

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 987**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

A61M 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2011 PCT/IB2011/000891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135429**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11729678 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2563343**

54 Título: **Aparato y kit de encapsulación de al menos un compuesto para su uso terapéutico y/o diagnóstico en eritrocitos**

30 Prioridad:

26.04.2010 IT BO20100255
12.08.2010 US 373018 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2017

73 Titular/es:

ERYDEL S.P.A. (100.0%)
Via Sasso 36
Urbino, IT

72 Inventor/es:

MAMBRINI, GIOVANNI y
SERAFINI, SONJA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 634 987 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

Aparato y kit de encapsulación de al menos un compuesto para su uso terapéutico y/o diagnóstico en eritrocitos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un aparato, a un kit, a sus usos y a un método de introducción de al menos un compuesto en el interior de eritrocitos.

10 **Antecedentes de la invención**

Recientemente muchos intentos se han centrado en el desarrollo de procedimientos para la liberación dirigida de agentes farmacéuticos en sitios específicos en un paciente o para obtener una liberación lenta de fármacos en el paciente. Se sabe que la eficacia de un fármaco puede aumentar cuando el sitio diana apropiado es alcanzado de manera efectiva por el fármaco, o cuando el fármaco se libera preferentemente en el órgano a tratar o en la célula a tratar. Además, la toxicidad de un fármaco puede reducirse cuando la cantidad total de fármaco administrado se minimiza aunque se mantiene su acción terapéutica hasta la liberación lenta del fármaco. El interés en los sistemas de administración de fármacos se refiere tanto a los agentes convencionales, muchos de los cuales son moléculas orgánicas relativamente simples, como a agentes activos farmacológicamente más complejos, tales como péptidos, proteínas, enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos señuelo, citoquinas, ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos, etc.

Un campo de interés reciente se refiere al uso de glóbulos rojos (designado en lo sucesivo como "eritrocitos" o "GRs") como portadores para liberar dosificaciones terapéuticas de fármacos en la circulación sanguínea en dosis bajas o en un sitio deseado en un paciente. Los eritrocitos pueden "cargarse" con agentes biológicamente activos y por medio de un proceso en el que las membranas celulares de los eritrocitos se hacen permeables y uno o más agentes se añaden a los eritrocitos resellando entonces las membranas celulares. Estos eritrocitos "cargados" o "tratados" ofrecen varias ventajas como sistemas de liberación de fármacos y sistemas de orientación selectiva, ya que son biodegradables, pueden mantenerse en la circulación durante largos periodos de tiempo y pueden orientarse selectivamente a células, tales como por ejemplo macrófagos.

Los procesos para la preparación de una suspensión celular cargada en una solución fisiológica se divulgan en la patente alemana n.º 23 26 244 y en las solicitudes de patentes alemanas publicadas con los números (0s) 23 26 161 y 24 95 119, en las que las membranas celulares de eritrocitos se lisan por presión osmótica y por campo eléctrico, respectivamente.

El documento "*Erythrocytes as carriers of primaquine-preparation: characterization and evolution*" (Naresh Talwar *et al.*; *Journal of Controlled Release*, 20 (1992) 133-142) divulga la encapsulación de fosfato en los eritrocitos. Se indica que el método sugerido implica la lisis de los eritrocitos y que los eritrocitos tratados se lavan. No obstante, en ninguna parte se menciona ni se sugiere que la concentración de los eritrocitos tratados ha de aumentarse y/o puede aumentarse.

La patente de Estados Unidos n.º 4.224.313, (Zimmermann *et al.*), divulga un método para preparar una masa de células cargadas en suspensión en una solución que aumenta la permeabilidad de la membrana celular por una presión osmótica inducida externamente o por un campo eléctrico o ambos. El material que se va a cargar incluye un agente farmacéutico que tiene la capacidad, cuando se incorpora en una célula, de destruir prematuramente las membranas celulares, y un agente estabilizante que puede inhibir la reacción del agente farmacéutico con las membranas celulares.

La patente de Estados Unidos n.º 4.478.824 (Franco *et al.*) divulga un método para incorporar sustancias en el interior de eritrocitos que cambian la presión osmótica interna de los GRs por medio de la acción de agentes químicos, tales como DMSO y glicerol, que pueden atravesar la membrana celular y entrar en las células por difusión.

La patente de Estados Unidos n.º 4.652.449, (Ropars *et al.*), divulga un método y un aparato para incorporar materiales en el interior de eritrocitos por presión osmótica. El método y el aparato se han empleado y sometido a ensayo solo en grandes volúmenes de sangre. Esto limita muchas aplicaciones para el empleo de sangre autóloga, es decir, sangre obtenida del mismo paciente que luego recibirá la sangre cargada con el fármaco.

La patente de Estados Unidos n.º 4.931.276, (Franco *et al.*), divulga un método para encapsular agentes no iónicos en eritrocitos. El método tiene una eficacia limitada cuando el agente deseado a incorporarse es no aniónico, o es aniónico o polianiónico pero no está presente en el medio acuoso prácticamente isotónico en una concentración suficiente para provocar los aumentos requeridos en la permeabilidad de las células sin la destrucción de las células.

Heusch *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 122:266-272 (1985), muestran que, en las células osmóticamente hinchadas, la doble capa lipídica que forma la membrana se separa del citoesqueleto de la célula, y la célula varía

considerablemente su tamaño y se vuelve esférica. Esto no ocurre en condiciones normales.

La solicitud de patente con número de publicación EP1466968 divulga un método y una máquina para encapsular sustancias activas en eritrocitos.

5 Las revisiones de los métodos para la incorporación de sustancias en células se proporcionan por Franco *et al.* en *Life Science* 32:2763-2768 (1983), *Am. J. Hematol.* 17:393-400 (1984), y *J. Cell. Physiol.* 129:221-229 (1986).

10 Aunque el uso de eritrocitos como sistemas de liberación de fármacos ha sido investigado por muchos, los métodos y los dispositivos que implementan estas metodologías aún no se han desarrollado hasta el punto de aplicarse normalmente en la práctica clínica, en el diagnóstico y en la investigación.

15 Además, las metodologías y los dispositivos desarrollados hasta ahora no son lo suficientemente flexibles como para permitir obtener eritrocitos para cualquier tipo de uso en el campo terapéutico, de diagnóstico y de investigación. En particular, siguiendo los procedimientos divulgados en el estado de la técnica, a menudo no es posible obtener un producto que pueda utilizarse realmente en el campo del diagnóstico (o terapéutico).

20 Un ejemplo reciente de un aparato para la encapsulación de un compuesto en eritrocitos también se divulga en la patente US6139836. Aunque este aparato representa una mejora considerable con respecto al estado anterior de la técnica, es relativamente complejo, costoso y difícil de usar. A este respecto, cabe señalar que el funcionamiento del aparato de la patente US6139836 requiere la presencia y la intervención continua de un operador especializado que ha de operar los diferentes componentes del aparato en la secuencia correcta. Por lo tanto, el tratamiento (carga) de eritrocitos demanda una gran cantidad tiempo e implica el riesgo de los errores que comete el operador.

25 Los aparatos conocidos no se pueden llevar a cabo de manera apropiada. Debido al hecho de que no pueden llevarse a cabo, el procedimiento necesita, por lo tanto, llevarse a cabo en estructuras dedicadas y no es posible operar en sitios que son más accesibles a los pacientes. Además, los aparatos conocidos requieren la intervención continua de personal especializado y no son siempre precisos y/o suficientemente eficaces.

30 Es objeto de la presente invención proporcionar un aparato, un kit, un uso y un método, que permitan superar al menos parcialmente los inconvenientes del estado de la técnica y al mismo tiempo sean fáciles y rentables de implementar.

35 Sumario

Según la presente invención, se proporcionan un aparato, un kit, usos y un método según las siguientes reivindicaciones independientes y, preferentemente, según cualquiera de las reivindicaciones directa o indirectamente dependientes en las reivindicaciones independientes.

40 Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, que muestran realizaciones no limitativas de los mismos, en los que:

- 45 - La Figura 1 es un diagrama de un aparato realizado según la presente invención;
 - La Figura 2 es un diagrama de una segunda realización de un aparato realizado según la presente invención;
 - La Figura 3 es un diagrama de una tercera realización de un aparato realizado según la presente invención;
 - La Figura 4 es una vista en perspectiva parcial, con detalles eliminados para mayor claridad, de un dispositivo reutilizable del aparato de la figura 1;
 50 - La Figura 5 es una vista superior esquemática, con detalles eliminados para mayor claridad, del aparato de la figura 1;
 - Las Figuras. 6 y 7 son vistas en perspectiva lateral, con detalles eliminados para mayor claridad, del aparato de la figura 5;
 - La Figura 8 muestra esquemáticamente algunas partes del aparato de la figura 1;
 55 - La Figura 9 muestra esquemáticamente un dispositivo desechable del aparato de la figura 1;
 - La Figura 10 es una imagen fluoroangiográfica obtenida mediante el uso de una infusión de eritrocitos cargados con verde de indocianina con un hematocrito del 6,4 %; y
 - La Figura 11 es una imagen fluoroangiográfica obtenida mediante el uso de una infusión de eritrocitos cargados con verde de indocianina con un hematocrito del 54 %.

60 Realizaciones de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato para la introducción de al menos un compuesto en el interior de los eritrocitos.

65 En las figuras. 1, 5, 6, 7 y 8, la referencia numérica 1 indica en conjunto un aparato para la introducción de al menos

un compuesto en el interior de eritrocitos. En particular, el aparato 1 se adapta para recibir una muestra de sangre que contiene eritrocitos; para recibir la muestra con una solución fisiológica a fin de separar el plasma y otras células sanguíneas de los eritrocitos; para hinchar los eritrocitos y lisarlos; para cargar el compuesto en el interior de los eritrocitos; y para cerrar los eritrocitos cargados con el fin de obtener eritrocitos tratados.

5 En particular, la solución fisiológica es una solución salina y es por ejemplo una solución acuosa de NaCl al 0,9 % en peso/volumen. Según realizaciones alternativas, es otra solución adecuada para el lavado de sangre.

10 Más en particular, cuando la muestra lavada se pone en contacto con una primera solución, los eritrocitos se hinchan. Los eritrocitos hinchados se exponen entonces a una segunda solución, llevándoles a lisarse parcial o totalmente. Posteriormente, los eritrocitos lisados o parcialmente lisados se concentran en un hemofiltro. Los eritrocitos lisados o parcialmente lisados se ponen en contacto con al menos un compuesto. Por ende, el compuesto se distribuye dentro y fuera de los eritrocitos lisados o parcialmente lisados. En otras palabras, algunas de las moléculas del compuesto se introducen en los eritrocitos. Los eritrocitos, que (en esta etapa del procedimiento) contienen el compuesto, se exponen entonces a una solución de sellado. La exposición a la solución de sellado induce las membranas celulares a sellarlas de nuevo, encapsulando de este modo el compuesto en el interior de la célula. El llamado "portador de GRs" o "eritrocito tratado" resultante se lava a continuación (con la misma solución fisiológica como se ha indicado previamente). Esto se hace para eliminar lo que no ha sido encapsulado en los GRs durante el procedimiento.

20 En particular, los compuestos se encapsulan utilizando los métodos de la presente invención.

25 Según algunas realizaciones, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: un agente biológicamente activo, un agente farmacológicamente activo, nanopartículas con hasta 500 nm de diámetro, un medio de contraste para el diagnóstico, una sustancia que hace que los eritrocitos sean identificables por fluorescencia, detectores ópticos, magnéticos y/o ecográficos (y/o con cualquier otro método adecuado para detectar el medio de contraste incorporado por el procedimiento en los eritrocitos). En particular, el compuesto es un fármaco, una sonda molecular o un profármaco (es decir, un precursor de un agente biológicamente o farmacológicamente activo).

30 Según algunas realizaciones, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, enzimas, hormonas, corticoides, glucocorticoides, agentes no esteroideos antiinflamatorios, inhibidores de la proteasa, glutatión, citoquinas, toxinas, oligonucleótidos y otros ácidos nucleicos y análogos de nucleósidos que son bien conocidos como agentes terapéuticos útiles. Estos incluyen 6-mercaptopurina (6-MP) o azatiopurina y fosfato de fludarabina que se utilizan comúnmente como agentes inmunosupresores y agentes inhibidores del crecimiento de células malignas, y azidotimidina fosforilada (AZT), dideoxicitosina (ddC) y dideoxiinosina (ddI), que son útiles como agentes anti-virales, en particular en el tratamiento del SIDA.

40 Por ejemplo, dexametasona-21-fosfato (d-21P) puede encapsularse en los portadores de GRs y cuando los GRs cargados se introducen en el sistema circulatorio de un mamífero, d-21P se convierte lentamente al fármaco dexametasona. Puesto que la dexametasona puede atravesar la membrana celular de los eritrocitos portadores (mientras que d-21P no puede), este proceso asegura que el mamífero está provisto de un nivel constante del agente biológicamente activo (en este caso dexametasona) durante un cierto periodo de tiempo.

45 Según realizaciones específicas, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: aminoácidos, oligopéptidos (2-10 aminoácidos), polipéptidos (10-20 aminoácidos), proteínas (más de 20 aminoácidos), hormonas, corticoides, glucocorticoides, AINEs, glutatión, citoquinas, toxinas, oligonucleótidos (hasta 20 nucleótidos), polinucleótidos (más de 20 nucleótidos). Los oligonucleótidos y polinucleótidos pueden contener uno o más nucleótidos modificados o análogos de nucleótidos. Los aminoácidos, los oligopéptidos y los polipéptidos pueden contener uno o más aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos. En particular, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: aminoácidos, oligopéptidos (2-10 aminoácidos), polipéptidos (10-20 aminoácidos), proteínas (más de 20 aminoácidos), hormonas, corticoides, glucocorticoides, AINEs, glutatión, citoquinas, toxinas, oligonucleótidos (hasta 20 nucleótidos), fosfato sódico de dexametasona y fosfato sódico de betametasona, glutatión, verde de indocianina (ICG).

