

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|                                                                    |                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2005.08.04</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>ERYTECH PHARMA</b>                                                                                   |
| (30) Prioridade(s): <b>2004.08.05 FR 0408667</b>                   | <b>60 AVENUE ROCKEFELLER 69008 LYON FR</b>                                                                                   |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2007.04.18</b>               | (72) Inventor(es):<br><b>YANN GODFRIN FR</b>                                                                                 |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2011.11.09</b><br><b>028/2012</b> | (74) Mandatário:<br><b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b><br><b>RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT</b> |

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE LISE/RESSELAGEM E DISPOSITIVO PARA INCORPORAR UM INGREDIENTE ACTIVO EM ERITRÓCITOS**

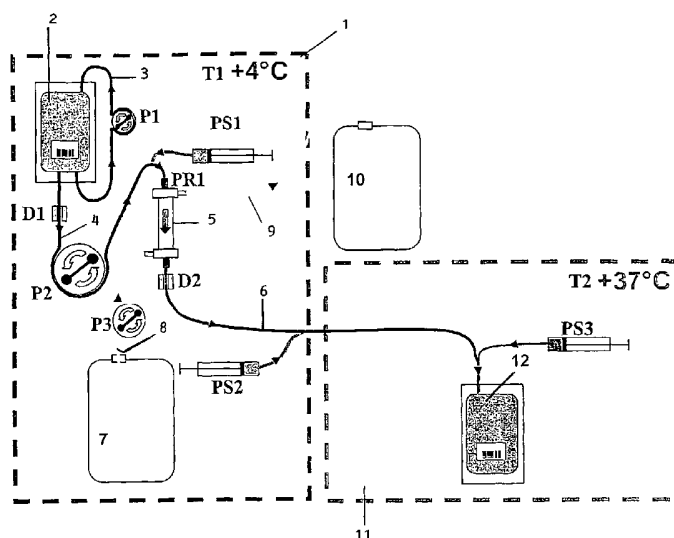
(57) Resumo:

PROCESSO DE LISE/RESSELAGEM PARA PREPARAÇÃO DE ERITRÓCITOS QUE CONTÊM UM INGREDIENTE ACTIVO (E.G. ASPARGINASE OU HEXAFOSFATO DE INOSITOL), O PROCESSO COMPREENDENDO OS PASSOS SEGUINTE: (1) COLOCAÇÃO DE UM CONCENTRADO GLOBULAR EM SUSPENSÃO NUMA SOLUÇÃO ISOTÓNICA POSSUINDO UM NÍVEL DE HEMATÓCRITO QUE É IGUAL OU SUPERIOR A 65%, COM REFRIGERAÇÃO ENTRE +1 E +8°C, (2) MEDIÇÃO DA FRAGILIDADE OSMÓTICA COM BASE NUMA AMOSTRA DE ERITRÓCITOS A PARTIR DESSE MESMO CONCENTRADO GLOBULAR, PREFERIVELMENTE NUMA AMOSTRA DA SUSPENSÃO OBTIDA NO PASSO (1), (3) LISE E PROCEDIMENTO DE INTERNALIZAÇÃO DO INGREDIENTE ACTIVO, NO INTERIOR DA REFERIDA CÂMARA, A UMA TEMPERATURA QUE É MANTIDA CONSTANTEMENTE ENTRE +1 E +8°C, COMPREENDENDO PERMITIR À SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS POSSUINDO UM NÍVEL DE HEMATÓCRITO QUE É IGUAL OU SUPERIOR A 65% E A UMA SOLUÇÃO DE LISE HIPOTÓNICA QUE ESTÁ REFRIGERADA ENTRE +1 E +8°C CIRCULAREM NUM CARTUCHO DE DIÁLISE; OS PARÂMETROS DE LISE SENDO AJUSTADOS DE ACORDO COM A FRAGILIDADE OSMÓTICA MEDIDA PREVIAMENTE; E (4) PROCEDIMENTO DE RESSELAGEM REALIZADO NUMA SEGUNDA CÂMARA A UMA TEMPERATURA ENTRE +30 E +40°C POR MEIO DE UMA SOLUÇÃO HIPERTÓNICA.

## RESUMO

"Processo de lise/resselagem e dispositivo para incorporar um ingrediente activo em eritrócitos"

Processo de lise/resselagem para preparação de eritrócitos que contêm um ingrediente activo (e.g. aspariginase ou hexafosfato de inositol), o processo compreendendo os passos seguintes: (1) colocação de um concentrado globular em suspensão numa solução isotónica possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65%, com refrigeração entre +1 e +8°C, (2) medição da fragilidade osmótica com base numa amostra de eritrócitos a partir desse mesmo concentrado globular, preferivelmente numa amostra da suspensão obtida no passo (1), (3) lise e procedimento de internalização do ingrediente activo, no interior da referida câmara, a uma temperatura que é mantida constantemente entre +1 e +8°C, compreendendo permitir à suspensão de eritrócitos possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65% e a uma solução de lise hipotónica que está refrigerada entre +1 e +8°C circularem num cartucho de diálise; os parâmetros de lise sendo ajustados de acordo com a fragilidade osmótica medida previamente; e (4) procedimento de resselagem realizado numa segunda câmara a uma temperatura entre +30 e +40°C por meio de uma solução hipertónica.



## DESCRIÇÃO

### **"Processo de lise/resselagem e dispositivo para incorporar um ingrediente activo em eritrócitos"**

O presente invento refere-se a um processo que permite a realização da assim chamada técnica de lise/resselagem, que permite que ingredientes activos sejam incorporados em eritrócitos.

O invento refere-se ainda a composições de eritrócitos que contêm asparaginase ou similar, ou hexafosfato de inositol, e que podem ser obtidas por realização do processo de acordo com o invento.

A técnica de lise/resselagem é descrita nas patentes EP-A-101 341 e EP-A-679 101. A última destas descreve uma instalação relativamente complexa que compreende, em primeiro lugar, um alojamento refrigerado para a parte de lise, no qual é colocada uma montagem compreendendo elementos de uso único, incluindo um cartucho de diálise, tubos, bolsas tipo chicana ou em serpentina e elementos metálicos removíveis, tais como um arranjo de arrefecimento em serpentina, e, em segundo lugar, um alojamento para a resselagem, alojamento que está provido com meios de reaquecimento e no qual é colocada uma montagem de uso único de material de plástico.

Os glóbulos vermelhos, que foram separados do plasma de antemão e que são submetidos a forças iónicas fracas (num meio hipotónico), incham até atingirem um volume crítico, ao qual a membrana é distendida até ao ponto de se tornar permeável a iões e macromoléculas. O exame ao microscópio das membranas de eritrócitos revela então o aparecimento de poros que medem de 20 a 500 nm, como resultado dos quais a hemoglobina se pode escapar (P. Seeman J. Cell. Biol. 1967, 32(1): 55-70). A restauração da isotonicidade do meio de suspensão causa o fecho dos poros, tornando a membrana impermeável a macromoléculas. Apenas é mantida a permeabilidade a iões.

O choque hipotónico é provocado fazendo com que os glóbulos vermelhos circulem no compartimento do "sangue" de

um dialisador, preferivelmente possuindo fibras ocas, e fazendo com que uma solução hipotónica circule em contracorrente no compartimento de "dialisado". A vantagem desta técnica reside no confinamento dos glóbulos vermelhos durante o choque hipotónico, o que permite que perdas de constituintes essenciais para a vida dessas células sejam consideravelmente reduzidas. Assim, a meia-vida dos glóbulos vermelhos não é significativamente modificada *in vivo*.

A vantagem de se utilizarem glóbulos vermelhos como veículos para medicamentos, em comparação com outras técnicas, tais como encapsulação em lipossomas ou microesferas, reside substancialmente no facto de esses glóbulos terem biocompatibilidade "natural", serem completamente biodegradáveis de acordo com um processo bem conhecido, terem uma expectativa de vida *in vivo* relativamente longa (aproximadamente 120 dias) e no facto de várias moléculas químicas e terapêuticas poderem ser aí encapsuladas.

O processo de internalização por lise e resselagem dos eritrócitos é um fenómeno complexo de múltiplos factores. Alguns parâmetros físicos/químicos significativos que têm importância na variabilidade dos resultados são a concentração em termos de hemoglobina antes da diálise, o caudal da suspensão de eritrócitos no dialisador, a osmolaridade do tampão de diálise hipotónico, a temperatura de diálise e a temperatura de resselagem e a pressão transmembrana no dialisador. A fragilidade osmótica dos eritrócitos varia de uma amostra de sangue para a seguinte e poderá ser um factor biológico fundamental. Assim, L. Boucher *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1996, 24, 73-78, estudaram a influência das variações na fragilidade osmótica de várias populações de glóbulos vermelhos na distribuição e concentração final de hexafosfato de inositol. Em conclusão, os autores indicam que a fragilidade osmótica inicial dos glóbulos vermelhos tem um papel predominante em termos do grau de lise e das variações na internalização do ingrediente activo, e que essa fragilidade osmótica depende de vários factores, tais como a permeabilidade dos glóbulos vermelhos, a relação entre área superficial/volume e conteúdo iónico, estado fisiológico e idade do doador (ver também A. A.

Hussain *et al.*, Br. J. Haematol. 1984, 57(4): 716-718), o intervalo de tempo durante o qual o sangue está armazenado, a presença de medicamentos, doenças (ver também K. Kolanjiappan *et al.*, Clin. Chim. Acta 2002, 326(1-2): 143-149) e tratamentos. Os resultados obtidos, fazendo variar o caudal da suspensão de eritrócitos, demonstraram a extrema sensibilidade das condições operatórias, com um caudal de 12 a 14 ml/min dependendo de os glóbulos vermelhos pertencerem a um grupo possuindo um nível baixo de fragilidade ou a um grupo possuindo um nível elevado de fragilidade.

Deste modo, aqueles textos proporcionam informação inicial sobre os vários factores que influenciam a fragilidade osmótica dos glóbulos vermelhos e a eficácia de incorporação através da técnica de lise/resselagem. Permitem a compreensão das dificuldades encontradas na prática, que explicam que essa técnica não pode ser aplicada como rotina em cuidados de saúde em humanos.

