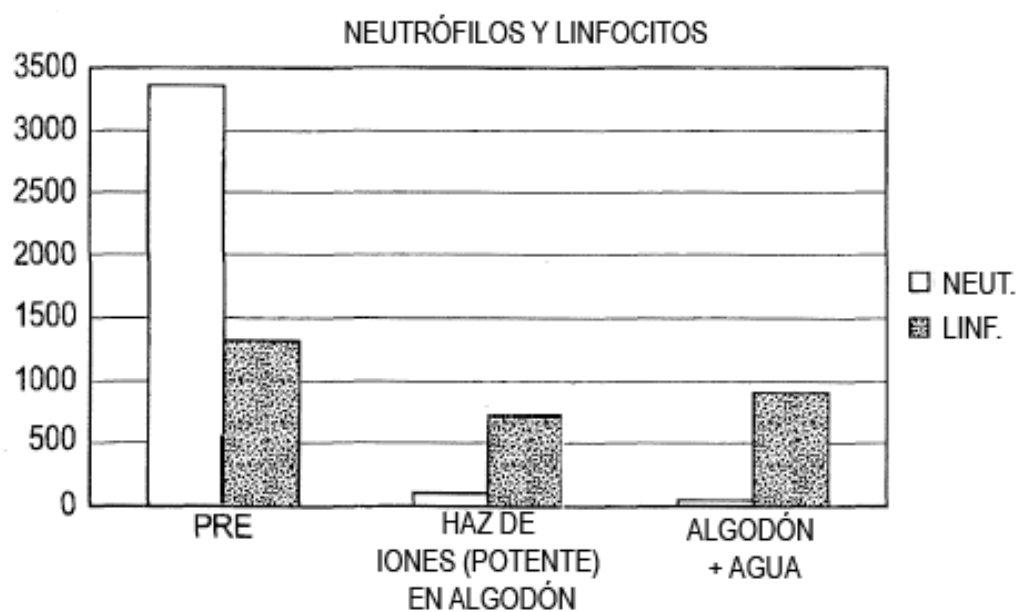


FIG. 19D

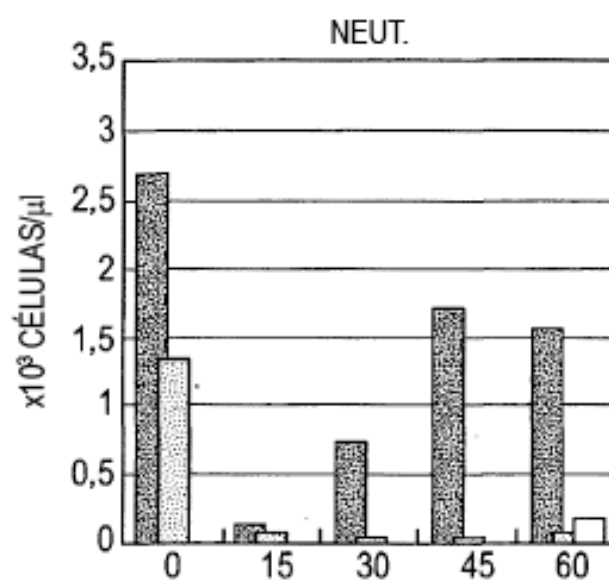


