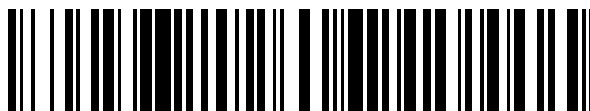


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 593**

51 Int. Cl.:

<b>A61M 1/34</b>	(2006.01)
<b>A61M 1/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/745</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/12</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/28</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/32</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/26</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2013 PCT/EP2013/063498**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001445**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2013 E 13736512 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2866929**

54 Título: **Aparato de perfusión extracorpórea**

30 Prioridad:

**28.06.2012 EP 12174028**  
**28.02.2013 EP 13157246**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.07.2018**

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND  
GMBH (100.0%)  
Else-Kroener-Straße 1  
61352 Bad Homburg, DE**

72 Inventor/es:

**FALKENHAGEN, DIETER;  
HARTMANN, JENS y  
HARM, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 676 593 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Aparato de perfusión extracorpórea

5 La invención se relaciona con un aparato de perfusión extracorpórea que comprende un circuito sanguíneo extracorpóreo para transportar sangre, un circuito de filtrado para transportar plasma sanguíneo y un controlador, en el que el circuito de filtrado está conectado al circuito sanguíneo extracorpóreo por medio de un filtro, en el que el filtro tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias que tienen una masa molar de 340.000 g/mol (masa molecular relativa de 340 kDa), y en el que un agente de reducción que comprende un primer portador que tiene una superficie neutra e hidrófoba está dispuesto en el circuito de filtrado.

10 La sepsis y las complicaciones asociadas contribuyen en una medida no despreciable a la morbilidad y mortalidad en humanos. En la mayoría de los casos, la sepsis se puede atribuir a una infección con bacterias gram negativas cuando las concentraciones altas de endotoxina llegan al cuerpo y tienen un efecto sistémico.

15 Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPSs) en la pared celular de bacterias gram negativas y se liberan por lisis celular y división celular. De hecho, los lipopolisacáridos son el componente lipídico más común de la membrana celular externa de las bacterias gram negativas. Las endotoxinas son sustancias pirogénicas, y el individuo afectado responde con una fuerte reacción inflamatoria y fiebre cuando las endotoxinas entran al cuerpo, por ejemplo durante el curso de envenenamiento microbiano y, como mediadores clave, causan una activación descontrolada del sistema de fagocitos mononucleares. Una acumulación de endotoxinas en el circuito sanguíneo como resultado de la endotoxemia conduce a una activación sin control de las células inmunitarias y a un desequilibrio del sistema de coagulación. Esto puede conducir a la sepsis, que se caracteriza, inter alia, por fiebre alta, presión arterial baja y, en casos graves, por fallo de múltiples órganos. La sepsis es una condición que se debe tomar muy en serio; la letalidad de las personas con sepsis grave o shock séptico es de aproximadamente 30-60%, dependiendo del grado de gravedad de la afección. La endotoxemia como resultado de una infección con bacterias gram negativas es una de las causas más comunes de la aparición de una respuesta inflamatoria sistémica ("síndrome de respuesta inflamatoria sistémica", SIRS), sepsis, sepsis grave o shock séptico y las complicaciones graves resultantes. Los pacientes con defensa inmune comprometida, como pacientes hepáticos o pacientes con quimioterapia, son susceptibles a infecciones bacterianas y por consiguiente muestran síntomas de intoxicación por endotoxina. La endotoxemia también puede ocurrir en el caso de insuficiencia hepática aguda o descompensación aguda con insuficiencia hepática crónica, lo que resulta en el desarrollo de estados que son muy similares (desde el punto de vista bioquímico) a la sepsis. A modo de ejemplo, puede producirse una descompensación aguda en pacientes con insuficiencia hepática crónica. En este estado, las endotoxinas que se originan en la flora intestinal normal pasan la barrera intestinal y estimulan la liberación de mediadores de inflamación en el cuerpo y, por lo tanto, provocan un estado similar a la sepsis.

