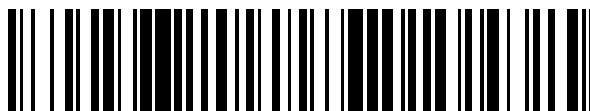


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 399**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/34** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61M 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2006 PCT/SE2006/001421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07069983**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006 E 06835845 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 1960016**

54 Título: **Método para la eliminación extracorpórea de un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria de la sangre**

30 Prioridad:

**13.12.2005 SE 0502750**

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

**10.04.2017**

73 Titular/es:

**EXTHERA MEDICAL CORPORATION (100.0%)  
757 Arnold Drive, Suite B  
Martinez, CA 94553, US**

72 Inventor/es:

**LARM, OLLE y  
BERGSTRÖM, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Marta**

ES 2 608 399 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

Método para la eliminación extracorpórea de un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria de la sangre

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en el tratamiento de una afección provocada o agravada por un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria.

10

Antecedentes15 *Biología*

Durante una larga evolución, muchos microorganismos patógenos han aprendido a explotar los glicoconjugados de la superficie de células eucariotas, es decir glicolípidos, glicoproteínas y proteoglicanos, como moléculas receptoras para la unión celular para facilitar la colonización tisular y los procesos de invasión. En resumen, proteínas específicas denominadas adhesinas de la superficie de bacterias, virus, hongos y parásitos interactúan con cadenas de carbohidrato de glicoconjugados que permiten a los microbios colonizar superficies mucosas y lesiones tisulares.

20

El papel del ácido siálico en la unión de patógenos a las células huésped se ha notificado a lo largo de muchos años. Solo recientemente se mostró que los proteoglicanos con sus cadenas de carbohidrato (glicosaminoglicanos) se unían a muchos patógenos diferentes. Eliminando los restos de carbohidrato terminales de estos diversos glicoconjugados con sialidasa y otras exoglicosidasas o con enzimas que degradan glicosaminoglicano (GAG) sobre las células en monocapas, se demostró que estas estructuras eran moléculas receptoras para diversas sialoadhesinas y proteínas de unión a heparán sulfato (HeBP).

25

30

Estos mecanismos se resumen en un artículo de revisión de Siiri Hirno, Meeme Utt y Torkel Wadström, *Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Volumen 12, incluyendo Proceedings from the 17th International Lectin Meeting en Wurzburg, 1997, editado por Edilbert van Driessche, Sonia Beeckmans y Thorkild C. Bog-Hansen, publicado por TEXTOP, Lemchesvej 11, DK-2900 Hellerup, Dinamarca, número ISBN 87-984583-0-2.

35

Durante las infecciones microbianas se liberan y activan mediadores inflamatorios. Estas denominadas "citocinas pro-inflamatorias" incluyen factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas son parte de la respuesta inflamatoria de la septicemia. El fallo multiorgánico inducido por la septicemia es en la actualidad la principal causa de muerte en las unidades de cuidado intensivo.

40

En relación con las infecciones microbianas y la cirugía cardiovascular, por ejemplo, derivación cardiopulmonar, se obtienen respuestas inflamatorias y tienen una multitud de consecuencias biológicas, que van desde disfunción orgánica subclínica hasta fallo multiorgánico severo. Se cree que las citocinas son importantes mediadores en esta respuesta.

45

Las citocinas mencionadas anteriormente tienen una capacidad para unirse de forma selectiva a una gama de glicosaminoglicanos, o GAG, incluyendo heparán sulfato en tejidos y sobre la superficie tanto de células endoteliales como leucocitos.

50 *Receptores*

El heparán sulfato es un glicosaminoglicano que está presente sobre la superficie de casi todas las células de mamífero. Está formado por residuos de D-glucosamina y ácido urónico alternantes (L-idurónico y D-glucurónico). Los heparán sulfato son polisacáridos heterogéneos altamente cargados (sulfatados) y representan la parte de carbohidrato de muchos glicoconjugados (sindecano, perlecana, glicoproteína) sobre la superficie celular.

55

Muchos microbios utilizan heparán sulfato sobre la superficie de la célula de mamífero como receptores. Este mecanismo es general y válido para casi todas las bacterias, virus y parásitos. Algunos microorganismos utilizan más de un receptor de glicoconjugado. Ejemplos de otros receptores que se usan junto con heparán sulfato son sulfatos de condroitina específicos y glicoproteínas que contienen ácido siálico.

60

Los microbios de unión a heparán sulfato/sulfato de condroitina se muestran a modo de ejemplo por virus como el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), agente causal de herpes orolabial; virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2), agente causal de herpes genital; citomegalovirus (CMV), el agente de complicación mayor en pacientes inmunodeprimidos; virus del dengue, que provoca fiebres recurrentes; y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); y por bacterias como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*,

65

*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*; y parásitos como *Plasmodium falciparum* (que provoca malaria), y *Trypanosoma cruzi* (que provoca tripanosomiasis).

5 Además, citocinas, como TNF- $\beta$ , utilizan también heparán sulfato sobre las superficies celulares para la unión y activación.

#### *Heparina como receptor*

10 La heparina es un polisacárido que se aísla a partir de tejido de mamífero. Desde su descubrimiento en 1916 por el científico americano McLean, la heparina ha sido reconocida por sus propiedades anticoagulantes de la sangre y la heparina, durante más de 50 años, se ha usado clínicamente como anticoagulante sanguíneo y agente antitrombótico.