FIG. 20A

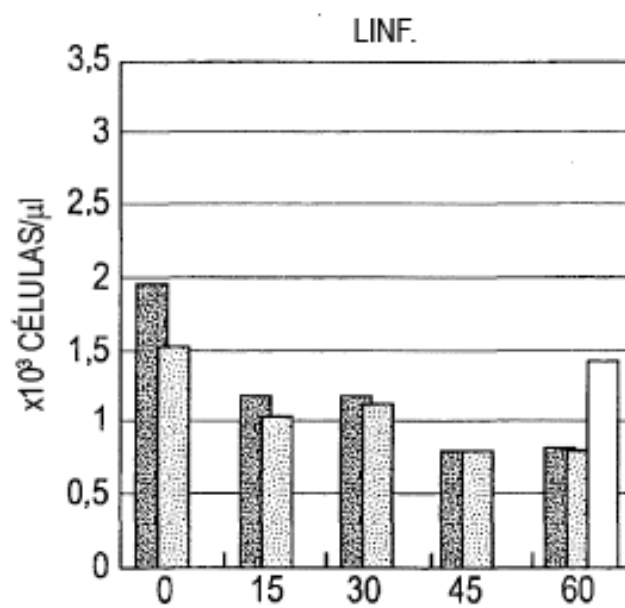
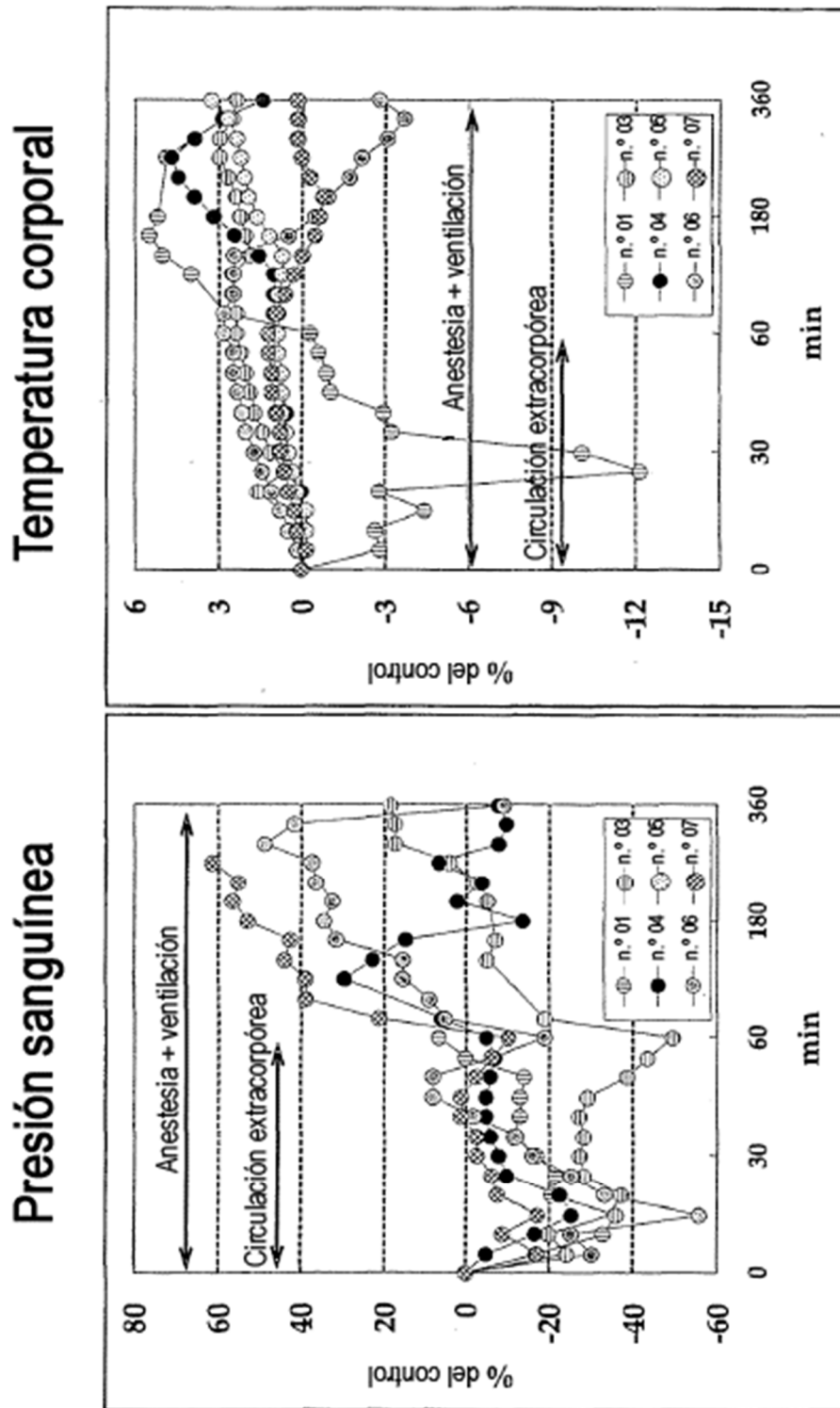


