

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 715**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

B01D 61/24 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 35/16 (2015.01)

C12N 5/0787 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/EP2013/001664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13727053 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2858696**

54 Título: **Procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos y preparación de leucocitos**

30 Prioridad:

08.06.2012 DE 102012209673

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

03.04.2018

73 Titular/es:

**ARTCLINE GMBH (50.0%)
Schillingallee 68
18057 Rostock, DE y
FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALTRICHTER, JENS;
MITZNER, STEFFEN;
LÜBCKE, ANTJE;
SELLENG, KATHLEEN;
DOSS, FANNY y
KOCH, STEPHANIE**

74 Agente/Representante:

BOTELLA REYNA, Juan

ES 2 661 715 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

Procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos y preparación de leucocitos

5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos a partir de una fracción leucocitaria. La invención se refiere asimismo a una preparación de leucocitos que se produce o se puede producir de forma correspondiente, así como a su uso.

10 La transfusión de leucocitos (glóbulos blancos), en particular de granulocitos, es una terapia adyuvante en pacientes con neutropenia potencialmente mortal o disfunción neutrofílica. Las transfusiones de granulocitos también pueden combatir o prevenir infecciones en estos pacientes. Estas transfusiones de granulocitos se componen de plasma sanguíneo enriquecido en granulocitos, un tipo de leucocitos, pero contienen también un número muy elevado de trombocitos (plaquetas) y eritrocitos (glóbulos rojos). Para estas aplicaciones se requieren grandes cantidades de granulocitos, normalmente entre $1 \cdot 10^{10}$ y $8 \cdot 10^{10}$ granulocitos por aféresis.

15 Los preparados de granulocitos obtenidos por aféresis, denominados también concentrados de granulocitos, se obtienen actualmente a partir de la sangre de donantes sanos. En general, los donantes son estimulados entre 2 y 24 horas antes de la donación con esteroides, por ejemplo glucocorticoides como dexametasona o prednisolona, y/o con factores de crecimiento, por ejemplo el factor estimulante de colonias de granulocitos ("granulocyte colony-stimulating factor", G-CSF). La donación se lleva a cabo mediante aféresis, en la que la sangre se conduce a través de un catéter a un tubo flexible, donde se mezcla con citrato y un acelerador de la sedimentación, y se transfiere a una centrífuga. En la centrífuga se extraen por bombeo el plasma del interior y los eritrocitos del exterior, se mezclan y se vuelven a infundir en línea al paciente. Mediante velocidades de bombeo adecuadas para el plasma y los eritrocitos, la capa intermedia, que contiene los leucocitos, se coloca debajo de un orificio de salida central y desde
20 allí se bombea a una bolsa. De esta forma se obtienen por aféresis preparados de granulocitos de muy baja pureza.

25 Los términos "preparado de granulocitos obtenido por aféresis" o "concentrado de granulocitos" engaña, ya que en realidad se trata más bien de sangre total enriquecida en granulocitos. El concentrado contiene aproximadamente 10-100 veces más eritrocitos y trombocitos que leucocitos. En los donantes estimulados previamente con esteroides y/o G-CSF generalmente más del 50% de los leucocitos son granulocitos.

30 El preparado de granulocitos obtenido de esta manera por aféresis no se puede conservar y debe usarse en la clínica en un plazo de 6 horas a, como máximo, 24 horas, según las leyes de cada país. Esto se debe a que los granulocitos solo tienen un corto periodo de vida en la sangre, siendo el tiempo medio de permanencia en la sangre de aproximadamente un día. Además, los granulocitos y monocitos se activan rápida e intensamente en condiciones no fisiológicas, de forma que se liberan radicales de oxígeno y enzimas que dañan también a las propias células ("efecto kamikaze"). Esta reducida capacidad de conservación y la activación de las células obstaculizan tanto la realización de un estudio más amplio en investigación como el uso para el tratamiento de infecciones.

40 Para obtener cantidades correspondientemente grandes de leucocitos, y en particular de granulocitos, los donantes actualmente se tratan con glucocorticoides y/o el denominado factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), lo que estimula la producción de granulocitos, y, una vez incrementada la cantidad de granulocitos en la sangre del donante, se realiza una aféresis de la sangre periférica para recoger estas células. La estimulación del donante con G-CSF puede estar asociada a efectos negativos para el donante, tales como dolor o fiebre.

45 Una posibilidad alternativa que, dado el caso, no requiere la estimulación del donante consiste en la producción de una preparación de leucocitos a partir de capas leucocitarias ("buffy coats", abreviado: BC) de sangre total sin aféresis. Para ello, las donaciones de sangre total, de aproximadamente 450 ml a 500 ml, normalmente se fraccionan tras la sedimentación o centrifugación en un concentrado de eritrocitos y plasma. En la bolsa residual, de la que se han extraído el concentrado de eritrocitos y el plasma, queda la capa leucocitaria que se ha formado entre
50 las dos fracciones y que contiene la mayor parte de los leucocitos y trombocitos del donante. Los eritrocitos están desenfocados en la capa leucocitaria pero aún dominan en la capa leucocitaria.

55 En algunos casos se combinan las capas leucocitarias de varios donantes de sangre total para obtener concentrados de trombocitos. La mayor parte de las capas leucocitarias, y especialmente los leucocitos, se consideran desechos.

60 El uso de preparaciones de leucocitos es conocido en sí. Los leucocitos se componen de diferentes tipos de leucocitos que presentan propiedades diferentes, entre otros de granulocitos, linfocitos y monocitos.

Para la aplicabilidad clínica y la aplicabilidad en la investigación clínica es especialmente importante la capacidad de conservación. Algunos tipos de leucocitos frecuentes, como los granulocitos, solo se pueden conservar durante muy poco tiempo, o no se pueden conservar en absoluto, y en las preparaciones de leucocitos conocidas pierden su viabilidad y funcionalidad en unas horas, de manera que normalmente no se pueden conservar ni usar durante más de 24 horas. Las preparaciones de leucocitos o de granulocitos usadas habitualmente están además fuertemente contaminadas con eritrocitos y trombocitos. Debido a la poca capacidad de conservación, estas preparaciones se deben producir y usar directamente después de la donación de sangre o la aféresis. Se realizan bajo petición.

Bashir y col., Br. J. Haematol. 2008, 140 (6) 701-11 produjeron una preparación de granulocitos a partir de capas leucocitarias. Para ello, las capas leucocitarias se combinaron, se mezclaron con 400 ml de solución aditiva para trombocitos y se centrifugaron. La capa resultante, enriquecida en granulocitos, se transfirió a una bolsa colectora de trombocitos añadiendo 70 ml de plasma. El producto correspondiente contenía como media $8,8 \cdot 10^9$ neutrófilos (granulocitos). La concentración de trombocitos no se había reducido notablemente. La preparación de granulocitos se conservó durante 68 horas en condiciones constantes. Al cabo de 68 horas, la tasa de supervivencia fue del 84% y la fagocitosis y el estallido respiratorio habían disminuido al 94% y 81% en comparación con el punto temporal inmediatamente posterior a la producción. Se produce una muy fuerte contaminación con eritrocitos y trombocitos.

En Mochizuki y col., Transfus. Med. 2007, 17 (4), 296 a 303, se estudió la influencia del tratamiento previo del donante en la función de los granulocitos después de 72 horas con la ayuda de un procedimiento de separación en bolsas. Como comparación se usó un control sin tratar que correspondía a una capa leucocitaria. Durante la conservación a temperatura ambiente se constató una pérdida de granulocitos del 10%. La tasa de supervivencia (viabilidad) ascendió al 96%. El estallido respiratorio y el estado fagocítico permanecieron relativamente estables al inicio, reduciéndose la fagocitosis al 83% con respecto al inicio. También en este caso se produce una muy fuerte contaminación con eritrocitos y trombocitos.

La presente invención, en cambio, se propone el objetivo de indicar un procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos, en particular de una preparación de granulocitos, así como una preparación de leucocitos correspondiente que se pueda conservar más allá de 24 horas sin pérdidas significativas de viabilidad y funcionalidad de los leucocitos y, en especial, de los granulocitos contenidos en ella, y en la que los eritrocitos y trombocitos estén desentrenados frente a los leucocitos en mayor medida de lo que es posible hasta ahora.

Este objetivo se alcanza mediante un procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos a partir de una fracción leucocitaria con los siguientes pasos de procedimiento:

- a) sedimentación de la fracción leucocitaria hasta que se forme una línea de separación entre los eritrocitos sedimentados y un sobrenadante de leucocitos, separación del sobrenadante de leucocitos del sedimento, en la que el sobrenadante de leucocitos se recoge o permanece en un recipiente para leucocitos,
- b) sedimentación de los leucocitos en el recipiente para leucocitos, en la que se forma un sobrenadante pobre en leucocitos, y eliminación del sobrenadante pobre en leucocitos del recipiente para leucocitos,
- c) lavado del sedimento en el recipiente para leucocitos con una solución que contiene cloruro sódico, en el que las células sedimentadas se resuspenden en la solución que contiene cloruro sódico, la solución se sedimenta y el sobrenadante resultante se elimina, y
- d) resuspensión del sedimento en el recipiente para leucocitos en una solución de conservación,
- e) conservación de la solución de conservación con el sedimento resuspendido en una bolsa permeable a gas.

En el sentido de esta solicitud, la expresión fracción leucocitaria abarca aquellas mezclas de células con contenido en leucocitos obtenidas por aféresis, así como capas leucocitarias obtenidas a partir de sangre total, entre otros, por ejemplo de médula ósea obtenida por punción, células pluripotenciales obtenidas por aféresis, células tratadas en cultivo celular, así como sangre total propiamente dicha y sangre de cordón umbilical.

Este procedimiento de acuerdo con la invención se puede aplicar tanto a preparados de leucocitos obtenidos por aféresis a partir de donaciones de sangre total de donantes estimulados como a capas leucocitarias procedentes de donaciones de sangre total de donantes no estimulados o estimulados y se basa en una combinación de sedimentaciones y lavados. La fracción leucocitaria como material de partida contiene habitualmente anticoagulantes, por ejemplo citrato-fosfato-dextrosa (CPD) o ácido-citrato-dextrosa (ACD). Los procedimientos para la producción de la fracción leucocitaria como preparado de leucocitos obtenido por aféresis o a partir de capas leucocitarias son conocidos en sí, obteniéndose estas últimas, por ejemplo, por centrifugación de una donación de sangre total a una alta aceleración, por ejemplo a temperatura ambiente con una aceleración de 4000 g durante 10 min.

El término "leucocitos" en relación con "fracción leucocitaria", "preparación de leucocitos" y similares también comprende en el marco de la invención granulocitos, fracciones de granulocitos y preparaciones de granulocitos, así como fracciones de otros leucocitos distintos de granulocitos.

5 Con el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden obtener fracciones leucocitarias en las que se ha eliminado más del 90%, en especial más del 98%, de los eritrocitos y más del 90% de los trombocitos en comparación con la sangre total, y las células se pueden conservar al menos durante 72 horas sin pérdida significativa de la función.

10 El paso de procedimiento e) de la conservación se realiza de acuerdo con la invención en una bolsa permeable a gas. De este modo se puede escapar o gasificar el dióxido de carbono que se forma en la solución de conservación, por lo que el pH de la solución baja más despacio que en una bolsa impermeable a gas, en la que se forma ácido carbónico que acidifica la solución de conservación. De esta forma se prolonga el tiempo de conservación posible.

15 Preferentemente, la solución contenida en el recipiente para leucocitos se conserva después del paso de procedimiento d) según un paso de procedimiento e), en especial a una temperatura de -200°C a +40°C, en especial de +2°C a +38°C, en especial de +20°C a +25°C, o se congela y conserva por criopreservación entre -50°C y -200°C. De este modo se puede disponer de preparaciones de leucocitos todavía funcionales incluso después de una conservación prolongada, por ejemplo de hasta 168 horas o más.

20

Para la conservación también resulta ventajosa la criopreservación con congelación y conservación entre -50°C y -200°C, por ejemplo en nitrógeno líquido o en una fase gaseosa sobre nitrógeno líquido.

La sedimentación del paso de procedimiento a) se lleva a cabo preferentemente a una aceleración de 0,5 g a 1000 g, en especial de 0,5 g a 1,5 g o de 50 g a 1000 g, y/o con la adición de un acelerador de la sedimentación, en particular hidroxietilalmidón, dextrano, Ficoll, Percoll y/o gelatina, ascendiendo el tiempo de sedimentación en especial a entre 5 y 120 minutos, preferentemente entre 20 y 45 minutos. La sedimentación de la fracción leucocitaria se realiza, pues, a una baja aceleración, por ejemplo a una aceleración de 1 g, es decir, a la aceleración de la gravedad terrestre (gravitación), o es asistida por centrifugación. La adición de un acelerador de la sedimentación puede resultar de utilidad. La relación entre mezcla de células y acelerador de la sedimentación es preferentemente de 1:0,2 a 1:20, preferentemente de 1:0,4 a 1:2. Al cabo de unos minutos se separa un sedimento con eritrocitos de un sobrenadante pobre en eritrocitos. El sobrenadante está enriquecido en leucocitos. Dependiendo del procedimiento de sedimentación, o bien el sobrenadante de leucocitos se introduce en un recipiente para leucocitos, por ejemplo una bolsa, separándolo así del sedimento, o bien el sedimento se extrae del recipiente para leucocitos en el que se ha producido la sedimentación y se desecha.

La sedimentación de los leucocitos en el paso de procedimiento b) y/o la del paso de procedimiento c) se lleva a cabo preferentemente por centrifugación, en especial a una aceleración de 50 a 10000 g, en especial de 100 a 5500 g, en especial de 200 a 500 g. De esta forma se separan eficazmente los leucocitos de los trombocitos.

40

La sedimentación se efectúa preferentemente en una bolsa flexible. Después de añadir un acelerador de la sedimentación y antes de la sedimentación, ventajosamente se deberá expulsar de la bolsa el aire presente y evitar una nueva entrada de aire cerrando la salida (por ejemplo mediante una pinza). La bolsa preferentemente no se deberá mover durante la sedimentación. Para el desplazamiento del aire y la inmovilización se usa ventajosamente un dispositivo en el que se suspende la bolsa. El desplazamiento del sedimento se puede efectuar a través de una salida inferior por presión diferencial o gravedad, y el del sobrenadante, a través de una salida superior por presión diferencial. La extracción del sedimento por gravedad se puede regular mediante una pinza o una bomba. La generación de una presión diferencial para el desplazamiento del sedimento hacia abajo o del sobrenadante hacia arriba se puede fomentar mediante una bomba de succión (presión negativa) o generando una sobrepresión alrededor de la bolsa de sedimentación. La presión diferencial se puede generar manualmente, por ejemplo mediante una prensa manual para bolsas de sangre, o de forma mecánica. Ventajosamente, la bolsa de sedimentación puede estar alojada, por ejemplo, dentro de otra bolsa o de una cámara a prueba de presión en la que se pueda generar una sobrepresión por introducción de un gas o un líquido. De forma alternativa, también se puede generar ventajosamente una presión negativa en el tubo extractor, por ejemplo mediante una bomba (peristáltica). El final de la separación viene determinado por la llegada del otro componente a la salida de la bolsa, y generalmente conlleva un cambio del color y/o de la densidad óptica del contenido. Este acontecimiento puede ser detectado visualmente por el usuario o también en un sistema automatizado mediante un detector, por ejemplo óptico.

60 El lavado en el paso de procedimiento c) preferentemente se repite una o varias veces. La repetición del lavado sirve

para la purificación adicional de la preparación de leucocitos y el desenriquecimiento de trombocitos y, dado el caso, de eritrocitos.

5 El lavado o los lavados del paso de procedimiento c) se realiza o realizan preferentemente por centrifugación y/o filtración. Ventajosamente, el lavado o los lavados del paso de procedimiento c) se realiza o realizan con una solución fisiológica que contiene, en particular, cloruro sódico 50 a 200 mM y/u otras sales y/o tampones.

10 Para transferir líquidos de una bolsa a otra durante los procesos de lavado y la adición de aditivos se pueden usar ventajosamente las mismas técnicas manuales o mecánicas o aprovechar la gravedad como se ha descrito anteriormente para la separación de sedimento y sobrenadante.

La solución de conservación es preferentemente un plasma sanguíneo del mismo grupo sanguíneo y/o una solución acuosa que contiene, en particular, plasma del mismo grupo sanguíneo.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención se realiza preferentemente a temperatura ambiente, con especial preferencia a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

20 El procedimiento se lleva a cabo preferentemente en un sistema cerrado estéril, en especial en un sistema de tubos flexibles y bolsas. Las medidas correspondientes que se han de tomar para unir y separar los tubos flexibles y las bolsas en condiciones estériles son conocidas y se aplican de forma convencional. Para ello se usan, por ejemplo, soldaduras de tubos flexibles estériles conocidas correspondientes. Como alternativa se pueden producir ventajosamente conexiones de tubos flexibles mediante técnicas asépticas, por ejemplo mediante conexiones Luer estériles o mandriles o cánulas estériles adecuados en conectores o membranas perforables, como los que se usan en los sistemas de infusión.