Además, los estados sépticos también pueden desencadenarse por bacterias gram positivas, virus y hongos.

35 Como se mencionó, generalmente se sabe que puede producirse una activación descontrolada de las células inmunes y un desequilibrio del sistema de coagulación en el caso de sepsis y otras afecciones graves. La activación descontrolada del sistema de fagocitos mononucleares estimula una liberación excesiva de mediadores de inflamación, en particular de citoquinas (también conocida como tormenta de citoquinas o hipercitocinemia). Las citoquinas son mediadores clave en el caso de sepsis y shock séptico. El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , a menudo también referido simplemente como TNF) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) se pueden citar como los ejemplos proinflamatorios más importantes. Otras citoquinas proinflamatorias importantes incluyen IL-6 e IL-8. La citoquina TNF- $\alpha$  liberada inicialmente desencadena una amplificación de la señal biológica a través de una cascada de mediadores, por consiguiente resultando en cambios fisiológicos, que incluyen interrupciones graves en el equilibrio biológico y, posteriormente, en el colapso circulatorio y la falla de múltiples órganos. El cuadro clínico de la sepsis se correlaciona con altas concentraciones sanguíneas del mediador clave TNF- $\alpha$ , pero también de otras citoquinas, como IL-1- $\beta$ , IL-6 e IL-8 en el caso de la fase proinflamatoria o IL-10 o IL-13 con la aparición de una fase antiinflamatoria, en la que los mediadores proinflamatorios, incluidas las citoquinas, tienen concentraciones muy bajas. Además, otras afecciones graves, como las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, la psoriasis y la artritis reumatoide también se asocian con una liberación excesiva de TNF- $\alpha$ .

50 Además del tratamiento médico intensivo aplicado como estándar, se usan antibióticos o corticosteroides, inmunoglobulinas y también fármacos que ayudan a la circulación en particular para el tratamiento de la sepsis.

55 Una desventaja de la terapia con antibióticos es la creciente propagación de bacterias resistentes a los antibióticos. Además, las endotoxinas se liberan cada vez más por el antibiótico y la consiguiente destrucción de las células de las bacterias, lo que a su vez conduce a una mayor distribución de mediadores de la inflamación. Además, una administración de antibióticos a menudo se asocia con efectos secundarios, como cambios en la flora intestinal o reacciones alérgicas. El intento de utilizar antibióticos contra el factor clave TNF-alfa fracasó, ya que con este método la reducción de la concentración de TNF a valores cero o muy bajos pareció desencadenar una situación anérgica, que estuvo acompañada por una mayor mortalidad en comparación con el grupo control. El uso terapéutico de anticuerpos específicos contra LPS y TNF- $\alpha$  es técnicamente muy complejo y, por lo tanto, está asociado con altos costes.