FIG. 20B

**FIG. 21**

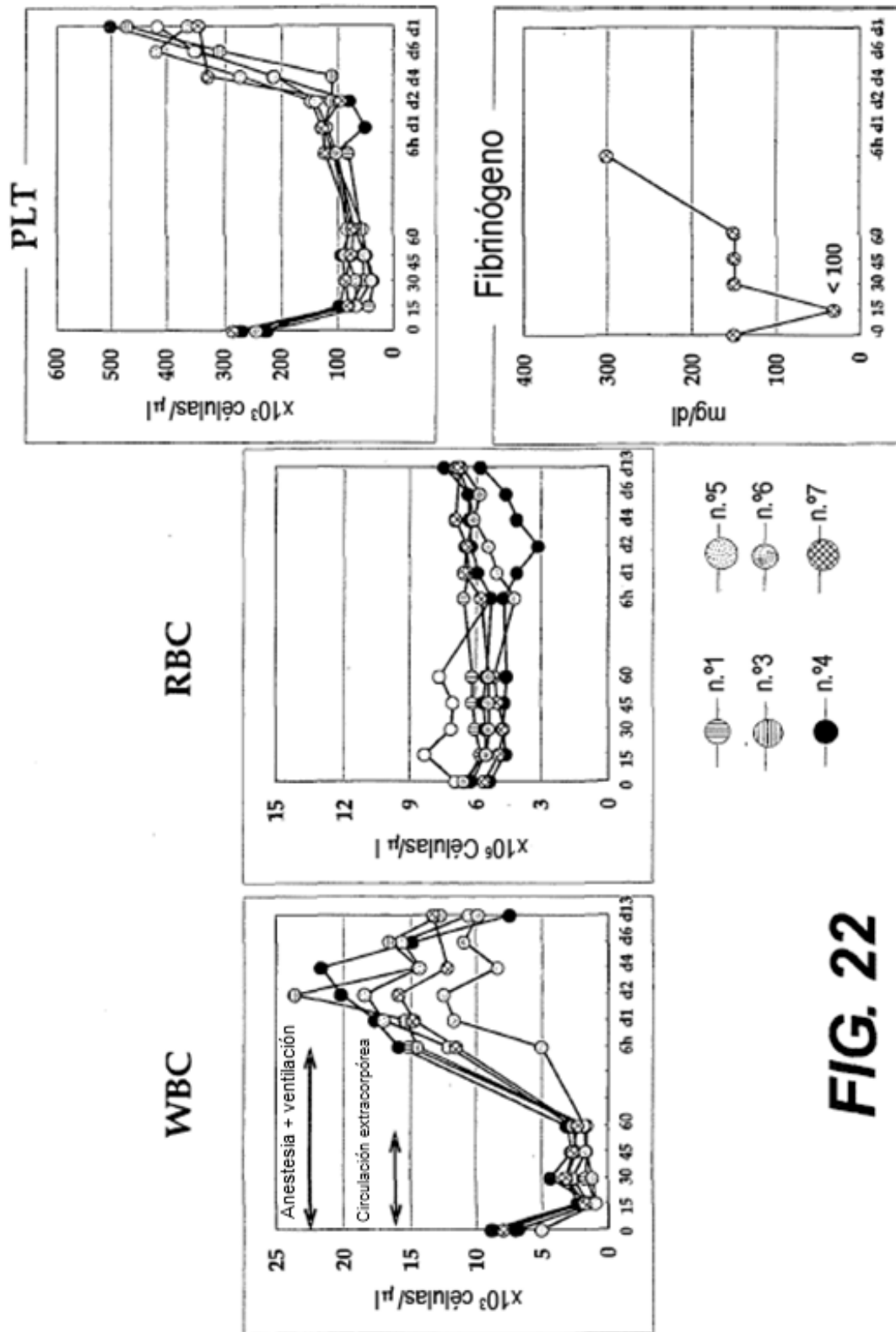


FIG. 22