15 Mientras que los heparán sulfato son componentes ubicuos de todas las formas de vida animal organizadas por tejidos, la heparina tiene una distribución muy particular en el tejido de mamífero. La heparina está, al contrario que los heparán sulfato, presente solo en los gránulos basófilos de mastocitos. Sin embargo, hoy en día, además de su posición establecida en la prevención y la terapia de trastornos tromboembólicos, la heparina ha demostrado un amplio espectro de diferentes actividades independientes de la anticoagulación.

20 Un gran número de proteínas en la sangre se unen, con alta afinidad, a heparina y/o heparán sulfato. Ejemplos son antitrombina (AT), fibronectina, vitronectina, factores de crecimiento (por ejemplo los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento de tipo insulina, etc.). La albúmina de suero humana (HSA) también se une, pero con una menor afinidad. Por otro lado, HSA está presente en grandes cantidades en la sangre.

25 Para utilizar estas propiedades de la heparina para impedir infecciones, se ha contemplado introducir fragmentos de heparina y/o fragmentos que contienen siálico en el sistema vascular. De ese modo, se pensó que estos fragmentos se unirían a las lectinas en los microbios, bloqueándolos y así impidiendo que se unieran a los receptores sobre la superficie celular de mamífero. Este concepto ha sido probado por muchos científicos pero con un éxito limitado, en la mayoría de los casos debido a complicaciones de hemorragia cuando se introducen grandes cantidades de heparina en el sistema vascular.

30 El documento US 6.197.568 divulga métodos para el aislamiento y la detección de flavivirus y otros virus de la fiebre hemorrágica, tales como virus del dengue, basados en la interacción dependiente de polianiones sulfatados de flavivirus y virus de la fiebre hemorrágica.

35 El documento US 2002/197252 A1 se refiere a dispositivos y métodos para reducir los niveles de mediadores pro-inflamatorios en la sangre mediante adsorción. Los dispositivos del documento US 2002/ 197252 A1 pueden comprender moléculas de heparina inmovilizadas sobre los medios de adsorción como un método para mejorar la "biocompatibilidad" mediante hidrofiliación o minimizando la activación del complemento sanguíneo de los medios de adsorción. La heparina se inmoviliza mediante interacción electrostática y/o reticulación química usando un agente de reticulación bifuncional.

40 El documento US 5 437 861 A describe composiciones, dispositivos y métodos para el tratamiento o la prevención del síndrome de choque séptico u otras afecciones evidenciadas por la presencia de citocinas al poner en contacto sangre completa de un paciente con una composición que comprende sílice y un material de tratamiento superficial, tal como heparina, pero preferiblemente HSA. La adición de heparina o HSA a la sílice solo sirve para prevenir la activación plaquetaria y la coagulación, mientras que la adsorción de citocinas se logra mediante la sílice en sí. La heparina o HSA es sustancialmente carente de unión covalente con la sílice.

45 Se usan dispositivos extracorpóreos en una variedad de situaciones clínicas incluyendo diálisis renal, derivación cardiopulmonar y plasmáferesis. "Terapias extracorpóreas" significa procedimientos en los que productos deseados como oxígeno, anticoagulantes sanguíneos, anestésicos, etc. pueden añadirse a los fluidos corporales. Al contrario, productos indeseados como las toxinas etc. pueden eliminarse de los fluidos corporales fuera del organismo. Ejemplos son la hemodiálisis y la hemofiltración, que representan tecnologías mediante las cuales la sangre se lava de productos de desecho.

#### Sumario de la invención

50 Se describe un método para el tratamiento de un mamífero que padece enfermedades o afecciones provocadas o agravadas por diferentes patógenos microbianos, células inflamatorias o proteínas inflamatorias mediante la eliminación de dichos microbios patógenos, células inflamatorias o proteínas inflamatorias de la sangre de dicho mamífero.

65 Se describe un método para la eliminación extracorpórea de patógenos microbianos, células inflamatorias o proteínas inflamatorias de la sangre de mamíferos.

Los objetos mencionados anteriormente, así como objetos adicionales de la invención, que serán evidentes para un experto en la técnica después de haber estudiado la descripción a continuación, se logran mediante la presente invención tal como se describe en el presente documento.

5 Un primer aspecto de la presente invención proporciona heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en el tratamiento de una afección provocada o agravada por un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria.

10 Se describe también un método para la eliminación extracorpórea de un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria de la sangre de mamífero, que comprende las etapas:

- 15 a) proporcionar una muestra de sangre de mamífero,
- b) poner dicha muestra en contacto con heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, teniendo dicha heparina una afinidad de unión por un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria, en condiciones que permiten la unión de cualquier patógeno microbiano, célula inflamatoria y proteína inflamatoria en dicha muestra de sangre a la heparina,
- 20 c) separar la muestra del sustrato sólido, de modo que dicho microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria esté al menos parcialmente retenido sobre el sustrato sólido, y
- d) recuperar dicha muestra que contiene una cantidad reducida de dicho microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria.

25 El concepto de la técnica anterior de introducir fragmentos de heparina y/o fragmentos que contienen siálico en el sistema vascular de pacientes ha mostrado un éxito limitado, en la mayoría de los casos debido a complicaciones por hemorragia cuando se introducen grandes cantidades de heparina en el sistema vascular. La presente invención sorteja estos problemas inmovilizándose la heparina sobre una superficie sólida, tal como se describe, entre otros, en el ejemplo de preparación 6.

