

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 540**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2017 PCT/EP2017/059626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17186626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2017 E 17718923 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023 EP 3448452**

54 Título: **Dispositivo para extraer entidades biológicas y/o químicas indeseables de fluidos biológicos**

30 Prioridad:

26.04.2016 IT UA20162865

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

20.07.2023

73 Titular/es:

**ISTITUTO ROMAGNOLO PER LO STUDIO DEI TUMORI "DINO AMADORI" - IRST S.R.L. (50.0%)
Via Pietro Maroncelli 40
47014 Meldola (FC), IT y
RIGAUD, MICHEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RIGAUD, MICHEL;
ZOLI, WAINER;
FABBRI, FRANCESCO;
GALLERANI, GIULIA y
FICI, PIETRO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 946 540 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

Dispositivo para extraer entidades biológicas y/o químicas indeseables de fluidos biológicos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para extraer al menos una entidad biológica, bioquímica y/o química indeseable, por ejemplo, sustancias tóxicas y/o células tumorales, de un volumen de fluido biológico, por ejemplo, sangre, o más bien sangre extraída temporalmente de un paciente. por medio de un circuito extracorpóreo [o sistema de circulación extracorpóreo (ECS)].

10 La presente invención también se refiere a un sistema de circulación extracorpóreo correspondiente que comprende dicho dispositivo para la extracción de al menos una entidad biológica y/o química indeseable de un volumen de sangre extracorpórea.

En particular, la presente invención se refiere a un "dispositivo de cirugía líquida ex vivo", así como a un sistema de "cirugía líquida ex vivo" para la extracción de células tumorales circulantes (CTCs) del volumen de sangre total (TBV) de un paciente con cáncer, durante un procedimiento repetido de circulación sanguínea extracorpórea, con el fin de disminuir o evitar la propagación de metástasis y el riesgo de recaída.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

20 Las células tumorales circulantes (CTC) son entidades biológicas liberadas al torrente sanguíneo circulante, principalmente desde el tumor primario, capaces de dar lugar a las denominadas metástasis (Zhank L. et al., Sci Transl Med, 2013; Baccelli I. et al., Nat Biotech, 2014; Aceto N, et al., Cell, 2014). Dado que las metástasis son la primera causa de muerte por tumores, la importancia biológica y clínica de estas células es incuestionable. La captura y la extracción de células de este tipo del cuerpo de un paciente con cáncer podría limitar y/o prevenir el riesgo de diseminación metastásica de la enfermedad y posibles recaídas, así como un enfoque quirúrgico convencional de un tumor sólido puede limitar la enfermedad o incluso curar a un paciente de cáncer.

25 Las CTCs se identificaron por primera vez en 1869, pero solo en los últimos 15 años una extensa investigación científica ha definido el papel y el potencial diagnóstico, pronóstico y predictivo de las mismas. Su valor clínico potencial, así como su valor clínico en términos de pronóstico son incuestionables. De hecho, detectar, "capturar" y estudiar estas células y sus características biomoleculares permitiría un tratamiento terapéutico más específico y eficaz del paciente. Posteriormente, extraer todas, o al menos una gran parte, de dichas células del torrente sanguíneo permitiría reducir o evitar drásticamente el riesgo de propagación metastásica de la enfermedad, aumentando así la supervivencia de los pacientes o su supervivencia libre de la enfermedad. Sin embargo, hasta ahora, el único uso clínico documentado de las CTCs es el pronóstico definido en función de su abundancia. Además, hasta ahora, el valor pronóstico del número de CTCs en la sangre periférica se ha documentado solo en cánceres de mama, colon y próstata en estadio metastásico, demostrando un mejor pronóstico para los pacientes que tienen menos de 5 CTCs / 7,5 ml de sangre periférica. Todo esto se debe a las características intrínsecas de las CTCs, es decir, su rareza, heterogeneidad y plasticidad.

35 En resumen, las CTCs han demostrado ser una herramienta clínica valiosa solo como un marcador de pronóstico y no como un factor que puede conducir a una terapia más específica y eficaz que ayude en la elección del o de los medicamentos que se utilizarán para aumentar la supervivencia de los pacientes (Joosse SA y Pantel K, Cancer Res, 2013; Alix-Panabieres C y Pantel K, Clin Chem, 2013; Krebs MG y otros, Nat Rev Clin Oncol, 2014; Joosse SA et al., EMBO Molecular Medicine, 2014). Además, las CTCs nunca han sido un objetivo directo de un enfoque terapéutico.

40 Las CTCs son células bastante raras, es decir, 1 - 10 células por mililitro de sangre periférica y, a menudo, son genética, fenotípica y funcionalmente heterogéneas. Estos valores se encuentran en la mayoría de los pacientes con tumores sólidos en estadio metastásico (es decir, en todos aquellos en los que fueron analizados/estudiados). En tumores sólidos que no se encuentran en estadio metastásico su frecuencia es aún menor. Pueden adquirir propiedades de tipo tallo y cambiar dinámicamente con el tiempo, pasando de un estado más epitelial a uno más mesenquimal y viceversa, a través de procesos conocidos como transiciones epiteliales a mesenquimales y mesenquimales a epiteliales (EMT y MET). Durante estos procesos, las CTCs cambian literalmente su fenotipo regulando a la baja antígenos específicos, mientras que regulan al alza a otros. Por ejemplo, durante/a través de la EMT, las CTCs pueden perder la expresión de un marcador epitelial clave, es decir, EpCAM, y adquirir un marcador mesenquimal central, es decir, N-cadherina, o un marcador relacionado con la troncalidad, es decir, ABC-G2. Las CTCs pueden moverse dentro del sistema circulatorio individualmente o en agrupaciones. Las agrupaciones poseen un potencial metastásico aumentado de 23 a 50 veces con respecto a las CTCs individuales (SA Joosse et al., EMBO Mol Med, 2014; MG Krebs et al., Nat Rev Clin Oncol, 2014; T Brabletz, Cancer Cell, 2012; Y Kang y K Pantel, Cancer Cell, 2013; N. Aceto et al., Cell, 2014).

55 Por lo tanto, existe una serie de poblaciones de CTC, epiteliales, mesenquimales, epiteliales-mesenquimales híbridas, similares a tallos, CTCs individuales, agrupaciones de CTC. Todos los pacientes con tumores sólidos son potenciales portadores de CTC, independientemente del estadio de la enfermedad. Por lo tanto, potencialmente todos los tumores sólidos, aproximadamente el 95-98 % de todos los tumores, tienen CTCs. Sin embargo, solo algunos de ellos

mostrarán una diseminación de CTC en sangre clínicamente relevante. De hecho, algún tipo de tumor se disemina solo localmente y/o no preferentemente a través de los vasos sanguíneos (p. ej., cáncer de cabeza y cuello). Por lo tanto, solo un tipo específico de tumor podría beneficiarse realmente de la extracción de las CTCs del TBV. Por ejemplo, los tumores que realmente pueden beneficiarse de la extracción de las CTCs serán aquellos que metastatizan más a través de los vasos sanguíneos y que también son más propensos a diseminar las CTCs lejos del tumor primario, tal como el cáncer de mama y de pulmón. Las CTCs también pueden estar presentes en los primeros meses de la enfermedad. Desde este punto de vista, a nivel clínico y de utilidad clínica, evitar su diseminación lo antes posible puede ser mucho más eficaz que inhibir su propagación cuando el tumor ya ha metastatizado en múltiples sitios. Como se mencionó anteriormente, las CTCs son fenotípicamente heterogéneas entre sí, es decir, los antígenos expresados en su superficie pueden ser diferentes de una célula a otra y son capaces de mutar con el tiempo. Esto significa que durante la progresión de la enfermedad pueden adquirir y/o perder antígenos. En otras palabras, las células tumorales circulantes constituyen una población celular poco común que consiste en varias subpoblaciones definidas como, por ejemplo, células epiteliales, células epiteliales-mesenquimales híbridas, células mesenquimales, células madre tumorales circulantes mesenquimales y/o epiteliales; por tanto, un conjunto de características biomoleculares que las hacen extremadamente difíciles de detectar e investigar.

A pesar de la importancia de las CTCs, todos los enfoques conocidos, informados en el estado de la técnica, se refieren a métodos que profundizan en las CTCs desde un único o pocos puntos de vista. Además, las CTCs se han investigado solo como marcadores sin demostrar todo su potencial. En la actualidad, nadie las explota como dianas y sin utilizar fármaco alguno que fije específicamente como objetivo a las CTCs. Las CTCs son la "fase leucémica" de un tumor sólido y, por tanto, merecen la misma importancia y un enfoque similar reservado a la masa tumoral primaria o metastásica: una verdadera "cirugía líquida".

Hasta la fecha, los principales sistemas de análisis y captura de estas células se basan en sus propiedades biológicas, por ejemplo, proporcionando el uso de anticuerpos individuales dirigidos contra antígenos expresados en su superficie (p. ej., en particular EpCAM), o propiedades físicas, al ser capaces de seleccionar las CTCs por tamaño o densidad celular, o en combinaciones de enfoques biológicos y físicos. Sin embargo, estos métodos exhiben el inconveniente de seleccionar células que expresan solo uno o unos pocos antígenos epiteliales y, especialmente, de analizar solo pequeños volúmenes de sangre periférica, normalmente inferiores a 30 ml.

Independientemente del tipo de método elegido, de hecho, en la mayoría de los casos, el análisis de las CTCs siempre se realiza en un pequeño volumen de sangre periférica, p. ej., 5 - 10 mililitros. Si, por un lado, una pequeña extracción de sangre es barata y poco invasiva para los pacientes, por otro lado, disminuye considerablemente las posibilidades de detectar células que son tan raras. Como lo demuestra Coumans et al. Clinl, Cancer Res, 2012, a medida que aumenta el volumen de sangre analizada, también aumenta la probabilidad de detectar y posiblemente extraer las CTCs. Además, se ha demostrado (mediante una extrapolación matemática) que en el 99 % de los pacientes con un tumor metastásico se puede detectar al menos una CTC una vez analizado todo el volumen de sangre, es decir, el volumen de sangre total (TBV). El TBV es el volumen de sangre que habitualmente circula en un ser humano/paciente. Normalmente, este volumen consiste en hasta unos 3-5 litros. De ello se deduce que para detectar y luego extraer el mayor número de células tumorales circulantes es necesario analizar un volumen de sangre lo más grande posible.