25 Antes, durante o después de uno de los pasos de procedimiento a) a d) se añaden aditivos para mejorar la conservación, en particular de los grupos que incluyen estabilizadores de pH, en especial tampones, nutrientes, en especial glucosa, mejoradores de la función, en especial citocinas y/o factores de crecimiento, componentes del plasma sanguíneo, en especial plasma sanguíneo del mismo grupo sanguíneo y/o albúmina, y/o antioxidantes, en especial ácido ascórbico, glutatión, cisteína o metionina. Los aditivos también se pueden añadir incluso durante la conservación.

30 Una solución de aditivos preferida es, por ejemplo, PAGGS-M, que además de cloruro sódico, dihidrogenofosfato sódico dihidrato y hidrogenofosfato disódico dihidrato también contiene glucosa monohidrato, manitol, adenina y guanosina. Este aditivo se añade preferentemente durante la conservación. Otro aditivo que se puede usar ventajosamente y que con preferencia se usa durante la conservación es el preparado inmunológico Immuno-akut®, que además de las vitaminas B6, B12, C, D y E también contiene ácido fólico, diversos carotenoides y oligoelementos. Cada uno de los componentes mencionados de PAGGS-M y/o Immuno-akut® también se pueden añadir como aditivo por separado.

40 Resulta ventajoso combinar varios preparados antes, durante y/o después de uno de los pasos de procedimiento a) a d). Esto provoca la liberación de citocinas por parte de los leucocitos, lo que mejora la capacidad de conservación debido a su efecto positivo sobre la vida de los granulocitos.

45 Por primera vez se aprovecha así el efecto de la denominada "reacción leucocitaria mixta" (también "reacción linfocitaria mixta", "mixed leukocyte reaction", "mixed lymphocyte reaction", abreviada MLR) para prolongar la conservación de los granulocitos. La MLR consiste en mezclar dos poblaciones de linfocitos alogénicos (linfocitos de individuos genéticamente diferentes de la misma especie), lo que en primer lugar produce la activación de linfocitos T, la liberación de mediadores y, dado el caso, la proliferación. Los antígenos de la superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad ("major histocompatibility complex", MHC) constituyen probablemente los mayores estímulos.

55 En una preparación de leucocitos combinada, los mediadores liberados, sobre todo citocinas y factores de crecimiento, también activan los demás leucocitos, por ejemplo los granulocitos, y mejoran su capacidad de conservación y actividad. De forma alternativa o adicional, la combinación de varias preparaciones de leucocitos también se puede realizar después de la conservación, en las últimas horas o incluso minutos antes del uso, para aprovechar la liberación de los mediadores directamente para la estimulación de los leucocitos en la preparación de leucocitos o en el paciente.

60 Una preparación de leucocitos combinada también se puede usar para transferir el sobrenadante, casi o

completamente exento de células pero con contenido en mediadores, de la preparación de leucocitos a un recipiente separado e infundirlo a un paciente para la inmunestimulación. Para ello se pueden usar las técnicas de transferencia mencionadas en otro lugar.

- 5 Antes o después de al menos uno de los pasos de procedimiento a) a e), o inmediatamente antes del uso, se realiza ventajosamente una irradiación, en especial con rayos γ , en especial con una dosis de al menos 25 Gy, en especial de al menos 30 Gy. Según las directrices alemanas "Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten", 4ª edición 2008, publicadas por la junta directiva del Colegio Federal de Médicos por recomendación del Consejo Científico, página 157, y Schroeder M.L., "Transfusion-associated graft-versus-host diseases", Br J Haematol 117, 275-287 (2002), la irradiación con una dosis media de 30 Gy (en ninguna parte del producto menos de 25 Gy) produce una inhibición segura de la proliferación de linfocitos T, mientras que la función de los eritrocitos, trombocitos y granulocitos permanece prácticamente inalterada.

- 15 El objetivo que se propone la invención también se alcanza mediante una preparación de leucocitos que se produce o se puede producir mediante un procedimiento de acuerdo con la invención antes descrito. La preparación de leucocitos se caracteriza por que los eritrocitos se han reducido en más del 90%, en especial en más del 98%, y los trombocitos en más del 90% con respecto a la sangre total, mientras que los leucocitos no se han reducido en más del 60%. Además, se puede conservar a una temperatura de 2°C a 38°C durante más de 24 horas y hasta 168 horas sin pérdida significativa de la función, en la que especialmente el estallido respiratorio y/o la fagocitosis siguen alcanzando, incluso después de 72 horas de conservación, más del 90% de los valores correspondientes de la preparación de leucocitos recién producida.

- 20 Puesto que la preparación de leucocitos se puede producir o se produce según el procedimiento de acuerdo con la invención, presenta las ventajas, propiedades y características correspondientes, descritas anteriormente.

- 25 El objetivo que se propone la invención también se alcanza mediante una preparación de leucocitos de acuerdo con la invención antes descrita, en especial combinada, adecuada para el uso en la producción de un sobrenadante esencialmente exento de células con una concentración elevada de mediadores y/o para el uso en un circuito extracorpóreo o para infusión. Con las alternativas mencionadas en último lugar es posible realizar investigaciones clínicas o tratamientos clínicos con preparaciones de leucocitos o de granulocitos sin previa petición, pues las preparaciones están disponibles cuando se necesitan sin tener que producirlas específicamente. El uso de una preparación de granulocitos de acuerdo con la invención en un circuito extracorpóreo es posible, por ejemplo, en un procedimiento como el descrito por Altrichter y col., Critical Care, 2001, 15:R82 "Extracorporeal cell therapy of septic shock patients with donor granulocytes: a pilot study".

- 35 El uso de una preparación de leucocitos combinada para la producción de un sobrenadante esencialmente exento de células con una concentración elevada de mediadores que se transfiere a un recipiente separado posee la ventaja de que el sobrenadante se puede infundir a un paciente para la inmunestimulación. Para ello se pueden usar las técnicas de transferencia antes mencionadas.

- 40 Asimismo resulta ventajoso usar las partes líquidas exentas de células de una preparación de leucocitos de acuerdo con la invención para la infusión como inmunestimulador.

- 45 Para la producción de la preparación de leucocitos de acuerdo con la invención también resultan ventajosos un sistema de preparación con bolsas y tubos flexibles configurado y diseñado para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención antes descrito para la producción de una preparación de leucocitos, así como un dispositivo de preparación configurado para la realización automatizada o semiautomatizada del procedimiento de acuerdo con la invención antes descrito para la producción de una preparación de leucocitos de acuerdo con la invención antes descrita, en particular usando un sistema de preparación de acuerdo con la invención antes descrito.

- 50 Otras características de la invención se desprenden de la descripción de formas de realización de acuerdo con la invención en combinación con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos. Las formas de realización de acuerdo con la invención pueden presentar características individuales o una combinación de varias características.

- 55 La invención se describe a continuación, sin limitar la idea inventiva general, mediante ejemplos de realización haciendo referencia a las figuras y remitiéndose expresamente a los dibujos en relación con todos los detalles de acuerdo con la invención no explicados con más detalle en el texto. Muestran:

- 60 Fig. 1 los recuentos de los diferentes tipos celulares en los diferentes pasos de procedimiento del procedimiento de acuerdo con la invención,

Fig. 2 los recuentos de los tipos celulares durante la conservación de una preparación de granulocitos de acuerdo con la invención,

5 Fig. 3 la evolución temporal de la fagocitosis durante la conservación,

Fig. 4 a 6 la evolución temporal del estallido respiratorio de una preparación de granulocitos de acuerdo con la invención en diferentes condiciones y con diferentes procedimientos de medición durante la conservación y

10 Fig. 7 a 13 los resultados de un segundo ejemplo de realización de acuerdo con la invención,

Fig. 14 los resultados de un tercer ejemplo de realización de acuerdo con la invención,

Fig. 15 a 18 los resultados de un cuarto ejemplo de realización de acuerdo con la invención,

15

Fig. 19 a 24 los resultados de un quinto ejemplo de realización de acuerdo con la invención,

Fig. 25 a 31 los resultados de un sexto ejemplo de realización de acuerdo con la invención,

20 Fig. 32 a 33 los resultados de un séptimo ejemplo de realización de acuerdo con la invención.

Primer ejemplo de realización

A continuación se ilustra, mediante un primer ejemplo, la producción de acuerdo con la invención de una preparación de leucocitos o preparación de granulocitos a partir de capas leucocitarias ("buffy coats").

Producción de la fracción leucocitaria

En primer lugar se centrifugaron donaciones de sangre total de 450 ml a 500 ml con CPD durante 10 min a 4000 g y 22°C. El plasma, la capa leucocitaria y los eritrocitos se separaron mediante una prensa de plasma (MacoPharma, Langen, Alemania) en las cuatro horas siguientes a la donación.

Para la producción de un concentrado de leucocitos se combinaron las capas leucocitarias de diferentes donaciones. Todas las conexiones de bolsas y tubos flexibles se realizaron con técnicas estériles conforme a las normas industriales.

Seis capas leucocitarias de 62 ml a 82 ml de donantes del mismo grupo sanguíneo se colocaron en fila, es decir que las bolsas correspondientes se unieron en una fila. Las bolsas se masajearon suavemente para desprender los leucocitos adheridos a la cara interior de las bolsas. El contenido bien mezclado de estas capas leucocitarias se recogió en la última bolsa de la fila (bolsa de combinación). Las pinzas entre las bolsas de la fila se cerraron para evitar el reflujo.

Se introdujeron 500 ml de hidroxietilalmidón (abreviado HEA, Infukoll HES 6% 200/0,2 SS (solución salina); Serumwerk, Bernburg, Alemania) en una bolsa de transferencia. La bolsa de transferencia se soldó en condiciones estables a la primera bolsa vacía de la fila y se transfirieron 50 ml de la solución de HEA a esta bolsa, la cual se aclaró a fondo por volteo y masaje manual.

Este paso de procedimiento se repitió con las demás bolsas de capas leucocitarias, abriendo en cada caso el paso hacia el tubo flexible y rellenando la bolsa siguiente con 50 ml de la suspensión de HEA/células. La conexión se volvió a cerrar para evitar el reflujo. Finalmente se introdujo la solución de HEA en la bolsa de combinación. Este "lavado de las bolsas de capas leucocitarias" se realizó una segunda vez.

A continuación, la bolsa de combinación se separó de la fila de bolsas de capas leucocitarias y se conectó directamente a la bolsa de HEA o la bolsa de transferencia. La bolsa de combinación se llenó por completo con solución de HEA y se eliminaron todas las burbujas de aire. De esta forma se mezclaron en la bolsa de combinación 416 ± 13 ml de capa leucocitaria con aproximadamente 258 ± 30 ml de solución de HEA. De este modo se obtuvo la fracción leucocitaria.

Producción de la preparación de leucocitos

60

Para la producción de la preparación de leucocitos a partir de la fracción leucocitaria se conectó primero la bolsa de combinación a una bolsa de transferencia sin abrir aún la conexión. Esta unidad se suspendió con el tubo flexible de conexión hacia arriba y se mantuvo suspendida durante 35 minutos sin perturbaciones, de forma que los eritrocitos sedimentaron por acción de la gravedad y se formó una línea de separación nítida entre los eritrocitos sedimentados y el sobrenadante enriquecido en leucocitos.

La bolsa de combinación se colocó en una prensa de plasma (Mediros, Rostock, Alemania) para transferir el sobrenadante enriquecido a la bolsa de transferencia vacía ("bolsa de leucocitos") una vez abierta la conexión con el tubo flexible. El sedimento de eritrocitos se desechó (véase paso de procedimiento a) del procedimiento de acuerdo con la invención).

La bolsa de leucocitos se conectó a una bolsa vacía, por ejemplo una bolsa de capas leucocitarias lavada de la fila de bolsas, sin abrir aún la conexión. Las bolsas se centrifugaron después durante 7 min a 200 g y $22 \pm 2^\circ\text{C}$, de manera que se formó un sedimento de leucocitos y un sobrenadante de solución de plasma/HEA que contenía la mayor parte de los trombocitos. Este sobrenadante se transfirió mediante la prensa de plasma a la bolsa vacía, la cual se separó y se desechó (véase el paso de procedimiento b) del procedimiento de acuerdo con la invención).

A continuación, se realizaron dos lavados para reducir aún más el número de trombocitos que todavía estaban contenidos en el sedimento de leucocitos. Para ello se conectó la bolsa de leucocitos a una bolsa con solución salina al 0,9% y se transfirieron aproximadamente 30 ml de la solución salina a la bolsa de leucocitos para resuspender el sedimento de células pasando la mano suavemente por la bolsa, para luego rellenar la bolsa de leucocitos con la solución salina hasta un peso total de 350 g. A continuación, la bolsa se centrifugó durante 7 min a 200 g y $22 \pm 2^\circ\text{C}$, la solución de lavado se transfirió a presión a una bolsa vacía y ésta se desechó (véase el paso de procedimiento c) del procedimiento de acuerdo con la invención). Este proceso se repitió una vez.

Finalmente, los leucocitos se resuspendieron en 200 ml de plasma de uno de los donantes de capas leucocitarias con el mismo grupo sanguíneo para obtener la preparación de leucocitos (paso de procedimiento d).

Conservación de la preparación de leucocitos

El concentrado de leucocitos o la preparación de leucocitos resultante se transfirió a una bolsa de conservación de trombocitos permeable a gas y se eliminaron las burbujas de aire. Los concentrados de leucocitos se conservaron a temperatura ambiente sin agitación, depositándose las bolsas en parrillas para garantizar el pleno contacto de la superficie de las bolsas con el aire.

En los demás ejemplos de realización la conservación también se efectuó en bolsas de conservación de trombocitos permeables a gas.

Análisis

Al cabo de 24, 48 y 72 horas se mezclaron las preparaciones de leucocitos y, tras desechar el primer mililitro, es decir, el contenido del extremo del tubo flexible, se extrajeron respectivamente 2 ml para el análisis.

Las concentraciones de eritrocitos, trombocitos y leucocitos se midieron por recuento automático (Sysmex KX-21N, Sysmex Corporation, Norderstedt, Alemania). Se prepararon frotis de sangre para la diferenciación manual de las poblaciones de leucocitos, en particular los monocitos, linfocitos y granulocitos.

La viabilidad de los leucocitos se determinó mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano.

Para el análisis funcional mediante quimioluminiscencia y citometría de flujo las concentraciones de leucocitos se ajustaron a $5 \cdot 10^6$ leucocitos por ml por adición de plasma sanguíneo correspondiente.

La producción de radicales de oxígeno se analizó por quimioluminiscencia. Para la determinación del estallido respiratorio (también "estallido oxidativo" u "oxyburst") los leucocitos se estimularon con partículas de zimosán opsonizadas con suero (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania). Para el control negativo se añadió solución salina tamponada con fosfato (PBS). La quimioluminiscencia se intensificó con lucigenina y luminol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) en dos ensayos diferentes.

Para el análisis de quimioluminiscencia se introdujeron las muestras por triplicado, respectivamente, en placas de microtitulación de 96 pocillos y se midió la luminiscencia con un medidor de quimioluminiscencia automatizado (RS

Luminoskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) inmediatamente después de añadir el zimosán. La quimioluminiscencia se determinó cada 2 minutos durante 60 minutos en unidades relativas de luz individuales (URL, "relative light units", RLU). Una vez concluidas las mediciones se calculó la media aritmética de las tres mediciones y se determinó el área bajo la curva (ABC, "area-under-the-curve", AUC) sumando estas medias.

5

Para medir la funcionalidad también se determinaron la fagocitosis y el estallido respiratorio mediante citometría de flujo con fluorescencia. Para ello se añadió a la preparación de leucocitos heparina en una concentración de 25 unidades internacionales (UI) por ml. Para determinar la fagocitosis se usó el kit de ensayo Phagotest® y para el análisis del estallido respiratorio, el kit de ensayo Phagoburst® (ambos de Orpegen, Heidelberg, Alemania). El principio de determinación de la fagocitosis consistió en incubar las células con *E. coli* inactivadas, opsonizadas y marcadas con fluoresceína (marcadas con FITC) durante 20 minutos a una temperatura de 37°C. Las muestras de control negativo se conservaron a 4°C.

El estallido respiratorio se ensayó por incubación de las células con *E. coli* opsonizadas. La formación resultante de especies reactivas de oxígeno se determinó 20 minutos después de la incubación con dihidrorrodamina 123 (DHR-123) a 37°C mediante la cantidad de rodamina fluorescente. Como control negativo sirvió una muestra sin bacterias añadidas.