30 El uso de heparina inmovilizada tal como se define por el método de acuerdo con la invención proporciona también una ventaja inesperada adicional. Los inventores han descubierto que la heparina ha de inmovilizarse sobre una superficie sólida para tener la capacidad que es necesaria para unir una cantidad significativa de los compuestos que van a eliminarse. Esta propiedad inesperada se describe en el Ejemplo comparativo 1 y el Ejemplo 1 para VHS-1, que muestran que en disolución, menos del 3 % del virus se une a un exceso de heparina (Ejemplo comparativo 1) mientras que más del 94 % del virus se une a la heparina inmovilizada (Ejemplo 1).

35 La presente invención permite el tratamiento seguro y eficaz de pacientes que padecen septicemia o choque septicémico eliminando los patógenos causantes de la afección de la circulación sanguínea del paciente. La presente invención permite la eliminación de muchos patógenos microbianos, células inflamatorias y proteínas inflamatorias diferentes. Ejemplos de patógenos microbianos comúnmente asociados con la septicemia que pueden eliminarse usando la invención incluyen estafilococos, tales como *Staphylococcus aureus*, estreptococos y *E. coli*.

40 Debido a que tanto heparina como heparán sulfatos se unen a un gran número de componentes, tal como se muestra a modo de ejemplo en la sección de antecedentes, se esperaba que una superficie de heparina se cubriría con muchas de estas proteínas, cuando se pusieran en contacto con la sangre, impidiendo así que los microbios se unieran. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una purificación altamente eficiente del suero y la sangre completa de mamíferos, incluyendo seres humanos, puede lograrse de acuerdo con la presente invención. En el presente documento se divulga que una columna de tamaño moderado conseguía eliminar casi por completo cantidades considerables de virus del suero sanguíneo y la sangre completa. Véanse por ejemplo los Ejemplos 2, 3 y 4.

En una realización, dicho microbio patógeno se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus y parásitos.

45 En una realización, dicho microbio patógeno es un virus. En una realización más específica, dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, virus de la gripe A, citomegalovirus y virus de la inmunodeficiencia humana. En otra realización más específica, dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus del herpes simple tipo 1 o virus del herpes simple tipo 2.

50 En otra realización, dicho microbio patógeno es una bacteria. En una realización más específica, dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. En una realización preferida, dicho microbio patógeno es *Helicobacter pylori* o *Staphylococcus aureus*.

55 En todavía otra realización, dicho microbio patógeno es un parásito. En una realización más específica, dicho parásito se selecciona del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*.

En una realización adicional, dicha célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en linfocitos inflamatorios y macrófagos inflamatorios.

5 En todavía una realización adicional, dicha proteína inflamatoria es una citocina pro-inflamatoria. En una realización más específica, dicha citocina pro-inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), interleucina-1 (IL-1), e interleucina-6 (IL-6).

En una realización, dicha sangre de mamífero es sangre humana.

10 En todavía otra realización, dicho sustrato sólido comprende micropartículas o fibras huecas. En ciertas realizaciones de la invención, el material de dicho sustrato sólido se selecciona del grupo que consiste en vidrio, celulosa, acetato de celulosa, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarosa reticulada, polipropileno, polietileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, silicona, teflón y poliuretanos.

15 La heparina se une a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente. La unión covalente de un carbohidrato a un sustrato sólido proporciona un mejor control de parámetros tales como densidad superficial y orientación de las moléculas inmovilizadas en comparación con la unión no covalente. Los inventores han demostrado que estos parámetros son importantes con el fin de proporcionar una óptima unión de patógenos a las moléculas de heparina inmovilizada. La concentración superficial de la heparina sobre el sustrato sólido se encontrará preferiblemente en el intervalo de 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . La unión de punto final covalente significa que la heparina se une covalentemente al sustrato sólido a través del residuo terminal de la molécula de heparina.

20 También se describe en el presente documento el uso de un dispositivo que comprende heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, teniendo dicha heparina una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, para la eliminación extracorpórea de un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria de la sangre de mamífero.

25 También se describe en el presente documento el uso de heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, en la preparación de un dispositivo para el tratamiento de una afección provocada o agravada por un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria.

30 Un dispositivo, tal como se hace referencia en el presente documento, puede comprender un dispositivo convencional para el tratamiento extracorpóreo de la sangre y el suero de pacientes, por ejemplo que padecen insuficiencia renal.

35 Se conoce que los patrones de flujo sanguíneo locales en la sangre que entra en contacto con dispositivos médicos para la circulación extracorpórea influyen en la formación de coágulos a través de la activación de cizallamiento y la agregación de plaquetas en zonas de estancamiento. En consecuencia, tal como se describe en el presente documento se diseñará de una manera que no cree estos problemas.

Un dispositivo tal como se describe en el presente documento puede tener por ejemplo las siguientes propiedades:

- 40
- Un flujo sanguíneo en el intervalo de 1-500 ml/min, preferiblemente 5-250 ml/min.
  - 45 - Baja resistencia al flujo.
  - Gran área superficial de sustrato que tiene heparina inmovilizada en el mismo, por ejemplo aproximadamente 0,1-1  $\text{m}^2$ .
  - Recubrimiento estable (no fuga de heparina a la sangre en contacto con el mismo).
  - Propiedades hemodinámicas apropiadas en el dispositivo (sin zonas de estancamiento).
  - 50 - Biocompatibilidad óptima.