Uma publicação muito recente resume muito bem a situação actual. C. G. Millan *et al.* publicado em Journal of Controlled Release 2004, 95: 27-49, apresentam uma revisão geral da utilização de eritrócitos como veículos farmacêuticos, na qual concluem que, apesar do interesse que estão a despertar em medicina humana, o seu desenvolvimento é ainda muito limitado hoje em dia por causa das dificuldades de armazenamento, riscos de contaminação e ausência de um procedimento industrial comprovado permitindo a sua preparação.

A asparaginase é uma enzima produzida a partir de microrganismos bacterianos (*E. Coli* ou *Erwinia*) que hidrolisa e consome asparagina, um aminoácido que é indispensável para sintetizar as proteínas necessárias para a vida celular, em particular de fibroblastos. Ao contrário das células normais, algumas células linfoblásticas cancerosas não têm a capacidade para sintetizar elas próprias a sua asparagina e estão dependentes de fontes extracelulares. O tratamento por asparaginase priva-as por isso desse constituinte, conduzindo à sua morte. Este antimitótico é selectivo em relação às células tumorais.

Em humanos, porém, a asparaginase nativa induz a produção de anticorpos que estão presentes em média em mais de 70% dos pacientes, conduzindo a um aumento na depuração de asparaginase e a reacções alérgicas que são por vezes muito graves (B. Wang *et al.*, *Leukaemia* 2003, 17, 8: 1583-1588). Assim, ainda que a asparaginase seja muito eficaz no tratamento de leucemias linfoblásticas agudas, é altamente tóxica e pode conduzir a reacções de hipersensibilidade, variando deste uma simples reacção do tipo urticária a um autêntico choque anafilático. Adicionalmente, são observados efeitos prejudiciais do tipo neurológico (perturbações de consciência), do tipo hemostático (hipofibrinogenemia, redução do nível no soro de antitrombina III e outros factores de coagulação, conduzindo a complicações hemorrágicas e/ou trombóticas), do tipo gastrointestinal e do tipo pancreático (incluindo inflamações agudas do pâncreas).

A encapsulação de asparaginase em eritrócitos permite melhorar o índice terapêutico (D. Schrijvers *et al.*, *Clin. Pharmacokinet.* 2003, 42 (9): 779-791). Por conseguinte, seria extremamente vantajoso proporcionar um processo que permitisse encasular asparaginase em eritrócitos de um modo reprodutível e industrial.

Adicionalmente, o hexafosfato de inositol tem sido proposto como substituto para 2,3-DPG (2,3-difosfoglicerato) em eritrócitos de modo a reduzir significativamente a afinidade de oxigénio por hemoglobina e aumentar a libertação de oxigénio em tecidos (EP-A-0 101 341). As Patentes US 4321259, US 5612207 e US 6610702 descrevem a incorporação desse substituto em eritrócitos e a sua utilização em várias aplicações terapêuticas. Estas incluem uma indicação como um aditivo para um tratamento do cancro através de radioterapia, de modo a melhorar a oxigenação de tumores hipóxicos e a sua sensibilidade a radioterapia. Contudo, essa indicação não é acompanhada por qualquer elemento de exequibilidade.

Para encapsulação, a US 4321259 utiliza a fusão entre eritrócitos e lipossomas que contêm hexafosfato de inositol. A US 5612207 utiliza uma técnica por electroporação. A US 6610702 estabelece uma melhoria na técnica de electroporação, por o hexafosfato de inositol ser associado a catiões amónio

de modo a formar um complexo hidrossolúvel biocompatível que pode promover a introdução em eritrócitos. Finalmente, em *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1996, 24, 73-78, acima descrita, L. Boucher *et al.* estudam a introdução de hexafosfato de inositol em eritrócitos pela técnica de lise/resselagem. Por conseguinte, estão disponíveis várias vias para o perito na especialidade de modo a introduzir esse composto em eritrócitos. Como C. G. Millan *et al.* (acima) mencionam, quando se faz referência a hexafosfato de inositol para o transporte de oxigénio em geral, actualmente, a utilização de eritrócitos incorporando uma molécula tal como hexafosfato de inositol depara-se porém com a ausência de um procedimento industrial comprovado.

Neste pedido de patente, por conseguinte, seria muito vantajoso ter um processo que permitisse que o hexafosfato de inositol fosse encapsulado em eritrócitos de um modo reprodutível e industrial.

Tomando o anterior em consideração, o problema tratado pelo requerente é proporcionar um processo para lise/resselagem industrial que permite produzir eritrócitos incorporando quantidades desejadas de ingrediente activo de um modo reprodutível, e possibilitando obter um produto que cumpra as normas para transfusão de sangue (esterilidade, ausência de patogénios e pirogénios).

Um objectivo importante do invento é proporcionar um tal processo que possa ser aplicado a concentrados globulares que cumpram as normas requeridas para transfusão de sangue.

Outro objectivo é proporcionar um tal processo que permita encapsular asparaginase ou hexafosfato de inositol em eritrócitos de um modo eficaz, reprodutível, fiável e estável.

Estes objectivos, bem como outros, são conseguidos por um processo de lise/resselagem para preparação de eritrócitos contendo pelo menos um ingrediente activo, o processo compreendendo os passos seguintes:

- 1 - colocação de um concentrado globular em suspensão numa solução isotónica possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65%, com refrigeração entre +1 e +8°C,
- 2 - medição da fragilidade osmótica com base numa amostra de eritrócitos a partir desse mesmo concentrado globular, os passos 1 e 2 sendo susceptíveis de ser realizados em qualquer ordem (incluindo em paralelo),
- 3 - lise e procedimento de internalização do ingrediente activo, no interior da referida câmara, a uma temperatura que é mantida constantemente entre +1 e +8°C, compreendendo permitir à suspensão de eritrócitos possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65% e a uma solução de lise hipotónica que está refrigerada entre +1 e +8°C, circularem num cartucho de diálise; os parâmetros de lise sendo ajustados de acordo com a fragilidade osmótica medida previamente, onde, com base na medição da fragilidade osmótica, é ajustado o caudal da suspensão de eritrócitos que passa no interior do cartucho de diálise, ou é seleccionada a osmolaridade da solução de lise; e
- 4 - procedimento de resselagem realizado numa segunda câmara, dentro da qual a temperatura está adaptada para a resselagem, preferivelmente entre +30 e +40°C, e na presença de uma solução hipertónica.

Na concretização preferida, o passo 2 é realizado numa amostra da suspensão preparada no passo 1. Como será depois explicado, a suspensão pode ter sido preparada a partir de um concentrado globular que foi submetido a operações de processamento usuais tais como lavagem com uma solução salina. Além disso, o ingrediente activo a ser internalizado pode estar presente nesta suspensão. Por conseguinte, é vantajoso realizar o passo 2 numa amostra desta suspensão e, no caso de o ingrediente activo estar na suspensão inicial, o passo 2 é realizado numa amostra de suspensão contendo o ingrediente activo.

O termo "internalização" pretende referir-se à introdução do ingrediente activo no interior dos eritrócitos.

De acordo com um aspecto do invento, o concentrado globular é suspenso numa solução isotónica possuindo um nível de hematócrito elevado que é igual ou superior a 65%, e

preferivelmente igual ou superior a 70%, e essa suspensão é refrigerada entre +1 e +8°C, preferivelmente entre +2 e +6°C, tipicamente na ordem de +4°C. De acordo com um método particular, o nível de hematócrito é de 65 a 80%, preferivelmente de 70 a 80%.

De acordo com um aspecto importante do invento, a fragilidade osmótica é medida em relação aos eritrócitos imediatamente antes do passo de lise. Os eritrócitos ou a suspensão contendo os mesmos estão vantajosamente a uma temperatura próxima de ou idêntica à temperatura seleccionada para lise. De acordo com outro aspecto vantajoso do invento, a medição de fragilidade osmótica realizada é utilizada rapidamente, isto equivale a dizer que o procedimento de lise é realizado num tempo curto após a amostra ter sido retirada. Preferivelmente, esse intervalo de tempo entre a amostra ser retirada e o início da lise é menor ou igual a 30 minutos, ainda preferivelmente menor ou igual a 25 minutos, ou mesmo 20 minutos.

Os dois parâmetros que permitem à diálise ser controlada são o tempo durante o qual as células estão presentes no dialisador (de acordo com as suas características) e a osmolaridade do dialisado. Os dois parâmetros têm de ser ajustados de acordo com as características de resistência osmótica, ou inversamente fragilidade osmótica, dos glóbulos vermelhos que são processados, de modo a serem sujeitos aos passos de lise/resselagem. Essa resistência osmótica pode ser caracterizada por pelo menos um dos parâmetros seguintes:

- a. A osmolaridade do meio para a qual a hemólise aparece, o que equivale a dizer, o início da formação dos poros.
- b. A velocidade  $V$  de hemólise, que é estabelecida pelo gradiente da porção linear da curva de % de hemólise =  $f(\text{osmolaridade do meio})$ .
- c. A percentagem de hemólise para uma dada osmolaridade.
- d. A osmolaridade que permite obter 50% de hemólise ( $H_{50}$ ).
- e. O tempo para a obtenção de uma dada percentagem de hemólise (por exemplo, 50%).

De acordo com concretizações preferidas, a resistência osmótica é caracterizada através dos parâmetros  $b$ ,  $d$  ou  $b$  e  $d$ .

Consequentemente, a fragilidade osmótica tem de ser medida num curto período de tempo, que é compatível com o intervalo de tempo curto entre a amostra ser retirada e o início da lise. De acordo com um aspecto do invento, medem-se um ou mais desses parâmetros de hemólise, contra uma solução hipotónica, possuindo isotonicidade conhecida, por exemplo, água (água destilada ou outra), através de uma membrana semipermeável. Pode ser concebido um método. De acordo com uma concretização preferida do invento, porém, a fragilidade osmótica é medida através de um dispositivo de medição automático que está configurado para medir a fragilidade osmótica de uma amostra de eritrócitos em menos de 15 minutos, mais particularmente em menos de 12 minutos e preferivelmente em menos de 10 minutos, e o resultado obtido é utilizado num breve período de tempo de modo a ajustar os parâmetros de lise e iniciar a lise.