Para luego realizar una verdadera biopsia/cirugía líquida y, por tanto, detectar y extraer el mayor número posible de CTCs, se requiere un aumento sustancial del volumen de sangre periférica que se analiza y, por tanto, del rendimiento de las propias CTCs. Dado que obviamente es imposible extraer grandes cantidades de sangre de un paciente sin causarle daños, una posibilidad es utilizar un método de extracción de las CTCs conectado a un sistema de circulación extracorpórea (ECS). Según lo declarado por Allard WJ y Terstappen LW, Clin Cancer Res, 2015, un sistema basado en ECS permitiría aumentar el volumen de sangre analizada hasta al menos 1 "volumen de sangre total" (TBV), es decir, alrededor de 3/5 litros en total, sino incluso hasta 4/6 TBV, y así aumentar el número de células tumorales circulantes que son potencialmente detectables y extraíbles.

Si bien se conocen dispositivos de captura de CTCs mediante sistemas de circulación extracorpórea y filtros de exclusión de tamaño adecuados para la captura de células tumorales, estos dispositivos tienen la desventaja de poder analizar volúmenes de sangre iguales a un máximo de 1 a 3 TBV y de no detectar y capturar células que son más pequeñas que los poros del filtro, independientemente de los antígenos expresados por las CTCs, obteniendo así sólo un rendimiento limitado de captura. En particular, los dispositivos conocidos no capturan a menudo CTCs que expresan antígenos distintos de los epiteliales. Además, estos dispositivos son tubos o filtros estacionarios, inmóviles y claramente propensos a obstruirse o bloquearse si por ellos pasan muchos litros de sangre y diferentes elementos celulares. Por ejemplo, los dispositivos conocidos fijan principalmente como objetivo una sola población de CTCs, p. ej., epiteliales, y generalmente se basaban en filtros microfabricados incluidos en una circulación extracorpórea afélica. Está claro que un volumen de sangre todavía demasiado pequeño se puede examinar con estos dispositivos debido a la naturaleza del procedimiento aférico (diseñado para examinar un número limitado de litros de sangre) y porque después de un número de ciclos/mililitros de sangre, el sistema inevitablemente se obstruirá o saturará, probablemente induciendo también una peligrosa coagulación de la sangre. Además, filtros de este tipo ciertamente requieren una velocidad de flujo de sangre baja para tratar de evitar la obstrucción y la saturación prematuras.

El documento US 2015/0283318 describe un método para tratar la infección por patógenos inactivando los patógenos en la sangre. En particular, este documento describe un método para tratar el cáncer, especialmente para prevenir la

metástasis del tumor y la recurrencia del tumor al extraer y/o inactivar (p. ej., matar) las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre después de extirpar el tumor o tratar el tumor con medios terapéuticos.

5 Es un objeto de la presente invención superar los inconvenientes mencionados anteriormente de los sistemas conocidos para detectar y capturar entidades biológicas y/o químicas CTC y proporcionar un dispositivo y un sistema que sean más eficientes y funcionales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se proporciona un dispositivo y un sistema para la extracción de al menos una entidad biológica y/o química indeseable de un volumen de sangre extracorpóreo según las reivindicaciones independientes. Otras realizaciones se definen en las respectivas reivindicaciones dependientes.

10 El dispositivo según la presente invención comprende una cámara de captura hueca de forma cilíndrica que tiene una entrada para la entrada de sangre procedente de un sistema/circuito extracorpóreo y una salida para la salida de la sangre extracorpórea y el reingreso a la circulación corporal normal. La cámara de captura comprende internamente al menos un elemento de captura que se extiende longitudinalmente dentro de la cámara de captura y que se puede mover con respecto a la cámara de captura y que tiene una superficie reaccionante que se pone en contacto con la sangre extracorpórea. La superficie reaccionante comprende una pluralidad de aglutinantes para la entidad biológica y/o química a extraer, de manera que a la salida de la cámara de captura se extrae la entidad biológica de la sangre extracorpórea, quedando la entidad biológica y/o química unida a la superficie reaccionante. En particular, el volumen total de sangre extracorpórea que fluye dentro de la cámara de captura está comprendido entre 3 y 5 litros de sangre hasta 30 litros de sangre, es decir, entre 1 y 6 TBVs, en donde cada TBV consiste en hasta 5 litros de sangre.

20 El dispositivo según la presente invención se caracteriza porque el elemento de captura es giratorio alrededor de un eje longitudinal de la cámara de captura y porque el dispositivo comprende, además, un sistema de acoplamiento y desacoplamiento configurado de tal manera que el elemento de captura se puede retirar de la cámara de captura para permitir el análisis de las entidades capturadas por la superficie reaccionante.

Este dispositivo es práctico y eficaz en su funcionamiento.

25 Empleando el dispositivo según la presente invención, es posible realizar una "cirugía líquida ex vivo" para extraer entidades biológicas (por ejemplo, CTCs) de la sangre de un paciente, limitando o evitando con ello la progresión del tumor, que es similar a un enfoque quirúrgico convencional de un tumor sólido que puede limitar la enfermedad o incluso curar a un paciente con cáncer.

30 Según la presente invención, es posible capturar el mayor número posible de entidades biológicas y/o químicas indeseables durante su circulación en el torrente sanguíneo. Además, la presente invención permite analizar un alto volumen de sangre, incluso hasta 300 ml/minuto, un valor muy superior a cualquier muestra de sangre. De hecho, los sistemas conocidos para el análisis de CTCs, basados en un simple muestreo de sangre, analizan un máximo de 1 - 30 ml de sangre periférica. Además, dada la rareza de las CTCs, la posibilidad de detectar casos de "falsos negativos" es estadísticamente muy alta. En cambio, otros sistemas pueden analizar una mayor cantidad de sangre, pero nunca alcanzan el volumen indicado por el enfoque según la presente invención, lo que es más importante, nunca usan un dispositivo que implique un contacto célula-superficie accionado dinámicamente. A través de un sistema *in vivo* de captura de CTCs, por ejemplo, dichas CTCs pueden ser capturadas directamente en una vena de un paciente sin recolectar sangre de dicho paciente. Sin embargo, un sistema de este tipo, aunque analiza la sangre del paciente durante unos 30 minutos, no puede analizar más de alrededor de 1,0 / 1,5 l de sangre y capturar las CTCs gracias a un solo anticuerpo que solo se une a la molécula EpCAM, si se expresa en la CTC.

40 En su lugar, el dispositivo y el sistema según la presente invención pueden examinar de 3 a 5 litros de sangre (= 1 volumen de sangre total [TBV]) hasta aproximadamente 30 litros de sangre, es decir, 4/6 TBVs, prácticamente idénticos o incluso mayores que la que se obtiene con un sistema ECS tradicional, por ejemplo, leucoféresis o hemodiálisis por enfermedad o insuficiencia renal.

45 En una realización particular de la presente invención, para aumentar la posibilidad de captar todas las CTCs, el TBV se examina más de una vez, hasta al menos unas 14 veces (14 TBVs), es decir, hasta unos 72-74 litros de sangre. De esta forma, el dispositivo de la presente invención permite la captura de CTCs de hasta unos 14 TBVs de un paciente con cáncer con el fin de permitir la recuperación de un número muy significativo de CTCs. La recuperación de un número muy significativo de CTCs permitirá obtener información clínica estadísticamente significativa (después del análisis celular y molecular posterior), lo que permitirá decisiones clínicas críticas y enfoques de medicina personalizados.

55 La extracción de subpoblaciones de CTCs, epiteliales, mesenquimales y/o híbridas, individualmente o en agrupaciones, se obtiene mediante la combinación de enfoques moleculares (dependientes de la expresión del antígeno) y físicos (dependientes del tamaño). El dispositivo según la presente invención puede comprender un cierto número de diferentes reactivos de unión que fijan como objetivo antígenos específicos para CTCs. En particular, comprende EpCAM, E-cadherina, N-cadherina, CD44 y sus isoformas (p. ej., CD44v6 y CD44v8), selectinas, proteínas ABC, MUC1, FGFR3c y otros "todos los tipos de diana/antígenos" relacionados con fenotipos epiteliales,

mesenquimales y similares a tallos del cáncer. Se necesitan al menos de 5 a 6 tipos de moléculas de unión para enriquecer y captar la mayoría de las poblaciones de CTC. Los datos preliminares confirmaron que la selección de los antígenos específicos para CTC informados anteriormente que se presentan en este documento es óptima. Con este enfoque combinatorio, de hecho, se han detectado CTCs epiteliales, mesenquimales y/o híbridas en modelos de líneas celulares durante la EMT y, en particular, también en pacientes con cáncer durante la progresión. Estos resultados demuestran claramente la eficacia del dispositivo según la presente invención.

De hecho, gracias al uso de una pluralidad de aglutinantes (al menos 6 anticuerpos) distribuidos en la superficie reaccionante, se puede interceptar un mayor número de entidades a extraer, ya que se dirigen a un mayor número de antígenos expresados por tales entidades. Por lo tanto, todas las subpoblaciones de CTC epiteliales, mesenquimales y/o híbridas, individualmente o en agrupaciones, son fijadas como objetivo y capturadas por el dispositivo. En concreto, el dispositivo sirve de trampa para las entidades circulantes a extraer, que, al interactuar con la pluralidad de aglutinantes en la superficie reaccionante del elemento de captura, quedan adheridas a esta superficie y no continúan por el recorrido del flujo de sangre. Por lo tanto, la sangre que sale del dispositivo estará desprovista de las entidades indeseables. En un momento posterior, estas entidades extraídas se pueden recolectar de la superficie del elemento de captura y analizar aguas abajo para respaldar las decisiones clínicas a través de datos clínicamente relevantes relacionados con su naturaleza. Por lo tanto, en sus diversas realizaciones, el dispositivo según la presente solicitud tiene como objetivo, al tratar el cáncer, extraer las entidades de la sangre y enriquecer CTC que permita un análisis posterior. A su vez, estos análisis permiten un seguimiento significativo de las características del cáncer, también durante la progresión, proporcionando al clínico un número estadísticamente significativo de células cancerosas a estudiar.