- Por medio de sistemas de purificación de sangre o plasma extracorpóreos (método de aféresis terapéutica), por lo tanto se intenta, como se describirá con mayor detalle a continuación, eliminar las citoquinas mencionadas anteriormente, en particular el factor TNF- $\alpha$ , de forma tal que normalice las concentraciones de estas citoquinas para evitar así la fase anérgica (antiinflamatoria). Las endotoxinas pueden eliminarse por medio de lo que se conoce como adsorbedores de LPS (por ejemplo, el adsorbedor Toraymyxin®) a fin de evitar así una liberación de las citoquinas proinflamatorias, lo que naturalmente también reduce la respuesta antiinflamatoria.
- Los métodos de aféresis son métodos llevados a cabo extracorpóreamente, en los que se eliminan los componentes sanguíneos y plasmáticos fisiopatológicamente relevantes, por ejemplo, biomoléculas tales como proteínas (glicol), péptidos, lípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos, pero también células sanguíneas y plasma sanguíneo. Los métodos de aféresis se pueden usar, por un lado, con fines diagnósticos y terapéuticos, pero, por otro lado, también constituyen una posibilidad muy efectiva para obtener ciertos componentes sanguíneos de individuos sanos en cantidad suficiente y con una pureza suficientemente alta. Se atribuye gran importancia a la aféresis terapéutica, ya que, con ciertas indicaciones, esta suele ser una alternativa muy efectiva, al mismo tiempo que tiene pocos efectos secundarios, en comparación con el tratamiento con fármacos. En el caso de los métodos de aféresis en plasma, el plasma puede o bien separarse completamente o ser remplazado por una solución sustituta, o solo ciertos componentes, tales como las citoquinas LDL, endotoxinas o inmunoglobulinas, se eliminan de allí mediante un adsorbedor, y el plasma es luego regresado al donante/paciente. En comparación con las estrategias de tratamiento antes mencionadas que usan fármacos, los métodos de aféresis terapéutica también tienen la ventaja de que el tratamiento se detiene en cualquier momento con efecto inmediato apagando el aparato de aféresis.
- Los métodos de aféresis y los materiales adsorbedores para eliminar componentes sanguíneos tóxicos y/o dañinos son bien conocidos en la técnica anterior. También se conocen materiales adsorbedores que adsorben específicamente citoquinas, en particular TNF- $\alpha$ , y/o endotoxinas (LPSs), y los eliminan de fluidos corporales tales como sangre o plasma.
- El documento US 2001/0070424 A1 divulga un material adsorbedor con base en un polímero poroso, que tiene al menos un poro de transporte con un diámetro de 25 a 200 nm y también poros eficaces con un diámetro de 10 a 25 nm. Inter alia, el polímero también puede ser una resina no iónica (resina neutra). El adsorbedor se usa para eliminar moléculas de proteínas, en particular citoquinas y  $\beta 2$  microglobulina.
- El documento WO 2011/123767 A1 divulga un método para tratar la inflamación, en el que una dosis terapéuticamente eficaz de partículas adsorbedoras porosas para adsorber mediadores de inflamación se administra a un paciente, en el que el volumen total de poro con un tamaño de poro desde 5 a 300 nm es mayor que 0,5 cc/g a 3,0 cc/g.
- En el documento WO 2003/090924 se describe una matriz de separación porosa para separar componentes sanguíneos junto con procesos de inflamación. La matriz de separación tiene un tamaño de poro desde 5  $\mu$ m a 500  $\mu$ m y también al menos un grupo funcional dispuesto en la matriz.
- El documento DE 19515554 A1 divulga métodos y aparatos para la eliminación extracorpórea simultánea de TNF- $\alpha$  y lipopolisacáridos a partir de sangre completa y/o plasma sanguíneo. Aquí, la sangre o el plasma sanguíneo se guían en un sistema de perfusión extracorpóreo a través de un material intercambiador de cationes poroso y un material intercambiador de aniones. Los materiales portadores porosos descritos aquí tienen un diámetro de poro medio de <30 nm y/o un tamaño de exclusión molecular para las proteínas globulares de <math>10^6</math> Dalton y en particular <math>2 \times 10^4</math> Dalton.
- Las resinas neutras para eliminar componentes tóxicos, incluyendo citoquinas, de un fluido corporal también se divulgan en el documento WO 2005/082504 A2. El documento WO 2005/082504 A2 describe un aparato de destoxificación, que comprende carbono activado y al menos una resina no iónica que tiene un tamaño medio de poro de 30 nm y un diámetro medio de partícula de 35-120  $\mu$ m (Amberchrom CG300C) o que tiene un tamaño medio de poro de 45 nm y diámetro de partícula medio de 560  $\mu$ m (resina con base en ésteres alifáticos Amberlite XAD-7HP).
- Los documentos EP 0787500 B1 y EP 0958839 B1 divulgan un material portador hidrófobo que tiene un tamaño de poro desde 10 a 30 nm y tamaños de partículas desde 20 a 350  $\mu$ m, preferiblemente 10 a 100  $\mu$ m o 250 a 350  $\mu$ m, para eliminar componentes tóxicos, en particular citoquinas, de un fluido corporal.
- El documento EP 1 944 046 B1 divulga un material portador con base en un copolímero de poliestireno divinilbenceno que tiene un tamaño de poro de 30 nm y un tamaño de partícula desde 75 a 120  $\mu$ m.
- Tetta et al. (Tetta et al. 1998. Nephrol Dial Transplant 13:1458-1464) describen un adsorbedor del tipo Amberchrom CG 300md que tiene un tamaño de poro de 30 nm para eliminar las citoquinas de un fluido corporal.
- La publicación de Cantaluppi et al. (Cantaluppi et al. 2010. Critical Care 14:R4) describe un adsorbedor del tipo Amberchrom CG161m para la adsorción de citoquinas.