55 Un ejemplo no limitativo de un dispositivo de este tipo, que puede usarse para la presente invención, es un dializador pediátrico Hemoflow tal como el hemofiltrador/dializador Prisma M10 de Gambro AB, Suecia. También pueden usarse otros modelos o tipos de dispositivos para el tratamiento extracorpóreo de la sangre o el suero.

También se describe en el presente documento un método para el tratamiento de un sujeto mamífero que padece una afección provocada o agravada por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, que comprende las etapas:

- 60
- a) extraer sangre del sujeto,
  - b) poner la sangre extraída en contacto con un dispositivo que comprende heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, teniendo dicha heparina una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, en condiciones que permiten la unión de un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria a la heparina, y
  - 65 c) reintroducir la sangre, que contiene una cantidad reducida de dicho microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria, en la circulación sanguínea del sujeto.

En el método de tratamiento, la extracción y reintroducción de la sangre puede realizarse en un bucle continuo, bucle que comprende una parte de la circulación sanguínea del sujeto.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "microbio patógeno" significa un microbio, que puede provocar una enfermedad en un organismo vivo cuando se introduce en dicho organismo. Los ejemplos de "patógenos microbianos" incluyen bacterias, virus y parásitos.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula inflamatoria" significa una célula que está implicada en la respuesta inflamatoria en un mamífero. Los ejemplos de "células inflamatorias" incluyen linfocitos inflamatorios y macrófagos inflamatorios.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína inflamatoria" significa una proteína, tal como una citocina, liberada, por ejemplo, en relación con una inmunización o infección microbiana.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "citocina" significa una proteína liberada, por ejemplo, en relación con una inmunización o infección microbiana, seleccionada del grupo que consiste en interleucinas, interferones, quimiocinas y factores de necrosis tumoral.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo de preparación 1

#### *Aminación de Sephadex G 25*

25 Se disolvió metaperyodato de sodio (Na<sub>16</sub>,0 g) en agua (994 ml) y se añadió a Sephadex G 25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) (50 g) en 1 l de agua. La mezcla se mantuvo en la oscuridad con agitación durante 24 h. Tras la filtración y el lavado con agua 5 x 1 l y finalmente tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0, el producto resultante se suspendió en tampón fosfato, pH 7,0 (350 ml) y se añadió una solución de polietilenimina (100 ml de Lupasol (BASF, Alemania), 5 % en agua). El gel se estabilizó mediante la adición de una solución acuosa de NaBH<sub>3</sub>CN, cianoborohidruro de sodio (0,5 g en 100 ml, tampón fosfato, 0,1 M, pH 7,0). El gel se filtró y se lavó tal como se describió anteriormente y finalmente se lavó con tampón acetato (500 ml, 0,1 M, pH 4,0), proporcionando Sephadex G 25 aminado (85 g).

### Ejemplo de preparación 2

35 *Unión de punto final covalente de heparina sobre un gel cromatográfico*

Se suspendió Sephadex G 25 aminado (85 g) obtenido tal como se describe en el Ejemplo de preparación 1 en tampón acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0) y se añadieron 4,0 g de heparina degradada con ácido nitroso (heparina de Pharmacia, Suecia). Tras agitar durante 0,5 h, se añadió NaBH<sub>3</sub>CN (0,4 g). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y entonces se procesó tal como anteriormente, proporcionando Sephadex G 25 heparinizado (80 g).

45 El gel contiene el 2 % de heparina (p/p, análisis de azufre). Las perlas de Sephadex G 25 tienen un diámetro promedio de 50-150  $\mu\text{m}$ . Un cálculo aproximado revela que 1  $\text{cm}^3$  contiene  $10^6$  perlas lo que da un área superficial de perla de 0,03  $\text{m}^2/\text{cm}^3$ . Además, si la heparina está unida únicamente a la superficie de las perlas, un Sephadex G 25 heparinizado con el 2 % de heparina p/p tiene aproximadamente 0,003  $\mu\text{g}$  de heparina/ $\text{cm}^2$ .

### Ejemplo de preparación 3

50 *Unión covalente de heparina sobre lana de vidrio aminada*

Un material de lana de vidrio se hepariniza usando el procedimiento general descrito a continuación.

55 La lana de vidrio se lava minuciosamente con ácido (HCl), se enjuaga con etanol absoluto y se seca en un horno a 100 °C durante 4 horas.

Se introducen funciones amino reactivas sobre la superficie de lana de vidrio mediante tratamiento con una solución acuosa de poliamina, polietilenimina (PEI) o quitosano. Para algunos fines, las poliaminas pueden estabilizarse sobre la superficie mediante reticulación con reactivos bifuncionales, tales como crotonaldehído o glutaraldehído.

60 El recubrimiento se estabiliza adicionalmente mediante reticulación iónica con un polisacárido sulfatado (sulfato de dextrano o heparina). Si es necesario, estas etapas se repiten y se forma una estructura de tipo sándwich. Entre cada etapa deberá realizarse un enjuague cuidadoso (agua, tampones adecuados). Después de una última adición de PEI o quitosano, se realiza la unión de punto final (EPA) a la superficie aminada de la heparina nativa mediante aminación reductora, utilizando la función aldehído en el residuo terminal reductor en la heparina nativa. El

acoplamiento se realiza en solución acuosa, mediante aminación reductora (cianoborohidruro,  $\text{CNBH}_3^-$ ) esencialmente tal como se describe en el Ejemplo de preparación 2.