Estas reacciones se terminaron añadiendo una solución de inactivación fría que comprendía azul de tripano. Las muestras se lavaron dos veces con solución salina fría. Los eritrocitos se lisaron y las células se fijaron añadiendo el reactivo de lisis adjunto al kit de ensayo. A continuación se usó una tinción de ADN para excluir artefactos provocados por agregados bacterianos y trombocitos.

Las muestras se analizaron en un plazo de 60 minutos por FACS ("fluorescence activated cell sorting", clasificación de células activadas por fluorescencia), un tipo de citometría de flujo basado en células marcadas con fluorescencia, en un FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, EE.UU.).

Resultados

Para los datos representados en las figuras 1 a 6, la altura de las barras muestra las medias y las barras de error, las desviaciones típicas.

En la Fig. 1 se representa el recuento de eritrocitos (RBC, "red blood cells"), trombocitos (PLT, "platelets") y leucocitos (WBC, "white blood cells") en la fracción leucocitaria (izquierda respectivamente), en el sobrenadante de HEA (centro respectivamente) y en la preparación de leucocitos final (derecha respectivamente) mediante diagramas de barras. El número de células se representa en una escala logarítmica. Se observa que el número de eritrocitos en el sobrenadante de HEA se ha reducido en más del 98% con respecto a la fracción leucocitaria y que la preparación de leucocitos ya solo contiene un 0,4% de la cantidad original. La concentración de trombocitos solo se ha reducido un 7% en el sobrenadante de HEA, pero en la preparación de leucocitos ha disminuido al 6,1% de la concentración original. La concentración de los leucocitos ha disminuido al 49,8% de la concentración contenida originalmente en la fracción leucocitaria.

Así pues, en el concentrado de leucocitos, los leucocitos están mucho más concentrados con respecto a los eritrocitos y los trombocitos que en el estado de la técnica.

45

En la Fig. 2 se muestra el recuento de los tipos de leucocitos presentes en la capa leucocitaria combinada (fracción leucocitaria) después de 12 horas, en el sobrenadante con HEA después de 12 horas y en la preparación de leucocitos o el concentrado de leucocitos definitivo después de 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas, a saber, para los leucocitos de tipo monocitos (arriba), linfocitos (centro) y granulocitos (abajo).

50

Se observa que la disminución de la concentración de leucocitos en los diferentes pasos de procedimiento afecta aproximadamente por igual a los diferentes tipos de leucocitos. Una vez producida la preparación de leucocitos definitiva, las relaciones y el número de los diferentes tipos de leucocitos ya no cambian significativamente en la preparación de leucocitos.

55

Como se muestra en la tabla 1 siguiente, la tasa de supervivencia (viabilidad) fue superior al 98% durante todo el periodo de observación.

Tabla 1

Tiempo después de la donación de sangre (h)	Viabilidad (%)
12	99,8 ± 0,3
24	99,7 ± 0,3
48	98,7 ± 0,3
72	98,7 ± 0,3

Como se muestra en la Fig. 3, la proporción de granulocitos (PMN, leucocitos polimorfonucleares) con actividad fagocítica con respecto a *E. coli* marcadas con fluoresceína fue superior al 95% en todos los puntos temporales, es decir, durante todo el periodo de conservación. Esta actividad se detectó a la temperatura corporal, mientras que a 0°C la actividad quedó considerablemente reducida. Las mediciones se realizaron mediante citometría de flujo con fluorescencia con el kit de ensayo Phagotest®.

En la Fig. 4 se muestra el resultado de la medición de la oxidación de DHR-123 que se produce durante el estallido respiratorio de los granulocitos en respuesta a la presencia de *E. coli* y en su ausencia, medida mediante citometría de flujo con fluorescencia con el kit de ensayo Phagoburst®. Las muestras con *E. coli* dieron el resultado representado mediante las barras derechas a los diferentes tiempos de conservación, y el control negativo con PBS produjo las actividades representadas mediante las barras izquierdas. Se observa que más del 95% de los granulocitos de la muestra activa fueron activos y que la actividad basal aumentó durante la conservación.

En la Fig. 5 se muestra el resultado de una medición del estallido oxidativo de las muestras de la preparación de leucocitos por medición de la quimioluminiscencia con lucigenina, añadiéndose zimósán a la muestra activa y PBS a la muestra negativa. La respuesta de estallido respiratorio se mantuvo elevada en todos los casos, mientras que apareció una ligera actividad basal hacia el final del periodo de estudio.

Lo mismo se aprecia en la Fig. 6 para el estudio de quimioluminiscencia con luminol en la preparación de leucocitos, tanto en la muestra activa por adición de zimósán como en la muestra pasiva con PBS.

Segundo ejemplo de realización

El segundo ejemplo de realización describe la producción de la preparación de leucocitos a partir de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis. Los análisis se llevaron a cabo de forma análoga al primer ejemplo de realización.

Unas horas antes de la aféresis se estimularon donantes sanos voluntarios con dexametasona y G-CSF conforme a las normas de transfusión alemanas vigentes, con el fin de incrementar el rendimiento de granulocitos. La aféresis se realizó con COBE spectra (Caridian BCT, Garching, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

El preparado de granulocitos obtenido por aféresis se mezcló en condiciones estériles con Infukoll® HES 6% (PM: 200.000) en una relación 1:2 directamente en la bolsa de donación y a continuación se suspendió, con las piezas de conexión hacia arriba, para la sedimentación. Durante la fase de sedimentación (unos 40 min a 22 ± 2°C) se comprobó a intervalos regulares, por control visual de la bolsa de sangre, si aparecía una capa de separación clara entre el sedimento de eritrocitos y el sobrenadante con contenido en leucocitos. En cuanto apareció una capa de separación clara (unos 40 min), el sobrenadante, que en su mayor parte contenía leucocitos y trombocitos, se transfirió a una nueva bolsa con la ayuda de una prensa de sangre manual. Para eliminar la mayor parte de los trombocitos residuales, el sobrenadante extraído se lavó dos veces con solución fisiológica de NaCl (0,9%). Tras el segundo paso de lavado, el concentrado de granulocitos purificado se resuspendió en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo y se conservó, inmóvil, a 22 ± 2°C en una bolsa de conservación de trombocitos.

Mediante el procedimiento descrito se alcanzó un desenriquecimiento del 98% para los eritrocitos y del 95% para los trombocitos. Durante la purificación solo se perdió un 26% de los leucocitos, de forma que se disponía del 74% de los leucocitos para la conservación.

En las figuras 7 a 13 se muestran los resultados para la preparación de leucocitos del segundo ejemplo de realización.

En la Fig. 7 se observa el desenriquecimiento de cada uno de los componentes de la sangre, a saber, eritrocitos, trombocitos y leucocitos, de los que queda un 2%, un 5% y un 74%, respectivamente.

En la Fig. 8 se muestran los recuentos celulares absolutos de estos componentes de la sangre para el preparado de partida, la fracción de granulocitos o el concentrado de granulocitos y la preparación de granulocitos de acuerdo con la invención ("concentrado de granulocitos purificado"), en el que ahora los leucocitos están en mayoría.

- 5 De la Fig. 9 se desprende que el recuento de leucocitos vitales en la preparación no ha disminuido significativamente ni siquiera después de 72 horas de conservación.

La Fig. 10 muestra que el recuento relativo de granulocitos fagocíticos sigue siendo cerca del 100% durante el periodo de conservación de hasta 72 horas después de la purificación, mientras que la muestra negativa solo aumenta ligeramente. La Fig. 11 muestra a este respecto el índice medio de fluorescencia (IMF), que indica la intensidad de la señal de fluorescencia media de una sola célula. Este es constante a 37°C, mientras que en la muestra negativa apenas se detecta.

En la Fig. 12 se muestra el recuento relativo de granulocitos oxidantes. Este se mantiene durante todo el periodo de conservación cerca del 100%, presentando también una gran parte de los granulocitos de la muestra negativa una actividad oxidante. En la Fig. 13 se representa la respuesta media de fluorescencia (también índice medio de fluorescencia, IMF) por célula en referencia a la Fig. 12, de la que se desprende que la actividad de los granulocitos de la muestra activa permanece constante mientras que la muestra negativa, como era de esperar, solo desarrolla una ligera actividad.

20 Con el procedimiento de acuerdo con la invención y la preparación de leucocitos de acuerdo con la invención se han eliminado los inconvenientes de los actuales preparados de granulocitos obtenidos por aféresis en lo que respecta a la escasa pureza, la poca capacidad de conservación y, dado el caso, la necesidad de una estimulación previa de los donantes y las molestias que les supone la infusión de una parte del citrato y del acelerador de la sedimentación durante la aféresis. La preparación de leucocitos o la preparación de granulocitos de acuerdo con la invención se puede conservar al menos durante 72 horas sin pérdida significativa de la función. La preparación de granulocitos o de leucocitos se puede producir en poco tiempo (unas tres horas y media) y con bajo coste. El procedimiento es fácil de realizar y se puede realizar en un sistema completamente cerrado, lo que resulta conveniente para la seguridad en lo que respecta a posibles contaminantes biológicos, toxicológicos o químicos. No es necesario disponer directamente de un donante específico para la preparación, puesto que las capas leucocitarias se producen en grandes cantidades en cualquier banco de sangre durante el funcionamiento normal. Tampoco es necesario estimular a los donantes específicamente con esteroides o G-CSF, lo que reduce los posibles riesgos para la salud de los donantes y contribuye a ahorrar costes y tiempo.

35 Tercer ejemplo de realización

El tercer ejemplo de realización describe la producción de una preparación de leucocitos a partir de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis. Los análisis se llevaron a cabo de forma análoga al primer ejemplo de realización.

40 La producción de los preparados de granulocitos por aféresis se llevó a cabo de forma análoga al segundo ejemplo de realización.

45 El concentrado de granulocitos se mezcló en condiciones estériles con HEA al 6% (hidroxietilalmidón, peso molecular: 200.000 Da) en una relación 1:0,5 directamente en la bolsa de donación. A continuación se soldó a ella en condiciones estériles una bolsa vacía con la ayuda de un aparato soldador para bolsas de sangre y tubos flexibles (Terumo BCT Europe, Garching, Alemania) sin abrir la soldadura, y la bolsa de donación se suspendió, con el tubo flexible de conexión hacia arriba, para la sedimentación. Durante la fase de sedimentación (unos 40 min a temperatura ambiente) se comprobó a intervalos regulares, por control visual de la bolsa de donación, si aparecía una capa de separación nítida entre el sedimento de eritrocitos y el sobrenadante rico en leucocitos. En cuanto apareció una capa de separación de este tipo, se abrió la soldadura en el tubo flexible de conexión entre las bolsas y la fase con contenido en leucocitos (sobrenadante) se transfirió a la bolsa vacía presente con la ayuda de una prensa manual para bolsas de sangre.

55 En este tercer ejemplo de realización se compararon dos variantes diferentes del procesamiento posterior (lavado del sedimento de leucocitos con solución de NaCl al 0,9%).

En la variante 1, una vez extraído el sobrenadante con contenido en leucocitos, se soldó en condiciones estériles una nueva bolsa vacía a la bolsa con el sobrenadante con contenido en leucocitos (la soldadura permaneció cerrada) y el sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 300 g y $22 \pm 2^\circ\text{C}$ frenando suavemente. Tras abrir la

soldadura de unión se extrajo el sobrenadante con una prensa de sangre manual y se desechó. Para eliminar la mayor parte de los trombocitos, el sedimento de leucocitos se lavó dos veces con solución fisiológica de NaCl (0,9%) y se centrifugó durante 15 minutos a 300 g y $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ frenando suavemente (deceleración lenta durante varios minutos). Después del segundo paso de lavado, el concentrado de granulocitos purificado se suspendió en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo y se analizó.

La variante 2 del tercer ejemplo de realización difiere de la variante 1 del tercer ejemplo de realización en las características de los pasos de centrifugación. Así, el sobrenadante de la sedimentación y los sedimentos de leucocitos resuspendidos en la solución de NaCl al 0,9% se centrifugaron en cada caso durante 5 minutos a 300 g y 4°C frenando intensamente (parada relativamente rápida en menos de un minuto).

Con ambas variantes de purificación descritas se pudo alcanzar un desenriquecimiento de eritrocitos superior al 98%. Sin embargo, las dos variantes muestran claras diferencias en el desenriquecimiento de trombocitos. Así, en la variante 1 (centrifugación de 15 minutos frenando suavemente) solo se desenriqueció un 70% de los trombocitos, mientras que en la variante 2 (centrifugación de 5 minutos) se pudo eliminar un 95%. En la variante 1 la pérdida de leucocitos ascendió al 27% y en la variante 2, al 33%.

En la Fig. 14 se aprecia el desenriquecimiento de cada uno de los componentes de la sangre en ambas variantes, a saber, los leucocitos (WBC, "white blood cells"), los eritrocitos (RBC, "red blood cells") y los trombocitos (PLT, "platelets"), conservándose en la variante 1 el 73%, el 2% y el 30%, respectivamente, y en la variante 2, el 67%, el 1% y el 5%, respectivamente (valores medios de 2 ensayos en cada caso).

Cuarto ejemplo de realización

El cuarto ejemplo de realización describe la producción de una preparación de leucocitos a partir de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis según la variante 2 descrita en el tercer ejemplo de realización y la conservación siguiente en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo durante un periodo de tiempo de 72 horas con tamponamiento del pH.

Después de la sedimentación y purificación del preparado de granulocitos obtenido por aféresis se ajustó la concentración de células a $5 \cdot 10^7$ leucocitos/ml, de forma que se conservaron $1 \cdot 10^{10}$ leucocitos en 200 ml de CPD-plasma sin agitación a temperatura ambiente en una bolsa de conservación de trombocitos. La bolsa de conservación de trombocitos se colocó sobre parrillas para garantizar el pleno contacto de la superficie de la bolsa con el aire. La conservación se realizó por duplicado, y en uno de los preparados de conservación se corrigió el pH, en cuanto bajaba de pH 7,2, con una cantidad correspondiente de solución de bicarbonato sódico al 8,4% (NaBic 8,4%) hasta que se volviera a encontrar en el intervalo fisiológico de la sangre humana (7,35 - 7,45).

Análisis

Después de 0, 24, 48, 72 y 144 horas se mezclaron a fondo los dos preparados de conservación de leucocitos y, en condiciones estériles, se extrajeron muestras de 3 ml, respectivamente, para el análisis.

En cada punto temporal se determinaron la concentración de células y el número total de células en las muestras. Asimismo se halló la vitalidad mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano y se analizó la funcionalidad en cuanto a la fagocitosis y el estallido respiratorio por citometría de flujo con fluorescencia. La realización de todos los análisis se realizó como se ha descrito en el primer ejemplo de realización.

Resultados

Los datos representados en las Figuras 15 a 18 son medias y sus desviaciones típicas.

De la Fig. 15 se desprende que el recuento celular de leucocitos vitales no disminuye significativamente durante el periodo de conservación de 144 horas. Asimismo se observa que el tamponamiento del pH con solución de bicarbonato sódico al 8,4% no ejerce efectos negativos sobre el recuento celular.

Tampoco las vitalidades, representadas en la Fig. 16, de los leucocitos durante el periodo de conservación de 144 horas se ven afectadas negativamente por el tamponamiento del pH. La vitalidad en ambas variantes de conservación es $>85\%$ incluso al final del periodo de conservación.

La Fig. 17 muestra que en ambas variantes de conservación, el número relativo de granulocitos fagocíticos (PMN,

leucocitos polimorfonucleares) prácticamente no varía hasta 72 horas después del inicio de la conservación, ascendiendo a >90%. Sin embargo, se observa claramente que, a diferencia del control no tamponado, el número relativo de granulocitos fagocíticos conservados en un CPD-plasma tamponado permaneció constante incluso después de 144 horas de conservación.

5

En la Fig. 18 se muestra el porcentaje de granulocitos que producen radicales de oxígeno ("oxidative burst", estallido respiratorio), descrito en la leyenda de forma simplificada como "PMN oxidantes". Este asciende tanto en el control como en el caso de la conservación con corrección de pH prácticamente al 100% durante hasta 72 horas. También en este caso se observa la influencia positiva de la corrección del pH sobre el número relativo de granulocitos oxidantes después de 144 horas, mientras que en el control se observan grandes oscilaciones que podrían deberse, en parte, a diferencias entre los donantes.

Con la variante de conservación descrita en el cuarto ejemplo de realización (conservación con corrección del pH) y los resultados mostrados se ha podido demostrar que es posible conservar los granulocitos durante un periodo de tiempo de 144 horas después de su purificación sin que se vean afectados el número de células, la vitalidad y el número relativo de células fagocíticas y oxidantes.

Quinto ejemplo de realización

El quinto ejemplo de realización describe la producción de una preparación de leucocitos a partir de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis según la variante 2 descrita en el tercer ejemplo de realización y la conservación siguiente en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo con la solución de aditivos PAGGS-M durante un periodo de tiempo de 72 horas.