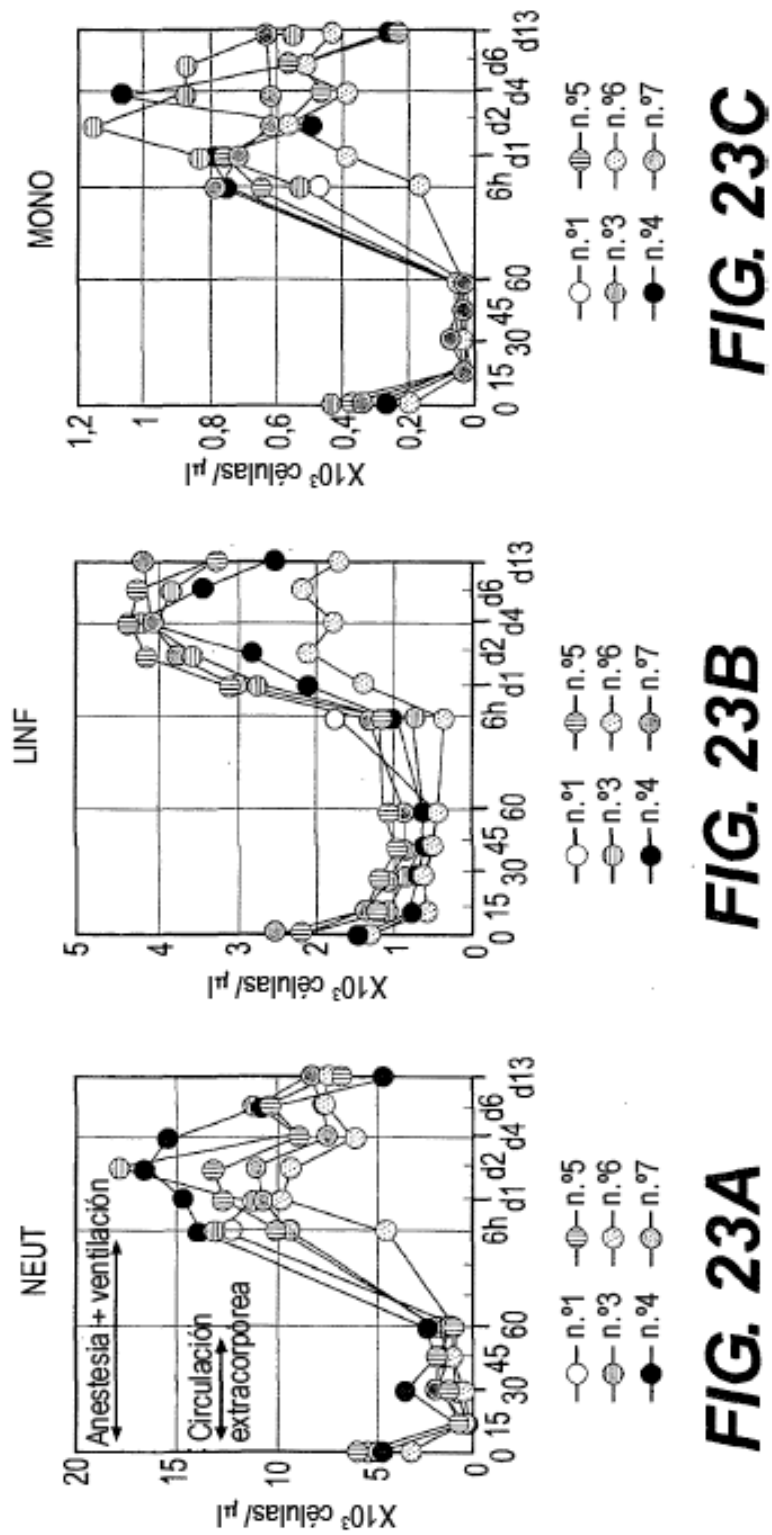


FIG. 23C

FIG. 23B

FIG. 23A