También se ha encontrado que las resinas intercambiadoras de aniones (por ejemplo, grupos DEAE o PEI enlazados a celulosa) son muy adecuadas para el enlace de endotoxinas. Sin embargo, el enlace indeseable de factores clave del sistema de coagulación intracorpórea, tales como la proteína C y la proteína S, y los problemas de coagulación asociados son desventajosos. Estos problemas de coagulación se pueden evitar mediante el uso de un adsorbente específico que comprende anticuerpos inmovilizados contra endotoxinas. Sin embargo, esta posibilidad solo puede aplicarse en una medida limitada por razones económicas.

En el documento DE 199 13 707 A1, se describe un adsorbedor inmune para uso en terapia de sepsis para plasmaféresis, que consiste en un material portador formado a partir de polímeros orgánicos o sintéticos y anticuerpos policlonales o monoclonales enlazados a él y dirigido contra factores del complemento, lipopolisacáridos y también contra mediadores adicionales de sepsis, como TNF- $\alpha$  e interleucinas.

El documento DE 10 2004 029 573 A1 divulga un material de aféresis o adsorbente y también un método para eliminar, reducir o inactivar la citoquina MIF (factor inhibidor de migración de macrófagos) de la sangre, plasma sanguíneo u otros fluidos corporales. El adsorbente comprende un material portador fijo sobre cuya superficie están inmovilizadas las moléculas de enlace a MIF o los grupos funcionales.

El documento DE 10 2005 046 258 A1 divulga un adsorbedor inmune para tratar la resistencia a la insulina y/o el síndrome metabólico, en el que el adsorbedor inmune comprende materiales portadores con ligandos unidos que son específicos para IL-6, IL-4 y C5a.

Una forma de terapia ya usada durante un largo tiempo en la aplicación clínica está constituida por la administración parenteral de polimixinas. Las polimixinas son sustancias antibióticas que se originan inicialmente de la bacteria *Bacillus polymyxa* y que ya se han utilizado durante décadas en humanos y animales para tratar infecciones con bacterias gram negativas. Las polimixinas interfieren con la estructura de la pared celular al aumentar la permeabilidad de la membrana celular, lo que da como resultado la lisis celular. Las polimixinas no solo enlazan los fosfolípidos, sino también a las endotoxinas (LPS) para formar un complejo polimixina: endotoxina (LPS) con alta afinidad. El mecanismo antibacteriano de las polimixinas se describe en detalle, por ejemplo, en una publicación de Tony Velkov et al. (Tony Velkov et al. 2010. *Journal of Medicinal Chemistry*: 53 (5):1898-1916).