La forma y el tamaño de la cámara de captura y el elemento de captura son tales que permiten un flujo de sangre en ellos de hasta aproximadamente 200-300 ml/minuto y aseguran la mayor superficie de contacto posible entre el elemento de filtro y el flujo de sangre.

Por ejemplo, son concebibles dos tipos de dispositivos y, por tanto, de cámaras de captura: uno microscópico y uno macroscópico.

El dispositivo microscópico puede proporcionar una longitud mínima de 2,0 cm y un diámetro mínimo de aproximadamente 1,2 cm, mientras que el dispositivo macroscópico puede proporcionar una longitud mínima de entre 4,0 y 5,0 cm y un diámetro mínimo de aproximadamente 1,2 cm. Por supuesto, son concebibles diferentes dimensiones sobre la base de estudios hemodinámicos apropiados.

La característica según la cual el elemento de captura se puede mover en relación con la cámara de captura permite capturar las entidades biológicas indeseables (es decir, CTCs) y ayudar a estas entidades a acercarse lo más posible a la superficie reaccionante del dispositivo (capaz de atrapar/agarrar las CTCs). De hecho, debido a la movilidad del elemento de captura, la superficie reaccionante está mejor en contacto con la sangre que fluye durante la fase extracorpórea de un procedimiento de circulación extracorpórea. Además, la estructura móvil puede estar encabezada y/o seguida, en la dirección del flujo sanguíneo, por una estructura de filtro.

El movimiento del elemento de captura, que representa la estructura central del dispositivo, puede estar guiado por el flujo sanguíneo o por una fuerza externa. El movimiento, a su vez, conducirá a una agitación de la sangre y a una trayectoria circulante en la cámara aumentando el contacto de las células con la superficie reaccionante y la pared interna de la cámara de captura. Este elemento móvil también facilita la circulación de fluidos, facilitando la captura de numerosos TBV, sin riesgo de obstrucción del sistema ni de coagulación de la sangre y daño.

La entidad biológica y/o química indeseable a extraer puede ser cualquier célula, entidad indeseable o estructura bioquímica patológica nociva para el cuerpo humano, que pueda detectarse en la sangre y tenga rasgos reconocibles específicos. En concreto, este elemento puede ser una célula tumoral circulante (CTC). De esta manera, a través del dispositivo según la presente invención, se puede prevenir, o al menos reducir en gran medida, la propagación de las CTCs en el cuerpo de un paciente y, en consecuencia, el desarrollo y crecimiento de metástasis. El dispositivo puede fijar potencialmente como objetivo todos los tumores sólidos, es decir, más del 95 % de los tumores. Sin embargo, como ya se mencionó, algunos tipos de tumores son más propensos a la diseminación a distancia a través de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, son biológica y clínicamente más adecuados para el uso del dispositivo según la presente invención en sus diversas realizaciones.

Resumiendo lo anterior, utilizando el dispositivo según la presente invención, es posible combinar por primera vez el examen de hasta 6 TBVs o hasta 14 TBVs con tres enfoques diferentes y complementarios: uno molecular, uno físico y uno de ingeniería basado en dinámica de fluidos, siendo el último de ellos el primer método en la técnica para capturar CTCs. Este enfoque combinado garantiza a) un mayor nivel de eficiencia de captura, proporcionando la extracción de CTCs epiteliales, mesenquimales, epiteliales-mesenquimales híbridas y similares a tallos, individualmente y/o en agrupaciones, b) un flujo sanguíneo sostenido y razonablemente rápido y c) sin riesgo de obstrucción del sistema ni de coagulación de la sangre y daños.

Los aglutinantes se distribuyen sobre la superficie del elemento de captura con el fin de capturar los elementos indeseables dentro del torrente sanguíneo mediante la unión a antígenos, proteínas o receptores en la superficie de

la entidad indeseable a extraer. Específicamente, los agentes de unión pueden comprender uno o más anticuerpos, proteínas de adhesión, aptámeros, oligo-aptámeros u otras moléculas orgánicas dirigidas específicamente contra cualquier compuesto o elemento indeseable que deba extraerse del torrente sanguíneo. En el caso de las CTCs, éstas son capturadas por los aglutinantes debido a la presencia de epítomos antigénicos en la membrana de la célula tumoral, que dependen de las subpoblaciones de las células diana, por ejemplo, células epiteliales, células epiteliales-mesenquimales híbridas, células mesenquimales, células madre tumorales circulantes mesenquimales y/o epiteliales (individualmente o en agrupaciones) y/o cualquier otra subpoblación de CTC que pueda detectarse en la sangre de pacientes con cáncer. La recogida de diferentes subpoblaciones de células se puede obtener gracias a mezclas adecuadas y personalizables de anticuerpos y/o moléculas reconocidas como aglutinantes para las células de interés. Esta mezcla de moléculas de captura puede ser diferente de un cáncer a otro, de un paciente a otro, dependiendo de los antígenos presentes en las CTCs. El descubrimiento y la selección de los antígenos más adecuados con los que funcionalizar las superficies del dispositivo puede depender del descubrimiento o la investigación de antígenos específicos en el tejido tumoral primario/metastásico o utilizando un enfoque de biopsia líquida (p. ej., Cell Search, DEPArray, ISET, etc., ...). Para aumentar la probabilidad de captura, se pueden utilizar agentes de unión o anticuerpos dirigidos contra antígenos/fenotipos alternativos expresados por las células CTC a extraer, es decir, además de los reconocidos tradicionalmente, así como los identificados más recientemente y que caracterizan las CTCs consideradas más agresivas (Barriere G et al. Ann Transl Med 2014).

Para optimizar la captura de las entidades a extraer, la unión de los anticuerpos y/u otras biomoléculas biológicas o agentes de unión debe ser tal que su resto de unión a antígeno (p. ej., Fab para anticuerpos) esté posicionada con una orientación que vaya desde la superficie del elemento de captura en la dirección de la superficie interior de la cámara de captura. De esta forma, se puede maximizar la probabilidad de unión al analito (por ejemplo, las CTCs).

La captura de entidades indeseables dentro del torrente sanguíneo puede lograrse mediante técnicas específicas, tales como la inmovilización controlada (Qian W et al., Clin Chem. 2000; Jung Y et al., Anal Biochem. 2008; Kumada Y, Biochim Biophys Acta 2014; Crivianu-Gaita V y Thompson M, Biosens Bioelectron 2015).

Ventajosamente, pueden inmovilizarse fragmentos Fab de un anticuerpo solo. En comparación con la técnica más tradicional de inmovilización del anticuerpo completo, la unión de fragmentos Fab demuestra poder alcanzar densidades superficiales más altas, obteniendo así una mayor capacidad de unión para el analito (Crivianu-Gaita V y Thompson M Biosens Bioelectron 2015).

El tipo de unión del anticuerpo/Fab a la superficie se puede determinar sobre la base del material elegido para la superficie reaccionante del elemento de captura. La inmovilización de anticuerpos/fragmentos Fab puede llevarse a cabo, por ejemplo, sobre superficies recubiertas de oro (Au), a base de silicio (Si) y polisacáridos, o sobre superficies plásticas y generalmente inorgánicas, pero siempre biocompatibles, tales como poliuretano, polipropileno y/o policarbonato.

La posibilidad de funcionalizar el dispositivo con diferentes aglutinantes, es decir, anticuerpos, dependiendo de la enfermedad, es de particular interés. De hecho, es concebible que un primer grupo de anticuerpos esté potencialmente presente en cada uno de los dispositivos y dirigido contra los antígenos expresados por una subpoblación que consiste en CTCs, mientras que un segundo grupo puede seleccionarse sobre la base de la enfermedad que se examina.

En concreto, a modo de ejemplo, EpCam (CD326), E-cadherina (CD324) y EGFR (epitelialidad), N-cadherina (CD325) y OB-cadherina (cadherina 11) (mesenquimalidad) pueden considerarse como antígenos "estándares", y al menos, por ejemplo, CD44v6 (cáncer de colon; tronco tumoral), CD44v8 (cáncer de mama; tronco tumoral), Her-2 (cáncer de mama) y ABC-G2 (tronco tumoral) como antígenos "específicos para la enfermedad".

Cabe señalar que tanto los diferentes aglutinantes como la forma del propio dispositivo y, en particular, la forma de la superficie reaccionante, así como la movilidad del elemento de captura con respecto a la cámara de captura, afectan a la acción de captura de las entidades a extraer, por ejemplo, las CTCs. De hecho, los aglutinantes detectan y capturan diversas subpoblaciones de entidades a extraer, mientras que la forma y el movimiento de la superficie reaccionante permiten aumentar la superficie de contacto, así como la probabilidad de contacto entre el elemento de captura y la sangre del paciente, permitiendo con ello una mayor probabilidad de unión entre las entidades y los diferentes aglutinantes.