La solución de aditivos PAGGS-M también contiene, además de cloruro sódico, dihidrogenofosfato sódico dihidrato e hidrogenofosfato disódico dihidrato, glucosa monohidrato, manitol, adenina y guanosina.

Después de la sedimentación y purificación del preparado de granulocitos obtenido por aféresis se ajustó la concentración de células en ambos preparados de conservación a $5 \cdot 10^7$ leucocitos/ml, de forma que se conservaron a temperatura ambiente y sin agitación $1 \cdot 10^{10}$ leucocitos en 200 ml de medio de conservación en una bolsa de conservación de trombocitos. Un preparado de ensayo contenía como medio de conservación CPD-plasma puro del mismo grupo sanguíneo (control). Al otro se añadió una mezcla de CPD-plasma con una proporción en volumen del 35% de la solución de aditivos PAGGS-M. Las bolsas de conservación de trombocitos permanecieron durante todo el periodo de conservación sobre parrillas para garantizar el pleno contacto de la superficie de las bolsas con el aire.

En ambos preparados de conservación el pH se corrigió con TRIS al 36,34% cuando el pH bajaba de 7,2 hasta que se volviera a encontrar en el intervalo fisiológico de la sangre humana (7,35 - 7,45).

Análisis

Después de 0, 24, 48 y 72 horas se mezclaron a fondo los dos preparados de conservación de leucocitos y, en condiciones estériles, se extrajeron muestras de 3 ml, respectivamente, para el análisis.

En cada punto temporal se determinaron la concentración de células y el número total de células en las muestras. Asimismo se halló la vitalidad mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano y se analizó la funcionalidad en cuanto a la fagocitosis y el estallido respiratorio por citometría de flujo con fluorescencia. La realización de todos los análisis se efectuó como se ha descrito en detalle en el primer ejemplo de realización.

Resultados

Los datos representados en las Figuras 19 a 24 son medias y sus desviaciones típicas.

En las Figs. 19 y 20 se observa que tanto el recuento total de leucocitos vitales como la vitalidad (>90%) permanecen estables durante el periodo de conservación de 72 horas. Así pues, no se aprecia ningún efecto negativo de la solución de aditivos.

55

De la Fig. 21 se desprende que el número relativo de granulocitos fagocíticos (PMN, leucocitos polimorfonucleares) en ambas variantes de conservación prácticamente no cambia en las 72 horas posteriores al inicio de la conservación, aproximándose al 100%. En la Fig. 22 se representa la intensidad media de la fluorescencia (IMF, índice medio de fluorescencia) en cada célula respecto a los resultados de la Fig. 21. De ello se desprende que la adición de la solución de aditivos PAGGS-M aumenta el rendimiento de la fagocitosis por célula durante 72 horas,

60

mientras que el control permanece constante durante el mismo periodo de tiempo.

En la Fig. 23 se muestra el número relativo de granulocitos oxidantes. Este asciende en ambos preparados de conservación a cerca del 100% durante 72 horas. El IMF por célula oxidante, representado en la Fig. 24, permite concluir que la actividad de los granulocitos en el control permanece constante durante el periodo de conservación de 72 horas. La actividad de los granulocitos se incrementa ligeramente durante la conservación con la solución de aditivos.

Mediante el procedimiento de conservación descrito en el quinto ejemplo de realización (conservación con solución de aditivos PAGGS-M) no solo se ha podido demostrar que es posible conservar los granulocitos durante un periodo de tiempo de 72 horas después de su purificación sin deterioro significativo del número de células, la vitalidad, el número relativo de células fagocíticas y oxidantes y su rendimiento, sino que la adición de PAGGS-M puede mejorar el rendimiento de los granulocitos.

15 Sexto ejemplo de realización

El sexto ejemplo de realización describe la producción de una preparación de leucocitos a partir de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis según la variante 2 descrita en el tercer ejemplo de realización y la conservación siguiente en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo con PAGGS-M al 35% y el preparado inmunológico "Immuno-akut®", de la empresa MensSana AG, durante un periodo de tiempo de 120 horas.

El preparado inmunológico "Immuno-akut®" contiene también, además de las vitaminas B6, B12, C, D y E, ácido fólico, diversos carotenoides y oligoelementos.

Después de la sedimentación y purificación del preparado de granulocitos obtenido por aféresis se ajustó la concentración de células en ambos preparados de conservación a $5 \cdot 10^7$ leucocitos/ml de forma que se conservaron a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y sin agitación $1 \cdot 10^{10}$ leucocitos en 200 ml de mezcla de CPD-plasma-PAGGS-M en una bolsa de conservación de trombocitos. A uno de los dos preparado de conservación se añadieron aproximadamente 30 g del preparado inmunológico en polvo disuelto y esterilizado por filtración. Las bolsas de conservación de trombocitos permanecieron durante todo el periodo de conservación sobre parrillas para garantizar el pleno contacto de la superficie de las bolsas con el aire. En ambos preparados de conservación se corrigió el pH, en caso necesario ($<7,2$), con TRIS al 36,34% hasta que se volviera a encontrar en el intervalo fisiológico de la sangre humana (7,35 - 7,45).

35 Análisis

Después de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas se mezclaron a fondo los dos preparados de conservación de leucocitos y, en condiciones estériles, se extrajeron muestras de 3 ml, respectivamente, para el análisis.

En cada punto temporal se determinaron la concentración de células y el número total de células en las muestras. Asimismo se halló la vitalidad mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano y se analizó la funcionalidad en cuanto a la fagocitosis y el estallido respiratorio por citometría de flujo con fluorescencia. El estallido respiratorio se midió adicionalmente mediante quimioluminiscencia con lucigenina. La realización de todos los análisis se efectuó como se ha descrito en detalle en el primer ejemplo de realización.

45

Resultados

Los datos representados en las Figuras 25 a 31 son medias y sus desviaciones típicas.

De la Fig. 25 se desprende que el recuento total de leucocitos vitales permanece estable durante el periodo de conservación de 120 horas. En la Fig. 26 se aprecia que en ambas variantes de conservación, la vitalidad permanece constante durante 96 horas y solo empeora mínimamente después de 120 horas. No se aprecia ningún efecto negativo de Immuno-akut® durante el periodo de conservación.

En la Fig. 27 se observa que en ambas variantes de conservación el número relativo de granulocitos fagocíticos (PMN, leucocitos polimorfonucleares) prácticamente no cambia durante 96 horas de conservación, permaneciendo cerca del 100%. En la Fig. 28 se representa la intensidad media de la fluorescencia (IMF, índice medio de fluorescencia) en cada célula. Se constata que ambos preparados de conservación presentan un rendimiento fagocítico constante durante 72 horas. El rendimiento de los dos preparados solo empeora mínimamente después de 96 horas, siendo algo menor cuando se conservan con el preparado inmunológico.

El estallido respiratorio medido por citometría de flujo con fluorescencia muestra una situación similar. En la Fig. 29 se muestra el número relativo de granulocitos oxidantes. En ambos preparados de conservación este es casi del 100% durante 96 horas. El IMF por célula oxidante, representado en la Fig. 30, también permanece constante durante 96 horas en ambos tipos de conservación.

En la Fig. 31 se representa el resultado de la medición del estallido respiratorio de ambos preparados de conservación obtenido por medición de la quimioluminiscencia con lucigenina tras la estimulación de los PMN con zimosán. El estallido respiratorio permaneció constante durante 72 horas en ambos tipos de conservación. Después de 96 y 120 horas se observa un empeoramiento mínimo del estallido respiratorio.

Mediante el aditivo de conservación descrito en el sexto ejemplo de realización (preparado inmunológico "Immuno-akut®") se ha podido demostrar que es posible conservar los granulocitos durante un periodo de tiempo de 96 horas después de su purificación sin deterioro significativo del número de células, la vitalidad, el número relativo de células fagocíticas y oxidantes y su rendimiento.

Séptimo ejemplo de realización

El séptimo ejemplo de realización describe la producción parcialmente mecánica/semiautomatizada de una preparación de leucocitos a partir de un preparado de granulocitos obtenido por aféresis o capas leucocitarias combinadas. Los análisis se llevaron a cabo de forma análoga al primer ejemplo de realización.

Las capas leucocitarias individuales se combinaron de forma análoga al primer ejemplo de realización. La producción de los preparados de granulocitos por aféresis se llevó a cabo de forma análoga al segundo ejemplo de realización.

El concentrado de granulocitos o las capas leucocitarias combinadas se mezclaron en condiciones estériles con HEA al 6% (PM: 200.000) en una relación 1:0,5 directamente en la bolsa de donación o la bolsa de combinación. A continuación, se conectó en condiciones estériles un tubo de bomba a la bolsa de donación/combinación. El otro extremo del tubo se unió, en condiciones estériles, a una bolsa vacía (bolsa colectora). La bolsa de donación o de combinación se suspendió para la sedimentación con el tubo de bomba apuntando hacia arriba. Durante la fase de sedimentación (30 a 40 minutos a temperatura ambiente) se comprobó a intervalos regulares, por control visual de la bolsa, si aparecía una capa de separación nítida entre el sedimento de eritrocitos y el sobrenadante rico en leucocitos. En cuanto apareció una capa de separación de este tipo, el sobrenadante con contenido en leucocitos se bombeó, aplicando una presión diferencial, hacia arriba, fuera de la bolsa de donación o de combinación y a través del tubo hacia la bolsa colectora, y la bolsa de donación/combinación se separó por soldadura en condiciones estériles. La velocidad de flujo se seleccionó en función del volumen del preparado de tal manera que no se alterase significativamente el tiempo de sedimentación (20 a 70 ml/min).

Una vez finalizado el bombeo se soldó, en condiciones estériles, otra bolsa vacía (bolsa de desechos) a la bolsa colectora. La bolsa colectora (sobrenadante rico en leucocitos) y la bolsa de desechos vacía se centrifugaron juntas durante 5 minutos a 300 g y 4°C. Después de la centrifugación, la bolsa colectora se transfirió a una prensa de sangre manual y el sobrenadante se introdujo a presión en la bolsa de desechos. La bolsa de desechos se desconectó en condiciones estériles y se desechó. Para eliminar la mayor parte de los trombocitos, el sedimento de leucocitos presente en la bolsa colectora se lavó dos veces con solución fisiológica de NaCl (0,9%) y por centrifugación durante 5 minutos a 300 g y 4°C. El sobrenadante se introdujo en cada caso en una bolsa de desechos y se desechó. Después del segundo paso de lavado, el concentrado de granulocitos purificado o las capas leucocitarias combinadas purificadas se suspendieron en CPD-plasma del mismo grupo sanguíneo y se analizaron.

Con esta variante semiautomatizada aquí descrita para la purificación de preparados de granulocitos obtenidos por aféresis o capas leucocitarias combinadas se alcanzó igualmente un desenriquecimiento de eritrocitos >95% y de trombocitos >93% en comparación con el preparado de granulocitos obtenido por aféresis/los leucocitos combinados. Esta manipulación, sin embargo, produce una pérdida de leucocitos claramente menor. Así, se obtuvo aproximadamente un 20% más de leucocitos que con los procedimientos manuales descritos en el primer ejemplo de realización o la variante 2 del tercer ejemplo de realización y sus resultados.

En la Fig. 32 se representa el desenriquecimiento de cada uno de los componentes de la sangre, a saber, leucocitos (WBC, "white blood cells"), eritrocitos (RBC, "red blood cells") y trombocitos (PLT, "platelets"), para la purificación de un preparado de granulocitos obtenido por aféresis. Se aprecia, pues, que mediante la purificación semiautomatizada se pudo recuperar un 89,6% de los leucocitos (procedimiento manual: contenido de leucocitos

70%), aunque el desenriquecimiento de eritrocitos (96%) y de trombocitos (93%) fue igual de bueno que con el procedimiento manual.

5 La Fig. 33 muestra los resultados de desenriquecimiento para una preparación de leucocitos producida a partir de capas leucocitarias combinadas. También en este caso se pudo mejorar el rendimiento de leucocitos (68,6%; procedimiento manual: 49,8%) con un excelente desenriquecimiento de eritrocitos (96%) y de trombocitos (94%).

La automatización de los pasos de lavado (presión diferencial o bombas) permitió incrementar aún más el rendimiento de leucocitos (sin figura).

10

Todas las características mencionadas, incluidas las características que se desprenden de los dibujos por separado así como las características individuales que se dan a conocer en combinación con otras características, se consideran esenciales para la invención tanto solas como en combinación. Las formas de realización de acuerdo con la invención se pueden ejecutar mediante características individuales o mediante una combinación de varias

15 características.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de una preparación de leucocitos a partir de una fracción leucocitaria, con los siguientes pasos de procedimiento:
- 5 a) sedimentación de la fracción leucocitaria hasta que se forme una línea de separación entre los eritrocitos sedimentados y un sobrenadante de leucocitos, separación del sobrenadante de leucocitos del sedimento, en la que el sobrenadante de leucocitos se recoge o permanece en un recipiente para leucocitos,
- b) sedimentación de los leucocitos en el recipiente para leucocitos, en la que se forma un sobrenadante pobre en leucocitos, y eliminación del sobrenadante pobre en leucocitos del recipiente para leucocitos,
- 10 c) lavado del sedimento en el recipiente para leucocitos con una solución que contiene cloruro sódico, en el que las células sedimentadas se resuspenden en la solución que contiene cloruro sódico, la solución se sedimenta y el sobrenadante resultante se elimina, y
- d) resuspensión del sedimento en el recipiente para leucocitos en una solución de conservación,
- 15 e) conservación de la solución de conservación con el sedimento resuspendido en una bolsa permeable a gas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la conservación de la solución del pasos de procedimiento e) se efectúa a una temperatura de -200°C a +40°C, en especial de +2°C a +38°C, en especial de +20°C a +25°C, o en forma de crioconservación entre -50°C y -200°C.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la sedimentación del paso de procedimiento a) se lleva a cabo a una aceleración de 0,5 g a 1000 g, en especial de 0,5 g a 1,5 g o de 50 g a 1000 g, y/o con la adición de un acelerador de la sedimentación, en particular hidroxietilalmidón, dextrano, Ficoll, Percoll y/o gelatina, ascendiendo el tiempo de sedimentación, en especial, a entre 5 y 120 minutos, preferentemente entre
- 25 20 y 45 minutos, y/o la sedimentación de los leucocitos del paso de procedimiento b) y/o la sedimentación del paso de procedimiento c) se lleva a cabo por centrifugación, en especial a una aceleración de 50 a 10000 g, en especial de 100 a 5500 g, en especial de 200 a 500 g.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el lavado o los lavados del paso de procedimiento c) se repite(n) una o varias veces y/o se realiza(n) por centrifugación y/o filtración y/o con una solución fisiológica que contiene, en particular, cloruro sódico 50 a 200 mM y/u otras sales y/o tampones.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la solución de conservación es un plasma sanguíneo del mismo grupo sanguíneo y/o una solución acuosa que contiene, en particular, plasma del mismo grupo sanguíneo, y/o porque antes, durante y/o después de uno de los pasos de procedimiento a) a e) se combinan varios preparados.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo en un sistema cerrado estéril, en especial en un sistema de tubos flexibles y bolsas.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque antes, durante o después de uno de los pasos de procedimiento a) a d) se añaden aditivos para mejorar la conservación, en particular de los grupos que incluyen estabilizadores de pH, en especial tampones, nutrientes, en especial glucosa, mejoradores de la función, en especial citocinas y/o factores de crecimiento, componentes del plasma sanguíneo, en especial plasma sanguíneo del mismo grupo sanguíneo y/o albúmina, y/o antioxidantes, en especial ácido ascórbico,
- 45 glutatión, cisteína o metionina.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque antes o después de al menos uno de los pasos de procedimiento a) a e), o inmediatamente antes del uso, se realiza una irradiación, en especial con rayos γ , en especial con una dosis de al menos 25 Gy, en especial de al menos 30 Gy.
- 50 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la transferencia de una parte de una bolsa a otra se efectúa por presión diferencial que se genera manual o mecánicamente o aprovechando la fuerza de la gravedad.
- 55 10. Preparación de leucocitos que se produce o se puede producir mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que los eritrocitos se han reducido en más del 90%, en especial en más del 98%, y los trombocitos en más del 90% con respecto a la sangre total, mientras que los leucocitos no se han reducido en más del 60%, la cual se puede conservar a una temperatura de 2°C a 38°C durante más de 24 horas y hasta 168
- 60 horas sin pérdida significativa de la función, y en la que especialmente el estallido respiratorio y/o la fagocitosis

siguen alcanzando, incluso después de 72 horas de conservación, más del 90% de los valores correspondientes de la preparación de leucocitos recién producida.

11. Preparación de leucocitos según la reivindicación 10, que es adecuada para el uso en la producción de un sobrenadante esencialmente exento de células con una concentración elevada de mediadores y/o para el uso en un circuito extracorpóreo o para infusión.