55 Según algunas realizaciones, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: agentes activos farmacológicos, péptidos, proteínas, hormonas, fosfato sódico de dexametasona y fosfato sódico de betametasona, glutatión, toxinas, oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios (que pueden incluir análogos de nucleótidos), nanopartículas con un diámetro de hasta 500 nm, agentes fluorescentes, verde de indocianina (ICG), otros agentes detectables por aparatos ópticos, ecográficos o de resonancia magnética, y otros agentes de contraste que pueden utilizarse como medios de diagnóstico de cualquier tipo y clase.

60 El aparato 1 comprende un sistema 2 de canales de conexión; una unidad de introducción 3 para llevar la muestra que contiene los eritrocitos en el interior del aparato 1; una unidad de separación de 4 para separar los diferentes componentes de la muestra (en particular, el plasma y las otras células a partir de eritrocitos); y una unidad de combinación 5, que comprende un depósito 6 (en particular, una bolsa de recogida) y en la que los eritrocitos y el compuesto se combinan entre sí a fin de obtener los eritrocitos tratados. Cabe señalar que, de manera ventajosa, el

aparato 1 tiene un peso inferior a 35 kg. El aparato 1 es, por lo tanto, fácil de llevar.

5 El aparato 1 también comprende una entrada 7 (en particular, un septo perforable del depósito 6) para llevar el compuesto al depósito 6; y una unidad de alimentación 8, que comprende un canal 9 para introducir la primera solución y un canal 10 para introducir la segunda solución.

10 La primera solución se adapta, cuando entra en contacto con los eritrocitos, para hinchar los eritrocitos y, en particular, consiste en una solución acuosa de una o más sales inorgánicas con una osmolaridad en general (es decir, la adición de las concentraciones de todas las sales disueltas) de aproximadamente 100 mOsm/kg a aproximadamente 300 mOsm/kg. Más en particular, la primera solución consiste en 6 volúmenes de solución fisiológica (solución acuosa de NaCl en una concentración de 0,9 % en peso/volumen) y 4,5 volúmenes de agua destilada (o desionizada).

15 La segunda solución se adapta, cuando entra en contacto con los eritrocitos, para lisar los eritrocitos y, en particular, consiste en una solución acuosa de una o más sales inorgánicas con una osmolaridad en general (es decir, la suma de las concentraciones de todas las sales disueltas) de aproximadamente 10 mOsm/kg a aproximadamente 150 mOsm/Kg. Más en particular, la primera solución consiste en 6 volúmenes de solución fisiológica (solución acuosa de NaCl en una concentración de 0,9 % en peso/volumen) y 8 volúmenes de agua destilada (o desionizada).

20 Cabe señalar que la entrada 7 permite no solo introducir el compuesto en el interior del depósito 6, sino también llevar la solución de sellado al depósito 6. La solución de sellado se adapta, cuando está en contacto con los eritrocitos, para volver a sellar los eritrocitos a fin de encapsular al menos parcialmente el compuesto. En particular, la entrada 7 comprende un septo perforable.

25 Según algunas realizaciones, la solución de sellado es una solución de fosfato-inosina-glucosa-piruvato-adenina (PIGPA). La solución PIGPA comprende, en particular, aproximadamente NaH_2PO_4 33 mM; aproximadamente KCl 1.606 M, aproximadamente NaCl 0,194 M; aproximadamente inosina 0,1 M; aproximadamente adenina 5 mM; aproximadamente ATP 20 mM; aproximadamente glucosa 0,1 M; aproximadamente piruvato 0,1 M; y aproximadamente MgCl_2 4 mM. Según otras realizaciones, la solución de sellado consiste en una solución acuosa de una o más sales inorgánicas que tiene una osmolaridad idéntica o superior a la sangre (es decir, idéntica o superior a 280 mOsm/kg). En una realización ventajosa, se utilizan aproximadamente 5 ml a 7 ml de la solución de sellado para volver a sellar un volumen de aproximadamente 50-90 ml de eritrocitos lisados.

35 El aparato 1 también comprende una unidad de concentración 11 para concentrar el contenido del depósito 6; y una unidad de recogida 12, que comprende un depósito 13 (en particular, una bolsa de recogida) para recoger los eritrocitos tratados.

40 El sistema de canales 2 conecta (es decir, permite el paso de fluido) la unidad de introducción 3, la unidad de separación 4, la unidad de combinación 5, la unidad de alimentación 8, la unidad de concentración 11 y la unidad de recogida 12.

En particular, el sistema de canales 2 consiste en uno o más canales. Más en particular, el sistema 2 comprende un canal de conexión 14 entre la unidad de separación 4 y la unidad de combinación 5.

45 Según realizaciones ventajosas, en el presente texto, a menos que se especifique lo contrario, por canal se ha previsto un conducto que está fabricado de material elásticamente deformable y, según algunas realizaciones, es esencialmente transparente en al menos algunas partes. En particular, el conducto está fabricado de silicona, PVC u otros polímeros. Además, también puede contener insertos textiles para mejorar la resistencia.

50 El aparato 1 comprende una unidad de control 15, que se adapta para ajustar el funcionamiento del aparato 1. Las figuras. 1-3 muestran las conexiones eléctricas (o conexiones por ondas electromagnéticas) entre la unidad de control y los diferentes componentes del aparato 1 por medio de líneas finas. Ventajosamente, la unidad de control 15 comprende una unidad de control eléctrico y una interfaz de operador (HMI), que se proporciona por ejemplo, con una pantalla y/o un teclado a través de los cuales el operador puede modificar y/o visualizar los parámetros operativos y las especificaciones de funcionamiento.

60 Según algunas realizaciones, la unidad de introducción 3 comprende un septo perforable 16 (o en cualquier caso una conexión), a través del cual se puede inyectar (o conectar) la muestra de sangre, (por ejemplo, por medio de una jeringa 17) en el canal 18 (en particular, un conducto) del sistema de canales 2. La unidad de introducción 3 comprende también medios de ajuste 19 (en particular, una válvula), que se disponen a lo largo del canal 18 y que se adaptan para ajustar el flujo a lo largo del canal 18. Según algunas realizaciones, el canal 18 se conecta al canal 14 entre la unidad de separación 4 y la unidad de combinación 5.

65 En particular, los medios de ajuste 19 se adaptan para ocluir totalmente el canal 18 (a fin de impedir sustancialmente el paso de fluido a lo largo del canal 18) y permitir el flujo libre de fluido a través del canal 18. Más en particular, los medios de ajuste 19 comprenden elementos de sujeción que se adaptan para deformar el canal 18 para ocluir

totalmente el lumen del canal 18. Los medios de ajuste 19 son operables por la unidad de control 15.

Según algunas realizaciones, la unidad de separación 4 comprende un conjunto de centrifugación 20 para separar los eritrocitos y/o los eritrocitos tratados de los otros componentes de la muestra. Un depósito 21 (en particular, una bolsa de recogida) se adapta para recoger lo que se ha separado de los eritrocitos por la unidad de separación 4 (en particular) la unidad de centrifugación 20. El depósito 21 se conecta a la unidad de centrifugación 20 por un canal 22 (en particular un canal del sistema 2).

Según algunas realizaciones, la unidad de centrifugación 20 comprende una placa 23 (esencialmente horizontal) adaptada para rotar y un recipiente de separación 24 montado en la placa 23. Más en particular, el grupo de centrifugación 20 comprende un motor 25 (en particular, un motor de corriente continua con sensores para la detección de la velocidad, la dirección y la corriente), que se adapta para rotar la placa 23 alrededor de un eje esencialmente vertical.

El aparato 1 también comprende un sensor 26 (o más sensores) para detectar aire, la presión parcial de oxígeno, dióxido de carbono, hemoglobina, cianohemoglobina, hematocritos, osmolaridad, sensores ópticos para la medición de la absorbancia/transmitancia, medición de la fluorescencia, resonancia magnética, medición de ondas acústicas (ecografía) y/u otros parámetros aguas arriba de la unidad de separación 4 con respecto a la unidad de introducción 3. En particular, el sensor 26 se dispone a lo largo del canal 14 entre el canal 18 y la unidad centrifugación 20. El sensor 26 se conecta a la unidad de control 15 y se adapta para comunicar lo que se ha detectado a lo largo del canal 14 a la unidad de control 15. Según realizaciones específicas, el sensor 26 se adapta para detectar oxígeno (y/o aire) aguas arriba de la unidad de separación 4 con respecto a la unidad de introducción 3.

En particular, el sensor 26 es un sensor de ultrasonidos (para la detección de burbujas de aire). El canal 14 tiene (al menos en el sensor 26) una dureza Shore A (medida según la norma ASTM D2240) inferior a 70 (y en particular superior a 50, más específicamente superior a 60). De este modo, el sensor 26 puede adherirse apropiadamente al canal 14 (y por lo tanto realizar actividades de detección con mayor precisión).

El sensor 26 es por ejemplo un detector de ultrasonidos AD8/AD9 de Introtek®. El canal 14 se fabrica por ejemplo de PVC XS de Sorin Group® Italia (al menos en el área del sensor 26).

El sensor 26 permite limitar la presencia de agentes contaminantes en el aparato 1 y mejorar la eficacia y la precisión de la introducción en los eritrocitos. Además, el sensor 26 permite obtener la discriminación exacta entre el aire y los líquidos durante el proceso automatizado, asegurando así que las etapas se realicen correctamente, y que no hay aire donde debería haber líquido, y viceversa. El sensor 26 favorece el correcto rendimiento del proceso en su versión más automatizada.

La unidad de alimentación 8 comprende un depósito 27 (en particular, una bolsa), que se conecta al sistema 2 a través del canal 9 del sistema 2. El depósito 27 contiene la primera solución mencionada anteriormente.

La unidad de alimentación comprende otro depósito 28 (en particular, una bolsa), que se conecta al sistema 2 a través del canal 10 del sistema 2. El depósito 28 contiene la segunda solución mencionada anteriormente.

La unidad de introducción 8 comprende medios de ajuste 29 (en particular, una válvula), que se disponen a lo largo del canal 9 y que se adaptan para ajustar el flujo a lo largo del canal 9.

La unidad de introducción 8 comprende medios de ajuste 30 (en particular, una válvula), que se disponen a lo largo del canal 10 y que se adaptan para ajustar el flujo a lo largo del canal 10.

En particular, los medios de ajuste 29 y 30 se adaptan para ocluir totalmente los canales 9 y 10, respectivamente (a fin de evitar esencialmente el paso de fluido a lo largo de los canales 9 y 10, respectivamente) y permitir que el fluido fluya libremente a través de los canales 9 y 10, respectivamente. Más en particular, los medios de ajuste 29 y 30 comprenden elementos de sujeción correspondientes que se adaptan para deformar los canales 9 y 10, respectivamente, a fin de ocluir totalmente el lumen. Los medios de ajuste 29 y 30 son operables (independientemente unos de otros) por la unidad de control 15.

La unidad de alimentación 8 comprende también medios de bombeo 31, que se adaptan para mover la primera y/o la segunda solución en dirección a la unidad de combinación 5 (o unidad de separación 4). En particular, los medios de bombeo 31 se disponen a lo largo de un canal 32 (del sistema 2) para mover la primera y/o la segunda solución a través del canal 32. El canal 32 conecta los canales 9 y 10 al canal 14.

Según algunas realizaciones, los medios de bombeo 31 comprenden una bomba peristáltica. Más en particular, los medios de bombeo 31 comprenden un rotor, sobre el que se montan uno o más rodillos, cuyo canal de deformación (estrangulación) 32 se mueve repetidamente a lo largo de un segmento de canal 32.

Ventajosamente, la unidad de recogida 12 comprende medios de ajuste 33, que son operables por la unidad de

ES 2 634 987 T3

control 15 para ajustar el flujo en dirección al depósito 13 desde el sistema 2. En particular, los medios de ajuste 33 se disponen a lo largo de un canal 34 (del sistema 2), que se conecta al depósito 13.

5 Los medios de ajuste 33 son estructuralmente esencialmente idénticos a los medios de ajuste 29 y 30 y funcionan en el canal de 86,36 cm de una manera sustancialmente idéntica al igual que los medios de ajuste 29 y 30 en los canales 9 y 10.

10 Ventajosamente, la unidad de combinación 5 comprende un dispositivo de mezcla 35 operable por la unidad de control 15 para mover el depósito 6 con el fin de mezclar el contenido del mismo. En particular, la unidad de combinación 5 comprende una placa de soporte 36 en el depósito para almacenamiento 6; y un accionador (del tipo conocido y no mostrado) para mover (es decir, bascular) la placa 36 y por lo tanto mezclar el contenido del depósito 6.

15 El accionador anteriormente mencionado comprende un motor a pasos y 4 sensores de posición para controlar la posición horizontal de la placa 36, la oscilación en un ángulo de hasta +/- 30° y el mantenimiento de un ángulo de hasta 45° (se adopta esta posición más inclinada durante el vaciado del depósito 6).

20 Ventajosamente, la unidad de combinación 5 también comprende un elemento de calentamiento (del tipo conocido y no mostrado, por ejemplo una resistencia eléctrica) controlable por la unidad de control 15 para calentar el contenido del depósito 6. El funcionamiento del elemento de calentamiento se controla por sondas de temperatura de tipo conocido y no mostrado para controlar el funcionamiento del mismo por retroalimentación por medio de la unidad de control 15.

25 Ventajosamente, la unidad de combinación 5 también comprende un elemento que mide continuamente el peso (del tipo conocido y no mostrado, por ejemplo una celda de carga) controlable por la unidad de control 15 para medir el peso (o volumen) contenido en el depósito 6.