La cámara de captura del dispositivo según la presente invención es hueca y debe tener una forma que permita que el flujo de sangre circule por su interior de forma fluida y suave. En particular, la cámara de captura tiene forma cilíndrica y el elemento de captura móvil central se extiende longitudinalmente dentro de la cámara de captura. Tanto la cámara de captura como el elemento de captura pueden estar hechos enteramente de una aleación o material biocompatible con un recubrimiento para evitar una posible interferencia con la coagulación, las células de la sangre normales u otros procesos fisiológicos. Con el fin de fomentar la adhesión de las entidades biológicas y/o químicas indeseables sobre la superficie reaccionante del elemento de captura, dicha superficie se puede recubrir ventajosamente con una fina capa de oro u otro material biocompatible. Además, con el fin de no perjudicar el flujo de sangre, la superficie reaccionante del elemento de captura puede estar hecha de un material deformable.

- Según la invención, el elemento de captura móvil puede girar alrededor de un eje longitudinal de la cámara de captura. Esto permite maximizar la superficie de contacto entre la superficie reaccionante del elemento de captura y el flujo de sangre que contiene las entidades indeseables a extraer. Además, la rotación del elemento de captura permite que la sangre fluya mejor, evitando con ello la obstrucción del sistema y/o el daño y la coagulación de la sangre. De hecho,
- 5 el movimiento continuo puede ayudar a mantener la fluidez de la sangre y prevenir la formación de coágulos. El movimiento del elemento central también puede ser permitido por la presencia de cuatro imanes, preferiblemente pequeños, dos colocados en sus extremos y dos en los extremos de la cámara de captura. Los imanes, así posicionados, mantendrán el elemento central en levitación, reduciendo con ello el posible rozamiento que se pudiera crear entre el elemento central y la cámara exterior.
- 10 También se puede añadir un anticoagulante tal como heparina con el fin de evitar fenómenos de coagulación no deseados. El movimiento y el anticoagulante tienen como finalidad mantener intactas las características de la sangre, permitiendo así el mantenimiento de la seguridad clínica del paciente.
- Para aumentar aún más la seguridad del paciente, se puede controlar la presión arterial tanto en la entrada como en la salida de la cámara de captura de forma que se mantenga uniforme.
- 15 La rotación del elemento de captura con respecto a la cámara de captura alrededor de un eje longitudinal puede tener lugar por el mero efecto del flujo de sangre y, por lo tanto, sin la aplicación de una fuerza externa dedicada, o por la aplicación de una fuerza motriz continua regulada externamente.
- La rotación del elemento de captura es fundamental para permitir una mejor capacidad de captura del dispositivo global con respecto a un aparato sin elementos giratorios. Estos datos dependen de la capacidad del elemento de
- 20 captura giratorio para ayudar a las CTCs diana a acercarse a la superficie reaccionante del dispositivo.
- Con el fin de permitir el análisis de las entidades indeseables capturadas por la superficie reaccionante, el elemento de captura según la invención puede retirarse de la cámara de captura. Esto se logra mediante un sistema de acoplamiento/desacoplamiento ubicado en la entrada y salida de la cámara de captura.
- 25 Además, los aglutinantes se unen a la superficie del dispositivo utilizando enlazadores bioquímicos capaces de escindirse solo cuando se ha detenido el procedimiento y se ha sacado el dispositivo del EC. Este detalle permite recuperar células del dispositivo para estudiarlas y obtener información clínicamente útil con métodos celulares y moleculares ya conocidos.
- En una realización, la superficie reaccionante del elemento de captura comprende una estructura helicoidal. En particular, la estructura helicoidal o de tornillo o de tornillo de Arquímedes se extiende longitudinalmente alrededor de
- 30 un eje de rotación y se fija a la cámara de captura por medio de un sistema de fijación. Más específicamente, el elemento de captura móvil tiene forma de hélice o espiral. Esta forma particular se utiliza para garantizar un flujo uniforme del fluido sanguíneo y, al mismo tiempo, una mayor superficie que está en contacto con la sangre circulante para aumentar la probabilidad de unión entre la entidad a extraer, por ejemplo, la célula tumoral y los aglutinantes, por ejemplo, los anticuerpos. Preferiblemente, la superficie helicoidal puede extenderse a lo largo de toda la longitud de la
- 35 cámara de captura. Sin embargo, también se puede utilizar una configuración en la que la longitud de la hélice sea inferior a la longitud de la cámara de captura y en cuyo interior exista una pluralidad de estructuras helicoidales dispuestas en serie. Por supuesto, a través de una configuración de este tipo, la longitud de todo el dispositivo debe incrementarse necesariamente.
- Se observa que el elemento de captura móvil está configurado para facilitar el contacto entre la superficie reaccionante del dispositivo y las células diana. Por lo tanto, en esta divulgación se incluye todo tipo de hélice móvil, doble hélice u
- 40 otra estructura 3D móvil creada para facilitar este contacto.
- Según el tipo microscópico mencionado anteriormente, el dispositivo puede, en particular, tener un diámetro mínimo de entre 0,5 y 0,8 cm por hélice simple, en donde la hélice puede realizar 5 rotaciones alrededor de su eje central, es decir, aproximadamente una cada 0,4 cm.
- 45 Según el tipo macroscópico mencionado anteriormente, el dispositivo puede tener un diámetro mínimo de entre 0,5 y 0,8 cm por hélice simple, en donde la hélice puede realizar 5 rotaciones alrededor de su eje central, es decir, aproximadamente una cada 1,0 cm.
- En particular, el elemento de captura móvil del dispositivo, pionero en el campo del estudio de CTC, es un sistema giratorio con el objetivo de conducir las células lo más cerca posible de la superficie reaccionante y de la pared interna
- 50 de la cámara de captura. En una realización, el elemento de captura es similar a un tornillo de Arquímedes, que incluye todas las formas, dimensiones y tipos diferentes de hélices o estructuras móviles 3D similares y cámaras de captura o tubos de alojamiento apropiados. La velocidad de rotación está controlada por el flujo de sangre a través de la cámara que depende de un sistema CEC. La velocidad del flujo se puede ajustar para lanzar/proyectar células de la sangre y CTCs hacia/sobre la superficie del mismo elemento de captura móvil y/o sobre la superficie de la pared interna de la cámara de captura. En esta etapa del procedimiento, las células golpean la superficie reaccionante de la hélice. Las células pueden ser capturadas en este punto o impulsadas por el empuje del propio elemento de captura
- 55 en movimiento hacia la pared interna de la cámara. En este sistema, se pueden analizar varias rondas de sangre total

para obtener una máxima eficacia de captura como ya se mencionó. Un dispositivo que tenga un elemento de captura giratorio ayuda, por lo tanto, a obtener una máxima eficacia de captura.

En otra realización, el dispositivo comprende, además, una o varias estructuras cónicas formadas por cables delgados de material biocompatible. Estas estructuras tienen una superficie de malla filtrante formada por agujeros (poros) con un diámetro superior a 100 μm . La estructura cónica se puede colocar aguas arriba o aguas abajo del elemento de captura y en línea con este elemento. La estructura cónica puede ser similar, por ejemplo, a un filtro de araña para la protección de émbolos distales y vasculares. En particular, el elemento de captura puede estar configurado para comprender una única estructura cónica fija o giratoria alrededor de un eje longitudinal que pasa por la punta del cono, en donde la base del cono recibe el flujo sanguíneo de entrada. Sin embargo, para mejorar el efecto de filtración, el elemento de captura puede estar configurado para comprender una pluralidad de estructuras cónicas colocadas en serie a lo largo de la dirección del flujo sanguíneo.

Este filtro de red cónico está técnicamente diseñado para bloquear CTCs muy grandes, pero en particular microémbolos tumorales o agrupaciones de CTC. Estos elementos poseen un mayor potencial metastásico con respecto a las CTCs individuales. Por lo tanto, los filtros tipo "filtro de araña" desempeñan un papel fundamental en la prevención de la diseminación de microémbolos sanguíneos, lo que limita la recaída metastásica y aumenta la seguridad del dispositivo.

El diámetro de los poros se seleccionó para bloquear las agrupaciones de CTC, pero lo suficientemente grande como para evitar el riesgo de obstrucción del sistema o la coagulación de la sangre y daños. La selección de un diámetro de aproximadamente 60 a 100 micrómetros tiene una justificación adicional. Las agrupaciones de CTC nacen de agrupaciones de células tumorales oligo-clonales y no de un evento de agregación intravascular (Aceto N. et al., Cell, 2014). Por lo tanto, aceptar una agrupación de células que se compone de 2 o más células (intervalo de 2 a 19, promedio 10,5, según lo informado por Sarioglu AF et al., Nat Methods, 2015) y suponiendo que el diámetro de una sola CTC oscile entre 8 y 16 micrómetros, 12 en promedio (Hosokawa M et al., PlosOne, 2013; Patrizia Paterlini-Bréchet, Cancer Microenviron 2014; Vona G et al., Am J Pathol. 2000), se puede inferir que una agrupación promedio de unas 10 células presenta una dimensión de alrededor 120 micrómetros (intervalo de 96 a 160).

En otra realización, el dispositivo puede comprender una combinación de un elemento de captura que tiene una estructura helicoidal con una o más estructuras cónicas. Esto permite potenciar aún más el rendimiento de la captura de las entidades a extraer, así como la seguridad clínica del dispositivo, ya que éste puede bloquear posibles coágulos y émbolos. En particular, un dispositivo de este tipo puede configurarse de modo que la estructura helicoidal preceda a la cónica, con referencia a la dirección del flujo sanguíneo.

Una realización puede prever la presencia de múltiples dispositivos completos (cámara de captura y elemento de captura central) colocados en serie como las perlas de un collar.

La estructura central del dispositivo, que puede ser el elemento helicoidal combinado con un filtro similar a una banda, puede recubrirse con moléculas que fijan como objetivo antígenos específicos para CTC con el fin de atraparlos específicamente durante su flujo a través del dispositivo.

Por supuesto, son posibles formas alternativas a las helicoidales o cónicas con respecto a la superficie reaccionante del elemento de captura. Lo importante es que la forma sea tal que asegure, por un lado, una buena superficie de contacto con el flujo sanguíneo, y por otro, un flujo sanguíneo fluido sin riesgo de coágulos, émbolos o sistema de bloqueo.