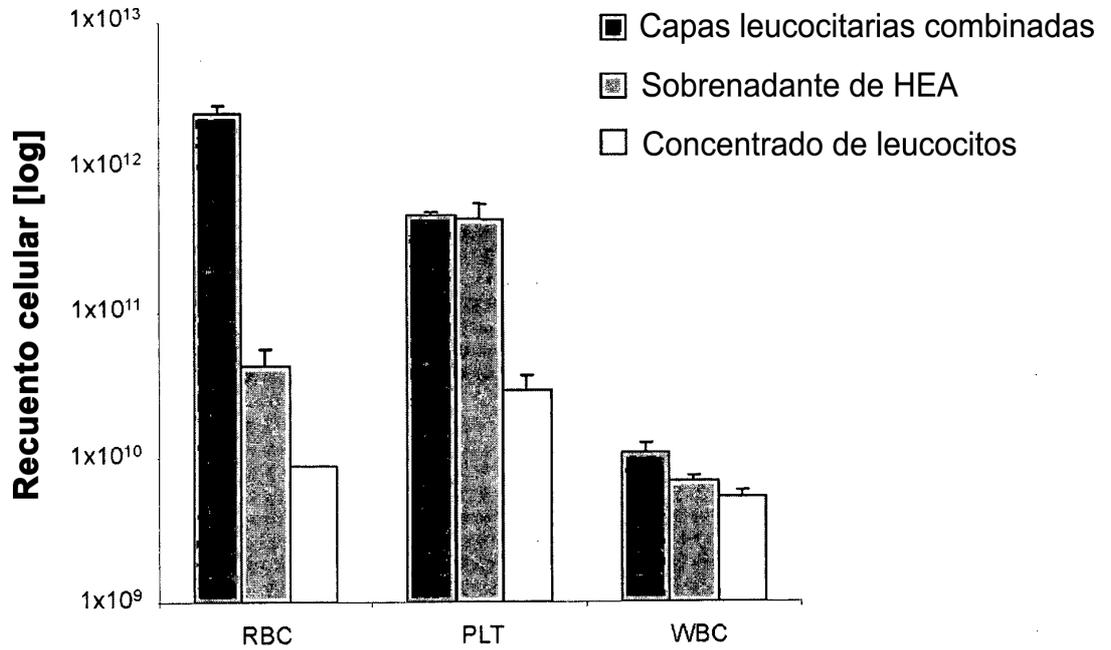


Fig. 1

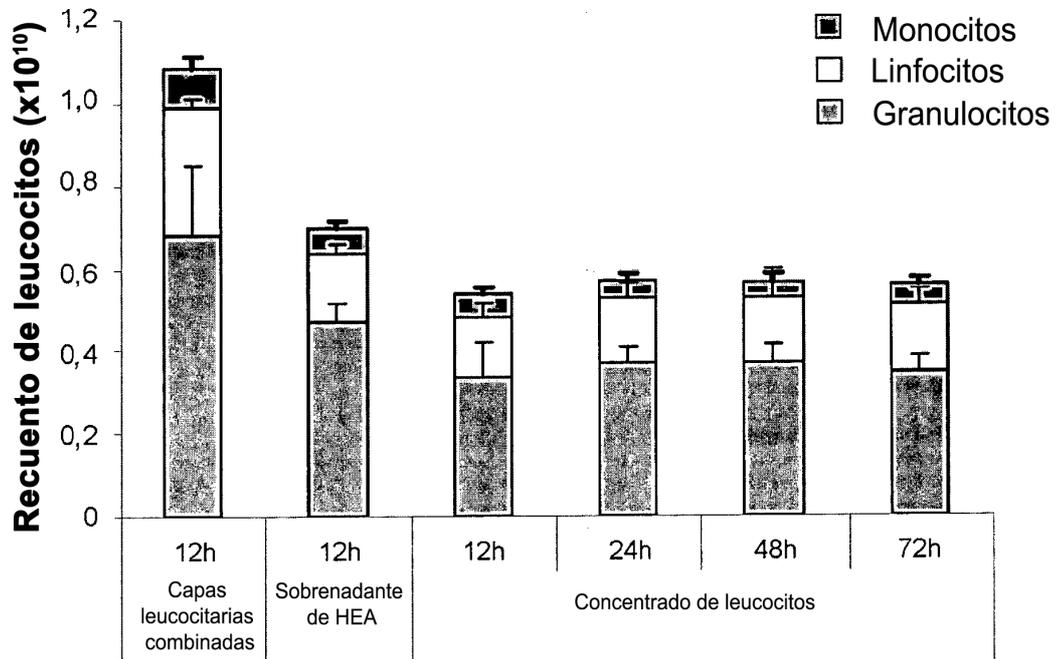


Fig. 2

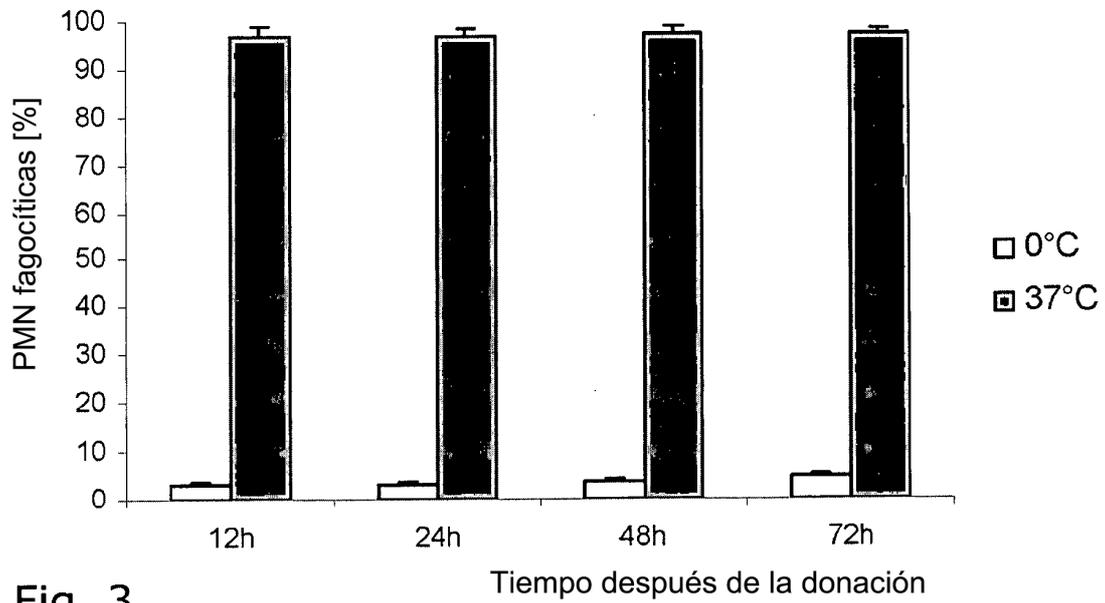


Fig. 3

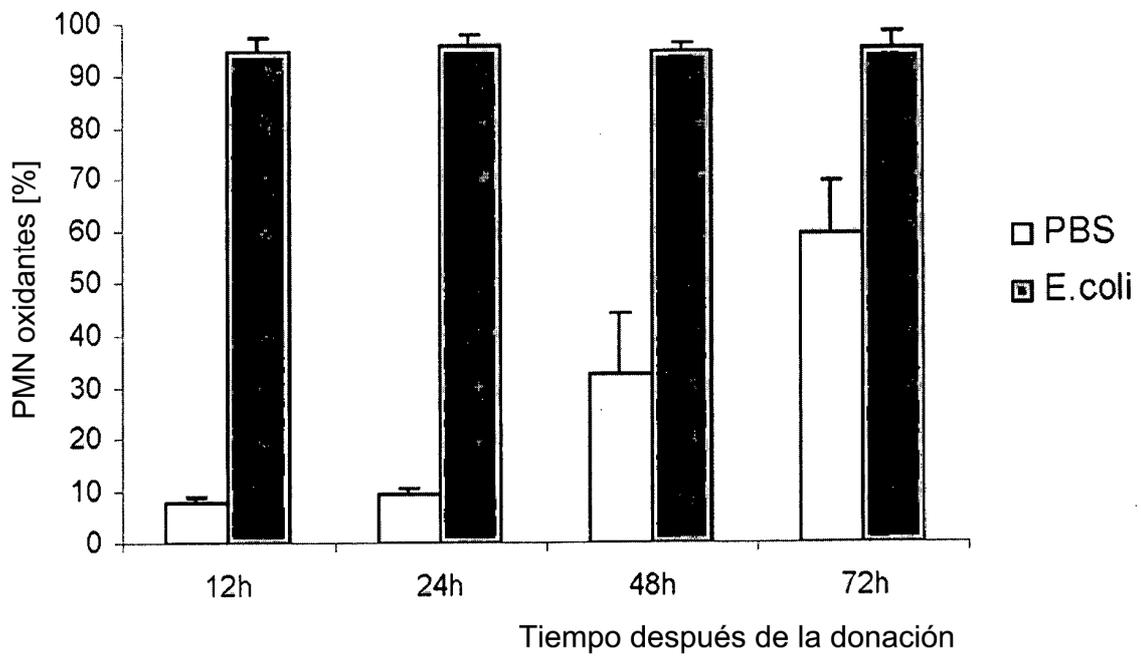


Fig. 4

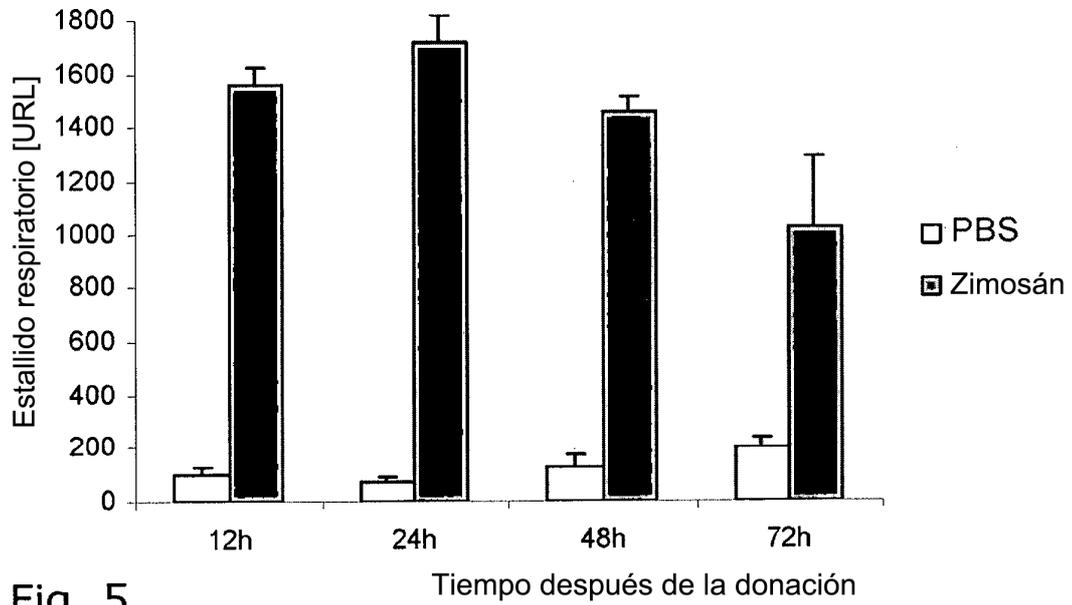


Fig. 5

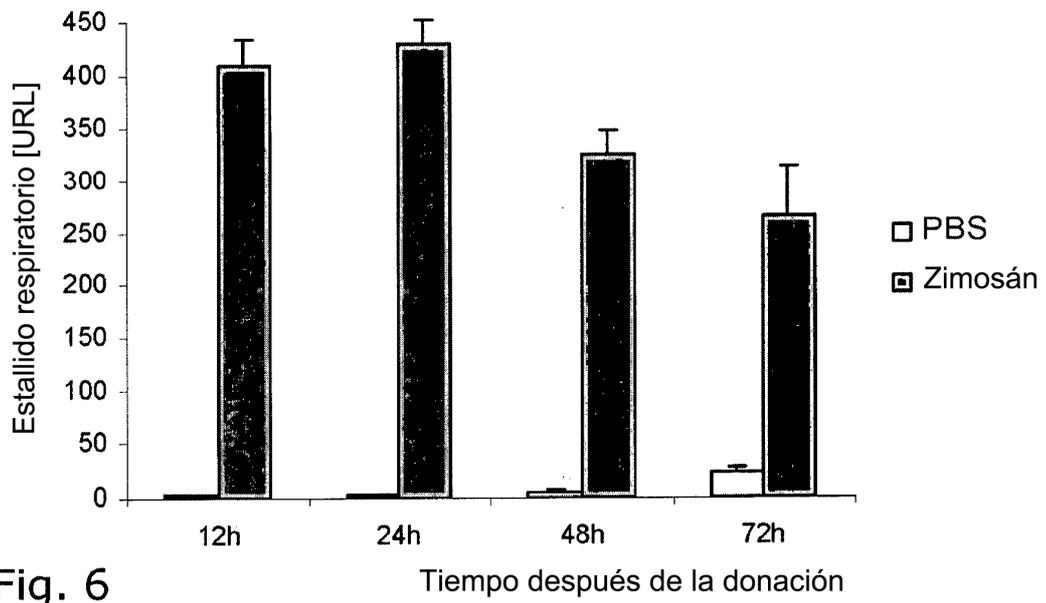


Fig. 6

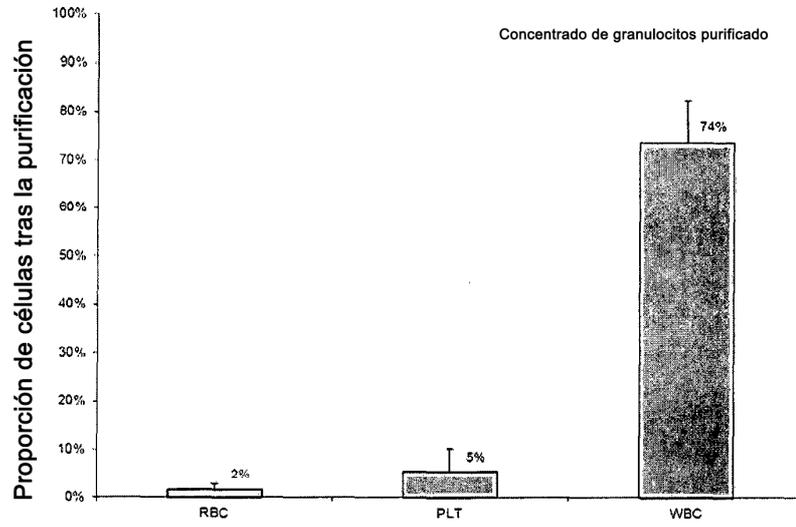


Fig. 7

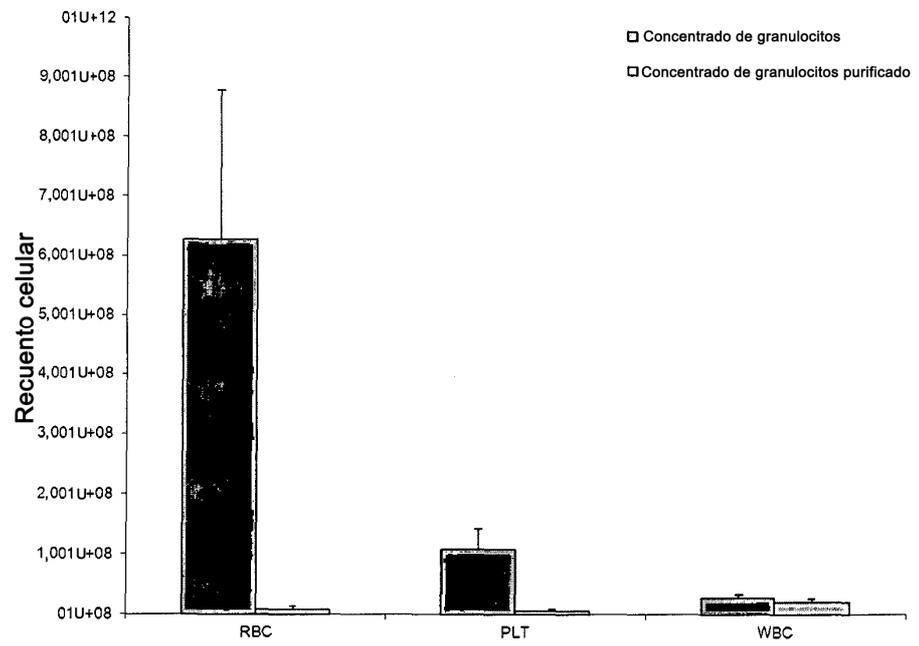


Fig. 8