A medição da fragilidade osmótica pode ser realizada por meio de um dispositivo que automatiza pelo menos parcialmente a técnica manual descrita por J. V. Dacie em *Practical Haematology*, 2.<sup>a</sup> edição, Churchill, London 1956. Um exemplo de um tal dispositivo é descrito no artigo por J. Didelon *et al.*, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 23 (2000) 31-42. O princípio é baseado na utilização de um dispositivo que junta, de um lado e do outro lado de uma membrana semipermeável, a amostra da suspensão de eritrócitos a ser avaliada e uma solução hipotónica, possuindo isotonicidade conhecida, por exemplo, água destilada, em volumes adequados, de modo a gerar hemólise lenta dos eritrócitos à medida que os iões NaCl se difundem para a solução, por exemplo, água destilada. O progresso da hemólise ao longo do tempo é seguido por uma medição da transmitância (ver também J. Didelon *et al.*, *Biorheology* 37, 2000: 409-416) por meio de um feixe laser que tem um comprimento de onda de 808 nm. Uma célula fotoelétrica mede as variações na luz transmitida através da suspensão. Por exemplo, as medições são realizadas durante 10 minutos. O dispositivo permite obter um ou mais dos parâmetros  $a$ - $e$  acima mencionados.

De acordo com um primeiro método, a medição da fragilidade osmótica é realizada numa amostra cuja temperatura inicial é entre +1 e +8°C, preferivelmente com água destilada que está também a essa temperatura, sob condições nas quais a alteração na temperatura não é prejudicial para essa medição. De acordo com um segundo método, a medição da fragilidade osmótica é realizada numa amostra que é mantida à temperatura entre +1 e +8°C. Assim, o dispositivo de medição descrito em J. Didelon *et al.* acima pode ser modificado de modo a permitir controlar a temperatura. Preferivelmente, esta temperatura é similar ou idêntica à temperatura de lise.

Uma vez determinados um ou mais desses parâmetros, pode-se aplicar uma relação tendo em consideração o(s) parâmetro(s) de modo a estabelecer quer o caudal das células no dialisador, quer a osmolaridade do dialisado, que é suficiente para obter glóbulos vermelhos que encapsulam a substância "activa" e/ou a sua quantidade desejada.

$$\text{Caudal de eritrócitos} = [A \times (H_{50})] + [B \times (V)] + K$$

- A e B = variáveis que são ajustáveis de acordo com o dialisador e a osmolaridade da solução de lise
- K = constante de ajustamento.

$$\text{Osmolaridade do dialisado} = [C \times (H_{50})] + [D \times (V)] + K$$

- C e D = variáveis que são ajustáveis de acordo com o dialisador e o caudal de eritrócitos no dialisador
- K = constante de ajustamento.

De acordo com uma concretização preferida, mede-se a concentração de NaCl em g/L que resulta em 50% de hemólise (parâmetro d.) e o caudal da suspensão de eritrócitos no cartucho de diálise é ajustado de acordo com os valores de concentração medidos.

De acordo com um aspecto do invento, o procedimento de lise é iniciado quando a temperatura da suspensão de

eritrócitos é entre +1 e +8°C, e a fragilidade osmótica foi medida e os parâmetros de lise registados.

De acordo com um aspecto vantajoso, a suspensão inicial a ser processada é colocada na câmara de lise/internalização acima mencionada. De acordo com uma concretização do invento, o processo utiliza um módulo refrigerado que está provido com controlo de temperatura, uma bolsa da suspensão de eritrócitos que está refrigerada entre +1 e +8°C está colocada nesse módulo e está ligada, ou destina-se a ser ligada, a uma montagem removível de uso único, estéril, que compreende um cartucho de diálise, tubos para ligar o cartucho, de um lado, à bolsa e, do outro lado, à solução de lise, o módulo compreendendo adicionalmente meios que podem resultar na circulação da suspensão de eritrócitos e da solução de lise, módulo dentro do qual a temperatura está estabilizada entre +1 e +8°C. O módulo refrigerado tem dimensões de modo a acomodar a bolsa e a montagem removível de uso único. O facto de a bolsa, o cartucho de diálise, a solução de lise, que estão ligados por vários tubos, serem proporcionados num único módulo refrigerado deste tipo é um aspecto vantajoso do processo de acordo com o invento.

O termo "bolsa" refere-se às bolsas flexíveis que são habitualmente utilizadas no campo das transfusões de sangue e de derivados de sangue.

De acordo com um aspecto importante do invento, são empreendidos passos para manter os eritrócitos em suspensão homogénea na bolsa de modo a manter estável o nível de hematócrito da suspensão que passa através do dialisador. De acordo com um aspecto do invento, a bolsa está assim provida com uma circulação externa do tipo alça que efectua a circulação da suspensão para e a partir da bolsa.

O termo cartucho de diálise pretende referir-se a um elemento que compreende dois compartimentos que estão separados por uma parede de diálise, através da qual pode ser efectuada a permuta iónica, o que permite que a pressão osmótica de uma solução aquosa localizada num dos compartimentos seja modificada de um modo controlado, com uma solução aquosa compreendendo um sal sendo introduzida no

outro compartimento. Este tipo de cartucho é amplamente utilizado no campo médico. De acordo com um método preferido, utiliza-se um cartucho de diálise possuindo fibras ocas, por exemplo, um cartucho deste tipo possuindo as propriedades específicas seguintes: diâmetro interno das fibras de 100 a 400  $\mu\text{m}$ , área superficial externa total das fibras de 0,3 a 2  $\text{m}^2$ , comprimento das fibras de 10 a 40 cm, coeficiente de ultrafiltração de 1,5 a 8 ml/h.mmHg.

Como foi descrito em detalhe acima, o procedimento de lise pode ser iniciado quando a temperatura da suspensão na bolsa é entre +1 e +8°C. De acordo com um método vantajoso, a temperatura da suspensão é controlada por meio de um sensor que está posicionado na circulação externa tipo alça.

De acordo com a fragilidade osmótica detectada, podem ser ajustados dois parâmetros principais, o caudal da suspensão de eritrócitos no cartucho de diálise e a osmolaridade da solução de lise, dado que é preferível fixar, em ambos os casos, um caudal constante para a solução de lise. O valor do caudal não é crítico. Tipicamente, para um cartucho de diálise possuindo fibras ocas, como descrito acima, o caudal da solução de lise é fixado a de 50 a 300 ml/min, preferivelmente de 150 a 250 ml/min.

A solução de lise é uma solução salina que é hipotónica em relação à suspensão de glóbulos vermelhos. Quando é fixada num valor constante, a sua osmolaridade pode ser tipicamente de 20 a 120 mOsm, preferivelmente de 70 a 110 mOsm, por exemplo, na ordem de 90 mOsm.

A título de exemplo, a solução de lise pode compreender  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e/ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e um açúcar, tal como glucose.

De acordo com um primeiro método, o caudal da suspensão de eritrócitos através do cartucho de diálise é ajustado enquanto o caudal e a osmolaridade do tampão de lise são fixos. Quanto maior a fragilidade osmótica, mais o caudal da suspensão é aumentado. Tipicamente, para um cartucho cujas especificações foram indicadas acima, o caudal será feito variar no intervalo de 5 a 200 ml/min, preferivelmente de 10 a 40 ml/min.

De acordo com um segundo método, a osmolaridade da solução de lise é ajustada, enquanto os caudais da suspensão e da solução de lise são fixos. Quanto maior a fragilidade osmótica, mais a osmolaridade da solução de lise é aumentada. Tipicamente, a osmolaridade será feita variar dentro do intervalo de 10 a 200 mOsm/l, preferivelmente de 20 a 150 mOsm/l.

De acordo com um terceiro método, são ajustados tanto o caudal da suspensão de eritrócitos através do cartucho de diálise como a osmolaridade da solução de lise.

De acordo com o invento, introduzem-se um ou mais ingredientes activos que se pretendem incorporar nos eritrócitos. O ingrediente ou ingredientes activos podem estar presentes na bolsa de suspensão e/ou podem ser introduzidos, preferivelmente de um modo progressivo, na circulação de suspensão a montante ou a jusante do cartucho de diálise. Uma vez que os volumes introduzidos são pequenos, a refrigeração do ingrediente activo é opcional.

A suspensão de glóbulos vermelhos é preferivelmente produzida a partir de um concentrado globular que é de um grupo sanguíneo compatível com o receptor, do qual foram removidos os leucócitos, não tem quaisquer patogénios detectados e em particular é fornecida numa bolsa, por exemplo, contendo 500 ml. Os glóbulos vermelhos podem ter sido irradiados quando se destinam a pacientes altamente imunodeficientes que poderão experimentar uma reacção imunológica do tipo "transplante/hospedeiro" (R. J. Davey Immunol. Invest. 1995, 24 (1-2): 143-149).

De acordo com um aspecto particular do invento, o concentrado globular inicial que é utilizado para preparar a suspensão foi submetido de antemão a uma operação de processamento que se destina a remover do sangue outros elementos que não eritrócitos. Este tipo de processamento, por exemplo, lavagem com uma solução salina de modo a remover o plasma ou uma solução de conservação, é conhecido de um perito na especialidade.

De acordo com um método particular, a lavagem é realizada na presença de um ou mais ingredientes activos que se pretendem encapsular.

A lavagem pode ser realizada por qualquer técnica convencional, tal como a técnica de bolsa quádrupla ou 4 bolsas para lavagem de glóbulos vermelhos (método MacoPharma e bolsa de transferência). É também possível utilizar um dispositivo de lavagem de glóbulos vermelhos automático do tipo COBE 2991 Cell Processor.