5 El análisis de superficie tal como se describe en el Ejemplo de preparación 2 revela que aproximadamente 10  $\text{mg}/\text{cm}^2$  de heparina se acopla a la superficie de vidrio.

#### Ejemplo de preparación 4

##### *Unión covalente de heparina sobre superficies poliméricas aminadas*

10 Se heparinizó una superficie polimérica usando el procedimiento general que se describe a continuación.

15 La superficie polimérica se ataca un agente oxidante (permanganato de potasio, peroxodisulfato de amonio) con el fin de introducir características hidrófilas junto con algunos grupos funcionales reactivos ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{C}=\text{C}-$ ). La superficie puede atacarse también con plasma o corona.

20 Se introducen funciones amino reactivas mediante tratamiento con una poliamina, polietilenimina (PEI) o quitosano. Para algunos fines, las poliaminas pueden estabilizarse sobre la superficie mediante reticulación con reactivos bifuncionales, tales como crotonaldehído o glutaraldehído.

25 El recubrimiento se estabiliza adicionalmente mediante reticulación iónica con un polisacárido sulfatado (sulfato de dextrano o heparina). Si es necesario, estas etapas se repiten y se forma una estructura de tipo sándwich. Entre cada etapa deberá realizarse un enjuague cuidadoso (agua, tampones adecuados). Después de una última adición de PEI o quitosano, la unión de punto final (EPA) a la superficie aminada de la heparina nativa se realiza mediante aminación reductora, utilizando la función aldehído en el residuo terminal reductor en la heparina nativa. Una función aldehído más reactiva en el residuo terminal reductor puede conseguirse mediante degradación de heparina nitrosa, parcial. Esto acorta el tiempo de reacción, pero la heparina inmovilizada tendrá un peso molecular más bajo. El acoplamiento se realiza en solución acuosa, mediante aminación reductora (cianoborohidruro,  $\text{CNBH}_3^-$ ) esencialmente tal como se describe en el Ejemplo de preparación 2.

30 Puede acoplarse 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de heparina a todas las superficies hidrófilas como vidrio, celulosa, quitina etc., y más o menos todos los polímeros hidrófobos como poli(cloruro de vinilo), polietileno, policarbonato, poliestireno, PTFE etc.

#### Ejemplo de preparación 5

##### *Unión de un solo punto o de múltiples puntos covalente de heparina sobre superficies poliméricas*

40 Se realiza tal como se describe en el Ejemplo de preparación 2, con la excepción de que las funciones aldehído se introdujeron en la cadena de heparina mediante oxidación con peryodato de sodio en solución acuosa.

#### Ejemplo de preparación 6

##### *Unión de heparina sobre la luz interna de fibras huecas*

45 En este ejemplo de preparación, se usó un dializador Hemoflow pediátrico. Las fibras del dializador se realizaron de polisulfona con un diámetro interior de 200 micras y un espesor de pared de 40 micras. El área superficial total de la sangre en contacto con el material era de 4000  $\text{cm}^2$  y el volumen de cebado era de 28 ml.

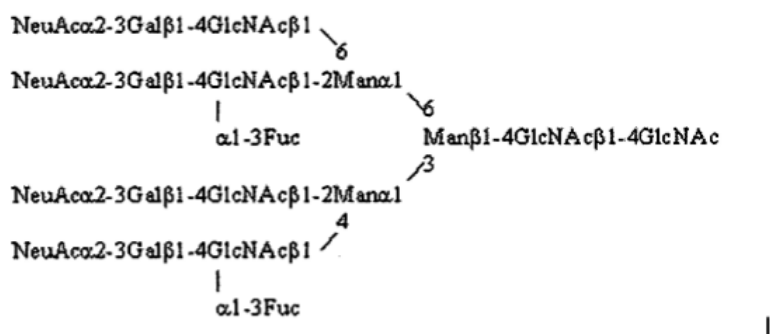
50 El procedimiento de aminación se realizó tal como se describe en general en el Ejemplo de preparación 4 con la excepción de que se omitió la etapa de ataque. La polisulfona es hidrófila y no necesita ataque. La inmovilización de heparina se realizó bombeando una solución que contenía heparina degradada con ácido nitroso (heparina de Pharmacia) junto con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  tal como se describe en el Ejemplo de preparación 2. Debido a que la medición de la cantidad de heparina es un procedimiento destructor, se heparinizó un dializador de referencia que se heparinizó en condiciones idénticas se sacrificó y sus fibras se sometieron a análisis de azufre. Los resultados revelaron un contenido en heparina de aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de heparina/ $\text{cm}^2$ , que corresponde a un contenido de 20 mg de heparina en el dispositivo.

#### Ejemplo de preparación 7

60 *Unión covalente de oligómeros con residuos de ácido siálico terminal sobre la luz interior de fibras huecas*

65 En este ejemplo de preparación, el grupo aldehído en el residuo terminal reductor se usó para el acoplamiento. La aminación de las fibras se realizó tal como se describe en el Ejemplo de preparación 6 y el acoplamiento del oligosacárido de fórmula I, que contiene residuos de ácido siálico terminales, se realizó haciendo circular el compuesto de fórmula I, disuelto en tampón acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0) junto con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (0,4 g), a

temperatura ambiente durante 24 h. Los resultados revelaron un contenido en ácido siálico de aproximadamente 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



5

Ejemplo comparativo 1

*Unión de VHS-1 a heparina en disolución*

10 Una solución (10  $\mu\text{l}$ ) que contenía  $10^7$  unidades formadoras de placa de virus (virus del herpes simple tipo 1 cepa KOS321) se incubó con 20  $\mu\text{l}$  de heparán sulfato marcado con  $^3\text{H}$  (HS) en un volumen total de 400  $\mu\text{l}$  de NaCl tamponado durante 30 min a 37 °C. Después, la solución se centrifugó a través de un filtro Microsep 1 M, reteniendo virus y HS unido. El 2,3 % de HS estaba unido (479 CPM) al virus, mientras que el 97,7 % del HS estaba no unido y se hizo pasar a través del filtro.