Debido al efecto neurotóxico y nefrotóxico de las polimixinas, solo la polimixina B y la polimixina E (colistina) han adquirido cierta importancia terapéutica como antibióticos. Hasta ahora, estas dos polimixinas eran los únicos representantes terapéuticamente admisibles de su clase de sustancias. La polimixina B y colistina están autorizados en los Estados Unidos por la FDA para infusión parenteral. La polimixina B y la colistina se han usado durante décadas para formas de terapia oral o tópica. Sin embargo, para el tratamiento sistémico parenteral de afecciones y estados causados por una infección con bacterias gram negativas, solo se usan como antibióticos en un contexto terapéutico como último recurso debido a sus efectos secundarios neurotóxicos y nefrotóxicos. La colistina parece ser menos nefrotóxica que la polimixina B, sin embargo, esto se ve compensado, al menos en parte, por la dosificación más alta necesaria, y por lo tanto, las reacciones nefrotóxicas deben esperarse aproximadamente en la misma medida en la práctica clínica diaria. Sin embargo, actualmente no hay suficientes datos disponibles con respecto a la nefrotoxicidad de los dos antibióticos. Los infectólogos de Nueva York (Estados Unidos) describen insuficiencia renal en el 14% de 60 pacientes tratados con polimixina B. Los médicos en Grecia describen una nefrotoxicidad significativa en la mayoría de los pacientes en los que la insuficiencia renal ya estaba presente al inicio de la terapia. Por el contrario, en pacientes con función renal normal, no se establecieron cambios significativos. Se puede encontrar una descripción detallada sobre la toxicidad de las polimixinas en una publicación de Falagas y Kasiakou (Falagas and Kasiakou. 2006. *Critical Care* 10:R27). La dosificación de polimixinas desempeña por lo tanto un papel central para evitar o minimizar los efectos secundarios tóxicos, en particular efectos secundarios nefrotóxicos.

Debido a la aparición, observada con frecuencia en los últimos años, de progresiones graves de enfermedades causadas por infecciones con cepas patógenas multirresistentes, por ejemplo en el caso de infecciones agudas con cepas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, las polimixinas se administran por necesidad cada vez más parenteralmente como antibiótico, a pesar de su toxicidad. Actualmente, Bedford Laboratories ("Inyección de Polimixina B 500.000 unidades", fabricante: Bedford Laboratories) ofrece una fuente de suministro de polimixina B en forma de la sal de sulfato de polimixina B1 y B2 para administración parenteral. De acuerdo con la información del fabricante, la administración parenteral se lleva a cabo por vía intravenosa, intramuscular o, en el caso de meningitis, por vía intratecal, en el que la dosis diaria máxima especificada es generalmente de 2,5 mg/kg de peso corporal por día, dividida entre dos o tres infusiones. La concentración sérica de polimixina después de la administración típicamente se encuentra en un intervalo de 1 a 6  $\mu\text{g/ml}$ . En casos severos, esto también puede ser mayor en un intervalo desde 6 a 50  $\mu\text{g/ml}$ . La colistina se administra predominantemente en forma de metanosulfonato de colistina, en el que la concentración sérica se encuentra en un intervalo desde aproximadamente 1 a 3  $\mu\text{g/ml}$ . La colistina (polimixina E) se usa de manera similar a la polimixina B, generalmente en una dosificación más alta.

Una resistencia a la polimixina B es bastante inusual, pero puede desarrollarse si el antibiótico no llega a la membrana del citoplasma debido a cambios en la membrana externa. Las polimixinas son efectivas contra muchos patógenos gram negativos, como *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* spp. y también contra *P. aeruginosa*. Tipos de

Proteus y *S. marcescens*, que normalmente son resistentes; la sensibilidad de *B. fragilis* es variable. Las concentraciones mínimas inhibitorias para *E. coli* se encuentran en el intervalo desde 0,04-3,7 mg/l y para *P. aeruginosa* entre 1,2 y 33,3 mg/l (Garidel y Brandenburg 2009. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 8:367-385).

5 Dado que las dosificaciones para polimixina B y colistina usadas previamente en la aplicación clínica en el caso de administración parenteral inducen efectos secundarios nefrotóxicos y neurotóxicos, se han desarrollado nuevas estrategias de tratamiento y enfoques terapéuticos en el pasado junto con la aplicación de lipopéptidos que se enlazan a endotoxinas tales como polimixina.

10 Los métodos de purificación extracorpórea de sangre y/o plasma sanguíneo, ya mencionados anteriormente, con el uso de materiales adsorbedores adecuados se han establecido como alternativas frecuentemente aplicadas a la administración de polimixinas en forma de un fármaco.