De acordo com outro aspecto do invento, os eritrócitos podem ser processados de antemão com uma solução que pode aumentar e/ou homogeneizar a sua resistência osmótica. Estas soluções são conhecidas de um perito na especialidade. Por exemplo, uma solução contendo L-carnitina pode permitir obter uma melhoria na resistência osmótica dos glóbulos vermelhos. Outros exemplos podem incluir soluções de heparina, citrato-fosfato-dextrose (CPD) e manitol.

A temperatura durante o passo de lise é mantida preferivelmente entre +2 e +6°C, e de um modo ainda mais preferível na ordem de +4°C.

O procedimento de resselagem é preferivelmente realizado por reaquecimento da suspensão lisada e adição de uma solução de resselagem hipertónica. A temperatura de resselagem pode ser entre +30 e +40°C. É preferivelmente entre +35 e +38°C, por exemplo, aproximadamente 37°C. A incubação pode durar tipicamente de 15 a 45 minutos.

Preferivelmente, a suspensão descarregada do cartucho de diálise e uma solução de resselagem hipertónica são introduzidas, preferivelmente de modo contínuo, numa bolsa intermédia. A suspensão é aí reaquecida e incubada à temperatura desejada durante um período suficiente para assegurar a resselagem. De acordo com um aspecto específico, a bolsa intermédia está colocada numa câmara ou módulo aquecidos cuja temperatura interna é controlada à temperatura seleccionada.

Como variante, a suspensão é trazida para uma bolsa intermédia, bem como a solução de resselagem. Quando a totalidade da suspensão tiver sido recolhida nessa bolsa, ésta é selada e transferida para um módulo que permite o aquecimento e a incubação à temperatura desejada.

A suspensão de glóbulos vermelhos resselados pode depois ser submetida a um ou mais passos de lavagem através de uma solução salina, de modo a remover as células não resseladas ou deficientemente seladas, resíduos e hemoglobina extracelular.

De acordo com outro aspecto, os eritrócitos são processados numa solução para conservação dos eritrócitos, por exemplo, contendo L-carnitina.

Os eritrócitos produzidos são preferivelmente armazenados a uma temperatura entre +1 e +8°C, preferivelmente entre +2 e +6°C, tipicamente aproximadamente +4°C.

O nível de hematócrito final do produto que está pronto para utilização é na prática de 40 a 70%.

O presente invento revela também um dispositivo de lise/resselagem que pode ser utilizado para realização do processo para preparação de eritrócitos de acordo com o invento, o dispositivo compreendendo:

- um módulo que pode ser refrigerado a uma temperatura entre +1 e +8°C e que compreende meios para arrefecimento e controlo da temperatura,
- uma montagem removível de uso único, estéril, que está configurada de modo a poder ser colocada no módulo e que compreende um cartucho de diálise que pode ser ligado, de um lado, a uma entrada para a solução de lise e, do outro lado, a uma entrada para a suspensão de eritrócitos,
- meios para ajustar o caudal da suspensão de eritrócitos através do cartucho de lise e/ou para ajustar a osmolaridade da solução de lise, de acordo com a fragilidade osmótica dos eritrócitos a serem processados.

De acordo com uma concretização, a montagem removível que é ela própria um aspecto do invento, é um *kit* de uso único e compreende uma bolsa que pode conter a suspensão de eritrócitos e um tubo que liga essa bolsa ao cartucho de diálise, e o módulo compreende uma bomba que pode cooperar com esse tubo e fazer com que a suspensão de eritrócitos circule da bolsa para e através do cartucho, essa bomba estando ligada opcionalmente aos meios para ajustamento do caudal. A montagem permite que a esterilidade seja mantida.

De acordo com um aspecto vantajoso, a bolsa está adicionalmente provida com um tubo tipo alça que está ligado à bolsa nas suas duas extremidades, e o módulo compreende uma bomba que pode cooperar com esse tubo e fazer com que o conteúdo da bolsa circule para e a partir dessa bolsa. Uma tal bolsa flexível provida com um tubo tipo alça e pelo menos um ponto de entrada e saída constitui um aspecto do invento *per se*. Essa bolsa pode compreender pelo menos um outro tubo flexível que está ligado a cada entrada/saída. A bolsa pode estar associada a uma bomba (por exemplo, uma bomba peristáltica) que está disposta de modo a cooperar com o tubo tipo alça e/ou um suporte para a bolsa e opcionalmente para a bomba. Uma tal bolsa pode ser utilizada para administrar composições (por exemplo, suspensão, emulsão) a humanos ou animais, dado que é desejável conservar um dado grau de homogeneidade na composição, por exemplo, uma composição para administração parentérica.

De acordo com outro aspecto vantajoso, uma sonda de temperatura está localizada no tubo tipo alça.

De acordo com outro aspecto, um tubo para injectar o ingrediente activo está ligado ao tubo que liga a bolsa à entrada de "sangue" do cartucho de diálise.

De acordo com outro aspecto, o cartucho de diálise está ligado por um tubo a um frasco que pode conter a solução de lise, e o módulo refrigerado compreende meios de recepção para esse frasco e uma bomba que pode cooperar com o tubo de modo a fazer com que a solução de lise circule para e através do cartucho de diálise.

Os meios para arrefecimento e meios para controlar a temperatura são capazes de manter a temperatura entre +2 e +6°C, preferivelmente da ordem de +4°C, no módulo.

De acordo com outro aspecto, a saída de "sangue" do cartucho de diálise está ligada a um tubo de saída que se abre, ou que pode ser aberto, fora do módulo. De acordo com outro aspecto, um tubo para injectar o ingrediente activo está ligado a esse tubo de saída. O tubo de saída pode estar ligado a uma segunda bolsa (bolsa intermédia) que pode recolher a suspensão de eritrócitos que é descarregada a partir da lise e também uma solução de resselagem (preferivelmente introduzida por um tubo secundário que se abre para o tubo de saída ligeiramente a montante do ponto no qual este se abre para o interior da bolsa intermédia). Essa bolsa está vantajosamente disposta num segundo módulo que está provido com meios capazes de controlar a temperatura no módulo entre +30 e +40°C, preferivelmente entre +35°C e +38°C.

De acordo com uma concretização vantajosa, a montagem removível de uso único compreende, numa única unidade, as bolsas, tubos de circulação, tubos de injeção (providos com um dispositivo de injeção ou um receptáculo destinado a cooperar com um tal dispositivo), cartucho de diálise e preferivelmente um frasco de solução de lise.

Preferivelmente, a própria montagem removível não compreende meios específicos destinados a arrefecimento ou aquecimento. Estas funções são apenas realizadas pelos módulos ou câmaras nos quais as duas porções da montagem estão colocadas.

As bombas utilizadas no processo e no dispositivo são preferivelmente bombas peristálticas (bombas de oclusão); de acordo com uma concretização, a bomba que efectua a recirculação da suspensão para e a partir da bolsa inicial e a bomba para circulação do tampão de lise têm uma velocidade de rotação predeterminada constante, enquanto a bomba que conduz a suspensão para o cartucho de diálise tem uma

velocidade de rotação que pode ser ajustada de acordo com a fragilidade osmótica dos eritrócitos a serem processados.

O ingrediente activo pode ser introduzido por quaisquer meios adequados, por exemplo, uma seringa de pistão a velocidade fixa, que é controlada opcionalmente, ligada ao tubo de injeção correspondente. Como variante, as seringas de pistão podem ser substituídas por bombas peristálticas.

O dispositivo compreende meios para ajustar o caudal da suspensão de eritrócitos através do cartucho de lise e/ou ajustar a osmolaridade da solução de lise de acordo com a fragilidade osmótica dos eritrócitos a serem processados.

De acordo com um aspecto, os meios de ajustamento do caudal estão configurados para controlar a bomba que conduz a suspensão para o cartucho de diálise. De acordo com outro aspecto alternativo, os meios de ajustamento estão configurados para controlar a osmolaridade de uma solução de lise, quer de modo a diluir e baixar a osmolaridade, quer para aumentar essa osmolaridade pela introdução de um soluto adequado. Como variante, pode-se introduzir opcionalmente no módulo uma solução de lise possuindo uma osmolaridade que está ajustada em relação à fragilidade osmótica dos eritrócitos a serem processados.

De acordo com um método preferido, o dispositivo compreende meios electrónicos que podem controlar o processo de lise e, opcionalmente, o processo de resselagem, de acordo com instruções que são introduzidas pelo operador (por exemplo, o operador dá entrada directamente dos dados referentes ao caudal da suspensão de eritrócitos), ou de acordo com os dados introduzidos pelo operador, por referência à fragilidade osmótica (os meios electrónicos estando configurados de modo a estabelecer e ajustar os parâmetros de lise, por exemplo, o caudal da suspensão de eritrócitos). Esses meios electrónicos estão preferivelmente conectados a sensores de temperatura (permitindo controlar a temperatura nos módulos e/ou no sensor de temperatura para a suspensão de eritrócitos). Esses meios podem controlar e operar as bombas, por exemplo, a pressão e o caudal da suspensão através do cartucho de diálise.

Os módulos estão providos preferivelmente, pelo menos numa face, com uma superfície de vidro que permite o controlo visual da instalação e da circulação das soluções e da suspensão.

O processo e o dispositivo podem ser utilizados para incorporar vários ingredientes activos, seleccionados em particular entre medicamentos, vacinas, enzimas, péptidos, antigénios e agentes de contraste que são utilizados em terapia humana ou animal (ver, por exemplo, C. G. Millan, J. Controlled Released 2004, 95: 27-49).

O invento refere-se também à aplicação do processo de acordo com o invento à incorporação eficaz, reproduzível, fiável e estável da asparaginase. O termo asparaginase pretende referir-se, de acordo com o invento, a qualquer asparaginase de qualquer origem, seja esta natural, sintética, artificial ou recombinante, e aos derivados que a incorporam, por exemplo, combinações de asparaginase e de um polímero tal como polietilenoglicol (PEG) (por exemplo, asparaginase "peguilada" ou pegasparaginase, que é um tipo de asparaginase encapsulada em PEG; por exemplo, Oncaspar<sup>®</sup> que é comercializada pela Enzon and Medac).