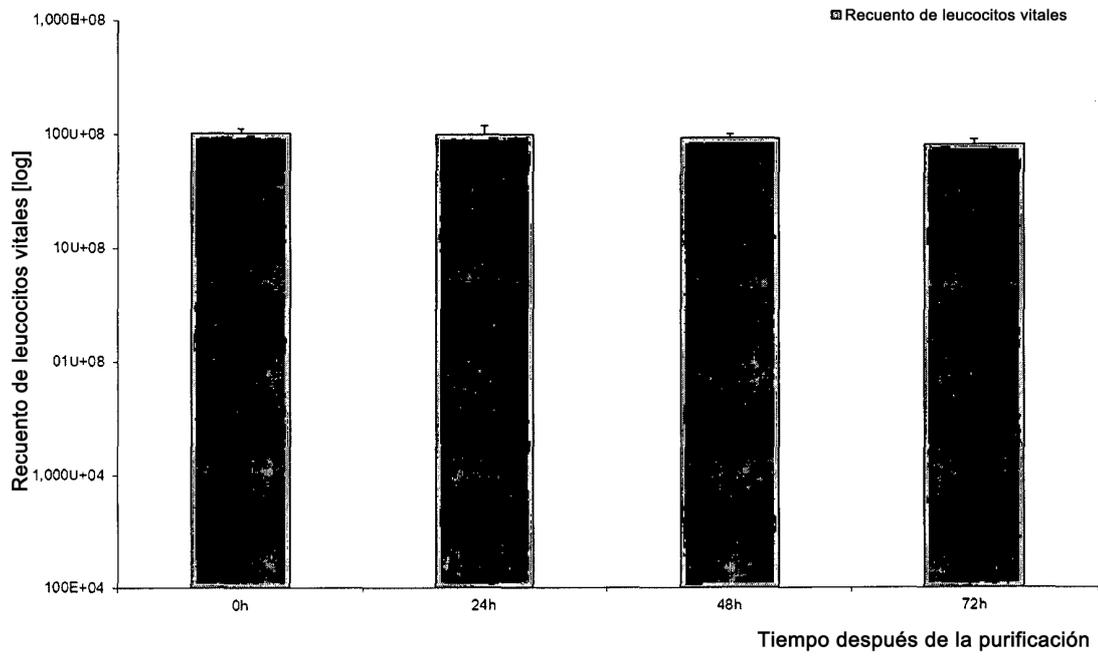


Fig. 9

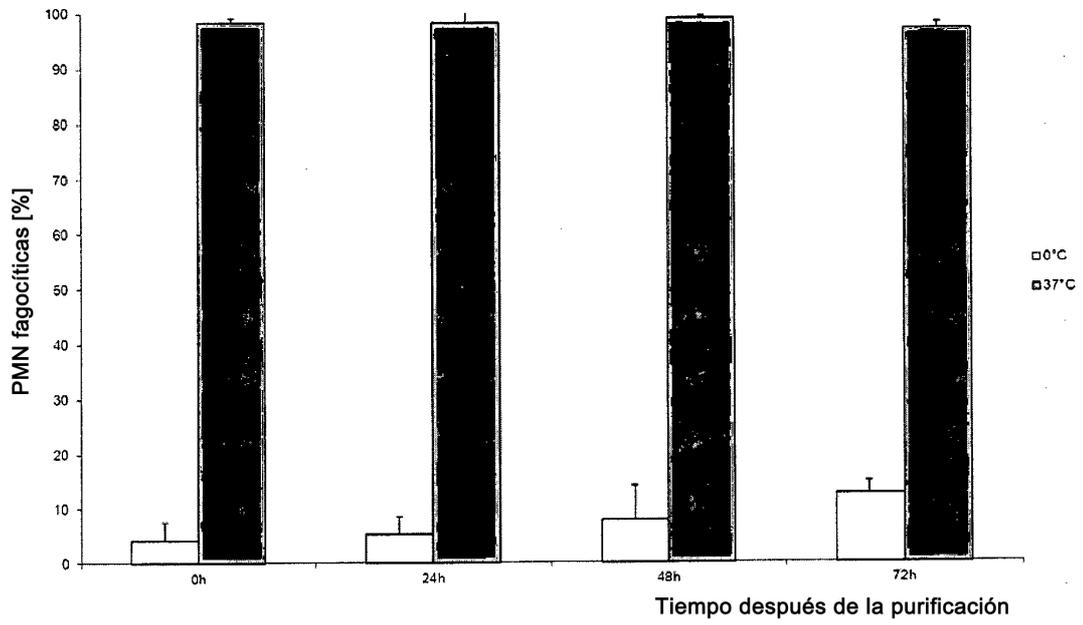


Fig. 10

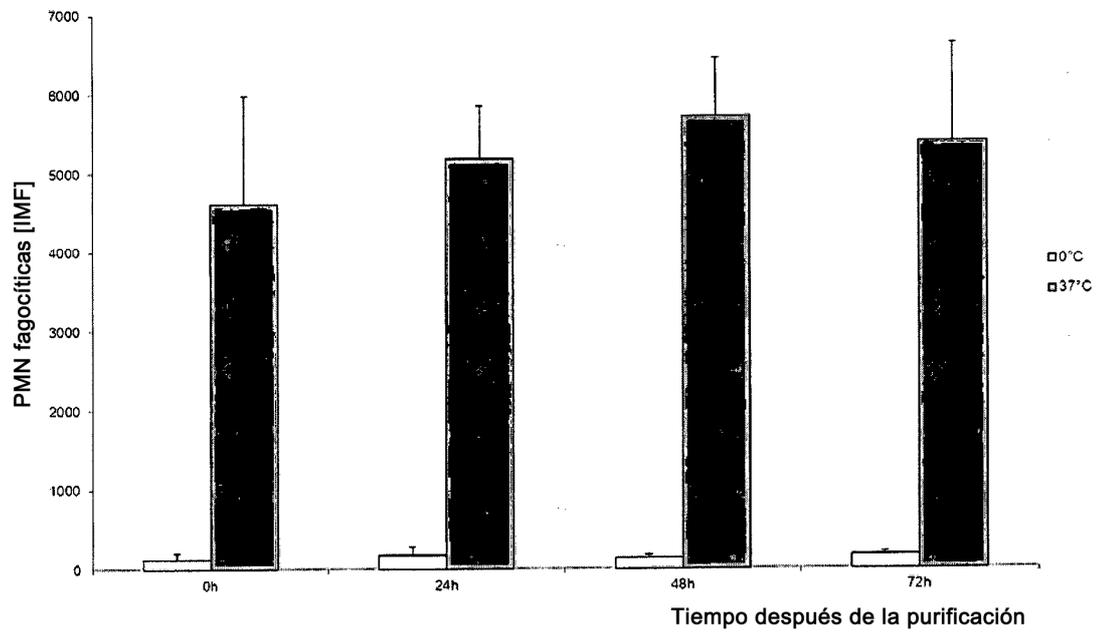


Fig. 11

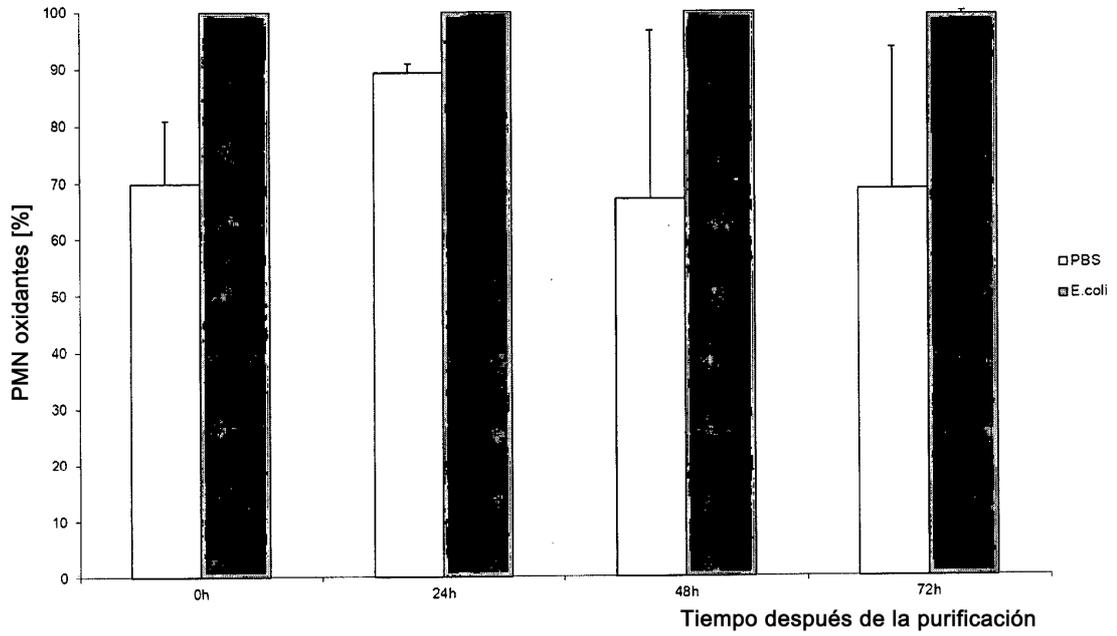


Fig. 12

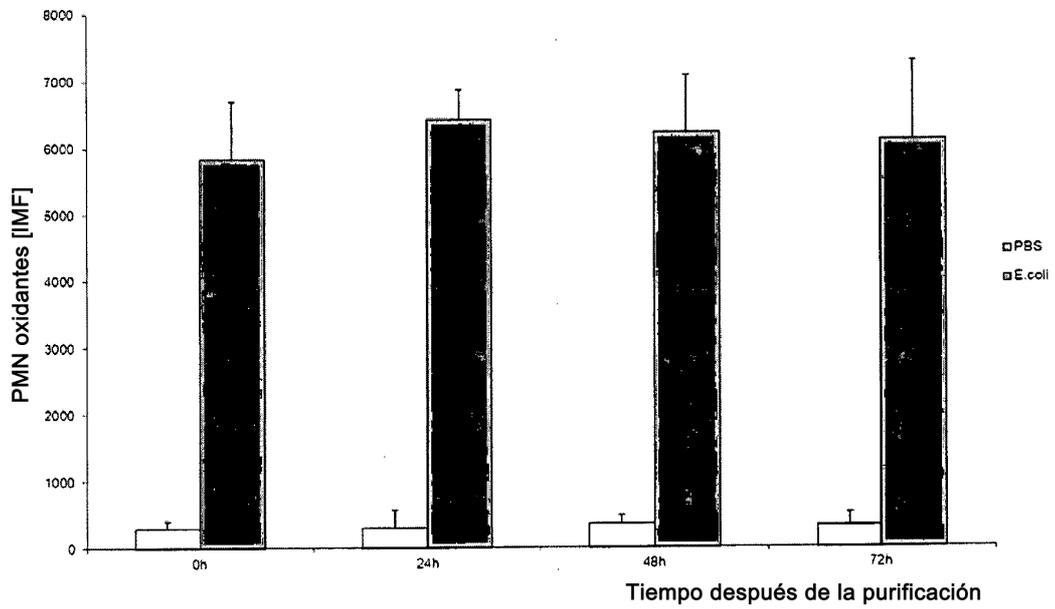


Fig. 13

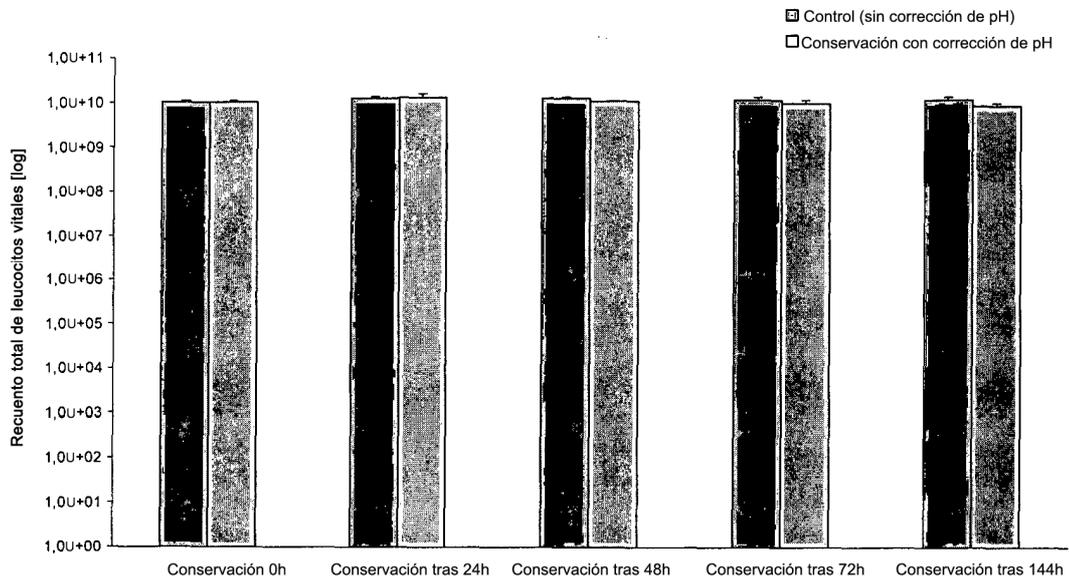


Fig. 15

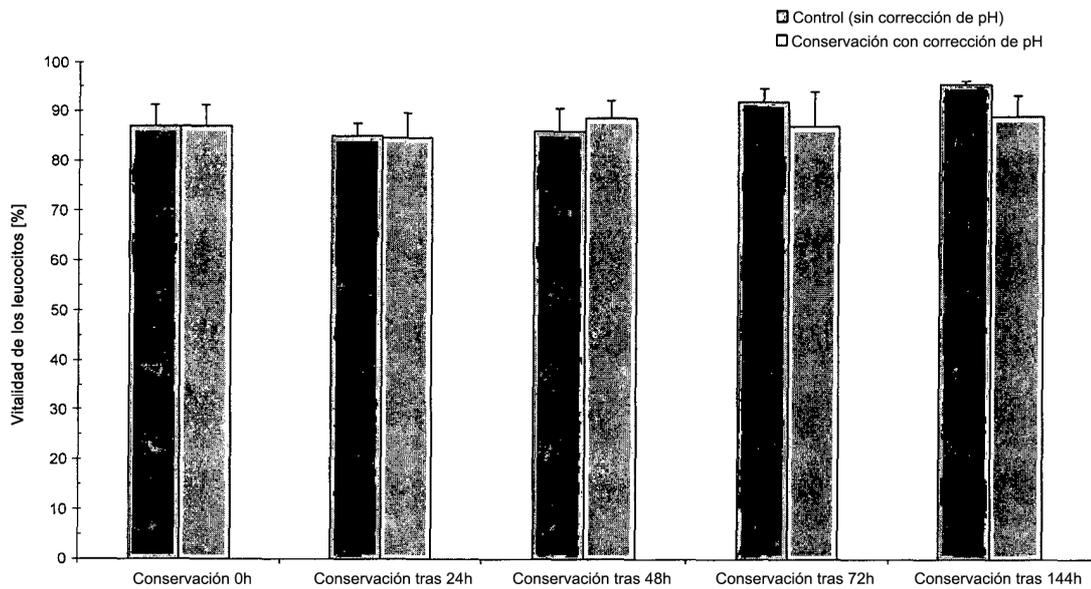


Fig. 16

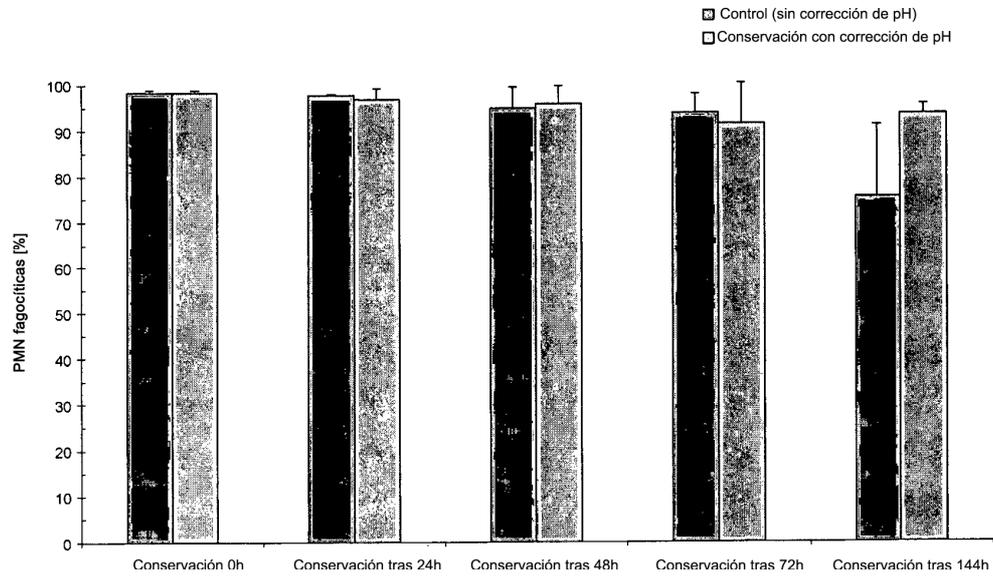


Fig. 17

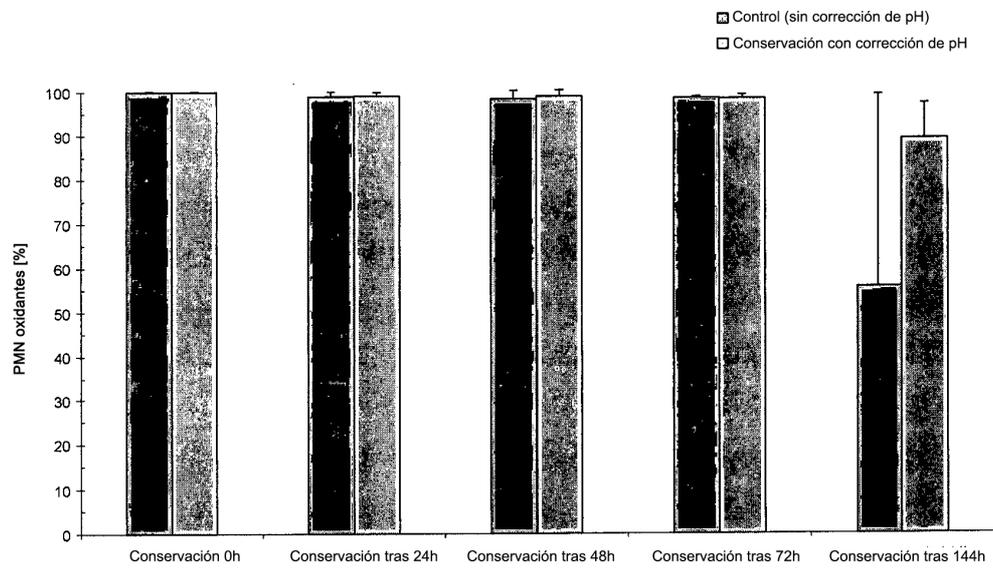