15

Ejemplo 1

*Eliminación de partículas de virus de VHS-1 y VHS-2 de solución salina tamponada mediante la unión a heparina inmovilizada sobre perlas de Sephadex*

20

Perlas de Sephadex recubiertas con heparina, tal como en el Ejemplo de preparación 2, se empaparon en NaCl tamponado (PBS) y se transfirieron 0,8 ml a cada una de dos columnas desechables pequeñas, formando una capa de gel de aproximadamente 1 cm. Tras lavar tres veces, se suspendieron 50  $\mu\text{l}$  de virus radiomarcados con  $^3\text{H}$ -timidina en 150  $\mu\text{l}$  de PBS.  $10^9$  unidades formadoras de placa de VHS-1, correspondiente a  $10^{11}$  partículas de virus, se añadieron a la columna 1, y  $10^8$  unidades formadoras de placa de VHS-2, correspondiente a  $10^{10}$  partículas de virus, se añadieron a la columna 2. El virus se dejó adsorber en las columnas respectivas. Después, se añadieron 0,8 ml de PBS a cada columna y se recogió el fluido que había pasado a su través para una estimación del virus no absorbido.

25

30 Posteriormente se lavaron ambas columnas 4 veces con 1 ml de PBS, y los lavados se recogieron como fracciones para la cuantificación del virus separado por lavado. Estas, y las siguientes fracciones, se transfirieron a viales de centelleo y se cuantificaron con respecto a la cantidad de virus a través de la determinación de cpm en un contador beta. En la siguiente etapa, las columnas se sometieron a elución de los virus unidos a heparina respectivos tres veces mediante 1 ml de NaCl 2 M, y las tres fracciones se recogieron de cada columna. Después de eso, se realizó la elución añadiendo dos veces 1 ml de SDS al 5 % en PBS (PBS-SDS), y se recogieron las dos fracciones de cada columna. Finalmente, cada una de las perlas recubiertas con heparina de las dos columnas se suspendió en 1 ml de PBS-SDS, y alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  se sometieron a cuantificación de las partículas de virus unidas restantes mediante determinación de radioactividad.

35

40 Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. Tal como se muestra, solo el 5,5 % de las partículas de VHS-1 y el 11,7 % de las partículas de VHS-2 no se adsorbieron a la columna. Además, puesto que el ADN viral y no sus proteínas de unión a heparina están marcadas con radioactividad, estas partículas no adsorbidas pueden representar virus no infecciosos con envueltas alteradas (es decir las partes exteriores, frágiles del virus que se unen a la heparina). El resto de los virus (el 94,5 % para VHS-1 y el 88,3 % de VHS-2) se une a las perlas recubiertas con heparina en la columna. La unión parece ser fuerte, a juzgar por el hecho de que solamente el 0,5 % de VHS-1 y el 1,1 % de VHS-2 se eliminaron mediante 4 lavados sucesivos. La capacidad limitada de NaCl 2 M en 3 intentos sucesivos para eluir los virus recalca la alta afinidad característica de la unión de ambos virus a las perlas recubiertas con heparina. Por el contrario, cantidades sustanciales de VHS-1 y VHS-2 se eluyeron mediante PBS-SDS.

45

50

Un total del 48 % de VHS-1 y el 68,8 % de VHS-2 se recuperaron de las columnas. Esto puede atribuirse al hecho de que NaCl 2 M reducía espontáneamente la radioactividad de las muestras en aproximadamente un 30 % de acuerdo con nuestras observaciones pasadas, y de que SDS-PBS tiene también probablemente este efecto.



En conjunto, los resultados demuestran el principio de que las partículas de virus VHS-1 y VHS-2 pueden eliminarse de una fase fluida mediante el paso a través de una columna corta que contiene perlas de Sephadex recubiertas con heparina, y de que los virus extraídos se unen con alta afinidad a las columnas.

5      Tabla 1. Unión de partículas de virus VHS radiomarcadas, suspendidas en NaCl tamponado, a perlas de heparina-Sephadex.

Unión de VHS a columna de heparina (% de virus de entrada = control = 100 %)		
	VHS-1	VHS-2
Virus de entrada (control)	100,0	100,0
Virus no adsorbido	5,5	11,7
Lavado a partir de la columna		
1 <sup>er</sup> lavado	0,2	0,4
2 <sup>o</sup> lavado	0,1	0,3
3 <sup>er</sup> lavado	0,1	0,2
4 <sup>o</sup> lavado	0,1	0,2
total no adsorbido + lavado	6,0	12,8
Eluido con NaCl 2 M		
1 <sup>a</sup> elución	7,8	14,7
2 <sup>a</sup> elución	1,6	1,9
3 <sup>a</sup> elución	0,1	1,3
Eluido con SDS al 5 % 1 <sup>a</sup> elución	10,6	11,9
2 <sup>a</sup> elución	18,5	18,3
total eluido NaCl + SDS	38,6	48,1
No eluido a partir de perlas	4,1	7,9
total no eluido	4,1	7,9
Total recuperado (no adsorbido + lavado + eluido + no eluido)	48,7	68,8