De acordo com os vários métodos possíveis, a asparaginase é introduzida na bolsa inicial e/ou na circulação da suspensão a montante e/ou a jusante do cartucho de diálise. É preferivelmente introduzida na circulação da suspensão a montante do cartucho de diálise. Vantajosamente, a fragilidade osmótica é medida na suspensão contendo asparaginase. A suspensão é depois resselada, lavada, opcionalmente adiciona-se a esta uma solução conservante, e depois armazena-se, preferivelmente numa bolsa flexível, pronta a utilizar.

São conhecidos métodos que permitem que a asparaginase seja doseada na suspensão, tal que seja possível ajustar o volume de suspensão na bolsa final de modo a corresponder a uma dose prescrita para o tratamento.

De acordo com uma concretização preferida, o concentrado inicial tem os leucócitos removidos e/ou está irradiado.

De acordo com um aspecto específico, é também introduzido um ingrediente activo que se destina a tratamento combinado, por exemplo, vincristina e/ou metotrexato, e/ou opcionalmente qualquer outro ingrediente activo que seja vantajoso acrescentado à asparaginase.

O invento refere-se também a uma suspensão ou um concentrado de eritrócitos contendo asparaginase que podem ser obtidos por realização do processo do invento. Esta suspensão pode ser produzida numa solução salina farmacologicamente aceitável (geralmente um meio padrão para eritrócitos, uma solução contendo NaCl e um ou mais ingredientes seleccionados entre glucose, dextrose, adenina e manitol; por exemplo, SAG-manitol ou ADSol). Esta solução é capaz de assegurar a conservação dos eritrócitos e pode incluir um aditivo de conservação, tal como L-carnitina. Os eritrócitos podem também conter vincristina e/ou metotrexato, e/ou opcionalmente qualquer outro ingrediente activo que seja vantajoso em conjunção com asparaginase. A suspensão ou concentrado podem ser processados de modo a serem diluídos antes da utilização. A suspensão pode também ser processada de modo a ficar pronta a utilizar. O nível de hematócrito final do produto pronto a utilizar é preferivelmente de 40 a 70%.

O presente invento refere-se também a um processo para tratamento de leucemias linfoblásticas agudas e linfomas, por meio da administração de uma quantidade eficaz de uma suspensão de eritrócitos que contém asparaginase e que pode ser obtida de acordo com o processo do invento. Um aspecto particular do invento compreende uma ou mais amostras de sangue retiradas de um paciente ou de um ou mais doadores, a preparação de um concentrado de eritrócitos, a incorporação de asparaginase de acordo com o invento e a produção de um lote de eritrócitos incorporando asparaginase, depois a administração da suspensão ao paciente, pela via intravenosa. Tipicamente, é administrado um volume de suspensão de eritrócitos processada correspondente a de 60 a 200 unidades de asparaginase por kg de peso corporal.

O invento revela também a utilização de eritrócitos que contêm asparaginase e que podem ser obtidos de acordo com o processo do invento para a preparação de um medicamento ou fármaco destinado a tratar um paciente em relação a uma leucemia linfoblástica aguda ou um linfoma. Um aspecto específico do invento compreende a utilização de uma ou mais unidades de sangue que são colhidas a partir de um paciente ou de um ou mais doadores para a preparação de um concentrado de eritrócitos, a incorporação de asparaginase de acordo com o invento e a produção de um lote de eritrócitos que incorporam asparaginase, para o tratamento do paciente com esses eritrócitos. De acordo com um método específico, a utilização é destinada a produzir uma bolsa que contém uma dose, por exemplo, um volume de suspensão de eritrócitos processados compreendendo o equivalente a de 60 a 200 unidades de asparaginase por kg de peso corporal.

O invento refere-se também à aplicação do processo de acordo com o invento à incorporação eficaz, reprodutível, fiável e estável de fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol e pentafofosfato de inositol, ou os seus derivados. Este é preferivelmente hexafosfato de inositol.

De acordo com os vários métodos possíveis, o fosfato de inositol é introduzido na bolsa inicial e/ou na circulação da suspensão a montante e/ou a jusante do cartucho de diálise. É preferivelmente introduzido na bolsa inicial. É vantajoso medir a fragilidade osmótica na suspensão contendo fosfato de inositol. A suspensão é depois lisada, resselada, lavada, opcionalmente adiciona-se uma solução de conservação, e depois armazena-se, preferivelmente numa bolsa flexível, pronta a utilizar.

São conhecidos métodos que permitem que o fosfato de inositol seja doseado na suspensão, tal que seja possível ajustar o volume de suspensão na bolsa final de modo a corresponder a uma dose prescrita para o tratamento.

De acordo com uma concretização preferida, o concentrado inicial tem os leucócitos removidos e/ou está irradiado.

O invento revela também uma suspensão ou um concentrado de eritrócitos que contêm fosfato de inositol, em particular hexafosfato ou pentafofosfato de inositol, que podem ser obtidos por realização do processo do invento. Essa suspensão pode ser produzida numa solução salina farmacêuticamente aceitável (geralmente, um meio padrão para eritrócitos, uma solução contendo NaCl e um ou mais ingredientes seleccionados entre glucose, dextrose, adenina e manitol; por exemplo, SAG-manitol ou ADSol). Esta solução pode assegurar a conservação dos eritrócitos e pode incluir um aditivo de conservação, tal como L-carnitina. Essa suspensão ou concentrado podem ser processados de modo a serem diluídos antes da utilização. A suspensão pode também ser processada de modo a ficar pronta a utilizar. O nível de hematócrito final do produto pronto a utilizar é preferivelmente de 40 a 70%.

O invento revela também um método para oxigenação tumoral, em particular associado a radioterapia, compreendendo a administração, ao paciente, de uma quantidade eficaz de uma suspensão de eritrócitos que incorporam fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, e que pode ser obtida pelo processo do invento. Um aspecto específico do invento compreende uma ou mais amostras de sangue retiradas de um paciente ou de um ou mais dadores, a preparação de um concentrado de eritrócitos, a incorporação de fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, de acordo com o invento, e a produção de um lote de eritrócitos que incorporam esse composto, depois a administração da suspensão ao paciente pela via intravenosa. Preferivelmente, esse método está associado a tratamento de radioterapia e é assim possível administrar, através da via intravenosa, os eritrócitos processados continuamente durante todo ou parte do tratamento de radioterapia e preferivelmente, para além disso, antes e/ou após esse tratamento, durante um período de tempo suficiente.

O método pode ser utilizado no tratamento de vários cancros e em particular cancros dos pulmões, próstata, recto, esófago bem como tumores do cérebro. O método destina-se em particular a tumores que são fracamente sensíveis a radiação, geralmente hipóxicos, e em particular a gliomas malignos. De

acordo com aspectos específicos do invento, o método destina-se ao tratamento de glioblastoma e de cancros ENT (*ear-nose-throat*, ouvido-nariz-pescoço).

O presente invento revela adicionalmente a utilização destes eritrócitos que contêm fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, que podem ser obtidos de acordo com o processo do invento, para a preparação de um medicamento ou fármaco destinado a tratar um paciente contra um cancro do tipo dos acima descritos, em particular em associação com um programa de radioterapia. Um aspecto específico do invento compreende a utilização de uma ou mais unidades de sangue que são colhidas a partir de um paciente ou de um ou mais dadores para a preparação de concentrados de eritrócitos, a incorporação do composto activo de acordo com o invento e a produção de lotes de eritrócitos incorporando esse composto, para o tratamento do paciente com esses eritrócitos.

O invento revela também um método para tratamento de drepanocitose ou outro estado hipóxico compreendendo a administração, ao paciente, de uma quantidade eficaz de uma suspensão de eritrócitos que incorporam fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, e que pode ser obtida pelo processo do invento. Um aspecto específico do invento compreende uma ou mais amostras de sangue retiradas de um paciente ou de um ou mais dadores, a preparação de um concentrado de eritrócitos, a incorporação de fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, de acordo com o invento, e a produção de um lote de eritrócitos que incorporam esse composto, depois a administração da suspensão ao paciente pela via intravenosa.

O presente invento revela adicionalmente a utilização desses eritrócitos que contêm fosfato de inositol, em particular hexafosfato de inositol, que podem ser obtidos de acordo com o processo do invento, para a preparação de um medicamento ou fármaco destinado a tratar um paciente com hipoxia. A hipoxia é caracterizada por uma entrega de oxigénio baixa aos tecidos, particularmente a músculos e ossos. Este tratamento é particularmente interessante para tratar um paciente sofrendo de drepanocitose. Um aspecto

específico compreende a utilização de uma ou mais unidades de sangue que são colhidas a partir de um paciente ou de um ou mais dadores para a preparação de concentrados de eritrócitos, a incorporação do composto activo de acordo com o invento e a produção de lotes de eritrócitos incorporando esse composto, para o tratamento do paciente com esses eritrócitos.

O hexafosfato de inositol ou similar incorporado nos eritrócitos conduz a uma diminuição da afinidade por oxigénio da hemoglobina. Isto conduz a uma melhor oxigenação de tecidos e a uma redução dos sintomas de hipoxia devida a drepanocitose. A P50 é a pressão de  $O_2$  ( $PO_2$ ) correspondendo a 50% de saturação de oxigénio da hemoglobina. Um aumento de P50 de 25 mmHg conduz a um aumento da oxigenação de cerca de duas vezes (a oxigenação é a diferença em saturação entre os valores de  $PO_2$  de 100 mmHg e 40 mmHg). Deste modo, para um adulto possuindo 2000 mL de glóbulos vermelhos, a transfusão de um saco de sangue contendo 200 mL de eritrócitos contendo hexafosfato de inositol pode conduzir a um aumento de mais de 10% de eritrócitos possuindo um poder de oxigenação que é duas vezes o normal. Isto conduz a mais de 20% de aumento da oxigenação o que é benéfico em indivíduos com hipoxia.