30 Según algunas realizaciones, la unidad de concentración 11 comprende un filtro 37 (en particular un hemofiltro o un filtro de diálisis) para separar al menos parcialmente los eritrocitos tratados por un líquido (en particular, una solución acuosa, tal como por ejemplo la primera y la segunda soluciones, la solución de sellado y/o una solución fisiológica).

35 La unidad de concentración 11 comprende un aspirador 38 (en particular, una bomba de vacío, que también puede funcionar a la inversa como un compresor en soluciones particulares de la presente invención, que no se divulgan en la presente memoria), que se controla por la unidad de control 15 y que se adapta para aspirar al menos una parte del líquido a través del filtro 37. El aspirador 38 se controla por uno o más sensores de presión de tipo conocido (no mostrado en la presente memoria).

40 Según algunas realizaciones de la presente invención, el aspirador 38 puede introducir aire en el interior del sistema de canales 2, para someter a ensayo la estanqueidad hidráulica del mismo y verificar su correcto posicionamiento con respecto a los medios de ajuste sobre los que se posiciona.

La unidad de concentración 11 también comprende un depósito 39 (en particular, una bolsa o un contenedor rígido) para recoger el líquido que se ha pasado a través del filtro 37.

45 Los medios de bombeo 40 también se proporcionan para llevar el contenido del depósito 6 en contacto con el filtro 37. En particular, el sistema 2 comprende un canal 41, a través del cual, en uso, el material a filtrar y ya sometido a filtración pasa desde el depósito 6 al filtro 37 y viceversa; y, según algunas realizaciones, se crea un canal de succión 42, que conecta el filtro 37 al depósito 6 y en el área de la cual se crea la presión requerida para mover los fluidos a lo largo del canal 41.

50 Los medios de bombeo 40 se disponen a lo largo del canal 42 y comprenden ventajosamente una bomba peristáltica. Más en particular, los medios de bombeo 40 comprenden un rotor, sobre el que se montan uno o más rodillos, cuyo canal de deformación (estrangulación) 32 se mueve repetidamente a lo largo de un segmento de canal 32.

55 El sistema de canales 2 también comprende un canal 43, que conecta el filtro 37 al depósito 39; y un canal 44 que conecta el depósito 39 al aspirador 38.

60 El aparato 1 también comprende otra unidad de alimentación 45 para introducir una tercera solución (en particular, una solución fisiológica). En particular, la unidad de alimentación 45 comprende medios de ajuste 46, que son operables por la unidad de control 15 para ajustar el flujo de la unidad de alimentación 45.

65 Según la realización mostrada, los medios de ajuste 46 se disponen a lo largo de un canal 47 (del sistema 2). Los medios de ajuste 46 son estructuralmente esencialmente idénticos a los medios de ajuste 29 y 30 y funcionan en el canal de 119,38 cm de una manera esencialmente idéntica al igual que los medios de ajuste 29 y 30 en los canales 9 y 10.

Ventajosamente, la unidad de alimentación 45 comprende un depósito 48 (en particular, una bolsa), que contiene la solución fisiológica, y se conecta al sistema de canales 2, en particular, a través del canal 47.

5 El aparato 1 también comprende medios de bombeo 49, que son operables por unidad de control 15 y que se adaptan para mover fluidos al menos entre las unidades de introducción, separación, combinación y recogida 3, 4, 5 y 12. Ventajosamente, los medios de bombeo 49 se adaptan para mover los fluidos entre las unidades de introducción, separación, combinación, recogida y alimentación 3, 4, 5, 12 y 45.

10 Los medios de bombeo 49 se disponen a lo largo del canal 14. Según algunas realizaciones, los medios de bombeo 49 comprenden una bomba peristáltica. Más en particular, los medios de bombeo 49 comprenden un rotor, sobre el que se montan uno o más rodillos, cuyo canal de deformación (estrangulación) 14 se mueve repetidamente a lo largo de un segmento de canal 14.

15 Ventajosamente, la unidad de introducción 3 y la unidad de recogida 12 se conectan al canal de conexión 14 entre los medios de bombeo 49 y la unidad de combinación 5. La unidad de alimentación 8 (y posiblemente la unidad de alimentación 45) también se conectan al canal de conexión 14 entre los medios de bombeo 49 y la unidad de combinación 5.

20 Según algunas realizaciones, el aparato comprende también medios de ajuste 50, que son operables por la unidad de control 15 y que se disponen a lo largo de dicho canal 14. En particular, los medios de ajuste 50 se disponen entre la unidad de alimentación 8 y la unidad de separación 4.

25 Los medios de ajuste 50 son estructuralmente esencialmente idénticos a los medios de ajuste 29 y 30 y funcionan en el canal 14 de una manera sustancialmente idéntica al igual que los medios de ajuste 29 y 30 en los canales 9 y 10.

30 Según algunas realizaciones, los medios de ajuste 50 se disponen entre la unidad de separación 4 y la unidad de alimentación 8. Según realizaciones específicas, los medios de ajuste 50 se disponen entre la unidad de introducción 3 y la unidad de recogida 12 (y posiblemente la unidad de alimentación 45) por un lado y la unidad de combinación 5 por otro lado. Según las realizaciones mostradas, los medios de ajuste 50 se disponen entre los medios de bombeo 49 y la unidad de combinación 5.

Según algunas realizaciones que no se muestran, el aparato 1 no tiene medios de ajuste 50.

35 Ventajosamente, el aparato 1 también comprende un dispositivo de pesaje 51 que se adapta para detectar el peso de los depósitos 27 y 28. El dispositivo de pesaje 51 también se adapta para detectar el peso del depósito 39. Ventajosamente, el dispositivo de pesaje 51 se adapta para detectar el peso del depósito 21. Según algunas realizaciones (no mostradas), el dispositivo de pesaje 51 se adapta para detectar el peso del depósito 48.

40 Según algunas realizaciones (no mostradas), el dispositivo de pesaje 51 se adapta para detectar el peso de la unidad de introducción 3.

45 El dispositivo de pesaje 51 se adapta para transmitir los datos detectados a la unidad de control 15. En particular, la unidad de control 15 se adapta para ajustar el funcionamiento de los medios de ajuste 29 y 30 de los medios de bombeo 31 y del aspirador 38 en función de los pesos de los depósitos 27, 28 y 39 detectados por los dispositivos de pesaje 51.

50 Según algunas realizaciones, el aspirador 38 puede introducir aire en el interior del sistema de canales 2 antes de que el operador introduzca la jeringa 17 que contiene la sangre, para someter a ensayo su estanqueidad hidráulica y verificar su correcto posicionamiento con respecto a los medios de ajuste en el que se posiciona.

55 Una breve descripción del funcionamiento del aparato 1 se divulga en adelante comenzando en el momento en el que un operador introduce una muestra de sangre a través del septo 16 por medio de la jeringa 17 (que también podría reemplazarse con una bolsa). La siguiente descripción específica, a menos que se indique explícitamente lo contrario, que las diferentes partes del aparato 1 se controlan por la unidad de control 15.

60 Durante la inyección de la muestra, los medios de ajuste 50, 33 y 46 se mantienen cerrados mientras que los medios de ajuste 19 se mantienen abiertos y los medios de bombeo 49 mueven la muestra en dirección a la unidad de separación 4. El motor 25 se hace funcionar de manera que rote la placa 23 (y el recipiente de separación 24). Cuando la muestra completa ha entrado en un recipiente de separación 24, el sensor 26 detecta la presencia de compuestos (en particular oxígeno) a lo largo del canal 14, los medios de ajuste 19 se cierran y los medios de ajuste 46 se abren de manera que la solución fisiológica alcance el recipiente de separación 24.

65 En este punto, el recipiente de separación 24 separa los eritrocitos del plasma y otras células, que se llevan al depósito 21.

ES 2 634 987 T3

Después de la separación del plasma, el motor 25 se detiene y los eritrocitos se llevan al depósito 6 por medios 49 de bombeo operativos y medios 19, 46 y 33 de ajuste de mantenimiento cerrados y medios 50 de ajuste abiertos.

5 En este punto, los medios de bombeo 49 se detienen y los medios de bombeo 31 funcionan con el fin de llevar la primera solución al depósito 6. Durante la transferencia de la primera solución en el interior del depósito 6, los medios de ajuste 30 y 50 (en particular, también los medios de ajuste 19, 33 y 46) se mantienen cerrados mientras que los medios de ajuste 29 se mantienen abiertos.

10 El funcionamiento de los medios de bombeo 31 (y por lo tanto la cantidad de la primera solución llevada al depósito 1) se ajusta por la unidad de control 15 sobre la base del peso (en particular, de la variación del peso) del depósito 27 detectado por el dispositivo pesaje 51.

15 Según realizaciones alternativas, los medios de ajuste 50 se mantienen abiertos para que parte de la primera solución alcance el recipiente de separación 24 con el fin de lavar el recipiente de separación 24. En este caso, la porción de la primera solución que se lleva a un recipiente de separación 24 se transfiere al depósito 6 que opera los medios de bombeo 49.

20 Una vez que la primera solución se ha introducido en el depósito 6, los medios de bombeo 31 se bloquean y el accionador de la placa 36 se hace funcionar de manera que se incline suavemente el depósito 6. La inclinación prosigue durante unos 5-20 minutos. De esta manera, los eritrocitos son al menos parcialmente hinchados.

Después de la inclinación, el contenido del depósito 6 se lleva al recipiente de separación 24 por los medios 49 de bombeo operativos y los medios 50 de ajuste abiertos de mantenimiento.

25 En un recipiente de separación 24 (cuando los medios de bombeo 49 se detienen) los eritrocitos al menos parcialmente hinchados se concentran por el funcionamiento del motor 25.

30 Después de haber concentrado los eritrocitos, el motor 25 se detiene y los medios de bombeo 49 se activan a fin de llevar los eritrocitos al menos parcialmente hinchados de nuevo al depósito 6.

En este punto, los medios de ajuste 50 se cierran y los medios de bombeo 31 funcionan manteniendo de nuevo los medios de ajuste 29 abiertos y los medios de ajuste 30 cerrados con el fin de llevar la segunda solución al depósito 6.

35 Según realizaciones alternativas, los medios de ajuste 50 se mantienen abiertos para que parte de la segunda solución alcance el recipiente de separación 24 con el fin de lavar el recipiente de separación 24. En este caso, la porción de la segunda solución que se lleva a un recipiente de separación 24 se transfiere al depósito 6 que opera los medios de bombeo 49.

40 El funcionamiento del medio de bombeo 31 (y por lo tanto la cantidad de la segunda solución llevada al depósito 1) se ajusta por la unidad de control 15 sobre la base del peso (en particular, de la variación del peso) del depósito 28 detectado por el dispositivo de pesaje 51.

45 Una vez que la segunda solución se ha introducido en el depósito 6, los medios de bombeo 31 se bloquean y el accionador de la placa 36 se hace funcionar de manera que se incline suavemente el depósito 6. La operación de inclinación prosigue durante aproximadamente 1-30 minutos, ventajosamente 5-20 minutos. De esta manera, los eritrocitos se lisan al menos parcialmente. Durante la mezcla del depósito 6, los medios de ajuste 50 se mantienen cerrados.

50 En este punto, los medios de bombeo 40 funcionan para llevar el contenido del depósito 6 al filtro 37 a través del canal 41. Cuando los eritrocitos han alcanzado el filtro 37, los medios de bombeo 40 se detienen y el aspirador 38 se hace funcionar entonces a fin de concentrar los eritrocitos al menos parcialmente lisados. La concentración se realiza hasta recuperar una cantidad apropiada de fluido en el depósito 39. El contenido correcto del depósito 39 se mide mediante la detección de la variación del peso del depósito 39 por medio del dispositivo de pesaje 51.

55 En otras palabras, el funcionamiento del aspirador 38 (y por lo tanto la cantidad de la solución acuosa llevada al depósito 39) se ajusta por la unidad de control 15 sobre la base del peso (en particular, de la variación del peso) del depósito 39 detectado por el dispositivo de pesaje 51.

60 Después de haber concentrado los eritrocitos al menos parcialmente lisados, el aspirador 38 se detiene y los medios de bombeo 40 funcionan a fin de llevar los eritrocitos de nuevo al depósito 6.

Por lo tanto, el operador inyecta el compuesto a través de la entrada 7 y, posteriormente, la placa 36 se inclina durante aproximadamente 1-45 minutos.

65 Después de la inclinación, el operador inyecta la solución de sellado en el depósito 6 a través de la entrada 7. En

este punto, el depósito se inclina durante aproximadamente 10-40 minutos a una temperatura de aproximadamente 25-40 °C para obtener los eritrocitos al menos parcialmente tratados.

5 El contenido del depósito 6 se transfiere por lo tanto al depósito 13 mediante los medios 49 de bombeo operativos, los medios 50 y 33 de ajuste de mantenimiento abiertos y los medios 46 y 19 de ajuste cerrados (en particular también los medios de ajuste 29 y 30).

10 Según una realización (no mostrada), el aparato 1 no tiene medios de bombeo 31. En este caso, la primera y la segunda soluciones se mueven en virtud de los medios de bombeo 49 y apropiadamente controlan los medios de ajuste anteriormente mencionados.

15 La Figura 3 muestra una variante del aparato 1 que difiere del aparato 1 de las figuras 1 y 8 solo puesto que el aparato 1 no tiene medios bombeo 40, comprende los medios de ajuste V (en particular, dispuestos a lo largo del canal 14 entre los medios de bombeo 49 y la unidad de separación 4) y el canal 42 se conecta al canal de conexión 14 (en particular, entre los medios de bombeo 49 y la unidad de separación 4). En este caso, la transferencia del contenido del depósito 6 al filtro 37 se realiza por los medios 49 de bombeo operativos y los medios 50 de ajuste de mantenimiento abiertos y los medios de ajuste V cerrados.