Ventajosamente, la pluralidad de aglutinantes se distribuye uniformemente sobre toda la superficie reaccionante del elemento de captura móvil. Esto permite distribuir la acción de captura sobre toda la superficie reaccionante del elemento de captura.

Alternativamente, los aglutinantes se pueden concentrar en zonas específicas de la superficie reaccionante del elemento de captura móvil. Esto es particularmente ventajoso cuando se utilizan aglutinantes de diferente naturaleza. En otras palabras, es posible una distribución "progresiva" de los aglutinantes sobre la superficie reaccionante. Esto significa que los aglutinantes, por ejemplo, los anticuerpos, dirigidos contra ciertos antígenos, pueden colocarse solo en un extremo de la superficie reaccionante, mientras que el resto puede adherirse a otras regiones adyacentes. Esta configuración, además de permitir una capacidad de captura eficiente, permite detectar las entidades de una forma más sencilla. De hecho, una vez que se ha eliminado el elemento de captura, las entidades se pueden identificar fácilmente analizando las diferentes regiones de la superficie reaccionante que son específicas para las diferentes subpoblaciones de entidades que se han de extraer.

En otra realización, los aglutinantes se distribuyen uniformemente o solo se concentran en zonas específicas en la superficie interna de la cámara de captura. De esta forma, es posible aumentar la acción de captura del dispositivo. Más específicamente, la distribución de los aglutinantes sobre la superficie interna de la cámara de captura, así como sobre la superficie reaccionante del elemento de captura permite que el dispositivo trate una mayor cantidad de sangre.

El elemento de captura móvil, el filtro cónico y la pared interna de la cámara de captura pueden tener superficies reaccionantes. Estas superficies están recubiertas de múltiples aglutinantes dirigidos a diferentes antígenos de CTC

y, en consecuencia, a diferentes poblaciones de CTC. Según esta configuración, el volumen total de sangre que sale de la cámara de captura, que pasa a través del dispositivo, se limpia de CTCs, siendo capturadas las CTCs por las superficies reaccionantes internas del dispositivo. Repitiendo este enfoque varias veces (de 6 a 14 veces), durante un máximo de 4 a 5 horas a una velocidad de flujo de sangre de hasta 300 ml/min, es posible detectar hasta 14 TBV por tratamiento con el objetivo de extraer más del 90/95 % de las CTCs del TBV.

Como ya se mencionó, las diversas realizaciones pueden comprender una o más cámaras de captura (tubos de alojamiento más los elementos móviles internos más los filtros de "araña" cónicos) organizadas en secuencia. Cada una de las cámaras de captura individual está recubierta, en sus superficies internas, con uno o más tipos de moléculas de unión (p. ej., anticuerpos o aptámeros) contra toda la sub-población de CTC conocida (epitelial, mesenquimal y/o híbrida, sola o en agrupación). En otra realización, se prevén al menos 3 o 4 cámaras. Las diferentes cámaras están organizadas en secuencia siguiendo la dirección del flujo de sangre. Cada una de las cámaras está recubierta con moléculas de unión contra un tipo específico de subpoblación de CTC (p. ej., la primera cámara contra las CTCs mesenquimales, la siguiente cámara contra las CTCs epiteliales y la última cámara contra las células madre cancerosas).

Se observa que la posibilidad de analizar hasta 6 TBV o hasta 14 TBV de la sangre del paciente está garantizada por el hecho de que el elemento de captura puede moverse, es decir, puede girar alrededor de su eje longitudinal en la dirección del flujo de sangre, y/o por el hecho de que están presentes estructuras cónicas que actúan como filtros para agrupaciones de células y/o por el hecho de que los aglutinantes no solo están presentes en la superficie del elemento de captura, sino también en la superficie interna de la cámara de captura y/o en la superficie de las estructuras cónicas.

El sistema de extracción de entidades biológicas y/o químicas según la presente invención se basa en la integración del dispositivo de extracción mencionado anteriormente en un sistema de circulación extracorpórea, similar a la leucoaféresis o hemodiálisis terapéuticas.

En particular, el sistema comprende medios de extracción para extraer sangre venosa del sistema vascular de un paciente y medios de entrada para introducir la sangre extraída en el dispositivo de eliminación. Para extraer la sangre filtrada del dispositivo y completar el ciclo, el sistema comprende, además, medios de salida y medios de re-entrada para reintroducir la sangre extraída del dispositivo - y por tanto filtrada - en el sistema vascular del paciente.

Además, para evitar la formación de coágulos y mantener bajo control la temperatura del flujo de sangre, el sistema comprende medios de introducción de un anticoagulante aguas arriba del dispositivo de eliminación y una unidad de control de la temperatura aguas abajo de dicho dispositivo.

Este sistema es capaz de capturar y luego extraer cualquier entidad biológica y/o química o bioquímica indeseable, tal como, por ejemplo, las CTCs, de la sangre de un paciente a lo largo del camino recorrido por estas entidades dentro del sistema circulatorio sanguíneo. Cuando las entidades pasan por el dispositivo de extracción, dichas entidades (por ejemplo, CTCs) son retenidas por los aglutinantes (por ejemplo, los anticuerpos) colocados en la superficie reaccionante del elemento de captura. Otros tipos de entidades o células de la sangre, en cambio, pueden continuar su camino dentro del sistema circulatorio. El paso de la sangre a analizar y filtrar a través del dispositivo de eliminación se produce durante un valor predeterminado de volumen de sangre, tras lo cual se retira el sistema de circulación extracorpórea, así como el dispositivo. Este último puede abrirse y las entidades pueden examinarse directamente en la superficie reaccionante del elemento de captura, o retirarse de él para evaluaciones moleculares adicionales.

Ventajosamente, una vez funcionalizado con los aglutinantes seleccionados, el dispositivo puede evaluarse, es decir, probarse, mediante la provisión de un aparato de flujo *in vitro* que imita la circulación de un volumen conocido de sangre *ex vivo* o de cualquier sustancia sintética que se comporte como la sangre. Este aparato permitirá investigar la interacción de entidades a extraer, por ejemplo, células tumorales "modelo", con el dispositivo funcionalizado y simular condiciones *in vivo* del flujo de sangre venosa *in vitro*. El flujo puede ser sostenido por una bomba peristáltica para permitir que la sangre interactúe repetidamente con el dispositivo funcionalizado. Un aparato de este tipo implica el uso de una muestra de sangre (tomada de un donante sano) a la que se le añaden entidades a extraer, tales como, por ejemplo, células tumorales de cultivos de células tumorales establecidas con características similares a las de las CTCs, CTCs epiteliales, mesenquimales, epitelialesmesenquimales híbridas y similares a tallos, individualmente y/o en agrupaciones. Para evitar daños mecánicos a las células, la sangre no debe pasar a través de la bomba peristáltica. En concreto, la sangre del donante sano - no más de 300 / 500 ml - se hace pasar varias veces por el aparato *ex vivo* y el dispositivo hasta alcanzar un TBV razonablemente similar al que se podría conseguir en un paciente. Este aparato también se utilizará para comprender qué elemento de captura o combinación de elementos de captura en términos de forma, disposición y cantidad, tiene las mejores habilidades para seleccionar y capturar las entidades a extraer (CTCs), manteniendo las características normales y la fluidez de la sangre. Por ejemplo, un aparato de este tipo será extremadamente importante para comprender si el dispositivo induce la formación de coágulos o agrupaciones de células que podrían afectar la seguridad clínica del dispositivo.

Un método *ex vivo* para extraer al menos una entidad biológica y/o química de un volumen de sangre extracorpórea de un paciente comprende los pasos de introducir la sangre extracorpórea en una cámara de captura hueca que comprende internamente al menos un elemento de captura, en donde el elemento de captura es móvil con respecto a la cámara de captura, filtrando la sangre extracorpórea por contacto con una superficie reaccionante del elemento de

captura móvil que comprende una pluralidad de aglutinantes para la entidad biológica y/o química a extraer, y extrayendo la sangre extracorpórea desprovista de dicha entidad biológica y/o química de la cámara de captura.

En particular, el volumen total de sangre extracorpórea (B) que fluye en el interior de la cámara de captura (10) está comprendido entre 1 y 6 TBVs y cada TBV consiste en hasta 5 litros de sangre.

- 5 Para aumentar la posibilidad de capturar todas las CTCs, el TBV se examina más de una vez. En particular, el TBV se examina más de una vez, hasta al menos unas 14 veces (14 TBVs), es decir, hasta unos 72-74 litros de sangre. De esta forma, el método permite la captura de CTCs de hasta unos 14 TBVs de un paciente con cáncer para permitir la recuperación de una cantidad muy significativa de CTCs. La recuperación de un número muy significativo de CTCs permitirá obtener información clínica estadísticamente significativa (después del análisis celular y molecular posterior),
10 lo que permitirá decisiones clínicas críticas y enfoques de medicina personalizados.

El método puede comprender, además, el paso de detener la introducción de sangre extracorpórea en la cámara de captura después de introducir un volumen predeterminado de sangre, y retirar el elemento de captura para analizar la naturaleza y cantidad de la entidad biológica y/o química extraída y presente en la superficie reaccionante.

- 15 Por lo tanto, el método puede comprender hacer pasar la sangre de un paciente a través de un dispositivo o sistema descrito anteriormente, poniendo en contacto simultáneamente la sangre con la superficie reaccionante del elemento de captura del dispositivo, en consecuencia, poniéndola en contacto con los agentes aglutinantes o anticuerpos seleccionados apropiados. La etapa de adhesión de los aglutinantes a las entidades a extraer puede realizarse mediante diversas técnicas de inmovilización controlada.