O método pode compreender transfusões de um volume representando entre 5 e 20%, preferivelmente 10-15% da massa de eritrócitos do indivíduo, e a frequência de transfusão pode ser vantajosamente de uma por mês ou dois meses.

O invento será agora descrito em maior detalhe através de exemplos não limitantes por referência a concretizações e aos desenhos, nos quais:

- A Figura 1 é uma representação esquemática de um dispositivo de lise/resselagem de acordo com o invento;
- A Figura 2 é um fluxograma básico do processo;
- A Figura 3 é um gráfico mostrando o progresso da hemólise dos eritrócitos, expressa como uma concentração (g/L) de NaCl que efectua 50% de hemólise de acordo com o tempo de incubação expresso em minutos;
- A Figura 4 é um gráfico similar ao da Figura 3, a hemólise sendo medida neste caso na presença de asparaginase (200 IU/ml);

- A Figura 5 é um gráfico similar aos das Figuras 3 e 4, a medição sendo realizada na presença de asparaginase (400 IU/ml); e
- A Figura 6 é um gráfico mostrando o rendimento de encapsulação de acordo com a concentração em g/L de NaCl que efectua 50% de hemólise.

### **EXEMPLO 1 : INSTALAÇÃO**

É primeiro feita referência à Figura 1. Uma primeira moldura em linhas a tracejado indica um primeiro módulo 1 que é de forma geralmente paralelepipedica que compreende uma face frontal de vidro, que não está ilustrada, e que é formada de modo a poder ser aberta e fechada. Bombas peristálticas P1, P2 e P3 e meios de recepção (não ilustrados) de uma montagem removível, que será agora descrita, estão dispostos no fundo desse módulo. As bombas P1 e P3 têm um caudal predeterminado constante. A bomba P2 é controlada de modo a fazer variar o caudal.

A montagem removível compreende uma bolsa flexível 2 que contém a suspensão de eritrócitos a serem lisados. Essa bolsa 2 está provida com um tubo flexível 3, numa configuração tipo alça, que coopera com a bomba P1 de modo a efectuar a circulação para e a partir da bolsa de modo a manter os eritrócitos em suspensão. A bolsa está adicionalmente ligada, na sua base, a um tubo flexível 4 que está ligado à entrada do compartimento de "sangue" de um cartucho de diálise 5. Esse tubo 4 coopera com a bomba P2 que efectua a circulação da suspensão da bolsa para o cartucho. Uma seringa do tipo pistão controlado PS1 está ligada ao tubo 4 a montante do cartucho 5, essa seringa do tipo pistão destinando-se a introduzir um ingrediente activo na circulação de eritrócitos. A saída do compartimento de "sangue" do cartucho 5 está ligada a um tubo de saída flexível 6 que se abre fora do módulo 1. Uma segunda seringa do tipo pistão controlado PS2 está ligada ao tubo 6, essa seringa do tipo pistão destinando-se a introduzir um ingrediente activo na circulação de eritrócitos lisados. Um frasco 7 que contém uma solução de lise está disposto no módulo 1 e está ligado à entrada de "dialisado" do cartucho 5 por um tubo flexível 8 que coopera com a bomba P3 que efectua a circulação da

solução de lise através do cartucho 5. Finalmente, a solução de lise que é descarregada a partir do cartucho é evacuada do módulo 1 por um tubo de evacuação flexível 9 que se abre para o interior de um frasco 10 que está localizado fora do módulo 1.

O tubo de saída 6 prolonga-se para o interior de um segundo módulo 11 que é geralmente de forma paralelepipedica e que compreende uma face frontal de vidro que não está ilustrada e que é formada de modo a poder ser aberta e fechada. Meios (não ilustrados) para elementos de recepção que formam parte da montagem removível estão dispostos no fundo desse módulo. Estes compreendem uma bolsa flexível 12 que está ligada ao tubo 6 e na qual a suspensão lisada é armazenada. Uma seringa do tipo pistão controlada PS3 está ligada ao tubo 6 e permite que o produto de resselagem seja injectado.

A montagem removível é completamente produzida a partir de material de plástico flexível e transparente que proporciona total visibilidade do processo.

O dispositivo está adicionalmente provido com vários meios que não estão ilustrados:

- meios que permitem que o interior do módulo 1 seja arrefecido e que a temperatura seja aí controlada a entre +2 e +4°C, compreendendo *inter alia* uma sonda de temperatura que está colocada no tubo 3 de modo a medir a temperatura da suspensão que aí circula, uma sonda de temperatura para medir a temperatura T1 no interior do módulo 1,
- o módulo 11 está adicionalmente provido com meios que permitem que o interior do módulo 11 seja aquecido e que a temperatura T2 seja aí controlada entre +37 e +38°C; uma sonda de temperatura está colocada no interior do módulo,
- meios para detectar (por exemplo, meios de ultra-sons ou colorimétricos) a presença de eritrócitos nos tubos em D1 e D2,
- meios PR1 para medir a pressão na entrada do cartucho de diálise,

- um dispositivo electrónico que recebe, em primeiro lugar, a informação das sondas de temperatura, sondas de pressão e meios de detecção e, em segundo lugar, a informação referente aos ajustamentos dos parâmetros de lise; com base nesses dados, o dispositivo controla as bombas P1, P2 e P3. Um fluxograma do processo está ilustrado na Figura 2.

O dispositivo electrónico é constituído por um computador que está concebido para executar o fluxograma acima.

De acordo com uma particularidade adicional, regista os parâmetros de cada procedimento de lise e deste modo de cada concentrado processado.

## **EXEMPLO 2 : ENCAPSULAÇÃO DE ASPARAGINASE**

Neste exemplo, a fragilidade osmótica é definida pela concentração de NaCl expressa em g/L que efectua cerca de 50% de hemólise.

### **1) Influência de asparaginase na fragilidade osmótica:**

#### **a. Preparação de soluções de asparaginase**

Injectaram-se 2,5 ml de NaCl a 0,9% por meio de uma seringa, através do septo, para o interior do balão que contém 10000 IU de asparaginase em forma de pó. Agitou-se a mistura até se dissolver, obtendo-se então uma solução mãe numa concentração de 4000 IU/ml. Removeu-se o conteúdo por meio da seringa e colocou-se este num tubo de hemólise de 5 ml. Prepararam-se 3 soluções e armazenaram-se a +4°C: à solução mãe adicionaram-se uma solução de 0 IU/ml (constituindo um controlo de NaCl a 0,9%), uma solução de 3200 IU/ml (adicionaram-se 625 µl de solução de NaCl a 0,9% à solução mãe) e uma solução de 1600 IU/ml (retirou-se 1 ml da solução 3200 IU/ml, ao qual se adicionou 1 ml de solução de NaCl a 0,9%).

b. Lavagem dos glóbulos vermelhos

- Começou-se com sangue inteiro que foi colhido sobre citrato-fosfato-dextrose e centrifugado a +4°C durante 20 minutos a 1000 g.
- Decantou-se o plasma e removeu-se a camada leucocitária.
- Adicionou-se NaCl a 0,9% a +4°C, volume para volume, ao concentrado de glóbulos vermelhos.
- Realizou-se a centrifugação durante 20 minutos a 1000 g, e depois removeu-se o sobrenadante.
- Realizou-se uma segunda operação de lavagem, e depois uma terceira, repetindo ambos os passos precedentes.
- Removeu-se o sobrenadante e ajustou-se o hematócrito a 80% com uma solução de NaCl a 0,9%.
- Prepararam-se tubos com um volume de suspensão de glóbulos vermelhos de 875 µL.

Isto foi realizado com 6 amostras de sangue de 6 doadores diferentes.

c. Adição da solução de asparaginase

- Mediu-se a fragilidade osmótica inicial em relação às 6 amostras.
- Adicionaram-se 125 µL de solução de asparaginase de 0, 1600 ou 3200 IU/ml com 6 tubos para cada concentração de asparaginase; agitou-se suavemente cada tubo durante alguns momentos. As concentrações finais contidas nos três grupos de seis tubos são: 0, 200 e 400 IU/ml. Os tubos foram armazenados a +4°C sobre gelo esmagado até se medir a fragilidade osmótica.
- Testaram-se 4 tempos de incubação: 5, 15, 30 e 60 minutos. O fim do tempo de incubação é definido como a remoção do tubo do gelo esmagado.
- A medição de fragilidade osmótica é realizada à temperatura ambiente.

d. As medições de fragilidade osmótica são realizadas no dispositivo comercializado pela SODEREL MEDICAL, Haillecourt, França, com a marca OSMOCELLS®.

## e. Resultados

O desenvolvimento e dispersão da fragilidade osmótica dos eritrócitos antes da diálise, na ausência ou na presença de asparaginase, são apresentados nas Figuras 3, 4 e 5.

Estes resultados demonstram uma grande variabilidade da fragilidade osmótica dos eritrócitos de uma amostra de sangue para a seguinte, de acordo com a concentração de asparaginase presente e de acordo com o tempo. Estes resultados enfatizam a importância da medição da fragilidade osmótica na amostra de eritrócitos a ser processada, tão próximo quanto possível da fase de diálise, e preferivelmente na presença da asparaginase a ser encapsulada.

## 2) Processo de encapsulação e resselagem:

### a. Equipamento

- Cartucho de diálise:
  - modelo PRISMA M60 PPI comercializado pela GAMBRO, Lakewood, CO, E.U.A.
  - dimensões (cm): 38 × 21 × 9
  - volume da câmara de sangue: 84 ml
  - fibras ocas: copolímero de acrilonitrilo e metalilsulfonato de sódio
  - área superficial eficaz: 0,60 m<sup>2</sup>
- Parâmetros de operação da instalação:
  - P1 = 20 ml/min
  - P2 = variável
  - P3 = 150 ml/min
  - PS3 = 10% de P2
  - T2 = 30 min.

### b. Produtos

- Glóbulos vermelhos embalados fornecidos pelo "Centre de Transfusion Sanguine" (Centro de Transusão de Sangue Francês), o que equivale a dizer, glóbulos vermelhos em suspensão em SAG-manitol,
- Ajustamento do hematócrito a 70%.