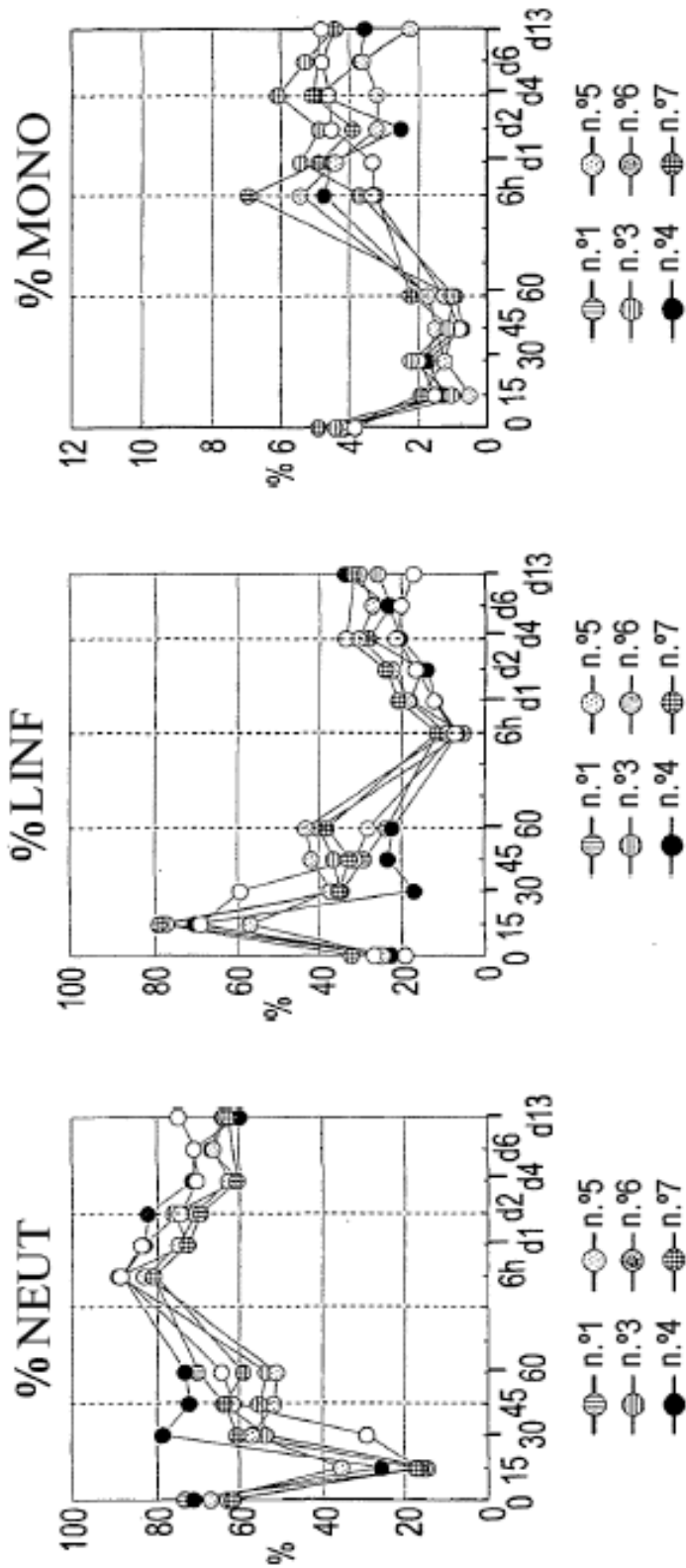


FIG. 24A

FIG. 24B

FIG. 24C