Ejemplo 2

10      *Eliminación de partículas de virus VHS-1 del suero humano mediante unión a heparina inmovilizada sobre perlas de Sephadex*

15      El procedimiento experimental tal como se describe en el Ejemplo 1 se utilizó con la diferencia de que las partículas de virus VHS-1 radiomarcadas a una cantidad de  $10^9$  UFP equivalente a  $10^{11}$  partículas de virus se mezclaron con 0,5 ml de suero humano y entonces se aplicaron sobre perlas recubiertas con heparina en una columna desechable. Después, el procedimiento incluyendo la elución y el lavado se siguió tal como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Unión de partículas de virus VHS-1 radiomarcadas ( $10^{11}$ ), suspendidas en suero humano, a perlas de heparina-Sephadex ( $1 \text{ cm}^3$ ).

Unión de VHS-1 a columna de heparina (% de virus de entrada = control = 100 %)	
Virus de entrada (control)	100,0
Virus no absorbido	2,4
Lavado a partir de la columna	
1 <sup>er</sup> lavado	0,9
2 <sup>o</sup> lavado	0,2
3 <sup>er</sup> lavado	0,1
4 <sup>o</sup> lavado	0,2
total no absorbido + lavado	3,8
Eluido con NaCl 2 M	
1 <sup>a</sup> elución	2,1
2 <sup>o</sup> elución	0,4
3 <sup>a</sup> elución	0,2
Eluido con SDS al 5 %	
1 <sup>a</sup> elución	3,5
total eluido NaCl + SDS	6,2
Total recuperado (no absorbido + lavado + eluido + no eluido)	10,0
Permanece sobre las perlas	90,0

Tal como se muestra, el 97,6 % de las partículas de VHS-1 suspendidas en suero humano estaban unidas a la columna. Mediante lavado de 4 veces, solo se eliminó el 3,8 % de las partículas de virus. Usando NaCl 2 M, solo se eluyó el 2,7 % del virus, y se eluyó un 3,5 % adicional mediante SDS. La conclusión de estos resultados es que el virus en suspensión en suero, que es la situación en la vida real durante una infección severa, diseminada, mejoraba el rendimiento de la columna de eliminación de virus en cuanto a la unión de virus radiomarcado, y que solo el 2,4 % de las partículas de VHS-1 estaban no adsorbidas. Como explicación probable, las proteínas séricas ayudaron a estabilizar las partículas de virus y mejoraron de ese modo la eliminación de VHS-1 mediante las perlas de Sephadex heparinizadas.

Ejemplo 3

*Eliminación de partículas de virus VHS-1 del suero humano mediante unión a heparina inmovilizada sobre a un dializador Hemoflow de fibras huecas*

El procedimiento experimental tal como se describe en el Ejemplo 1 se utilizó con la diferencia de que las partículas de virus VHS-1 radiomarcadas a una cantidad de  $10^9$  UFP equivalente a  $10^{11}$  partículas de virus se mezclaron con 0,5 ml de suero humano y entonces se aplicaron sobre el dializador de fibras huecas recubiertas con heparina del Ejemplo de preparación 6. Después, el procedimiento incluyendo la elución y el lavado se siguió tal como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tal como se muestra, el 92,3 % de las partículas de VHS-1 suspendidas en suero humano se unieron a la columna. Mediante lavado de 4 veces, solo se eliminó el 4,2 % de las partículas de virus. Mediante NaCl 2 M, solo se eluyó el 4,0 % del virus, y se eluyó un 4,5 % adicional mediante SDS. La conclusión de estos resultados es que la unión de partículas de virus suspendidas en suero humano a fibras heparinizadas es comparable con la de la unión de virus suspendidos de manera similar a perlas de Sephadex recubiertas con heparina, y que solo el 7,7 % de las partículas de VHS-1 estaban no adsorbidas.

Tabla 3. Unión de partículas de virus VHS-1 radiomarcadas, suspendidas en suero humano, a fibras huecas heparinizadas.

Unión de VHS-1 a columna de heparina (% de virus de entrada = control = 100%)	
Virus de entrada (control)	100,0
Virus no absorbido	7,7
Lavado a partir de la columna	
1 <sup>er</sup> lavado	3,1
2 <sup>o</sup> lavado	0,8
3 <sup>er</sup> lavado	0,1
4 <sup>o</sup> lavado	0,2
Total no adsorbido + lavado	4,2
Eluido con NaCl 2 M	
1 <sup>a</sup> elución	3,3
2 <sup>o</sup> elución	0,5
3 <sup>a</sup> elución	0,2
Eluido con SDS al 5%	
1 <sup>a</sup> elución	4,5
total eluido NaCl + SDS	8,5
Total recuperado (no absorbido+lavado +eluido+no eluido)	12,7
Permanece sobre las perlas	87,3

Ejemplo 4

*Eliminación de partículas de virus VHS-1 y VHS-2 de la sangre completa humana mediante unión a heparina inmovilizada sobre perlas de Sephadex*

El procedimiento experimental tal como se describe en el Ejemplo 1 se utilizó con la diferencia de que las partículas de virus VHS-1 y VHS-2 radiomarcadas a una cantidad de equivalente a  $10^{11}$  partículas de virus por ml se mezclaron con 1 ml de sangre humana y entonces se aplicaron en 1 ml de perlas recubiertas con heparina en una columna desechable. Después, el procedimiento incluyendo la elución y el lavado se siguió tal como en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación. Tal como se muestra, el 99,1 % de las partículas de VHS-1 y el 99,8 % de las partículas VHS-2 suspendidas en sangre humana se unieron a la columna.