- Solução de asparaginase: utilizada para ter 400 IU por ml de suspensão de glóbulos vermelhos antes da diálise.

### c. Resultados

A Figura 6 mostra o rendimento de encapsulação no caso de 400 IU/ml de asparaginase com um caudal P2 de 22 ml/min no dialisador. Parece que o rendimento de encapsulação varia de acordo com a fragilidade osmótica antes da diálise (5 amostras). A optimização do processo do invento é efectuada pelo ajustamento dos parâmetros de diálise, e em particular o caudal da suspensão de eritrócitos no dialisador, de acordo com a fragilidade osmótica medida, de modo a assegurar um rendimento de encapsulação que é tão constante quanto possível apesar da variabilidade inerente nas amostras de sangue.

Com o caudal P2 (caudal da suspensão de eritrócitos no cartucho de diálise) sendo retirado como o meio de ajustamento, foi possível estabelecer os níveis óptimos seguintes para o cartucho de diálise utilizado.

**Tabela 1:**

| Fragilidade osmótica g/L | CAUDAL P2 ml/min |
|--------------------------|------------------|
| > 4,7                    | 24               |
| 4 a 4,7                  | 25               |
| 3,5 a 4                  | 22               |
| < 3,5                    | 20               |

A redução no caudal P2 para uma fragilidade osmótica >4,7 é explicada por fenómenos resultantes da diálise. O aumento na pressão transmembrana para caudais na ordem de 26 ml/min e superiores resulta num aumento no efeito de osmose. Deste modo, é vantajoso diminuir o caudal P2, como indicado.

Foram também seguidos parâmetros hematológicos e de incorporação de 7 amostras de eritrócitos diferentes processadas pelo processo de acordo com o invento (com P2 ajustada de acordo com Tabela 1 dependendo da fragilidade osmótica de cada amostra), e esses parâmetros hematológicos

foram comparados com os valores obtidos para um indivíduo saudável. As médias dos parâmetros hematológicos medidos são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:**

| Parâmetros Hematológicos                                                   | Material celular inicial | Produto final (J0) | Produto final após +24h a +4°C | Valores normais (células na circulação) |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|
| Volume celular médio (MCV) (fentolitro)                                    | 84,7 ± 2,9               | 76,6 ± 3,9         | 80 ± 3,7                       | 83-97                                   |
| Hemoglobina celular média (pg)                                             | 28,4 ± 1,7               | 22,1 ± 0,7         | 22,5 ± 1,6                     | 28 - 32                                 |
| Concentração de hemoglobina celular média (%)                              | 34,0 ± 1,2               | 29,2 ± 0,9         | 27,9 ± 1,2                     | 31 - 35                                 |
| Fragilidade osmótica (Salinidade induzindo cerca de 50% de hemólise) (g/l) | 3,97 ± 0,5               | 3,53 ± 0,4         | Não realizado                  | 3,7 - 4,3                               |
| Hematócrito da suspensão (%)                                               | 60,5 ± 3                 | 50,4 ± 2,6         | 47,6 ± 3                       | NA                                      |
| Concentração de hemoglobina da suspensão (g/dl)                            | 18,7 ± 1,1               | 12,9 ± 0,7         | 13,1 ± 0,6                     | NA                                      |
| Concentração de eritrócitos (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )            | 6,31 ± 0,44              | 5,8 ± 0,44         | 5,8 ± 0,37                     | NA                                      |
| Hemoglobina extracelular (g/dL)                                            | 0                        | 0                  | 1                              | NA                                      |
| NA = não aplicável                                                         |                          |                    |                                |                                         |

#### **Parâmetros de incorporação:**

A dosagem de asparaginase é efectuada nos eritrócitos após lise através de liofilização, utilizando o método descrito em J.L. Orsonneau, Annales de Biologie Clinique 2004, vol. 62, N.º 5.

- Nível globular médio de asparaginase expresso em IU de asparaginase por 10<sup>9</sup> eritrócitos: 10 ± 1,1.
- Concentração globular média de asparaginase expressa em IU/ml de eritrócitos: 112 ± 11,3.

- Rendimento de encapsulação (concentração globular de asparaginase no produto final/concentração de asparaginase antes da diálise):  $29,8\% \pm 2,1$ .

Em testes preliminares realizados em 14 amostras diferentes sem ter em conta a fragilidade osmótica e sem ajustamento do caudal, mas com caudais P2 de 18 a 30 ml/min, foi possível medir um rendimento de encapsulação médio de  $32 \pm 12,4\%$ , o que representa uma variabilidade excessivamente grande. Pelo contrário, o ajustamento do caudal P2 na experiência acima permitiu obter um rendimento de encapsulação médio muito mais homogéneo ( $29,8\% \pm 2,1$ ).

Lisboa, 2012-01-31

### REIVINDICAÇÕES

1. Processo de lise/resselagem para preparação de eritrócitos que contêm um ingrediente activo, o processo compreendendo os passos seguintes:

(1) - colocação de um concentrado globular em suspensão numa solução isotónica possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65%, com refrigeração entre +1 e +8°C.

(2) - medição da fragilidade osmótica com base numa amostra de eritrócitos a partir desse mesmo concentrado globular,

os passos 1 e 2 sendo susceptíveis de ser realizados em qualquer ordem,

(3) - lise e procedimento de internalização do ingrediente activo, no interior da referida câmara, a uma temperatura que é mantida constantemente entre +1 e +8°C, compreendendo permitir à suspensão de eritrócitos possuindo um nível de hematócrito que é igual ou superior a 65% e a uma solução de lise hipotónica que está refrigerada entre +1 e +8°C circular num cartucho de diálise; os parâmetros de lise sendo ajustados de acordo com a fragilidade osmótica medida previamente, onde com base na medição de fragilidade osmótica, é ajustado o caudal da suspensão de eritrócitos que passa no interior do cartucho de diálise, ou é seleccionada a osmolaridade da solução de lise, e

(4) - procedimento de resselagem realizado numa segunda câmara a uma temperatura entre +30 e +40°C por meio de uma solução hipertónica.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, onde a fragilidade osmótica é medida por meio de um dispositivo de medição que está configurado de modo a medir a fragilidade osmótica de uma amostra de eritrócitos em menos de 15 minutos e o resultado obtido é utilizado dentro de um breve período de tempo de modo a ajustar os parâmetros de lise.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde um ou mais dos parâmetros de hemólise da amostra de eritrócitos é/são medidos contra uma solução hipotónica,

possuindo uma isotonicidade conhecida, através de uma membrana semipermeável.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, onde é/são medidos um ou mais dos parâmetros seguintes:

- a. a osmolaridade do meio para a qual a hemólise aparece,
- b. a velocidade de hemólise, que é estabelecida pelo gradiente da porção linear da curva de % de hemólise =  $f(\text{osmolaridade do meio})$ ,
- c. a percentagem de hemólise para uma dada osmolaridade,
- d. a osmolaridade que permite obter 50% de hemólise,
- e. o tempo para a obtenção de uma dada percentagem de hemólise.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde é utilizado um módulo refrigerado provido com controlo de temperatura, uma bolsa da suspensão de eritrócitos que está refrigerada entre +1 e +8°C que está colocada no módulo, e está ligada, ou se destina a ser ligada, a uma montagem removível de uso único, estéril, que compreende um cartucho de diálise, tubos para ligar o cartucho, de um lado, à bolsa e, do outro lado, ao frasco, o módulo compreendendo adicionalmente meios que podem resultar na circulação da suspensão de eritrócitos e da solução de lise, módulo dentro do qual a temperatura está estabilizada entre +1 e +8°C.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, onde o procedimento de lise é iniciado quando a temperatura da suspensão na bolsa é entre +1 e +8°C.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde é mantido um nível estável de hematócrito na suspensão durante todo o tempo da sua passagem no cartucho de diálise.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, onde é utilizada uma bolsa que está provida com uma circulação tipo alça externa que pode efectuar a circulação da suspensão para e a partir da bolsa.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o ingrediente activo está presente na bolsa de suspensão e/ou é introduzido na circulação de suspensão antes e/ou após a passagem através do cartucho de diálise.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o concentrado globular contém eritrócitos que foram previamente processados com uma solução que pode aumentar e/ou homogeneizar a sua resistência osmótica.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde a temperatura durante os passos 1 e 3 é mantida a entre +2 e +6°C, e é preferivelmente aproximadamente +4°C.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o ingrediente activo é seleccionado entre asparaginase e hexafosfato de inositol.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, para produzir eritrócitos incorporando asparaginase destinados a tratar um paciente contra leucemias linfoblásticas agudas e linfomas, ou para produzir eritrócitos incorporando hexafosfato de inositol destinados a tratar tumores hipóxicos em associação com um tratamento de radioterapia ou a tratar drepanocitose ou outro estado hipóxico.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, onde a fragilidade osmótica é medida numa amostra da suspensão obtida no passo (1).

15. Processo de acordo com a reivindicação 1, onde a medição da fragilidade osmótica realizada é utilizada rapidamente o que equivale a dizer que o procedimento de lise é realizado num tempo curto após a amostra ser retirada, o intervalo de tempo entre a amostra ser retirada e o início da lise sendo menor ou igual a 30 minutos, preferivelmente menor ou igual a 25 minutos mais preferivelmente menor ou igual a 20 minutos.

**16.** Processo de acordo com a reivindicação 2, onde é utilizado um dispositivo que junta, de um lado e do outro lado de uma membrana semipermeável, a amostra da suspensão de eritrócitos a ser avaliada e uma solução hipotónica, possuindo isotonicidade conhecida, por exemplo, água destilada, em volumes adequados, de modo a gerar hemólise lenta dos eritrócitos à medida que os iões de NaCl se difundem para a solução, por exemplo, água destilada, onde o progresso da hemólise ao longo do tempo é seguido por uma medição da transmitância por meio de um feixe laser que tem um comprimento de onda de 808 nm e uma célula fotoelétrica mede as variações na luz transmitida através da suspensão.