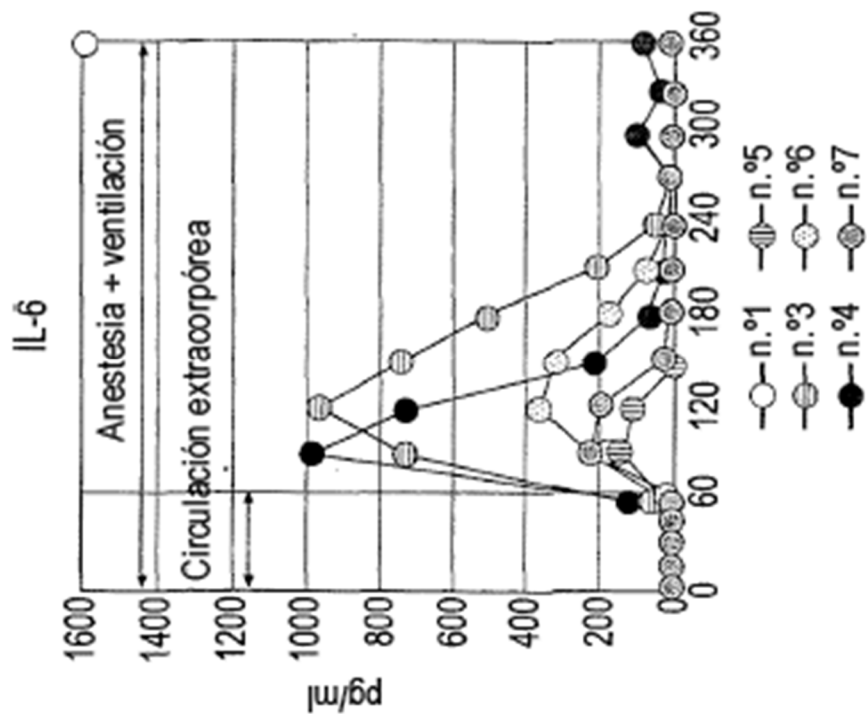


FIG. 25B

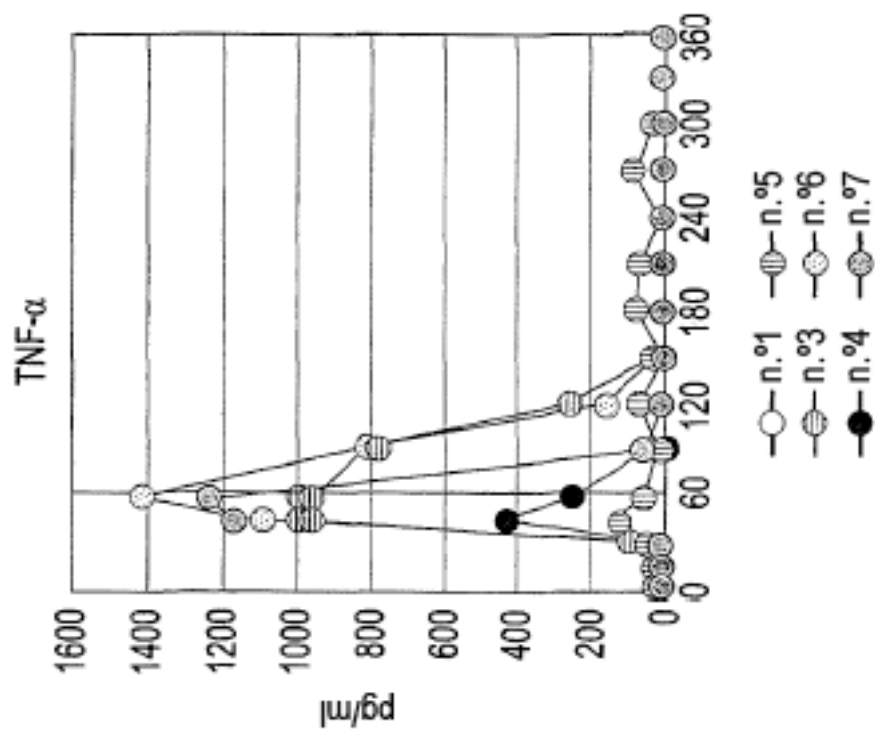