Tabla 4. Unión de partículas de virus VHS radiomarcadas, suspendidas en sangre humana, a perlas de heparina-Sephadex (1 cm<sup>3</sup>).

Unión de VHS en sangre completa a columna de heparina (% de virus de entrada = control = 100%)		
	VHS-1 %	VHS-2 %
Virus de entrada (control)	100,0	100,0
Virus no adsorbido	0,9	0,2

Ejemplo 5

5 *Eliminación de virus de la gripe A del suero humano mediante unión a oligosacáridos inmovilizados que contienen ácido siálico*

10 Mezclas madre de virus de *Influenza A H1N1* se replicaron en células MDCK cultivadas 35 °C en condiciones estándar durante 3 días, después de lo cual las células se homogeneizaron y se titularon para evaluar el número de unidades formadoras de focos (UFF)/ml. Las partículas de virus se suspendieron en suero humano hasta una concentración final de 10<sup>6</sup> UFF/ml. Una suspensión de 10 ml se aplicó sobre un dializador de fibras huecas recubiertas con ácido siálico, preparado usando el método descrito en el Ejemplo de preparación 7. Después de titular la infectividad del suero que contenía *Influenza A* tras el paso a través del dializador y comparándola con los

15 títulos de una alícuota del suero que contenía el mismo virus que no había pasado a través del dispositivo, se concluyó que el 87 % de las UFF de virus *Influenza A* permanecían unidas a las fibras.

Ejemplo 6

20 *Eliminación de Helicobacter pylori y Staphylococcus aureus mediante unión a heparina inmovilizada*

25 Cuatro pipetas estériles se empaquetaron con lana de vidrio (0,5 ml) que se heparinizó tal como se describe en el Ejemplo de preparación 3. Las "columnas" así formadas se lavaron con 3 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS), pH 7,2. Se sometieron a prueba dos cepas diferentes de *H. pylori* y dos cepas diferentes de *S. aureus*. Cada una de las cuatro muestras de bacterias diferentes, suspendidas en tampón PBS, se aplicó en una "columna" separada. Las cantidades de bacterias en las muestras se midieron antes de la aplicación en columna y tras la elución a partir de la columna mediante densidad óptica (DO) a 560 nm y recuentos viables (UFC/ml). Tal como resulta evidente a partir de la tabla a continuación, aproximadamente el 90 % de las bacterias *H. pylori* y aproximadamente el 50 % de las bacterias *S. aureus* estaban inmovilizadas sobre las columnas.

Tabla 6. Unión de *H. pylori* y *S. aureus* a lana de vidrio heparinizada.

Bacterias	DO <sub>560</sub>		UFC/ml		Unión %
	Dentro	Fuera	Dentro	Fuera	
H. Pylori ATCC 43504	8,33	0,81	2x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>	~90
H. Pylori ATCC 43504	8,33	1,86	2x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>7</sup>	~90
S. aureus CCUG 12600	9,30	5,5	7,7x10 <sup>9</sup>	3,6x10 <sup>8</sup>	~50
S. aureus CCUG 12600	9,30	6,9	7,7x10 <sup>9</sup>	3,6x10 <sup>9</sup>	~50

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de una afección provocada o agravada por un microbio patógeno, célula inflamatoria o proteína inflamatoria.
- 10 2. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, estando dicho microbio patógeno seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus y parásitos.
- 15 3. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2, siendo dicho microbio patógeno una bacteria.
- 20 4. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3, estando seleccionada dicha bacteria del grupo que consiste en *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- 25 5. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4, siendo dicha bacteria *Helicobacter pylori* o *Staphylococcus aureus*.
- 30 6. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2, siendo dicho microbio patógeno un virus.
- 35 7. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, estando dicho virus seleccionado del grupo que consiste en virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, virus de la gripe A, citomegalovirus y virus de la inmunodeficiencia humana.
- 40 8. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 7, estando dicho virus seleccionado del grupo que consiste en virus del herpes simple tipo 1 y virus del herpes simple tipo 2.
- 45 9. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2, siendo dicho microbio patógeno un parásito.
- 50 10. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, estando dicho parásito seleccionado del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*.
- 55 11. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, estando dicha célula inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en linfocitos inflamatorios y macrófagos inflamatorios.
- 60 12. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho
- 65

sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, siendo dicha proteína inflamatoria una citocina pro-inflamatoria.

- 5 13. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 12, estando seleccionada dicha citocina pro-inflamatoria del grupo que consiste en factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), interleucina-1 (IL-1), e interleucina-6 (IL-6).
- 10 14. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo dicho sustrato sólido micropartículas.
- 15 15. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo dicho sustrato sólido una o más fibras huecas.
- 20 16. Heparina que tiene una afinidad de unión por un microbio patógeno, una célula inflamatoria o una proteína inflamatoria, estando dicha heparina inmovilizada sobre un sustrato sólido, y estando dicha heparina ligada a dicho sustrato sólido mediante unión de punto final covalente, para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando dicho sustrato sólido seleccionado del grupo que consiste en vidrio, celulosa, acetato de celulosa, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarosa reticulada, polipropileno, polietileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, silicona, teflón y poliuretanos.
- 25