**17.** Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 16, onde a medição da fragilidade osmótica é conduzida em eritrócitos ou numa suspensão contendo os mesmos a uma temperatura próxima de ou idêntica à temperatura seleccionada para lise.

**18.** Processo de acordo com a reivindicação 4, onde a resistência osmótica é caracterizada através dos parâmetros b, d, ou b e d.

**19.** Processo de acordo com a reivindicação 14, onde a suspensão obtida no passo (1) contém o ingrediente activo.

**20.** Processo de acordo com a reivindicação 3, 4 ou 18, onde é medida a concentração de NaCl em g/L que resulta em cerca de 50% de hemólise (parâmetro d.) e o caudal da suspensão de eritrócitos no cartucho de diálise é ajustado de acordo com os valores de concentração medidos.

**21.** Processo de acordo com a reivindicação 1, onde o procedimento de lise é iniciado quando a temperatura da suspensão de eritrócitos é entre +1 e +8°C, e a fragilidade osmótica foi medida e os parâmetros de lise registados.

**22.** Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde a solução de lise flui através do cartucho de diálise a um caudal constante.

Figura 1

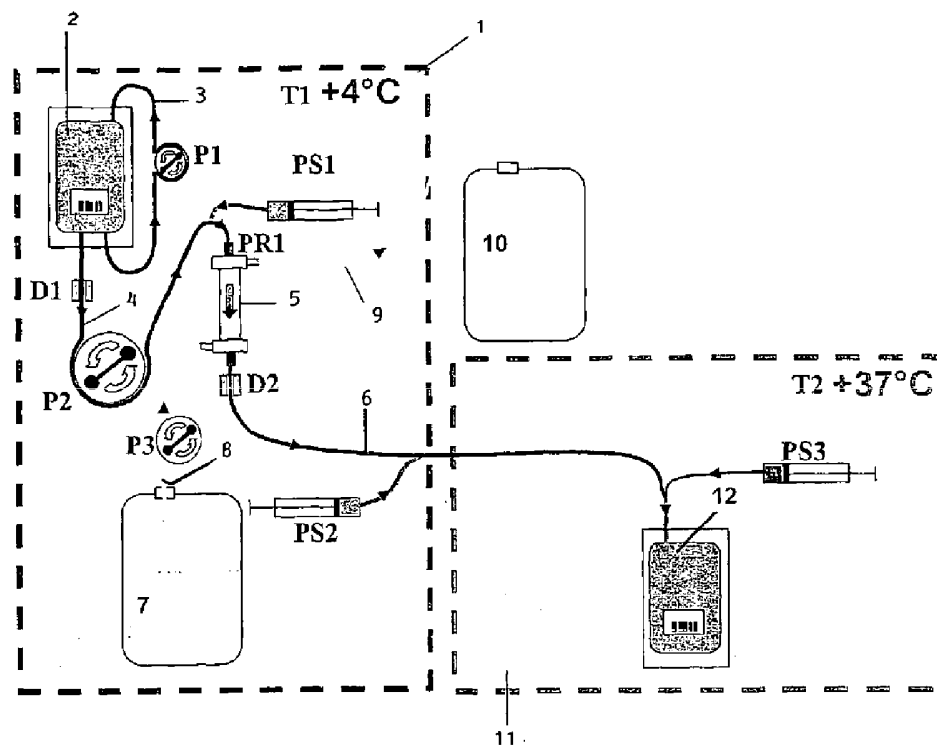


Figura 2

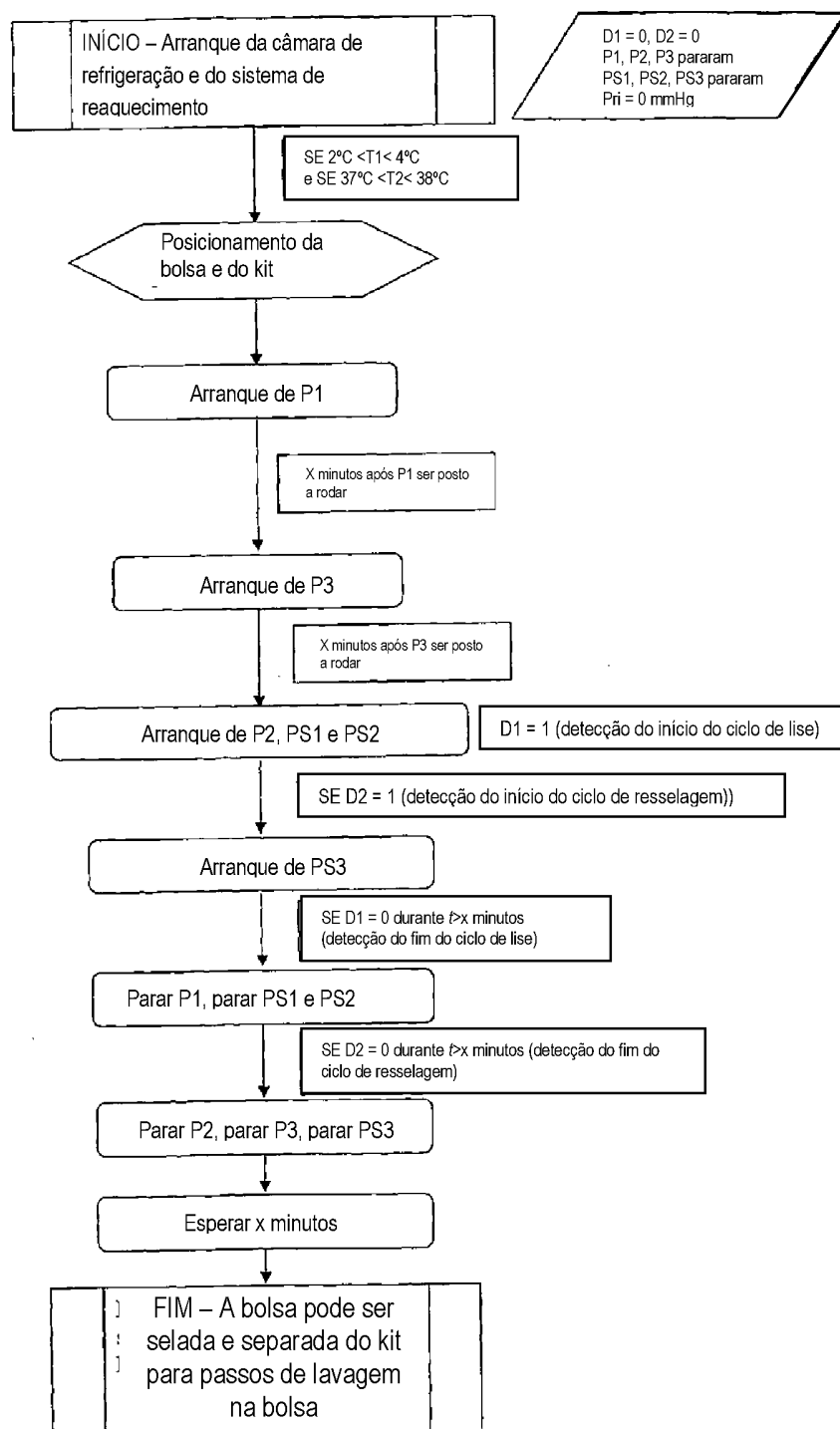


Figura 3

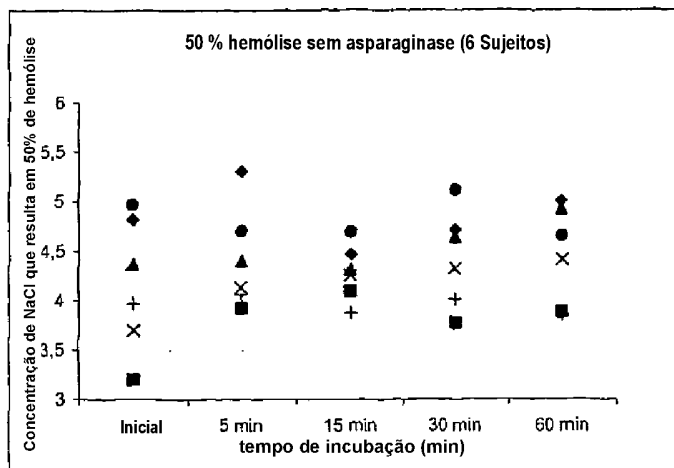


Figura 4

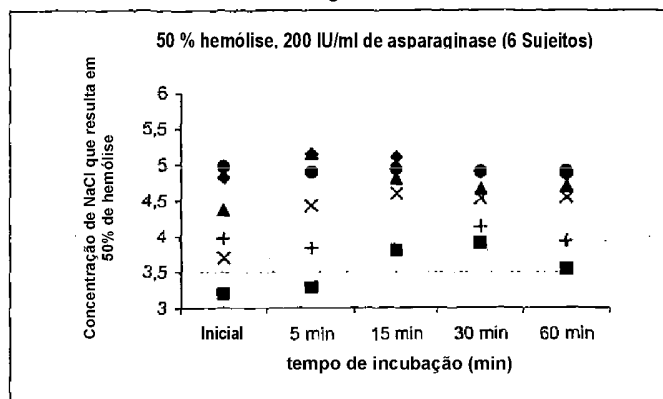


Figura 5

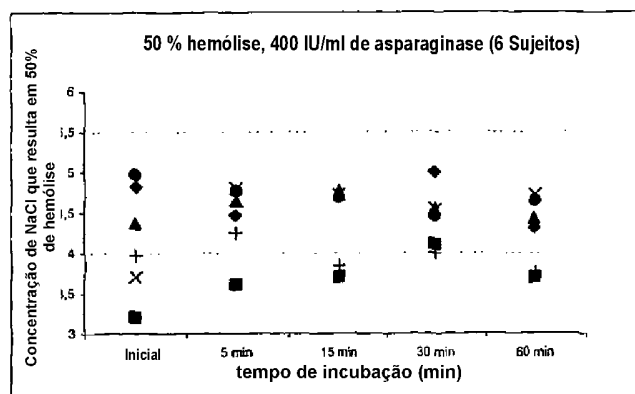


Figura 6