20 Los medios de ajuste V son estructuralmente esencialmente idénticos a los medios de ajuste 29 y 30 y funcionan en el canal 14 de una manera sustancialmente idéntica al igual que los medios de ajuste 29 y 30 en los canales 9 y 10.

25 La figura 2 muestra una variante del aparato 1 que permite concentrar los eritrocitos tratados antes de la transferencia al depósito 13. La variante de la figura 2 se diferencia de la variante de las figuras. 1 y 8 exclusivamente puesto que comprende un filtro adicional 52 (en particular, un hemofiltro o filtro de diálisis) y los medios de ajuste 53 y 54 (operables por la unidad de control 15). El filtro 52 y los medios de ajuste 53 se montan entre los canales 41 y 42 y se adaptan para concentrar al menos los eritrocitos parcialmente tratados (y lavados) antes de que los eritrocitos se transfieran al depósito 13. Los medios de ajuste 54 se disponen a lo largo del canal 41 entre el depósito 6 y el filtro 37.

30 Los medios de ajuste 53 y 54 son estructuralmente esencialmente idénticos a los medios de ajuste 29 y 30 y funcionan de una manera sustancialmente idéntica al igual que los medios de ajuste 29 y 30.

35 En uso, en particular, después de haber obtenido los eritrocitos al menos parcialmente tratados en el depósito 6, el contenido del depósito 6 se lleva al filtro 52 mediante los medios 40 de bombeo operativos y los medios 54 de ajuste de mantenimiento cerrados y los medios de ajuste 53 abiertos. Cuando los eritrocitos han alcanzado el filtro 52, los medios de bombeo 40 se detienen y el aspirador 38 se hace funcionar a fin de concentrar los eritrocitos al menos parcialmente tratados. La concentración se realiza hasta recuperar una cantidad apropiada de fluido en el depósito 39. Después de haber concentrado los eritrocitos al menos parcialmente tratados, el aspirador 38 se detiene y los medios de bombeo 40 funcionan a fin de llevar los eritrocitos de nuevo al depósito 6.

40 Ventajosamente, el aparato 1 comprende un dispositivo desechable 55 (véase, en particular, la figura 9) que comprende todas las partes del aparato que entran en contacto directo con los eritrocitos. En particular, el dispositivo 55 comprende un sistema de canales 2, los depósitos 6 y 13 y la entrada 7. Según algunas realizaciones, (por ejemplo, que se muestran en la figura 9), el dispositivo 55 comprende también el(los) filtro/s 37 y/o 52, los depósitos 45 27, 28 y 48 y el recipiente de separación 24. Ventajosamente, el dispositivo 55 también comprende los depósitos 21 y 39.

50 Cabe señalar que el dispositivo 55 comprende las únicas partes que están en contacto o potencialmente podrían entrar en contacto con la sangre. El hecho de que el dispositivo 55 sea desechable simplifica considerablemente el uso del aparato 1 y mejora la seguridad y la velocidad de uso.

El aparato 1 comprende también un dispositivo reutilizable 56, que se adapta para servir como un soporte sobre el que se monta el dispositivo 55. Algunos detalles de una realización del dispositivo 56 se muestran en la figura 4.

55 El dispositivo 56 comprende medios de bombeo 49 y medios de ajuste 29, 30 y 33. Según algunas realizaciones, (como las mostradas en la figura 4), el dispositivo 56 comprende también medios de bombeo 49, medios de ajuste 19 y 46, el motor que rota la placa 36 (y, de manera ventajosa, la placa 36). El dispositivo 56 también comprende ventajosamente el aspirador 38 (y ventajosamente el sensor 26 y el dispositivo de pesaje 51). Según realizaciones específicas, el dispositivo 56 comprende también medios de ajuste 50. En particular, el dispositivo 56 comprende 60 también medios de bombeo 31 y/o 40.

En la figura 4, los números 57 y 58 indican un brazo de cierre y una carcasa para el recipiente de separación 24, respectivamente.

65 El aparato 1 divulgado anteriormente tiene varias ventajas con respecto al estado de la técnica. En particular, el aparato 1 permite automatizar casi todas las etapas operativas para obtener los eritrocitos tratados. De esta manera,

el tiempo y la posibilidad de que el operador cometa errores durante el procedimiento se reducen considerablemente.

5 El aparato 1 también es relativamente simple, fácil de llevar y rentable. El uso del aparato 1 se simplifica aún más y la seguridad se mejora adicionalmente ya que el aparato 1 comprende un dispositivo 55 de tipo desechable.

A este respecto, cabe señalar que, según realizaciones ventajosas, el aparato comprende no más de tres medios de bombeo (en particular, entre dos y tres) y al menos cuatro medios de ajuste (ventajosamente 5).

10 Además, el aparato 1 divulgado anteriormente es extremadamente flexible, permitiendo, entre otras cosas, obtener eritrocitos tratados con diferentes concentraciones de compuesto introducido y también con diferentes hematocritos y volúmenes finales.

15 El aparato 1 divulgado anteriormente permite un alto grado de automatización y control (sin la necesidad de un control humano por un operador) de todas las secuencias de acciones que permiten introducir al menos un compuesto en los glóbulos rojos.

20 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un kit desechable para el aparato 1; el kit comprende un dispositivo 55 como se ha definido anteriormente o partes del dispositivo 55 que van a ensamblarse para obtener el dispositivo 55.

Según un tercer aspecto de la presente invención, el dispositivo 56 se proporciona como se ha definido anteriormente.

25 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para introducir al menos un compuesto (en particular, como se ha definido anteriormente) en el interior de los eritrocitos. El método comprende una etapa de lisis, durante la cual los eritrocitos que son al menos parcialmente lisados se suspenden en una segunda solución hipotónica (en particular, como se ha definido anteriormente); y una primera etapa de concentración, que es posterior a la etapa de lisis y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se concentran por medio de hemofiltración.

30 Ventajosamente, el método comprende una etapa de hinchamiento, que precede a la etapa de lisis y durante la cual los eritrocitos se hinchan al ser suspendidos en una primera solución hipotónica (en particular como se ha definido anteriormente) a fin de obtener una suspensión; la primera solución hipotónica tiene una mayor concentración de solutos con respecto a la segunda solución hipotónica.

Según algunas realizaciones, el método se realiza con el aparato según el primer aspecto de la presente invención.

40 El método también comprende una etapa de combinación, que es simultánea (o sigue) a la primera etapa de concentración y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se combinan con el compuesto; una etapa de cierre, que sigue a la etapa de combinación y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se cierran de manera que al menos encapsulan parcialmente el compuesto y obtienen los eritrocitos tratados; y una segunda etapa de concentración, que sigue a la etapa de cierre y durante la cual se concentran los eritrocitos tratados.

45 La concentración de los eritrocitos tratados después de la etapa de cierre (y antes de la segunda etapa de concentración) es inferior que los eritrocitos tratados después de la segunda etapa de concentración. Más precisamente, al final de la etapa de cierre (y antes de la segunda etapa de concentración) los eritrocitos tratados están en solución en una primera concentración; al final de la segunda etapa de concentración, los eritrocitos tratados están en solución en una segunda concentración mayor que la primera concentración.

50 Durante la segunda etapa de concentración, el agua se retira de la solución de eritrocitos tratados. En otras palabras, la solución de eritrocitos tratados al final de la etapa de cierre (y antes de la segunda etapa de concentración) tiene una fracción de agua más alta con respecto a la fracción de agua de la solución de eritrocitos tratados al final de la segunda etapa de concentración.

55 Cabe señalar que la presente invención, entre otras cosas, se deriva del hecho de que, sorprendentemente, no todas las concentraciones de eritrocitos tratados conducen a resultados efectivos. Este problema estaba completamente ausente en el estado de la técnica.

60 Ventajosamente, durante la segunda etapa de concentración, los eritrocitos tratados se concentran utilizando un hemofiltro.

65 Según algunas realizaciones, el método comprende una tercera etapa de concentración, que sigue a la etapa de hinchamiento y precede a la etapa de lisis y durante la cual se reduce el contenido de agua de la suspensión, aumentando en consecuencia la concentración de los eritrocitos en la suspensión.

Según algunas realizaciones, la tercera etapa de concentración se realiza mediante el uso de una etapa de separación que comprende una unidad de centrifugación (en particular como se ha definido anteriormente).

5 Ventajosamente, durante la etapa de cierre, los eritrocitos al menos parcialmente lisados se colocan en contacto con la solución de sellado (en particular como se ha definido anteriormente).

10 Según algunas realizaciones, el método comprende una etapa de lavado, que sigue a la etapa de cierre (y precede posiblemente a la segunda etapa de concentración) y durante la cual los eritrocitos tratados se lavan con una solución fisiológica. La etapa de lavado se adapta para eliminar el compuesto que no ha entrado en los eritrocitos y otras sustancias no deseadas (por ejemplo, proteínas o solución de sellado).

15 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para introducir al menos un compuesto (en particular como se ha definido anteriormente) en el interior de los eritrocitos. El método comprende una etapa de lisis, durante la cual los eritrocitos que son al menos parcialmente lisados se suspenden en una segunda solución hipotónica (en particular como se ha definido anteriormente); y una primera etapa de concentración, que es posterior a la etapa de lisis y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se concentran por medio de hemofiltración.

20 Ventajosamente, el método comprende una etapa de hinchamiento, que precede a la etapa de lisis y durante la cual los eritrocitos se hinchan al ser suspendidos en una primera solución hipotónica (en particular como se ha definido anteriormente) a fin de obtener una suspensión; la primera solución hipotónica tiene una mayor concentración de solutos con respecto a la segunda solución hipotónica.

25 El método también comprende una etapa de combinación, que sigue a la etapa de concentración y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se combinan con el compuesto (o simultáneamente con varios compuestos al mismo tiempo); una etapa de cierre, que sigue a la etapa de combinación y durante la cual los eritrocitos al menos parcialmente lisados se cierran de manera que al menos parcialmente encapsulan el compuesto (o compuestos) y obtienen eritrocitos tratados; y una segunda etapa de concentración, que sigue a la etapa de hinchamiento y precede a la etapa de lisis y durante la cual el contenido de agua de la suspensión se reduce aumentando en consecuencia la concentración de los eritrocitos en la suspensión.

30 Según algunas realizaciones, el método según el quinto aspecto de la presente invención tiene una o más características del método del cuarto aspecto de la presente invención (en este caso, cabe destacar que la segunda etapa de concentración del quinto aspecto corresponde a la tercera etapa de concentración del cuarto aspecto y viceversa).

35 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un aparato del primer aspecto de la presente invención para la introducción de al menos un compuesto en el interior de los eritrocitos.

40 Ventajosamente, el compuesto se define según la divulgación anterior.

Según algunas realizaciones, el uso del aparato tiene lugar según el cuarto y/o quinto aspecto de la presente invención.

45 Según un aspecto específico de la invención, se proporciona un aparato para la introducción de al menos un compuesto en el interior de los eritrocitos; el aparato 1 es similar (esencialmente idéntico) al que se divulga según el primer aspecto de la presente invención y difiere del mismo puesto que además o como una alternativa al sensor 26, tiene una o más de las siguientes características. El aparato 1 comprende el depósito 27 y el depósito 28 para que contengan la primera y la segunda solución, respectivamente. Los canales 9 y 10 se conectan al depósito 27 y al depósito 28, respectivamente. El aparato 1 comprende una unidad de pesaje 51 para pesar el tercer y el cuarto depósito 27, 28. La unidad de control 15 se adapta para controlar los medios de ajuste 29 en función del peso del tercer depósito 27 y los medios de ajuste 30 en función del peso del cuarto depósito 28. El aparato 1 comprende un depósito 21 para recoger lo que se ha separado de los eritrocitos por la unidad de separación 4; un séptimo depósito 48 que contiene una tercera solución (en particular una solución fisiológica); un canal 47 conectado al depósito 48; y un canal 22 conectado al depósito 21. Los canales 9 y 10 se conectan al depósito 27 y al cuarto depósito 28, respectivamente. El aparato 1 comprende una unidad de pesaje 51 para pesar los depósitos 27 y 28, el depósito 21 y el depósito 13. La unidad de control 15 se adapta para controlar los medios de bombeo 31 (y/o 40 y/o 49) en función del peso de los depósitos 13 (y/o 21 y/o 27 y/o 28 y/o 39 y/o 48).

60 Según aspectos adicionales de la presente invención se proporciona lo siguiente.

La solución (que contiene eritrocitos tratados y concentrados, es decir, obtenidos después de la segunda etapa de concentración) para su uso como un medicamento.

65 La solución (que contiene eritrocitos tratados y concentrados, es decir, obtenidos después de la segunda etapa de concentración) para su uso en el diagnóstico *in vivo*.

El uso de la solución (que contiene eritrocitos tratados y concentrados, es decir, obtenidos después de la segunda etapa de concentración) para la producción de un medicamento.

5 El uso de la solución (que contiene eritrocitos tratados y concentrados, es decir, obtenidos después de la segunda etapa de concentración) para la producción de un medicamento.

Una composición farmacéutica que comprende la solución (que contiene eritrocitos tratados y concentrados, es decir, obtenidos después de la segunda etapa de concentración).

10 A menos que se indique expresamente lo contrario, el contenido de las referencias (documentos, textos, solicitudes de patentes, etc.) citado en este texto se incorpora integralmente en la presente. En particular, las referencias anteriormente mencionadas se incorporan en la presente memoria por referencia.

15 Otras características de la presente invención resultarán de la siguiente divulgación de algunas realizaciones del aparato 1 dadas únicamente a título de ilustración no limitativa.

Ejemplo 1

20 Este ejemplo divulga los ensayos de funcionamiento del dispositivo de la figura 1. El método utilizado en adelante sigue las indicaciones de la descripción del funcionamiento del aparato 1 divulgado anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención.