Fig. 18

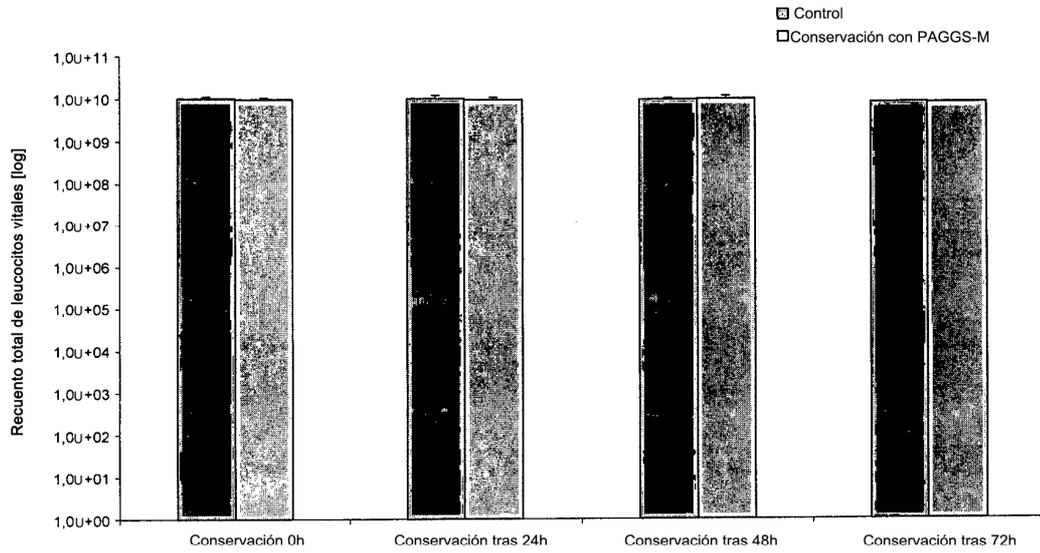


Fig. 19

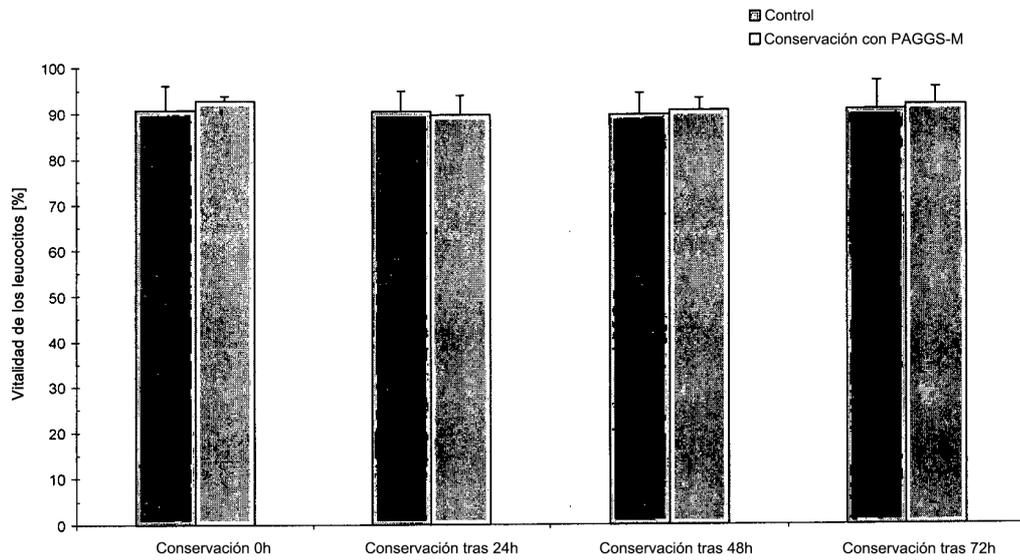


Fig. 20

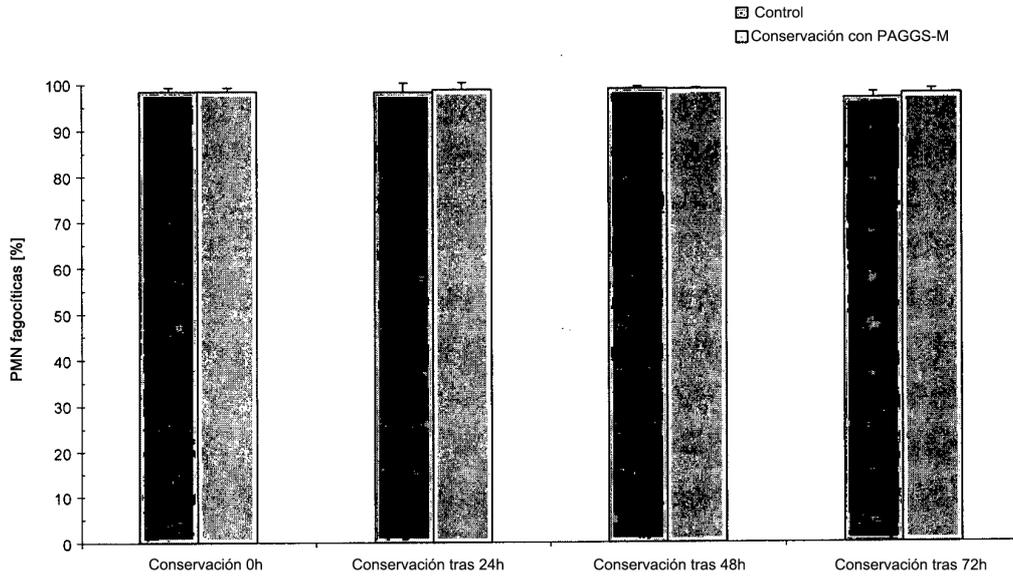


Fig. 21

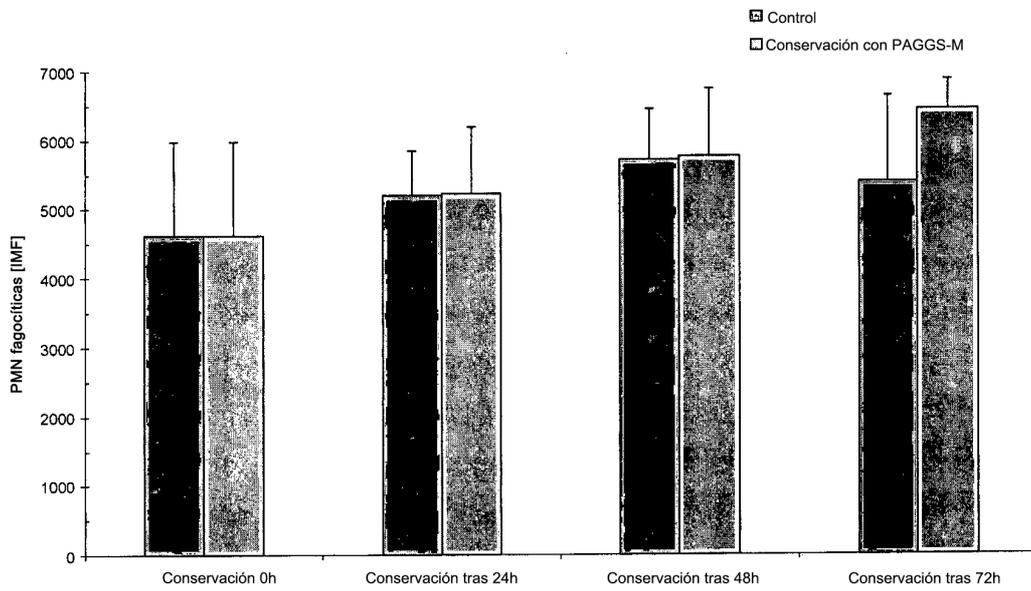


Fig. 22

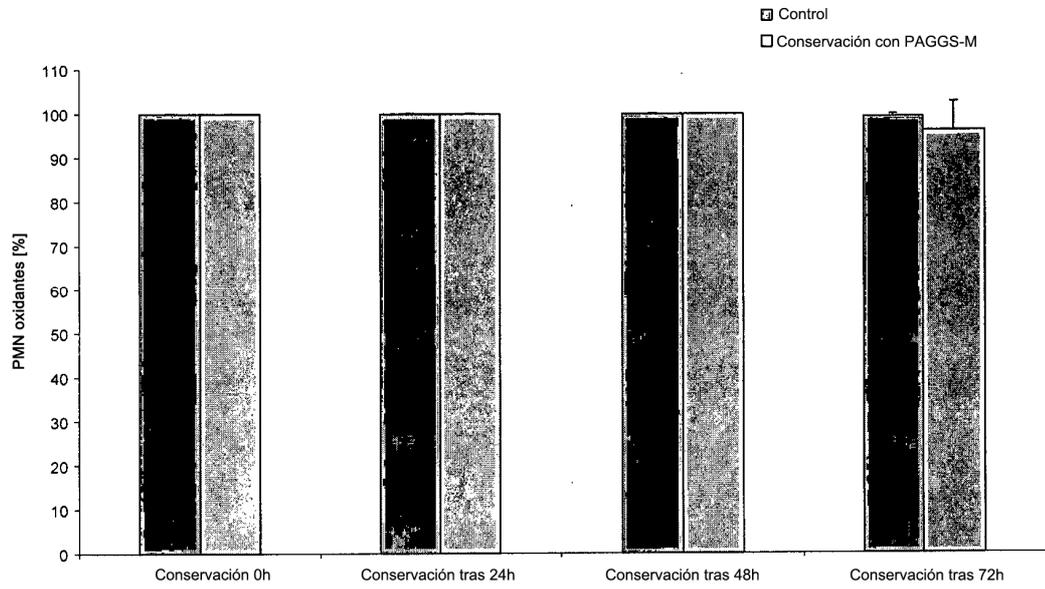


Fig. 23

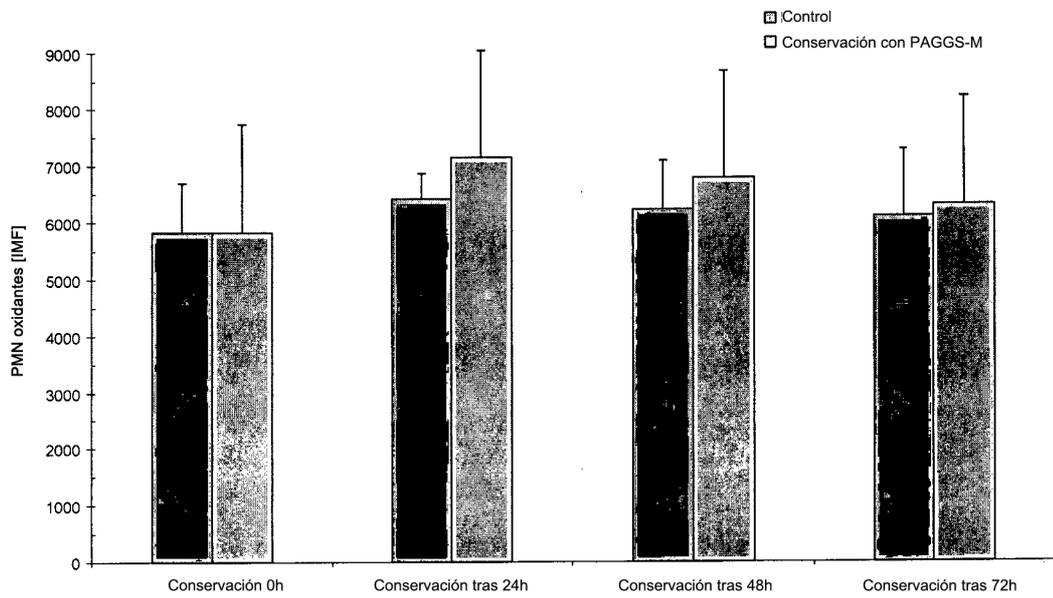


Fig. 24

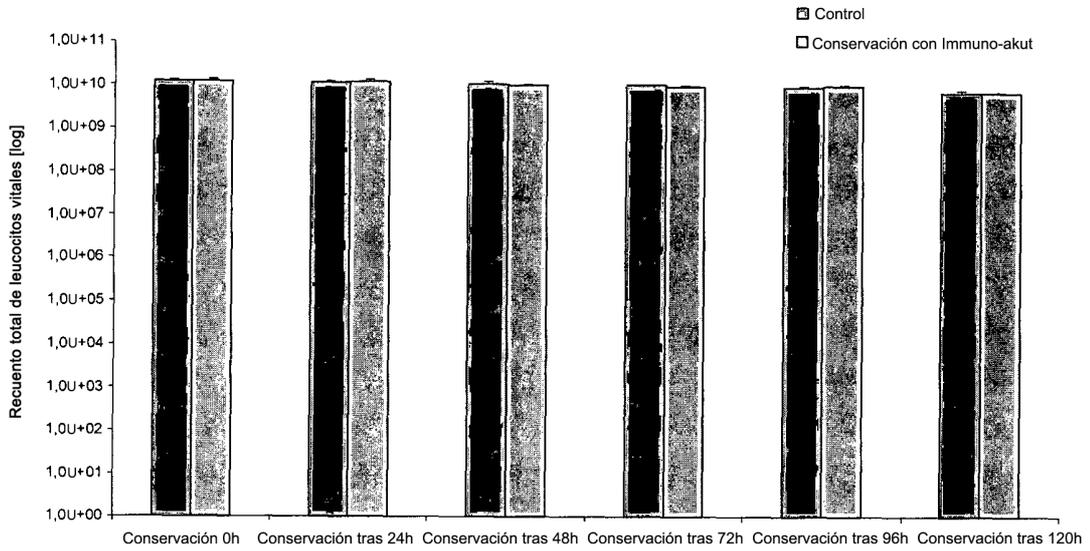


Fig. 25

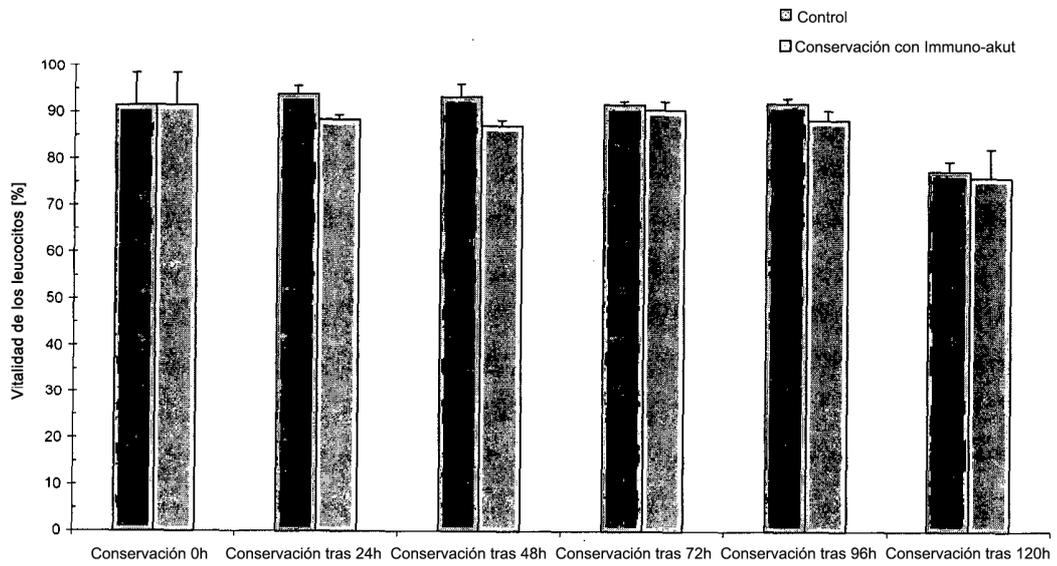