FIG. 25A

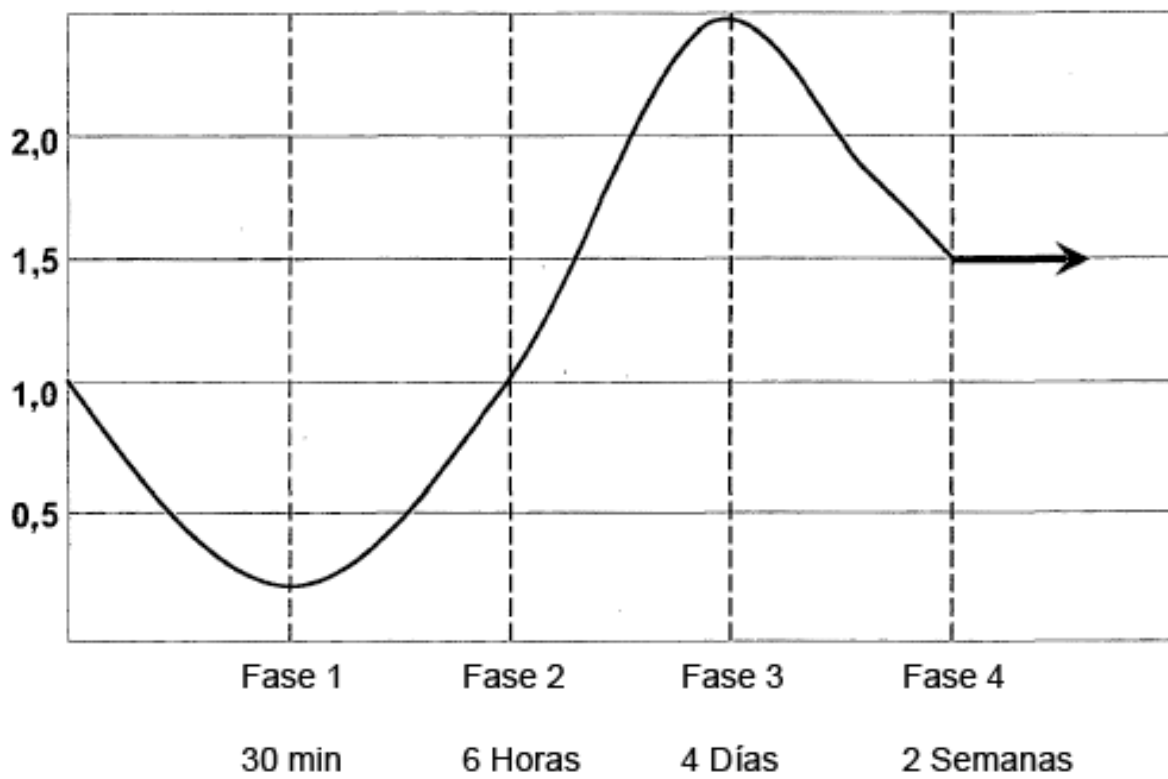


FIG. 26