25 Se realizaron ocho ensayos de carga con fosfato sódico de dexametasona (empleando 500 mg para cada procedimiento) en los glóbulos rojos humanos que se derivan a partir de 50 ml de sangre entera procedente de donantes sanos.

Los materiales utilizados para los ensayos son:

- dispositivo de la figura 4;
- 30 • dispositivo de la figura 9;
- solución hipotónica 1 (400 ml con una osmolaridad de 180 mOsm/Kg), solución hipotónica 2 (200 ml con una osmolaridad de 120 mOsm/kg);
- solución hipertónica resellada (PIGPA) (NaH₂PO₄ aproximadamente 33 mM; KCl aproximadamente 1,606 M, NaCl aproximadamente 0,194 M; inosina aproximadamente 0,1 M; adenina aproximadamente 5 mM; ATP aproximadamente 20 mM; glucosa aproximadamente 0,1 M; piruvato aproximadamente 0,1 M; y MgCl₂ aproximadamente 4 mM) (7 ml a 2.500-3.800 mOsm/kg).
- 35 • fosfato sódico de dexametasona en una solución acuosa de 500 mg/20 ml (utilizado por completo)
- solución salina fisiológica de calidad inyectable (solución acuosa de NaCl al 0,9 % en peso/volumen) (bolsas de 2 l de los cuales se utilizaron 1,8 l; 0,8 litros para el primer lavado y 1 l para el segundo lavado)
- 40 • 50 ml de sangre entera procedente de un donante sano anticoagulada con 10.000 UI de heparina sódica

Resultados

45 Los datos obtenidos por los ensayos se muestran en la tabla siguiente, donde puede verificarse la reproducibilidad real de los resultados entre diferentes ensayos de la desviación estándar.

Tabla 1

		DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIA
Datos en el pre-procedimiento sangre entera	Volumen de sangre entera (ml)	50,0	0,5
	VCM (femtolitros)	87,7	2,1
	Hematocritos (%)	40,0	4,6
Datos post-procedimiento	VCM (femtolitros)	80,1	3,9
	Hematocritos (%) (sin concentración adicional)	10,0	1,7
	Volumen de recogida (sin concentración adicional) (ml)	83,9	3,9
	Fosfato sódico de dexametasona encapsulado en glóbulos rojos (mg)	12,30	3,0
	Eficacia en la recuperación de glóbulos rojos con respecto al número inicial (%)	43,1	10,3
Datos tras la concentración adicional final	Hematocritos (%) (tras la concentración)	60,7	7,2
Final	Volumen de recogida (sin concentración adicional) (ml)	8,2	2,5

La Tabla 1 muestra los datos la sangre entera del pre-procedimiento, los datos después del procedimiento de

encapsulación (incluyendo la carga del fármaco en los glóbulos rojos) y, finalmente, el efecto del aumento del hematocrito como consecuencia de la concentración final por medio de un filtro de hemoconcentración adicional (o dializador como se muestra en la figura 2).

- 5 Mediante la eficacia de la etapa de post-procedimiento se tiene en su lugar por objeto el porcentaje de las células de sangre recuperadas con respecto a las células de sangre iniciales que comenzaron el proceso y se correlaciona el peso neto de la bolsa de recogida y el valor del hematocrito al final del proceso en relación con el volumen y el valor del hematocrito inicial de la sangre que se utiliza para el procedimiento.
- 10 Los datos anteriores muestran que el objeto de la presente invención permite obtener eritrocitos cargados de una manera extremadamente efectiva y práctica y con rendimientos óptimos.

Ejemplo 2

15 Nanopartículas superparamagnéticas

Las nanopartículas superparamagnéticas ya están disponibles y se utilizan como agentes de contraste en imágenes por resonancia magnética (IRM). No obstante, una vez inyectadas en la circulación sanguínea por inyección IV, las nanopartículas se cubren rápidamente por los componentes plasmáticos de la sangre, un proceso conocido como opsonización que resulta fundamental en la determinación de la confianza de las nanopartículas haciéndolas fácilmente reconocibles por el sistema de defensa principal del cuerpo, es decir, el sistema de fagocitos mononucleares. Por lo tanto, la encapsulación de las nanopartículas superparamagnéticas en eritrocitos humanos se ha obtenido mediante el presente aparato, a fin de evitar su rápida eliminación de la circulación sanguínea y por lo tanto obtener intervalos temporales de imagen más amplios en aplicaciones de resonancia magnética intravascular (PCT/EP07/06349 administración de agentes de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética). Como ejemplo, la carga del agente de contraste SHU555A se ha realizado mediante el procedimiento divulgado anteriormente y un aparato que son el objeto de la presente patente, como en la figura 1. La concentración de SHU555A en el interior de los eritrocitos, al final del procedimiento, se determinó siguiendo las mediciones de RMN de la relajividad (T1 y T2) de las muestras. El rendimiento de encapsulación computado de este modo determinó 20 concentraciones SHU555A en los eritrocitos en el intervalo de Fe 1-2,1 mM.

Con el fin de verificar si las células cargadas con las nanopartículas magnéticas mediante el aparato divulgado en la figura 1 mantuvieron las propiedades de los eritrocitos nativos, se llevaron a cabo mediciones de algunos indicadores de la integridad celular. Sobre la base de estas mediciones, fue posible establecer que el procedimiento no condujo a modificaciones significativas de las propiedades de GRs, como el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) que resultan en los intervalos del ejemplo previo (dex 21 P). Como conclusión, las nanopartículas superparamagnéticas seleccionadas se encapsularon con éxito dentro de los GRs por medio de la utilización del aparato mostrado en la figura 1, proporcionando por lo tanto un producto con los requisitos para su uso en clínicas para utilizarse para fines de diagnóstico en IRM (imagen de resonancia magnética).

Ejemplo 3

45 Agente de contraste verde de indocianina (ICG)

Otra aplicación de la técnica innovadora en relación con el transporte de moléculas exógenas en glóbulos rojos se representa por la encapsulación de agentes de contraste que se van a utilizar en fluoroangiografía o con otros métodos de detección óptica y/o de fluorescencia. Como ejemplo, se muestran los resultados de la encapsulación del agente de contraste verde de indocianina (ICG) obtenido con el aparato como se muestra en la figura 2. Esto se propone como una nueva estrategia para fines de diagnóstico y terapéuticos para la visualización y/o la fotocoagulación de nuevos vasos de la coroides en enfermedades degenerativas y vasculares de la retina.

ICG es un agente de contraste infrarrojo (IR) que contiene tricarbocianina y es aprobado por la FDA para uso diagnóstico para visualizar la vascularización de la retina y para la terapia fotodinámica. Su uso como un agente de contraste saca ventaja del hecho de que la mayoría de las moléculas biológicas ni absorben ni emiten en la región cercana de IR, lo que conduce a una fluorescencia libre de interferencias. El uso real de ICG como un marcador fluorescente y el agente fotoestabilizante se limita no obstante por varios factores: inestabilidad en agua, degradación debido a la luz y al calor, semivida corta en la circulación sanguínea (aproximadamente 2-4 minutos) y rápida depuración hepatobiliar debido a la unión a las proteínas plasmáticas. Además, las moléculas de ICG pueden difundirse a través de los vasos y el proceso de difusión podría influir en la semiología angiográfica. La administración de ICG en el compartimento vascular mediante el uso de eritrocitos como portadores permite superar tales limitaciones. De este modo, una vez que la molécula está dentro de los GRs, está por un lado protegido de la inactivación por factores endógenos y, por el otro lado, su encapsulación en GRs autólogos implica una protección del organismo contra los efectos tóxicos del propio agente (náuseas, vómitos, erupción cutánea, choque hipotensivo, etc.). A tenor de esto y con el fin de mejorar significativamente las características de la angiografía coroidal y de la fotocoagulación con láser, el aparato en la versión mostrada en la figura 2 se utilizó a fin de cargar ICG en los

eritrocitos humanos autólogos. Después se cargaron los glóbulos rojos, que se concentraron de nuevo mediante el uso de un segundo hemofiltro con el fin de obtener la misma cantidad de ICG en un volumen reducido de suspensión de eritrocitos que tiene un hematocrito superior y por lo tanto una concentración de ICG superior.

- 5 Cuando el procedimiento de encapsulación de ICG se completó utilizando el aparato como se define en la figura 2, así con una etapa final de concentración adicional de eritrocitos, se obtuvieron 6 ml de ICG que contiene GRs (0,3 μ mol/ml de GR) con un hematocrito del 44 % que se puede aumentar adicionalmente hasta un hematocrito al 60 % mediante la extensión de la etapa de concentración.

10 **Ejemplo 4**

Orientación selectiva de los eritrocitos con sustancias farmacológicamente activas encapsuladas y/o sustancias encapsuladas para su uso diagnóstico

- 15 La orientación selectiva a los macrófagos de eritrocitos que contienen fármacos y/o medios de contraste puede conseguirse por el aparato mostrado en la figura siguiendo un procedimiento similar al utilizado en el ejemplo 1. Cuando se utilizó fludarabina como un agente de encapsulación, se adquirió una concentración final de 0,8 mM. Los eritrocitos tratados de esta manera se reconocieron por IgGs autólogas en porcentajes de más del 80 % en número total de células procesadas.

20 **Ejemplo 5**

- 25 Se obtuvo una primera solución de eritrocitos cargados con verde de indocianina. Esta solución (que no se concentró después de cargar la indocianina en los eritrocitos) tenía un hematocrito de 6,4 % y se inyectó en un paciente. La figura 10 es una imagen fluoroangiográfica del paciente tratado de esta manera.

- 30 Se obtuvo una segunda solución de eritrocitos cargados con verde de indocianina. Esta solución (que no se concentró después de cargar la indocianina en los eritrocitos) tenía un hematocrito de 54 % y se inyectó en un paciente. La figura 11 es una imagen fluoroangiográfica del paciente tratado de esta manera.

- A partir de la comparación de las dos imágenes, resulta evidente que, sorprendentemente, cuando la solución diluida (figura 10) no permite un diagnóstico, la solución concentrada (figura 11) permite un fácil diagnóstico.

- 35 A este respecto, cabe señalar que, antes de la presente invención, no era previsible que el resultado de un aumento de la concentración diera un resultado claro. En particular, es absolutamente sorprendente que los eritrocitos cargados no se dispersaron en el organismo, pero en su lugar se movían juntos y por lo tanto permiten obtener una imagen extremadamente clara.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para introducir al menos un compuesto en el interior de los eritrocitos; el aparato (1) comprende un sistema (2) de canales de conexión, que incluye un primer y un segundo canal (9, 10); una unidad de introducción (3) para insertar una muestra que contiene los eritrocitos en el interior del aparato (1); una unidad de separación (4) para separar los diferentes componentes de la muestra entre sí; una unidad de combinación (5), que comprende un primer depósito (6) y en el área de la cual los eritrocitos y el compuesto se combinan entre sí para obtener eritrocitos tratados; una entrada (7) para insertar el compuesto en el primer depósito (6); una unidad de alimentación (8), para introducir una primera solución a través del primer canal (9) e introducir una segunda solución a través del segundo canal (10); una unidad de concentración (11) para concentrar el contenido del primer depósito (6); y una unidad de recogida (12), que comprende un segundo depósito (13) para recoger los eritrocitos tratados; el sistema (2) de canales conecta la unidad de introducción (3), la unidad de separación (4), la unidad de combinación (5), la unidad de alimentación (8), la unidad de concentración (11) y la unidad de recogida (12); el aparato (1) **se caracteriza por que** comprende una unidad de control (15); y primeros medios de bombeo (49), que son accionables por la unidad de control (15) y que se diseñan para mover fluidos al menos entre la unidad de introducción (3), la unidad de separación (4), la unidad de combinación (5) y la unidad de recogida (12); la unidad de alimentación (8) comprende primeros medios de ajuste (29), que son accionables por la unidad de control (15) y que se disponen a lo largo del primer canal (9) para regular el flujo a lo largo del primer canal (9); y segundos medios de ajuste (30), que son accionables por la unidad de control (15) y que se disponen a lo largo del segundo canal (10) para regular el flujo a lo largo del segundo canal (10); la unidad de recogida (12) comprende terceros medios de ajuste (33), que son accionables por la unidad de control (15) y que se adaptan para ajustar el flujo en dirección del segundo depósito (13); el aparato **se caracteriza por que** comprende un sensor de aire (26) para identificar la presencia de aire en el sistema (2) de canales entre la unidad de introducción (3) y la unidad de separación (4).
2. El aparato según la reivindicación 1, donde la unidad de alimentación (8) comprende segundos medios de bombeo (31), que son accionables por la unidad de control (15) y que se diseñan para mover la primera y la segunda solución en dirección de la unidad de combinación (5).
3. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde la unidad de combinación (5) comprende un dispositivo de mezcla (35) controlable por la unidad de control (15) para mover el primer depósito (6) para mezclar el contenido del mismo; y al menos un elemento de calentamiento controlable por la unidad de control (15) para calentar el contenido del primer depósito (6).
4. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un tercer depósito (27) y un cuarto depósito (28) para contener la primera y respectivamente la segunda solución; los primeros y segundos canales (9, 10) se conectan al tercer depósito (27) y al cuarto depósito (28), respectivamente; el aparato (1) comprende una unidad de pesaje (51) para pesar el tercer y el cuarto depósitos (27, 28); la unidad de control (15) se adapta para controlar los primeros medios de ajuste (29) en función del peso del tercer depósito (27) y los segundos medios de ajuste (30) en función del peso del cuarto depósito (28).
5. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, comprende una unidad de alimentación (45) adicional, que se diseña para introducir una tercera solución (en particular una solución fisiológica) a lo largo de un tercer canal (47) del sistema (2) de canales y comprende cuatro medios de ajuste (46), que son accionables por la unidad de control (15) y que se disponen a lo largo del tercer canal (47) para regular el flujo a lo largo del tercer canal (47).
6. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde el sistema (2) de canales comprende un canal de conexión (14) entre la unidad de combinación (5) y la unidad de separación (4); dichos primeros medios de bombeo (49) se disponen a lo largo del canal de conexión (14); la unidad de introducción (3), la unidad de recogida (12) y posiblemente la unidad de alimentación (8), y la unidad de alimentación (45) adicional se conectan al canal de conexión (14) entre los primeros medios de bombeo (49) y la unidad de combinación (5).
7. El aparato según la reivindicación 6, comprende quintos medios de ajuste (50), que son accionables por la unidad de control (15) y que se disponen a lo largo de dicho canal de conexión (14) entre la unidad de alimentación (8) y la unidad de separación (4) y entre la unidad de introducción (3), la unidad de recogida (12) y posiblemente la unidad de alimentación (45) adicional, por un lado y la unidad de combinación (5) por otro lado.
8. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde la unidad de introducción (3) comprende sextos medios de ajuste (19), que son accionables por la unidad de control (15) y que se adaptan para regular el flujo a partir de la unidad de introducción (3).
9. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde la unidad de concentración (11) comprende un filtro (37) para separar al menos parcialmente los eritrocitos tratados del líquido; un aspirador (38), que se controla por la unidad de control (15) y que se adapta para aspirar al menos una parte del líquido a través del filtro (37).
10. El aparato según la reivindicación 9, donde la unidad de concentración (11) comprende un quinto depósito (39)

para recoger el líquido que ha pasado a través del filtro (37); y terceros medios de bombeo (40) para transportar el contenido del primer depósito (6) en contacto con el filtro (37); el aparato (1) comprende una unidad de pesaje (51) para pesar el quinto depósito (39); la unidad de control (15) se adapta para controlar el aspirador (38) en función del peso del quinto depósito (39) detectado por la unidad de pesaje (51).