Fig. 26

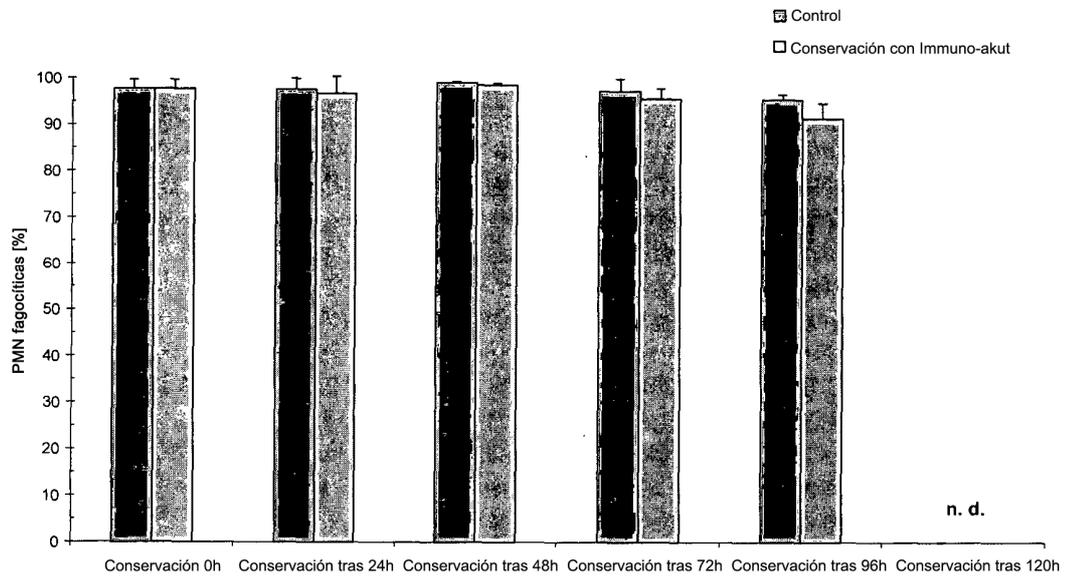


Fig. 27

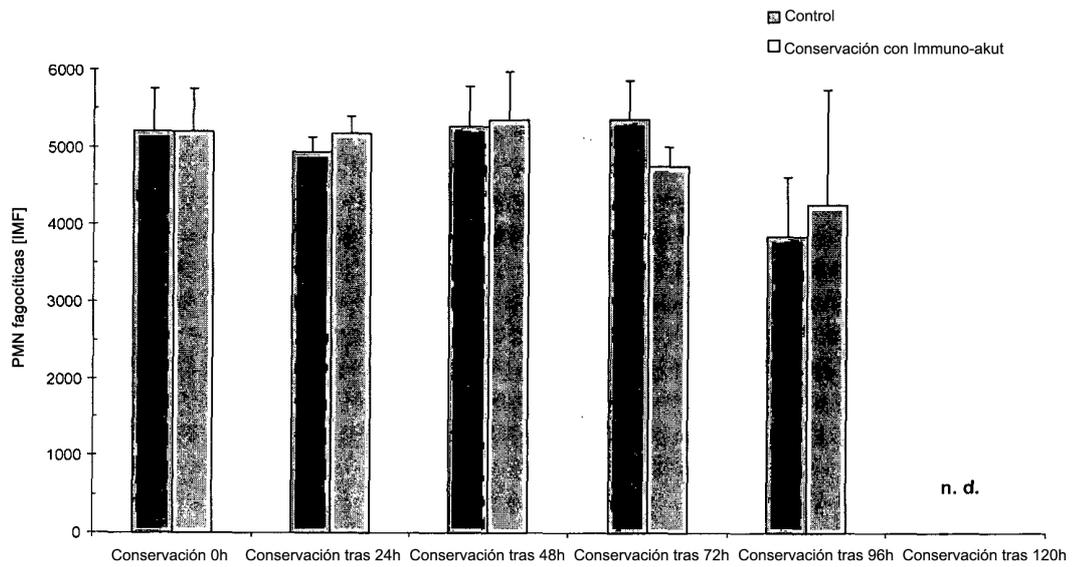


Fig. 28

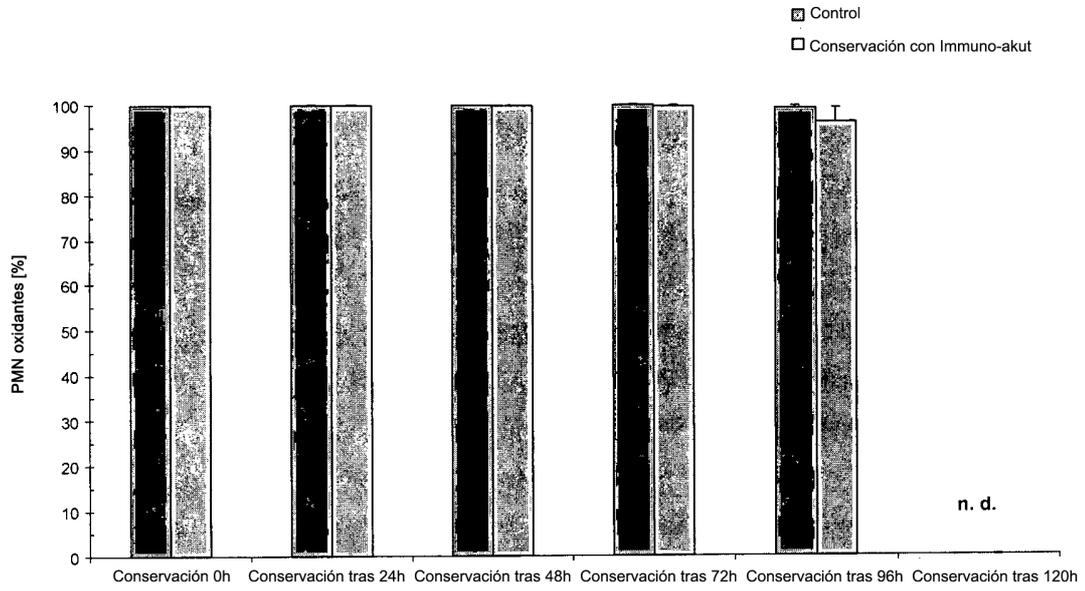


Fig. 29

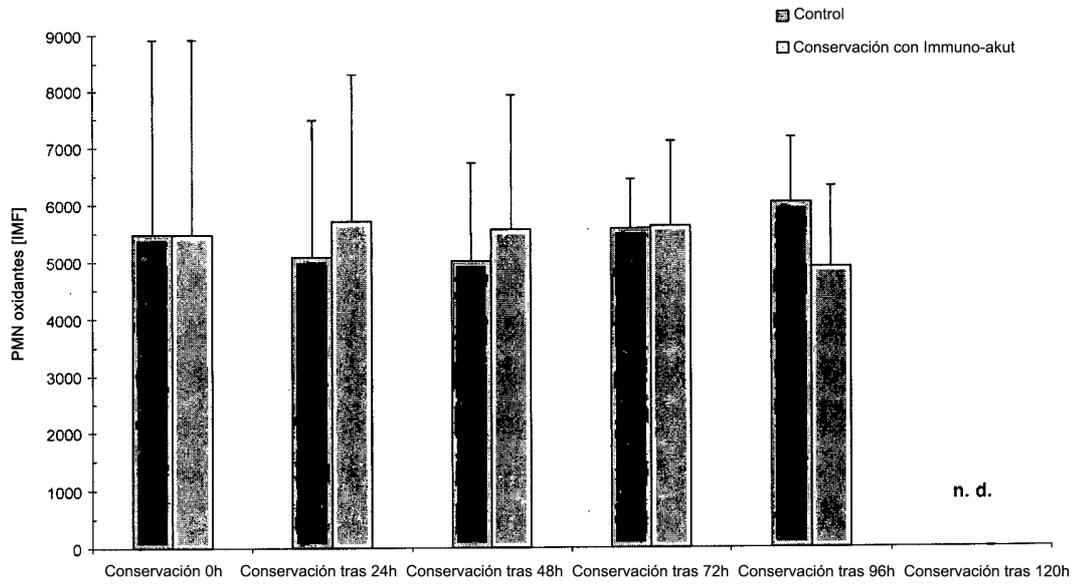


Fig. 30

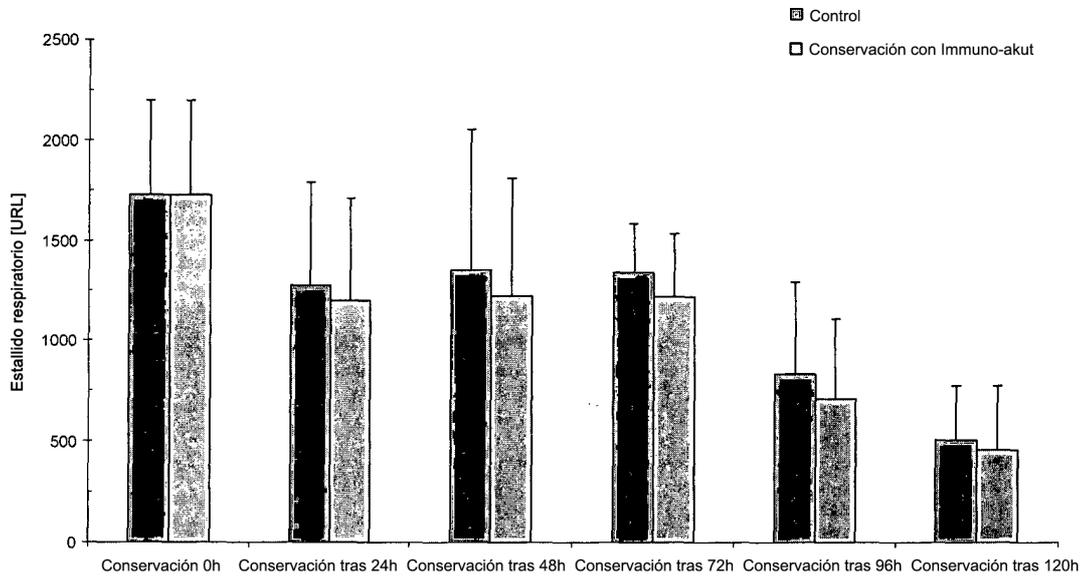


Fig. 31

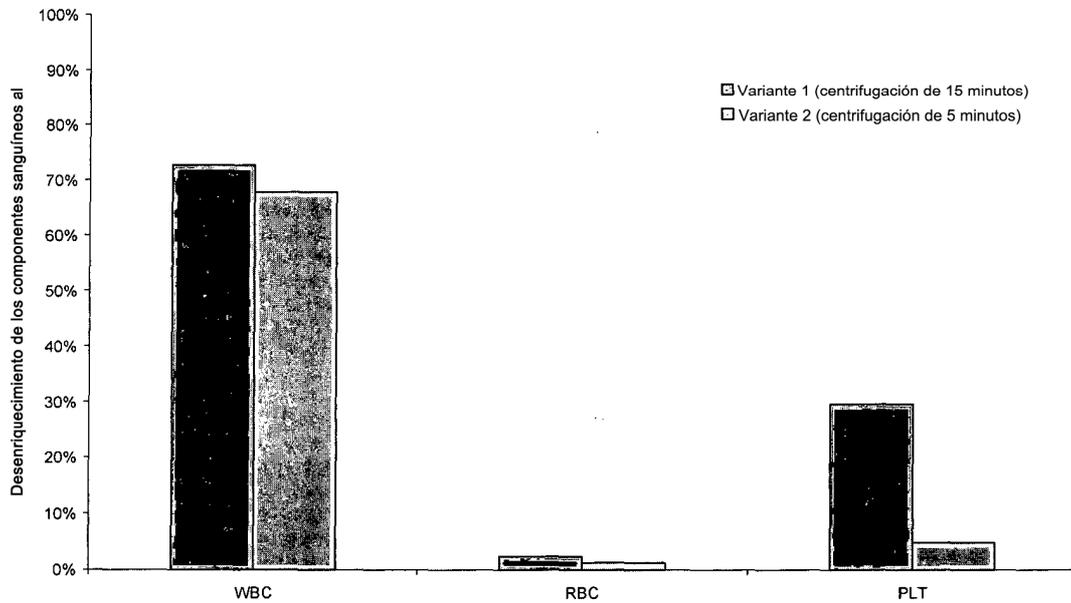


Fig. 14

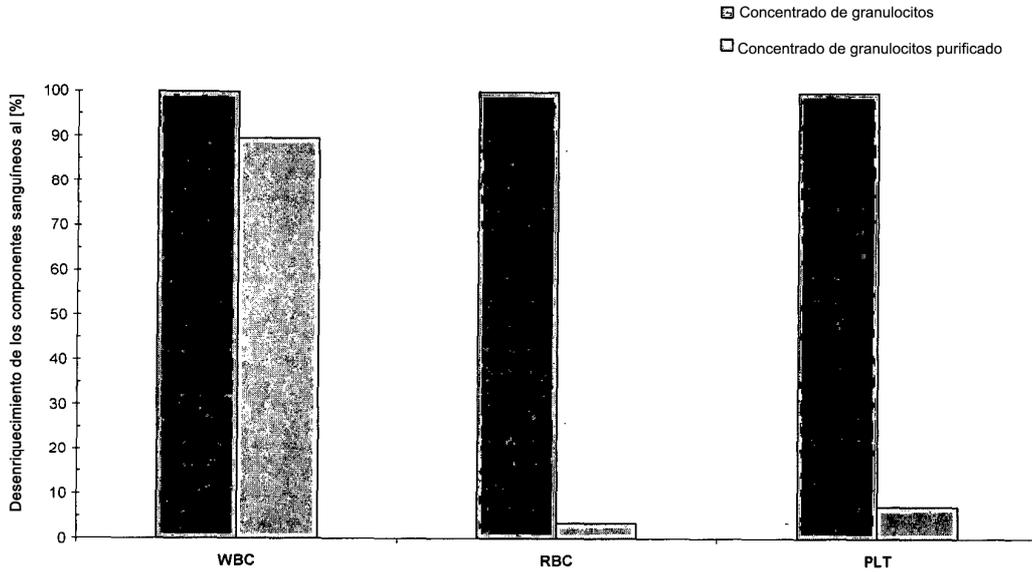


Fig. 32

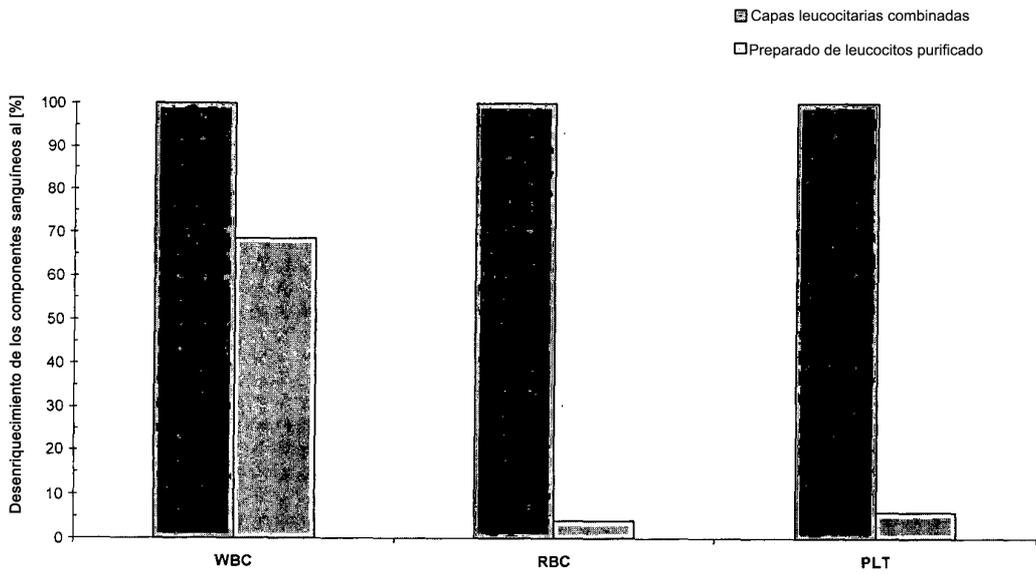


Fig. 33