Los materiales adsorbedores conocidos comprenden materiales portadores porosos o tipo fibra, en cuyas superficies se inmoviliza la polimixina B. Se han informado anteriormente efectos neurotóxicos y nefrotóxicos conocidos junto con materiales adsorbedores de este tipo, que se usan en gran medida en el tratamiento de estados sépticos.

15 En EP 0110 409 A, se divulgan portadores inmovilizados con polimixina B formados a partir de vidrio poroso (FPG 2000) y también portadores de polisacáridos inmovilizados con polimixina B a base de celulosa (Cellulofine A-3). También se conocen micropartículas formadas a partir de celulosa o celulosa derivatizada, a las que la polimixina B está enlazada covalentemente (Weber V., Loth F., Linsberger I., Falkenhagen D.: *Int. J. Artif. Organs* 25(7), 679). El documento EP 0 129 786 A2 describe un material de destoxificación de endotoxinas con un portador tipo fibra, sobre el que la polimixina está inmovilizada covalentemente. El portador tipo fibra está equipado con grupos funcionales para enlazar covalentemente polimixina a la superficie del portador. Las desventajas de los adsorbedores de endotoxinas especificados incluyen la baja capacidad y velocidad de enlace a endotoxinas. La eficacia y la calidad del tratamiento en relación con los portadores tipo fibra con polimixina B enlazada covalentemente se han descrito como subóptimos (Cruz DN et al. 2007. *Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. Crit. Care* 11(3):137).

20 Los documentos WO 2010/083545 y WO 2011/160149 describen materiales adsorbedores con los que se inmoviliza la polimixina sobre superficies portadoras hidrófobas mediante interacciones no covalentes (adsorción). Los documentos WO 2007/142611 A1 y US 5510242 describen superficies portadoras hidrófobas con polimixinas enlazadas por adsorción. El uso de telas de poliéster recubiertas con polimixina para enlazar antígenos de LPS de *Salmonella typhimurium* fue descrito por Blais y Yamazaki (Blais y Yamazaki, 1990. *Use of polymyxin-coated polyester cloth in the enzyme immunoassay of Salmonella lipopolysaccharide antigens. International journal of Food Microbiology* 11:195-204).

25 El documento WO 2011/133287 A1 divulga un aparato de filtración de sangre, que comprende un aparato de separación de microfluidos y con el que se pueden eliminar de la sangre sustancias indeseables tales como toxinas, fármacos, patógenos y similares. El aparato puede comprender sensores que monitorizan la sangre en términos de la presencia o concentración de las sustancias indeseables. La monitorización también puede incluir la infusión de ingredientes terapéuticos activos, tales como un antibiótico, en la sangre del paciente.

30 Un aparato de perfusión extracorpórea del tipo mencionado en la introducción ha sido descrito, por ejemplo, por Falkenhagen et al. (Falkenhagen et al., 2006. *Fluidized Bed Adsorbent System for Extracorporeal Liver Support. Therapeutic Apheresis and Dialysis* 10(2):154-159). El filtro descrito allí se puede obtener bajo el nombre comercial "Albuflow®" (Fresenius Medical Care, Alemania).

35 Aunque la letalidad de los pacientes que padecen afecciones inducidas por la endotoxemia, en particular la sepsis, podría reducirse mediante la aplicación clínica de los materiales de adsorción con base en polimixina mencionados anteriormente, la letalidad de los pacientes con sepsis grave y shock séptico sigue siendo muy alta a pesar de la terapia máxima. Por esta razón y también debido al problema cada vez mayor de la resistencia múltiple de las bacterias a los antibióticos y la creciente incidencia asociada de progresiones graves de la enfermedad, también hay una gran demanda de formas de terapia mejoradas y aparatos de perfusión extracorpóreos más eficientes, que adicionalmente son bastante seguros en la aplicación clínica.

40 El objetivo de la invención es por lo tanto proporcionar un aparato de perfusión extracorpórea del tipo mencionado en la introducción, con el que es posible un tratamiento mejorado de sepsis y estados similares a sepsis.