5 11. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde la unidad de separación (4) comprende un conjunto de centrifugación (20) para separar los eritrocitos y/o los eritrocitos tratados de los otros componentes.

10 12. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un tercer depósito (27) y un cuarto depósito (28) para contener la primera y respectivamente la segunda solución; un sexto depósito (21) para recoger lo que se ha separado de los eritrocitos por la unidad de separación (4); un séptimo depósito (48) que contiene una tercera solución (en particular una solución fisiológica); un tercer canal (47) conectado al séptimo depósito (48); y un cuarto canal (22) conectado al sexto depósito (21); los primeros y segundos canales (9, 10) se conectan al tercer depósito (27) y respectivamente al cuarto depósito (28); el aparato (1) comprende una unidad de pesaje (51) para
15 pesar los tercer y cuarto depósitos (27, 28), el sexto depósito (21) y el segundo depósito (13); la unidad de control (15) se adapta para controlar los medios de bombeo (31, 40, 49) en función del peso de los depósitos (13, 21, 27, 28, 39, 48).

20 13. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un dispositivo reutilizable (56), que comprende medios de bombeo, medios de ajuste, la unidad de control (15) y posiblemente una placa rotatoria (25) del conjunto de centrifugación, el sensor de aire (26), el dispositivo de pesaje (51) y el aspirador (38); y un dispositivo desechable (55) que comprende el sistema (2) de canales, los depósitos y posiblemente el(los) filtro/s y un recipiente de separación (24) del conjunto de centrifugación (20).

25 14. El aparato según una de las reivindicaciones precedentes, donde la unidad de combinación (5) comprende un dispositivo de mezcla (35) controlable por la unidad de control (15) para mover el primer depósito (6) para mezclar el contenido del mismo; y al menos un dispositivo de pesaje para pesar el contenido del primer depósito (6).

30 15. Un kit desechable para el aparato (1) según una de las reivindicaciones precedentes; el kit comprende el sistema (2) de canales y los depósitos conectados al sistema (2) de canales del aparato (1); el kit **se caracteriza por que** al menos uno de los canales (14) del sistema (2) de canales tiene al menos un segmento que presenta una dureza inferior a 70 Shore A; dicho segmento se adapta para disponerse en el sensor (26).

35 16. El kit según la reivindicación 15, comprende al menos un filtro (37) para la unidad de concentración (11), un recipiente de separación (24) para un conjunto de centrifugación (20) para la unidad de separación (4), un sexto depósito (21) para recoger lo que se ha separado de los eritrocitos por la unidad de separación (4) y un séptimo depósito (48) para contener la tercera solución (en particular una solución fisiológica).

40 17. Un dispositivo reutilizable **caracterizado por que** se realiza según la reivindicación 13.

45 18. Uso de un aparato para introducir al menos un compuesto en el interior de los eritrocitos; el uso **se caracteriza por que** el aparato se realiza según una de las reivindicaciones 1 a 14; el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en: agentes farmacológicos activos, péptidos, proteínas, hormonas, fosfato sódico de dexametasona y fosfato sódico de betametasona, glutatión, toxinas, oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios (que pueden incluir análogos de nucleótidos), nanopartículas con un diámetro de hasta 500 nm, agentes fluorescentes, otros agentes detectables por aparatos ópticos, ecográficos, o de resonancia magnética, y otros agentes de contraste que pueden utilizarse como medios de diagnóstico de cualquier clase y tipo.