- 20 Por lo tanto, el método puede comprender sucesivamente el paso de extraer temporalmente la sangre venosa del sistema vascular de un paciente a través de un sistema de circulación extracorpórea, el paso de agregar heparina (u otro anticoagulante similar) para prevenir fenómenos de coagulación no deseados, el paso de introducir la sangre en el dispositivo, contactando con ello la sangre y, por lo tanto, las entidades a extraer (por ejemplo, CTCs) presentes en la sangre del paciente con los aglutinantes seleccionados durante un período de tiempo predeterminado, el paso de agregar una cantidad efectiva de, p.ej., protamina para revertir la acción de la heparina cuando finaliza el tratamiento y el paso final de reintroducir la sangre en el sistema vascular del paciente.
25

El tiempo real de tratamiento según el método puede variar, pero depende aproximadamente del tiempo que tardan 4 o 6 TBVs en pasar por el dispositivo o hasta 14 TBVs. En particular, el método proporciona el análisis y la captura de hasta 5 litros o hasta 72 - 74 litros de sangre, es decir, aproximadamente 300 ml/min. El tiempo de tratamiento de una cantidad de sangre de este tipo puede, por lo tanto, variar aproximadamente entre 20/30 minutos y 3 a 4 horas.

- 30 Cabe señalar que el dispositivo y, por tanto, el sistema según la presente invención, puede utilizarse tanto en una fase inmediatamente posterior al diagnóstico como también en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y de la respuesta a posibles terapias. En la fase metastásica y/o terminal, el dispositivo puede aumentar el tiempo de progresión, la supervivencia libre de progresión y/o mejorar la calidad de vida de los pacientes con tumores. El dispositivo también se puede utilizar como dispositivo "curativo" gracias a sus propiedades de extracción de entidades indeseables, tales como las CTCs responsables de la propagación metastásica.
35

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán más evidentes a la vista de la siguiente descripción de algunas realizaciones preferidas que se describen a continuación.

Las Figs. 1a y 1b son representaciones esquemáticas del dispositivo según la presente divulgación en una vista longitudinal (a) y en una sección transversal (b);

- 40 la Fig. 2 es una representación esquemática de un elemento de captura según una realización de la presente divulgación;

la Fig. 3 es una representación esquemática del elemento de captura de la Figura 2 con una distribución progresiva de los aglutinantes en la superficie del reaccionante;

- 45 las Figs. 4a, 4b, 4c y 4d son representaciones esquemáticas de un elemento de captura según una segunda (a, b) y una tercera (c, d) realización de la presente divulgación en una vista longitudinal (a, c) y en sección transversal (b, d);

la Fig. 5 es una representación de un sistema de circulación extracorpórea según la presente divulgación;

la Fig. 6 muestra un detalle del sistema de circulación extracorpórea según una realización de la presente divulgación;

- 50 la Fig. 7 muestra un detalle del sistema de circulación extracorpórea según otra realización de la presente divulgación; y

la Fig. 8 muestra esquemáticamente un diagrama de flujo de un método según la presente divulgación.

La Figura 1 es una representación esquemática del dispositivo 1 para la extracción de al menos un elemento C biológico y/o químico indeseable (no mostrado en la figura) de un volumen B de sangre extracorpórea. En particular, el dispositivo es adecuado para la extracción de células tumorales circulantes. El dispositivo 1 consiste esencialmente en una cámara de captura 10 que tiene una entrada 12 para la entrada de la sangre extracorpórea B y una salida 14 para la salida de la sangre B. Como se puede ver de la comparación de las Figuras 1a y 1b, la cámara de captura 10 tiene una forma cilíndrica hueca y la sangre B fluye a través de la cavidad de sección transversal circular.

Dentro de la cámara de captura 10 se encuentra el elemento de captura 20; 20'; 20", que, gracias a la presencia de una superficie reaccionante (no representada en la figura) puesta en contacto con la sangre B, es capaz de captar y extraer la entidad biológica y/o química C indeseable del torrente sanguíneo B.

La Figura 2 muestra una realización de un elemento de captura 20 a ser colocado dentro de la cámara de captura 10. Éste consiste en un elemento longitudinal 24 paralelo al eje longitudinal a de la cámara de captura 10 alrededor del cual se enrolla una superficie reaccionante 22 de forma helicoidal. Específicamente, la superficie reaccionante 22 tiene la forma de un tornillo de Arquímedes. Los aglutinantes A (representados en la figura por flechas) se distribuyen sobre la superficie reaccionante 22, cuyos agentes se utilizan para capturar la entidad biológica y/o química C a extraer, representada por una célula tumoral circulante. Como puede verse en la figura, el elemento de captura 20 puede girar alrededor del eje longitudinal a de la cámara de captura 10. Esta rotación es provocada por el flujo de sangre B que impulsa la superficie reaccionante 22 en un movimiento helicoidal. De esta manera, cada una de las partes de la superficie reaccionante 22 puede entrar en contacto con el flujo de sangre B.

La Figura 3 muestra el caso particular en el que los aglutinantes se distribuyen de manera circunscrita en ciertas regiones de la superficie reaccionante 22 del elemento de captura 20. En particular, la figura muestra seis regiones rectangulares diferentes definidas en la superficie reaccionante 22 de forma helicoidal, que en la Figura 3 está dispuesta en un solo plano por razones de claridad. Cada una de las seis regiones presenta un aglutinante A de diferente naturaleza (A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ y A₆), de forma que diferentes subpoblaciones de células tumorales C (en este caso seis) asociadas a diferentes antígenos puedan ser simultáneamente capturadas y localizadas sobre la superficie reaccionante 22 de una manera más fácil y rápida. Alternativamente, los diferentes tipos de aglutinantes pueden adherirse al dispositivo central con una concentración uniforme pero no localizados en superficies específicas, es decir, distribuyéndolos homogéneamente sobre toda la superficie del dispositivo o sobre la pared interna de la cámara de captura.

La Figura 4 muestra otra realización de un elemento de captura 20'; 20" a ser colocado dentro de la cámara de captura 10. Según esta realización, el elemento de captura 20'; 20" tiene una estructura cónica y está situado dentro de la cámara de captura 10 para que el flujo de sangre penetre por la base de la estructura cónica. El elemento de captura puede comprender una única estructura cónica 20' (Figs. 4a y 4b) o una pluralidad de estructuras cónicas 20". En concreto, las Figuras 4c y 4d muestran el caso en el que dos estructuras cónicas está colocadas en serie en la dirección del flujo de sangre B. La estructura cónica 20'; 20" de esta realización, en particular, consiste en finos cables de material biocompatible sobre los que se adhieren los aglutinantes A. La estructura cónica 20'; 20" tiene una base circular y se extiende simétricamente alrededor de un elemento longitudinal 24'; 24" paralela al eje longitudinal a de la cámara de captura 10.

La Figura 5 muestra un sistema de circulación extracorpórea 100 según la presente divulgación. Mediante un sistema de cánulas 2 se puede extraer la sangre B del circuito vascular de un paciente P y mediante otro sistema de cánulas 3 se puede introducir en el dispositivo de eliminación 1. Un medio 6 para la introducción de un anticoagulante se inserta entre los dos sistemas de cánulas 2 y 3. Después de pasar por el interior del dispositivo 1, la sangre B puede extraerse a través de medios 4 dedicados adecuados y, pasando a través de una unidad de control de la temperatura 7, reintroducirla a través de un nuevo sistema de cánulas 5 en el cuerpo del paciente P. En las proximidades del sistema de cánulas 5 de reintroducción de la sangre B se inserta un medio 8 apropiado para la reintegración de fluidos, por ejemplo, para neutralizar el efecto del anticoagulante.

La Figura 6 muestra un detalle del sistema 100 con respecto a la entrada 12 y la salida 14 de la cámara de captura 10 del dispositivo 1. En concreto, el sistema comprende una bomba para la circulación extracorpórea 30, una válvula de entrada 32 y una válvula de salida 34 para la entrada y la salida de la cámara de captura 10, dos colectores 34 a la entrada 12 y a la salida de la cámara de captura 10, un detector de aire 37 aguas abajo del dispositivo 1 y un detector de la presión de entrada 38 y un detector de la presión de salida 39. La Figura 6 muestra, dentro del sistema 100, un dispositivo 1 que comprende un elemento de captura 20 con una superficie reaccionante helicoidal 22. Sin embargo, ésta es separable y puede ser reemplazada por un elemento de captura diferente 20" que comprende una pluralidad de estructuras cónicas 22".

La Figura 7 muestra un detalle del sistema 100 con respecto a la entrada 12 y la salida 14 de la cámara de captura 10 del dispositivo 1 según una realización alternativa. En particular, el sistema descrito es muy similar al que se muestra en la Figura 6, con la única diferencia de que el elemento de captura 20" consiste en una estructura helicoidal seguida de una pluralidad de estructuras cónicas. Por lo tanto, la superficie reaccionante 22" está definida por una combinación de superficies cónicas y helicoidales, lo que aumenta las posibilidades de captura de las células para ser eliminadas por el dispositivo 1. Además, la presencia combinada de estructuras cónicas aumenta la seguridad clínica del dispositivo 1, ya que puede bloquear coágulos y émbolos potenciales.

Por último, la Figura 8 muestra un diagrama de bloques que describe el método 200 para la extracción de al menos una entidad biológica y/o química C de un volumen de sangre extracorpórea (B).

5 El método 200 comprende el paso de introducir 210 la sangre extracorpórea B en la cámara de captura 10 del dispositivo 1 que tiene en su interior al menos un elemento de captura 20; 20'; 20". Posteriormente, el método comprende el paso de detectar 220 la sangre extracorpórea B por contacto con la superficie reaccionante 22; 22'; 22" del elemento de captura 20; 20'; 20" que comprende una pluralidad de aglutinantes A para la entidad biológica y/o química C a extraer. Finalmente, el método comprende el paso de extraer 230 de la cámara de captura 10 la sangre extracorpórea B desprovista de dicha entidad biológica y/o química C.