45 El objetivo se consigue mediante un aparato de perfusión extracorpórea del tipo mencionado en la introducción, que se caracteriza de acuerdo con la invención en que el aparato de perfusión comprende un medio dispensador para alimentar un lipopéptido enlazador de endotoxina en el circuito sanguíneo extracorpóreo, en el que el lipopéptido enlazador de endotoxina se selecciona del grupo que consiste en polimixinas, derivados de polimixina, profármacos de los mismos y una combinación de los mismos.

Gracias a la invención, es posible un tratamiento mejorado de la sepsis y los estados similares a la sepsis en comparación con la metodología de terapia previamente conocida.

Una primera gran ventaja del aparato de perfusión de acuerdo con la invención radica en el hecho de que el filtro no solo constituye una barrera para endotoxinas y otros componentes de plasma de alto peso molecular, sino también para los complejos de endotoxina:lipopéptido formados, tales complejos de endotoxina:lipopéptido presentes en la sangre del paciente, que circula en el circuito sanguíneo extracorpóreo antes de descomponerse en el hígado, no puede ingresar al circuito de filtrado y no puede alcanzar al portador. El contacto con el portador, debido a los procesos de interacción competitiva entre la superficie del primer portador y el complejo, conduciría a la disolución del complejo de endotoxina:lipopéptido, lo que puede empeorar el estado de un paciente con sepsis. El suministro renovado de endotoxinas causado por la disociación de los complejos lipopéptido:endotoxina causa una intensificación renovada del proceso de activación del complemento o sistema de coagulación y también de los sistemas celulares (monocitos) causados por endotoxinas, estos procesos de activación se asocian con consecuencias clínicas correspondientes tales como la iniciación o intensificación de la falla de múltiples órganos o el inicio de la etapa anérgica de la sepsis, es decir, la etapa en la que el sistema inmunitario se debilita. La consecuencia de esto significa que la liberación de endotoxinas debería evitarse en cualquier caso.

Gracias a la invención, los lipopéptidos que se enlazan a endotoxinas pueden alimentarse a la sangre por medio de los medios dispensadores, y las endotoxinas pueden eliminarse mediante formación de complejos, y al mismo tiempo pueden agotarse los componentes sanguíneos indeseables, en particular las citoquinas, por el agente de agotamiento, por lo que es posible una terapia máxima sin riesgo de seguridad adicional para el paciente.

Otra ventaja clave del aparato de perfusión de acuerdo con la invención también reside en el hecho de que los componentes sanguíneos indeseables, en particular las citoquinas, pueden eliminarse del plasma sanguíneo por adsorción en la superficie del primer portador debido al agente de agotamiento dispuesto en el circuito de filtrado. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la eficacia de la adsorción para citoquinas, en primer lugar y más importante TNF- $\alpha$ , con el uso del filtro utilizado de acuerdo con la invención es significativamente mejor en comparación con un filtro de plasma que retiene sólo componentes sanguíneos celulares, aunque menos citoquinas del circuito sanguíneo extracorpóreo pasa a través del filtro al plasma fraccionado transportado en el circuito de filtrado. El filtro utilizado de acuerdo con la invención impide prácticamente por completo la penetración de proteínas o lipoproteínas y glicoproteínas que tienen una masa molar relativa superior a 300.000. Se ha encontrado que esta ventaja garantiza una reproducibilidad mucho mejor de la eliminación de citoquina en comparación con el uso de un filtro de plasma que retiene solo componentes celulares.

El filtro utilizado de acuerdo con la invención permite que pase el plasma sanguíneo fraccionado, de modo que se retienen los componentes sanguíneos de alto peso molecular, las endotoxinas y también los complejos endotoxina:lipopéptido, mientras que los componentes sanguíneos más pequeños pueden pasar a través de la membrana filtrante. Se puede obtener un filtro adecuado bajo el nombre comercial "Albuflow®" (fabricante: Fresenius Medical Care, material: fibras huecas de polisulfona, coeficiente de cribado para albúmina de  $\geq 0,6$  y para fibrinógeno  $\leq 0,1$ ).