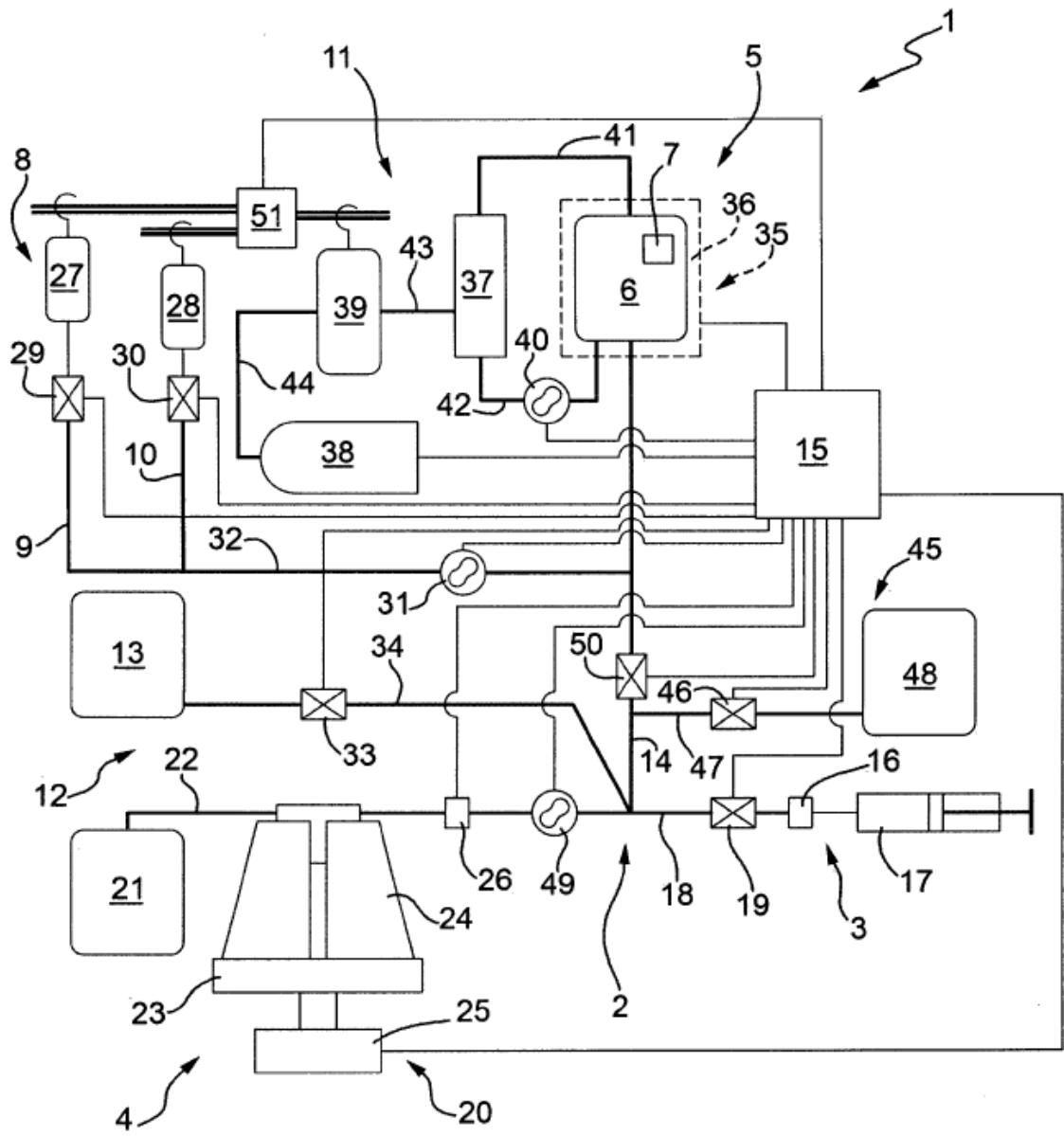


FIG.1

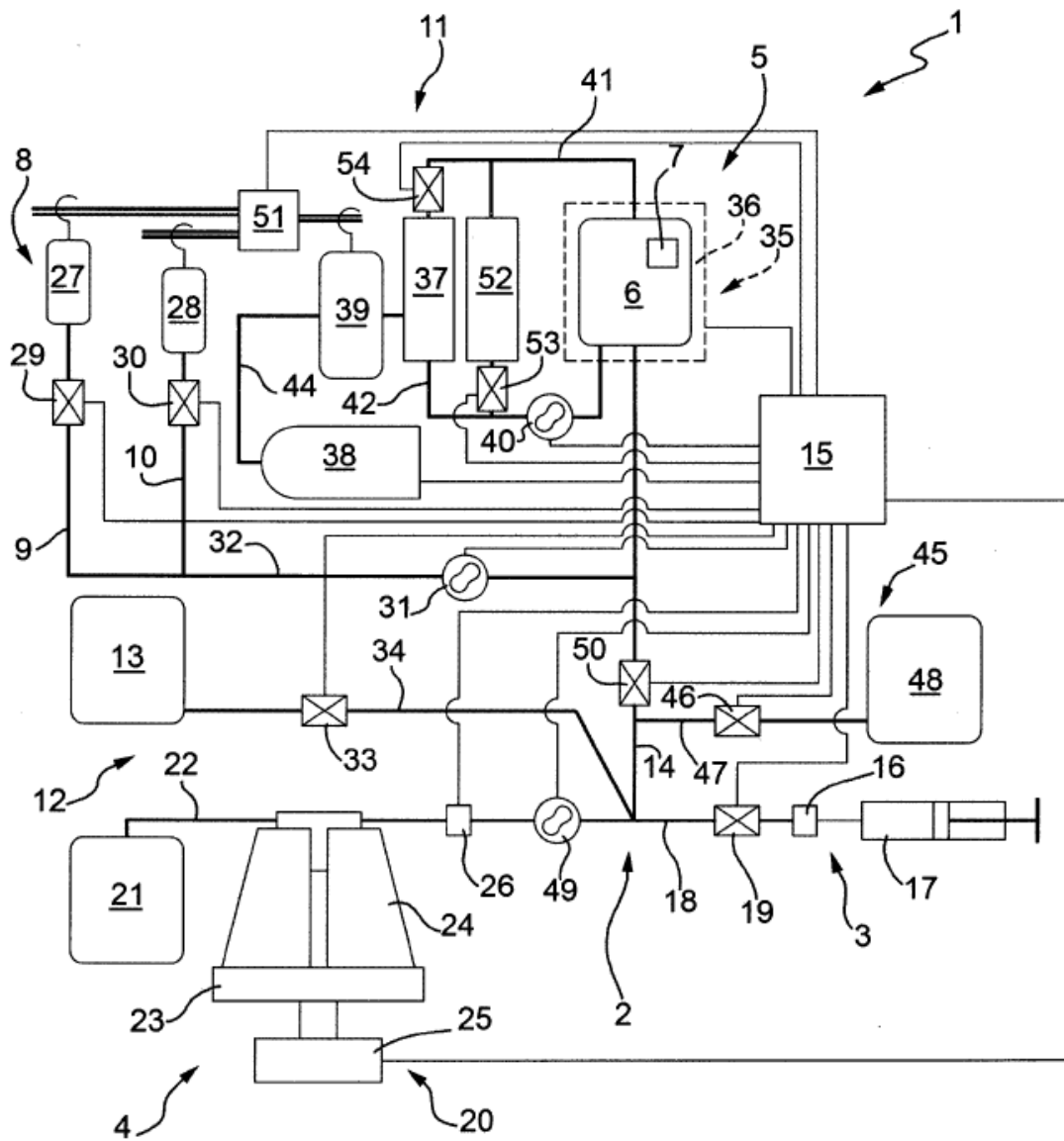


FIG.2

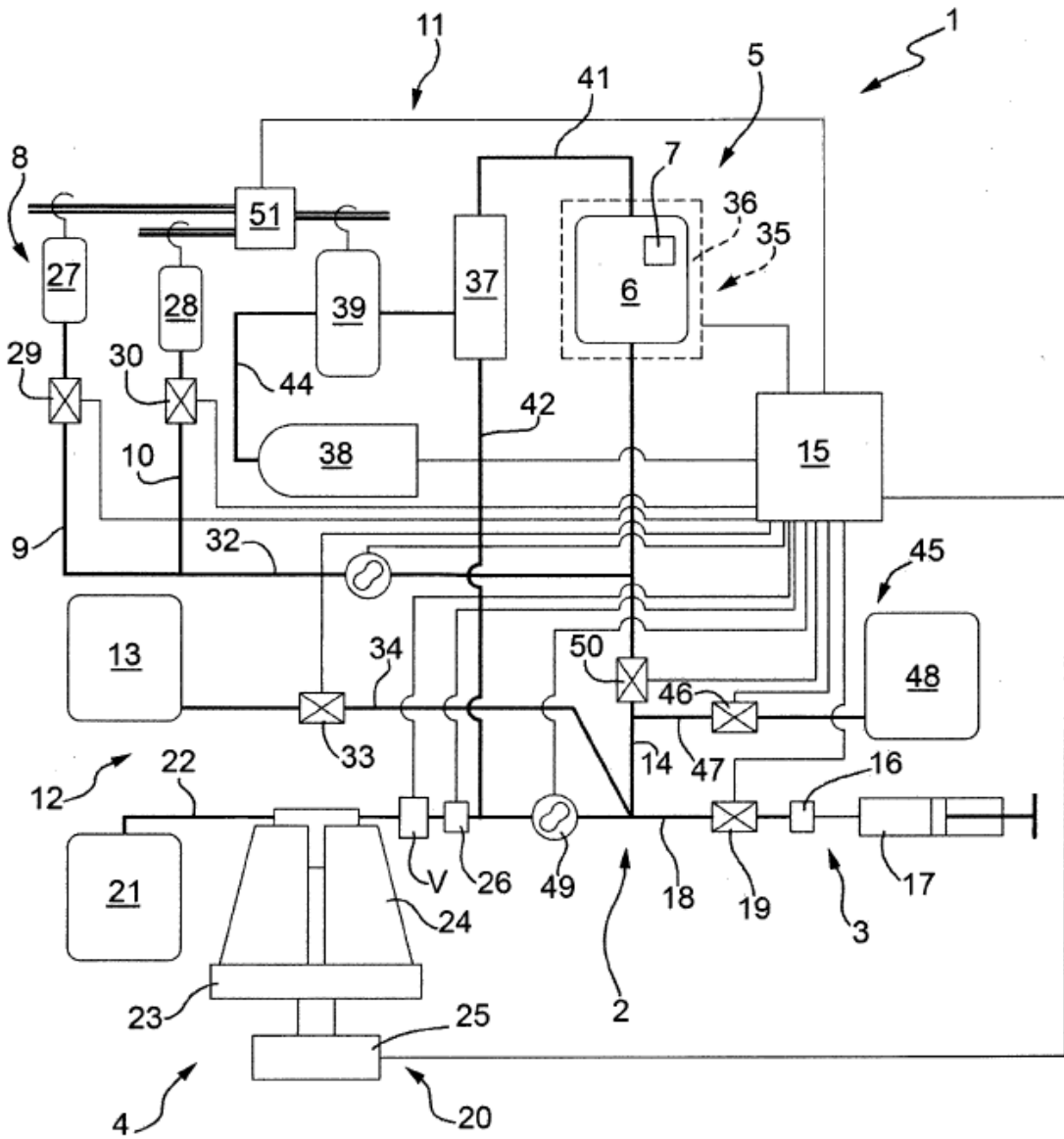


FIG.3

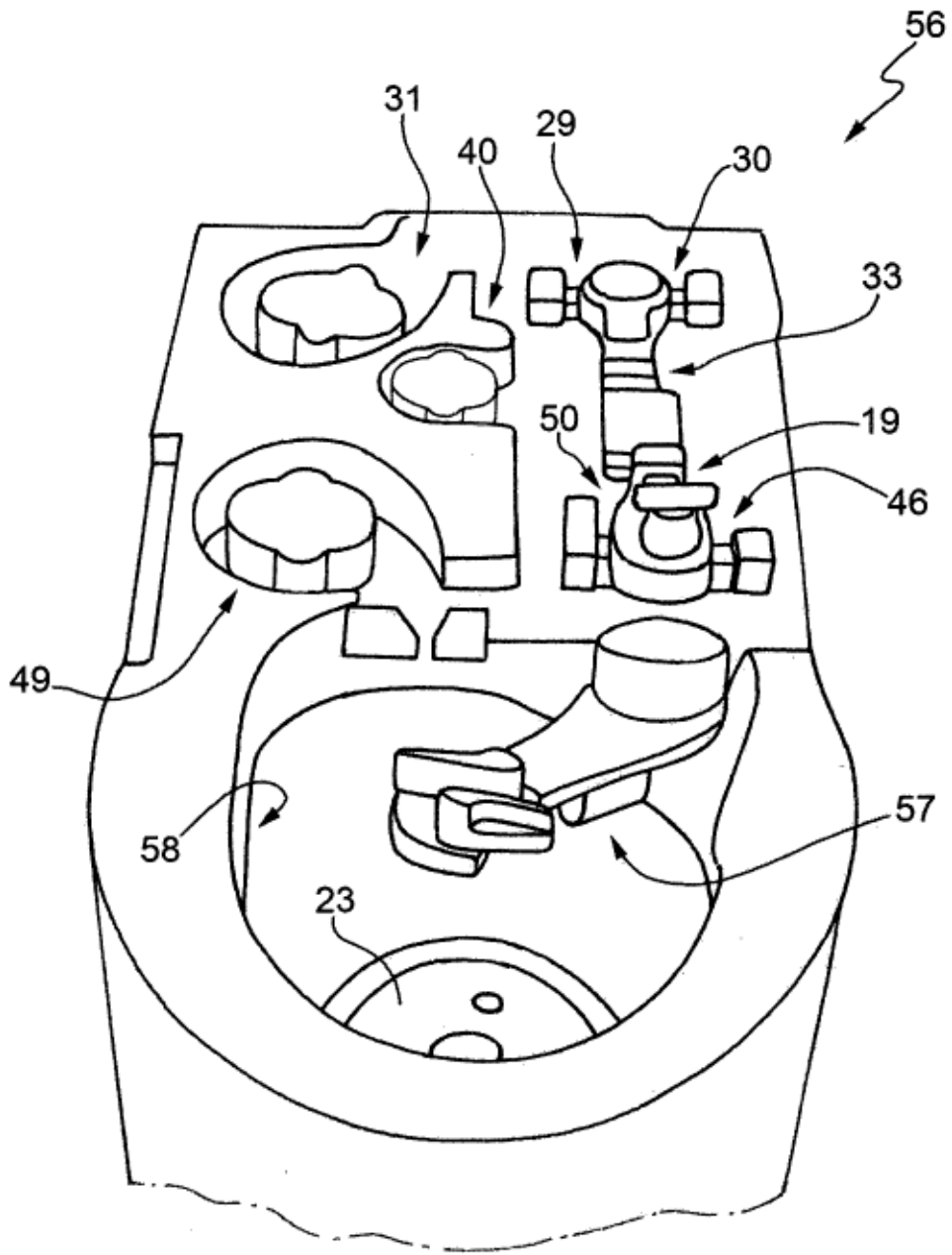


FIG.4

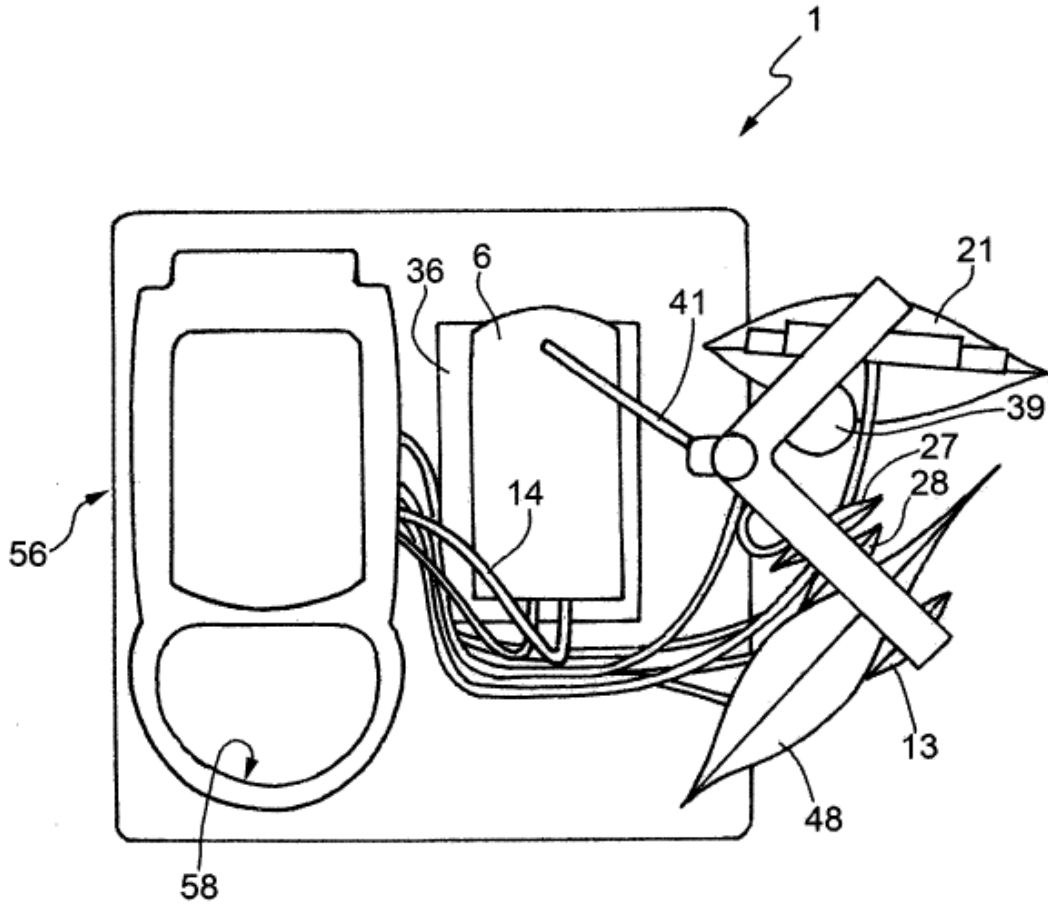


FIG.5

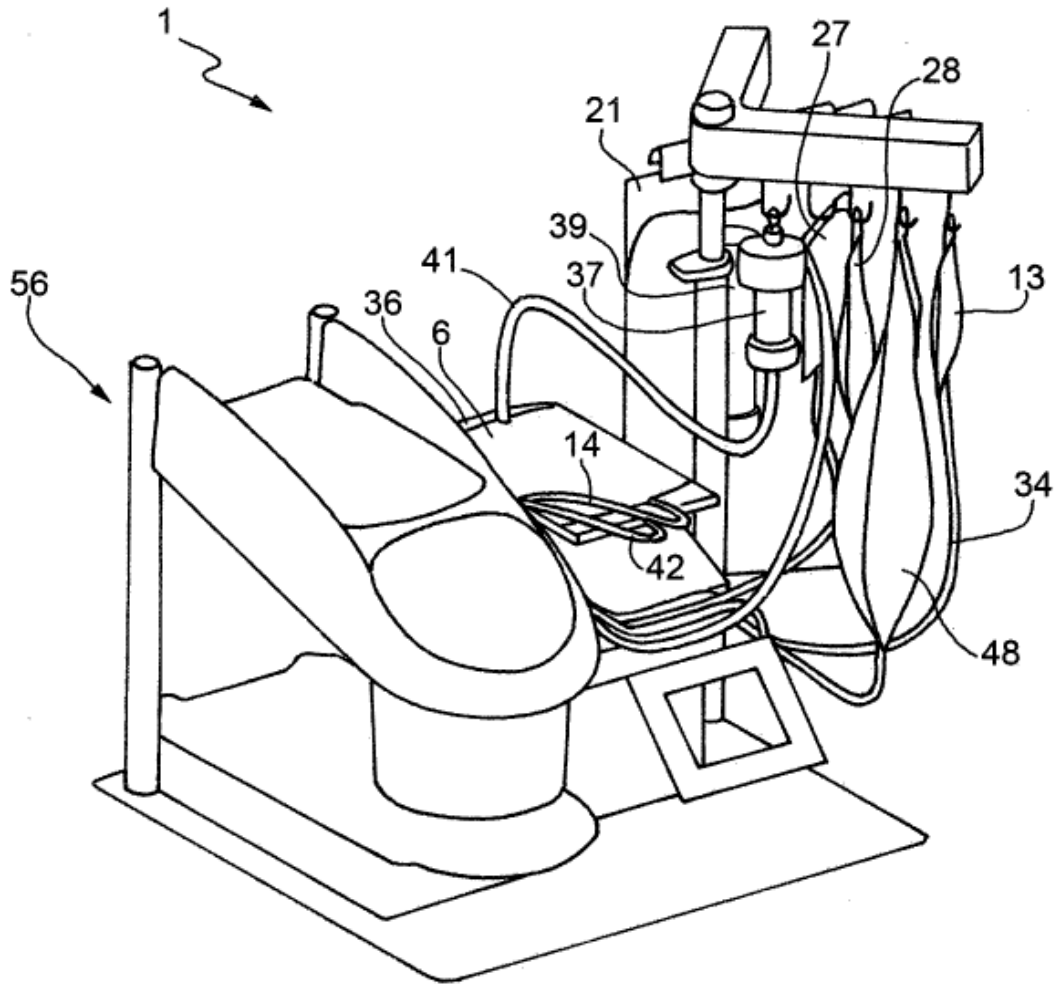