10 Los pasos 210, 220 y 230 pueden realizarse después de analizar un volumen de sangre B predeterminado. Por encima de este valor de volumen de sangre B, el método 200 comprende el paso de detener 240 la introducción de sangre B extracorpórea en la cámara de captura 10 y retirar el elemento de captura 20; 20'; 20" para analizar la naturaleza y cantidad de la entidad biológica y/o química C eliminada y presente en la superficie reaccionante 22; 22'; 22". Finalmente, en un paso posterior 250, el elemento de captura 20; 20'; 20", una vez despejadas las entidades previamente capturadas, se pueden reintroducir en la cámara de captura 10 y se puede reiniciar el método 200 desde el paso 210. Cabe señalar que en base al análisis de las entidades capturadas en el paso 240, el elemento de captura 15 20; 20'; 20" puede ser reemplazado por uno diferente en términos de forma y/o configuración de las superficies reaccionantes 22; 22'; 22" o en términos de cantidad, naturaleza y distribución de los aglutinantes A.

20 Una persona experta en la técnica, con el fin de cumplir requisitos adicionales y contingentes, puede realizar varias modificaciones y variaciones adicionales al dispositivo y al sistema descritos anteriormente, todas comprendidas, sin embargo, dentro del alcance de protección de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) para la extracción de al menos una entidad biológica y/o química (C) de un volumen de sangre extracorpórea (B), que comprende:
- 5 - una cámara de captura (10) hueca de forma cilíndrica que tiene una entrada (12) para la entrada de la sangre extracorpórea (B) y una salida (14) para la salida de la sangre extracorpórea (B) y
- 10 - al menos un elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') comprendido dentro de la cámara de captura (10), que se extiende longitudinalmente dentro de la cámara de captura (10), y móvil con respecto a la cámara de captura (10), teniendo el elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') una superficie reaccionante (22; 22'; 22"; 22''') puesta en contacto con la sangre extracorpórea (B) y que comprende una pluralidad de aglutinantes (A) para la entidad biológica y/o química a extraer (C), de manera que a la salida (14) de la cámara de captura (10) se elimina la entidad biológica y/o química (C) de la sangre extracorpórea (B), estando unida la entidad biológica y/o entidad química (C) a la superficie reaccionante (22; 22'; 22"; 22'''), en donde el volumen total de sangre extracorpórea (B) que fluye dentro de la cámara de captura (10) está comprendido entre 3 y 5 litros de sangre hasta 30 litros de sangre, caracterizado por que
- 15 el elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') es giratorio alrededor de un eje longitudinal (a) de la cámara de captura (10), y por que
- el dispositivo comprende, además, un sistema de acoplamiento y desacoplamiento configurado de manera que el elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') se puede retirar de la cámara de captura (10) para permitir el análisis de las entidades capturadas por la superficie reaccionante (22; 22'; 22"; 22''').
- 20 2. El dispositivo (1) según la reivindicación 1, en donde la entidad biológica y/o química (C) a extraer es una célula tumoral circulante.
3. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los aglutinantes (A) comprenden uno o más anticuerpos, o proteínas de adhesión o aptámeros, proporcionando con ello la extracción de CTCs epiteliales, mesenquimales, epiteliales-mesenquimales híbridas y similares a tallos, solas y/o en agrupaciones.
- 25 4. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la superficie reaccionante (22) del elemento de captura (20) móvil tiene forma de hélice o similar.
5. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, una o varias estructuras cónicas que tienen cada una una superficie de malla filtrante formada por orificios de un diámetro igual o superior a 100 µm.
- 30 6. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de aglutinantes (A) se distribuye uniformemente sobre toda la superficie reaccionante (22; 22'; 22"; 22''') del elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') móvil.
7. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la pluralidad de aglutinantes (A) consiste en aglutinantes de diferente naturaleza, que se concentran en zonas específicas de la superficie reaccionante (22; 22'; 22"; 22''') del elemento de captura (20; 20'; 20"; 20''') móvil.
- 35 8. El dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los aglutinantes (A) se distribuyen o concentran uniformemente en zonas específicas en la superficie interna de la cámara de captura (10).
9. El dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el volumen total de sangre extracorpórea (B) que fluye dentro de la cámara de captura (10) es de hasta 14 TBVs que consiste en hasta 70 litros de sangre.
- 40 10. Sistema de circulación extracorpórea (100), que comprende:
- medios de extracción (2) para extraer sangre venosa (B) del sistema vascular de un paciente (P);
- medios de entrada (3) para introducir la sangre (B) extraída en el dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, medios de salida (4) para extraer la sangre (B) del dispositivo (1) y medios de re-entrada (5) para reintroducir la sangre (B) extraída del dispositivo (1) en el sistema vascular del paciente (P).
- 45 11. El sistema (100) según la reivindicación 10, que comprende, además:
- un medio para introducir un anticoagulante (6) aguas arriba del dispositivo (1) y una unidad de control de la temperatura (7) aguas abajo del dispositivo.

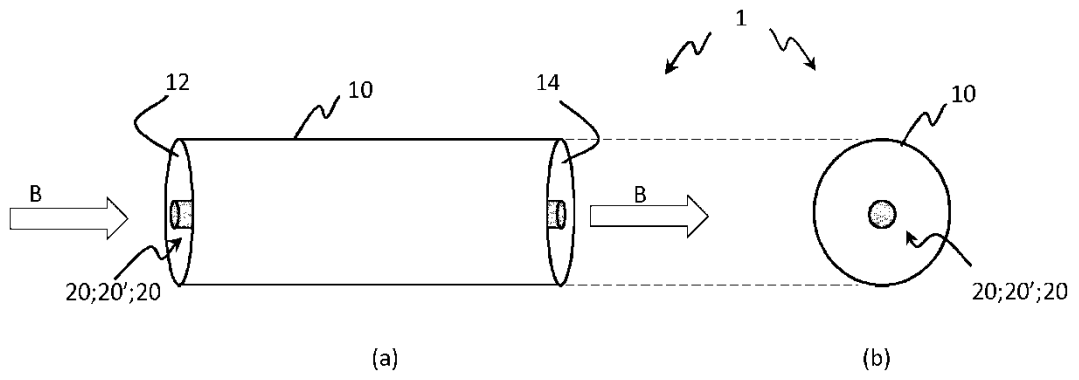


Fig. 1

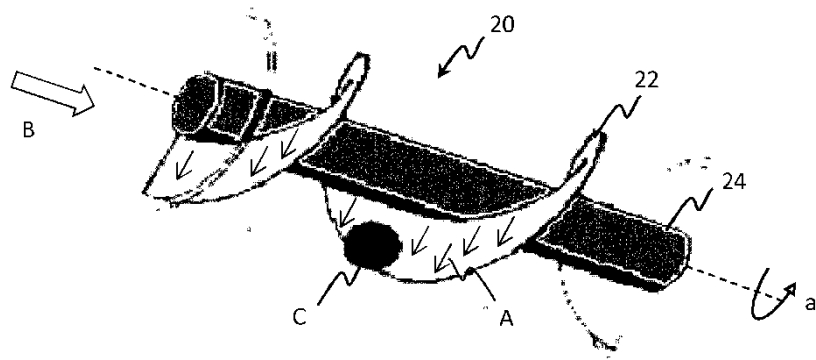


Fig. 2

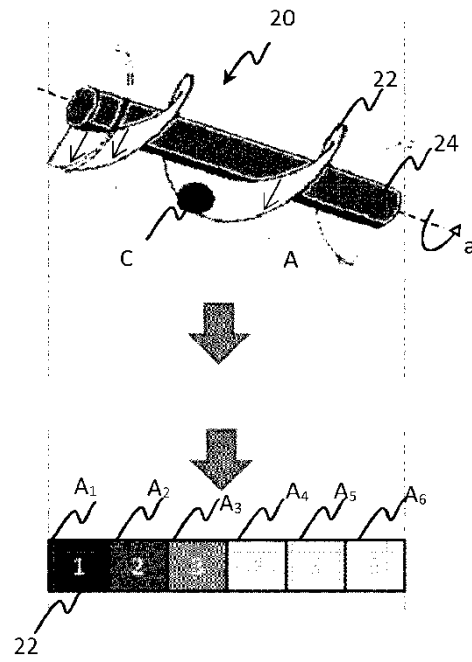


Fig. 3

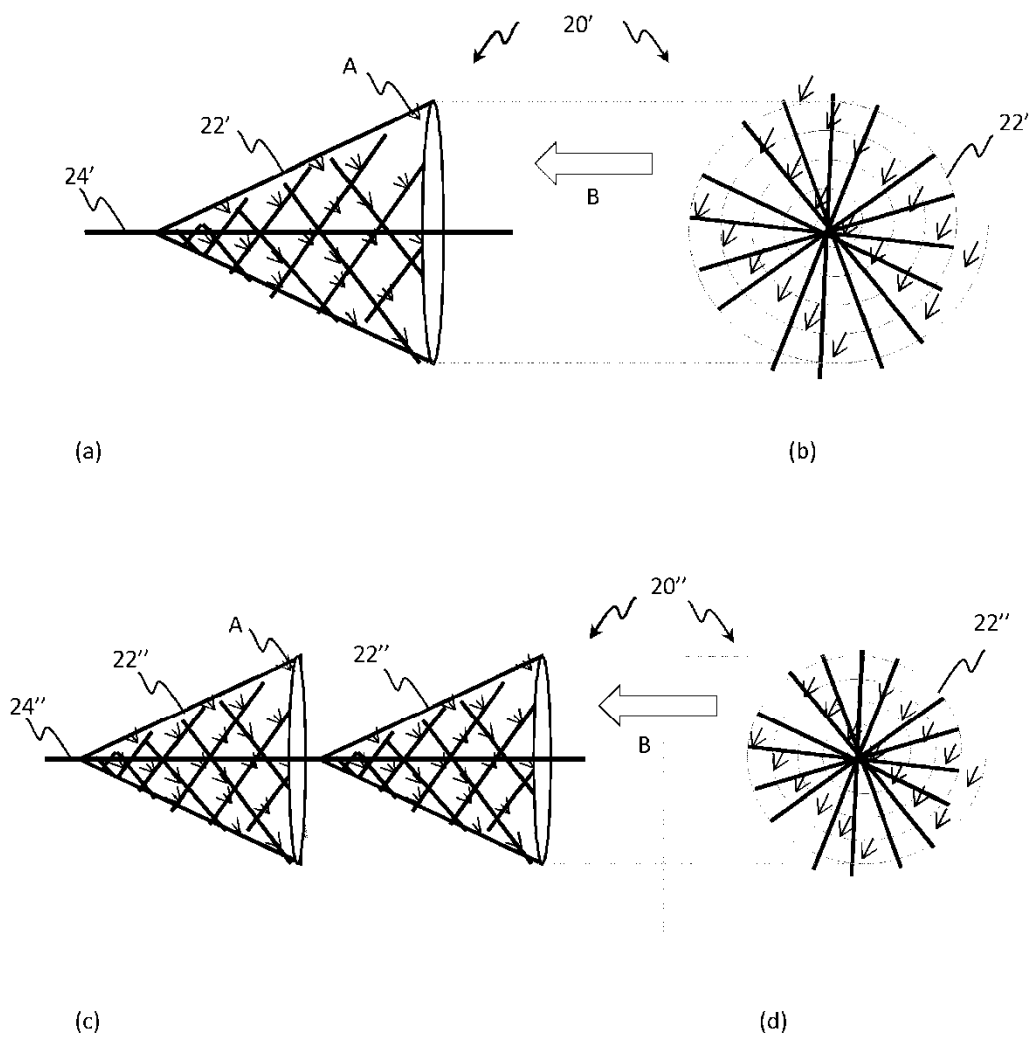


Fig. 4

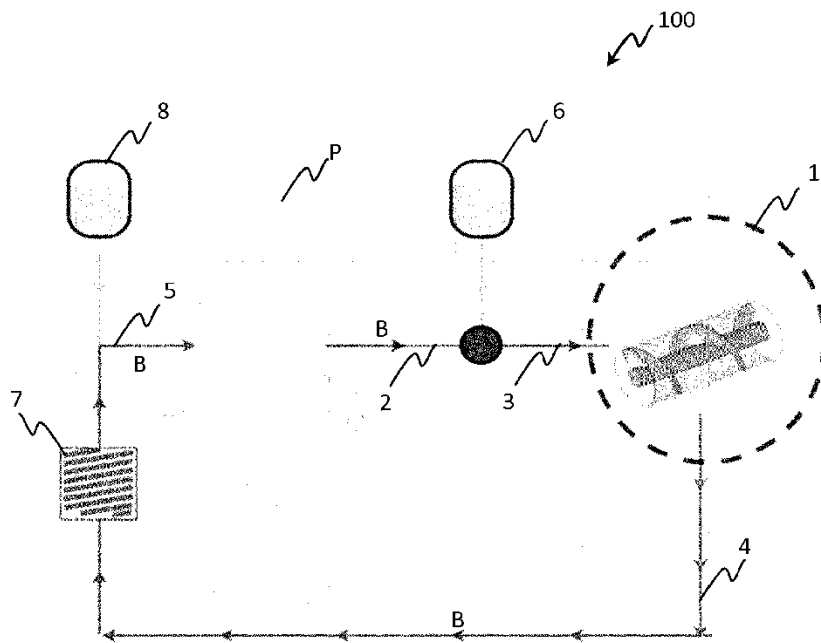


Fig. 5

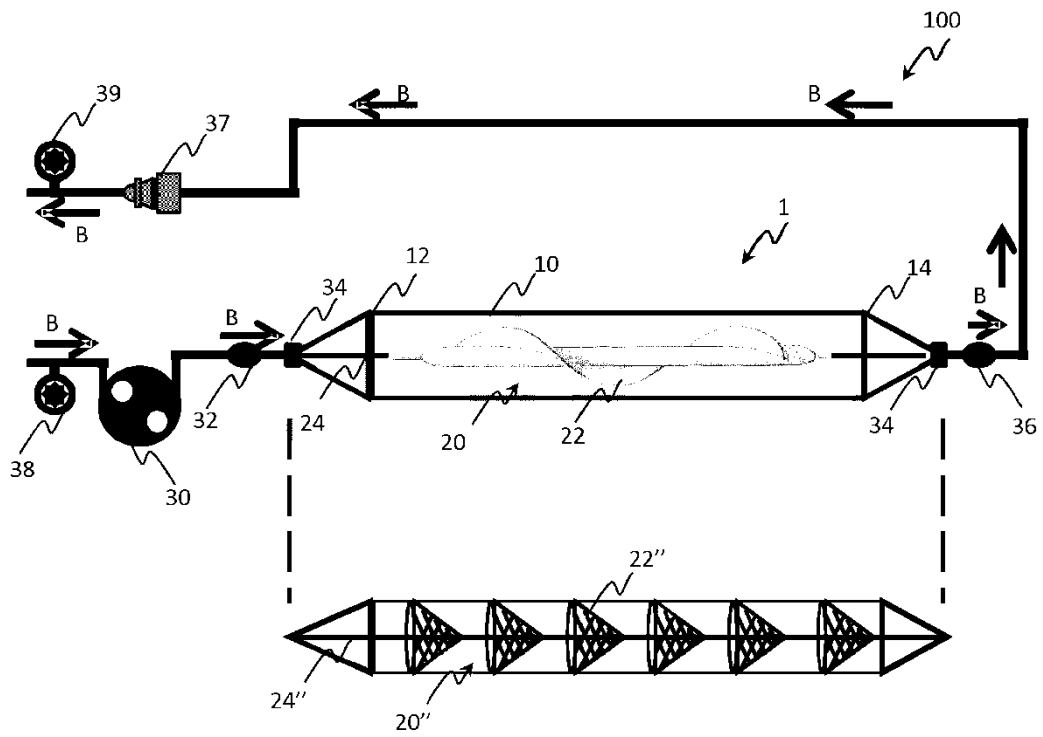


Fig. 6

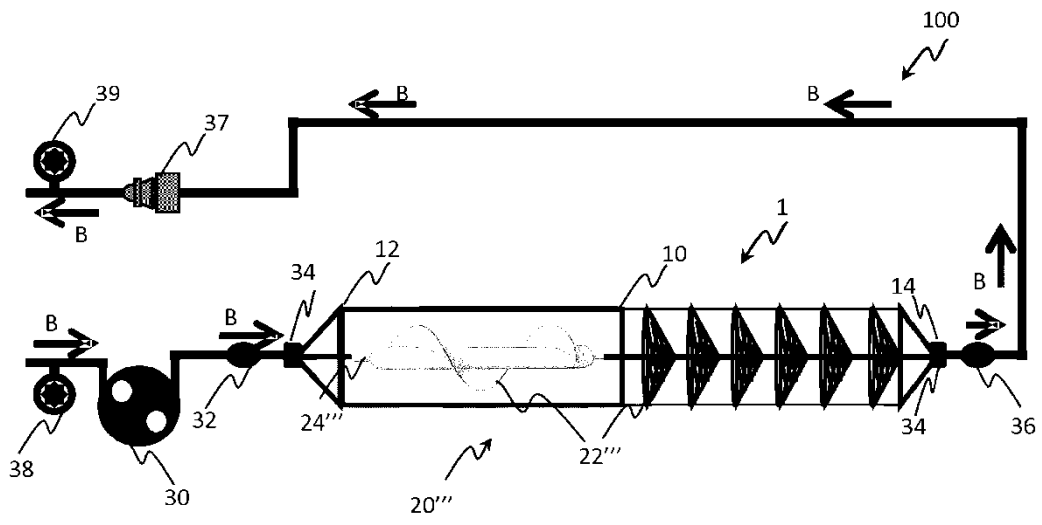


Fig. 7

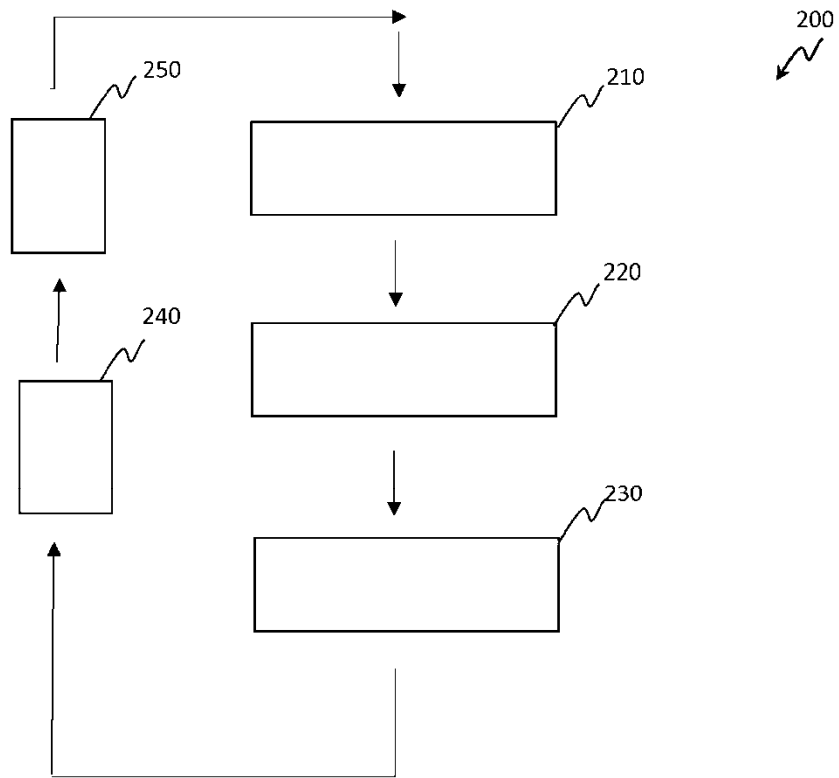


Fig. 8