FIG.6

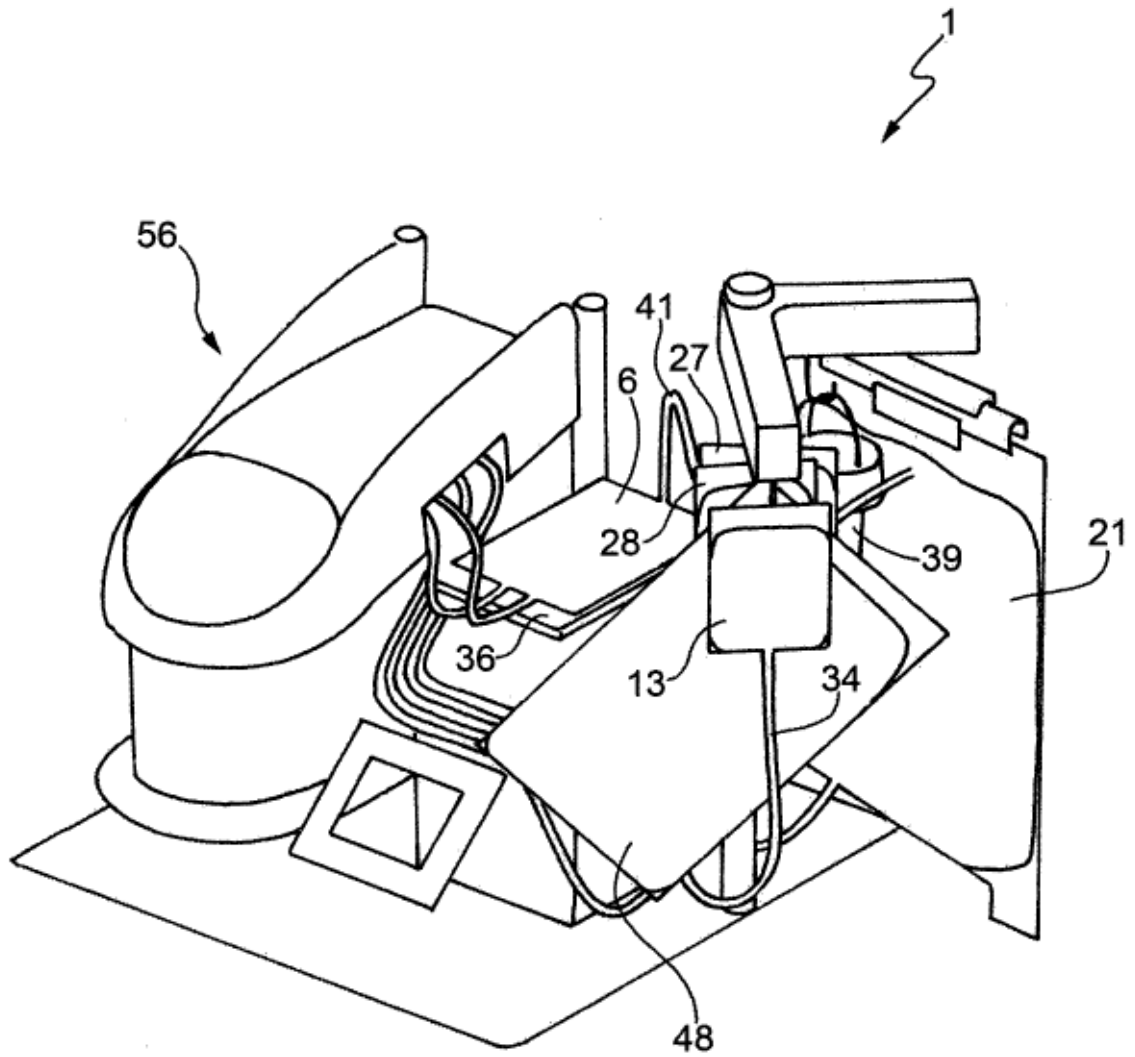


FIG.7

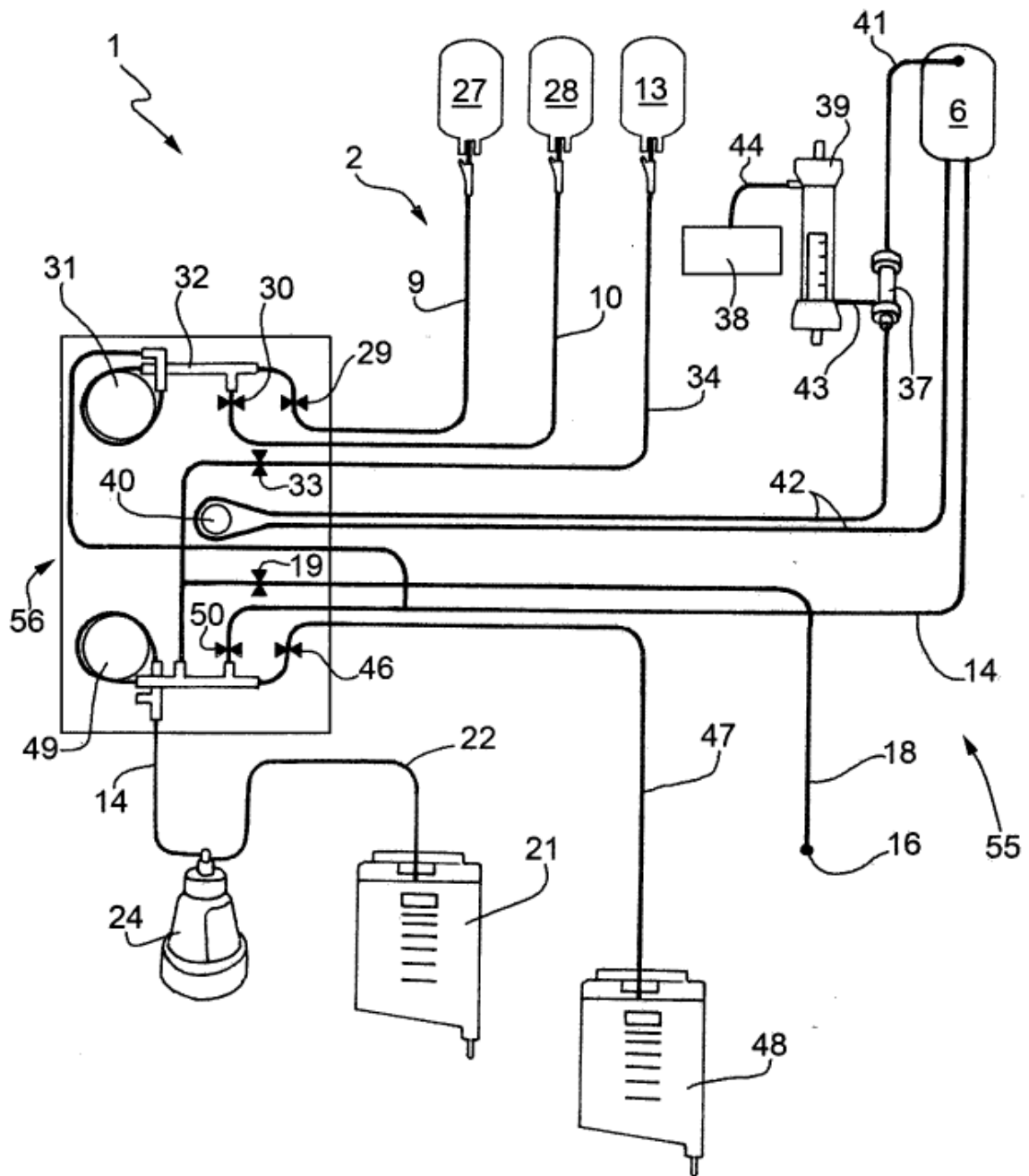


FIG.8

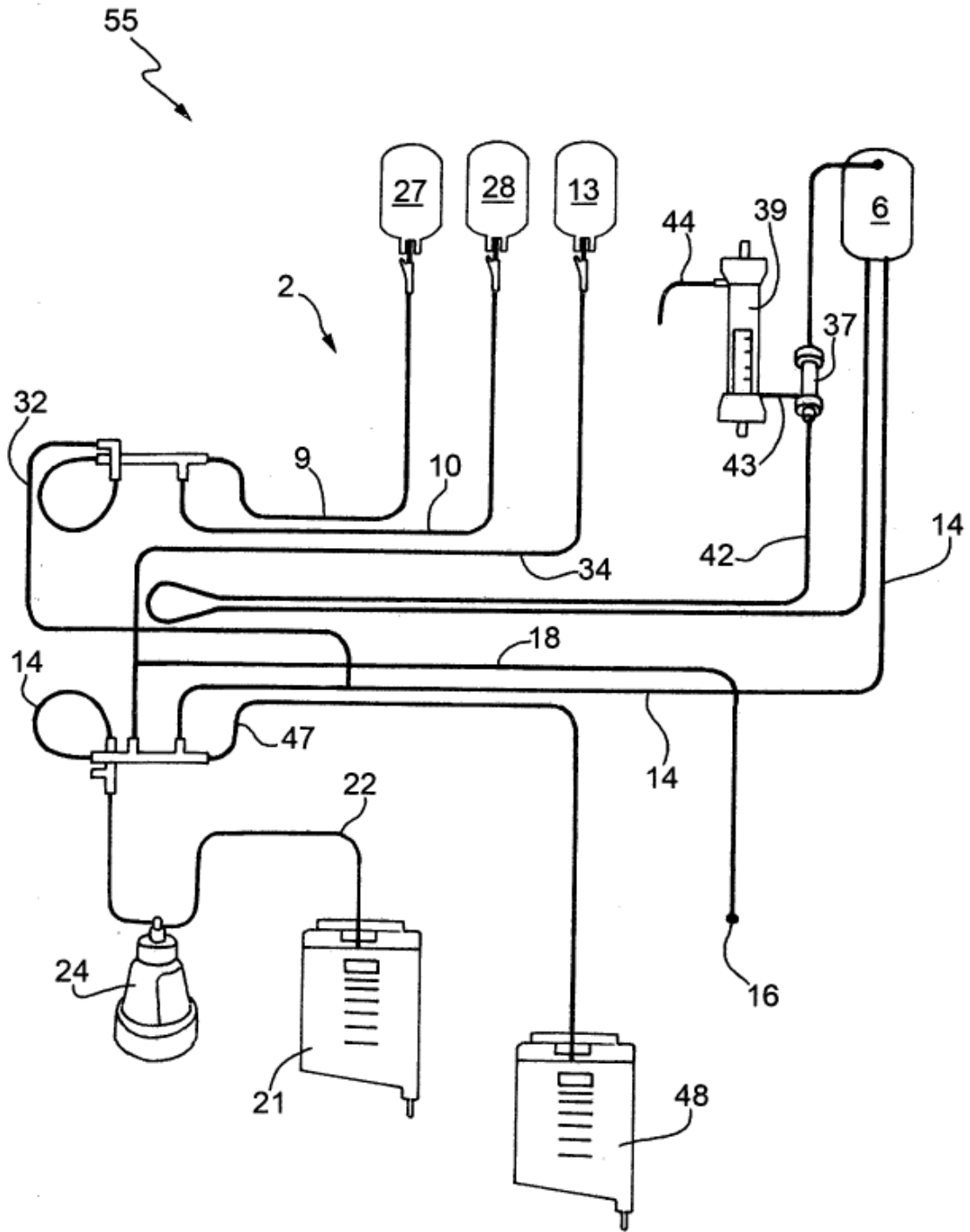


FIG.9

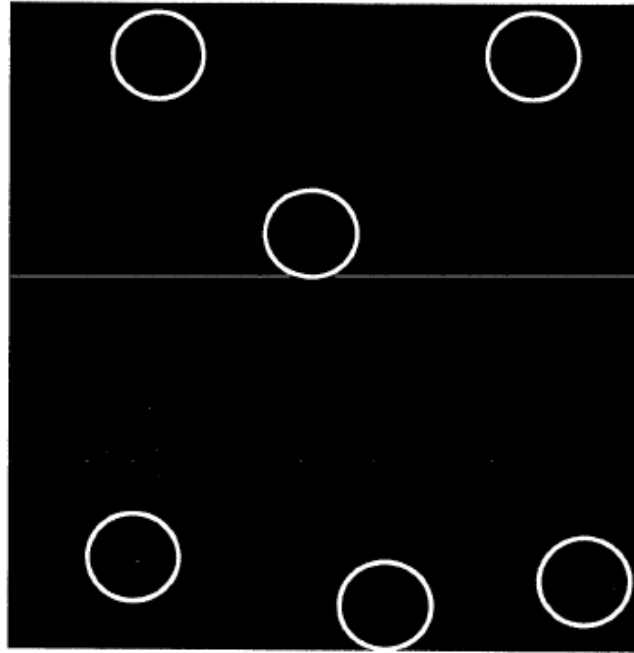


FIG. 10

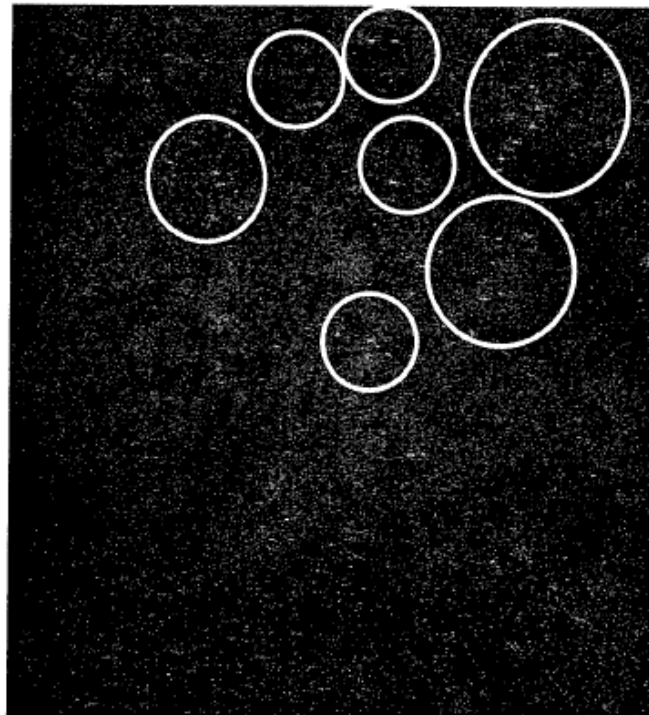


FIG. 11