El término "plasma sanguíneo" utilizado aquí, en la medida en que se transporta en el circuito de filtrado del aparato de acuerdo con la invención, se refiere por lo tanto a plasma sanguíneo fraccionado.

La expresión "portador que tiene una superficie neutra e hidrófoba" dentro del alcance de esta divulgación se relaciona con un sólido insoluble en agua, que tiene una superficie neutra e hidrófoba. El término "neutral" debe entenderse de forma no iónica. El portador puede estar en forma de fibra o partículas. El portador también puede ser poroso y puede tener superficies externas e internas. Las superficies externa e interna son neutrales e hidrófobas. El término "superficie interna" del portador denota la totalidad de las superficies de los poros. El término "superficie externa", en contraste, se relaciona con la totalidad de las superficies del portador a las que se puede acceder directamente desde el exterior.

Los términos "polimixina" y "polimixinas" tal como se usan aquí se relacionan con compuestos químicos conocidos de origen natural que se originan inicialmente a partir de la bacteria *Bacillus polymyxa* (polimixina B) y también *Bacillus colistinus* (polimixina E). Las polimixinas pueden aislarse de las bacterias o pueden producirse sintéticamente. La polimixina B que se origina en la bacteria se compone de 6 derivados denominados polimixina B1, polimixina B2, polimixina B3, polimixina B4, polimixina B5 y polimixina B6. Por el contrario, la polimixina autorizada por la FDA para infusión parenteral está compuesta solo por polimixina B1 a B4. Como se mencionó anteriormente, solo la polimixina B y la polimixina E (colistina) son de relevancia clínica.

El término "profármaco" como se usa aquí se relaciona con compuestos precursores de polimixinas como se define anteriormente, en el que los compuestos precursores se convierten in vivo en la polimixina activa. Los ejemplos representativos incluyen los profármacos metanosulfonato de colistina y metanosulfonato de sodio de polimixina B.

El término "derivado de polimixina" se relaciona con un compuesto derivado de polimixina, cuyo compuesto se puede obtener por modificación de polimixinas naturales, por ejemplo mediante modificación química de las cadenas laterales Dab, el anillo peptídico cíclico o la cadena de ácido graso de la estructura de la molécula polimixina. En la

publicación de Velkov et al. (Velkov et al. 2010. Journal of Medicinal Chemistry, 53(5):1898-1916) se resume una descripción detallada de antibióticos, análogos y derivados con base de polimixina. La idoneidad de un derivado de polimixina para su uso en la presente invención puede ser probada por una persona experimentada en la técnica sobre la base de simples pruebas de rutina.

5 El término "endotoxemia" se usa aquí para todos los patrones de enfermedad en los que se encuentran cantidades clínicamente relevantes de endotoxinas en la sangre del paciente y conducen posteriormente a patrones de enfermedad tales como sepsis y SIRS.

El término "agente de agotamiento" se relaciona con un agente con el que se pueden eliminar componentes indeseables del plasma sanguíneo transportado en el circuito de filtrado. Los agentes de agotamiento que comprenden un portador que tiene una superficie neutra e hidrófoba han demostrado en el pasado que son particularmente favorables para la eliminación de mediadores de inflamación tales como citoquinas por adsorción en la superficie del portador de la misma. Estas citoquinas son ventajosamente citoquinas proinflamatorias potencialmente dañinas. Los ejemplos representativos para citoquinas proinflamatorias incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, en el que el TNF- $\alpha$  es de particular importancia como un mediador de inflamación proinflamatorio inicial. El agente de agotamiento utilizado de acuerdo con la invención es por lo tanto particularmente favorable para el tratamiento de afecciones y estados atribuidos a los efectos tóxicos de TNF- $\alpha$ . A modo de ejemplo, en el caso de la sepsis, los valores para el TNF- $\alpha$  en la fase proinflamatoria son al menos superiores a 100-200 ng/ml. Los ejemplos especificados a continuación proporcionan pruebas de que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y también la IL-10 antiinflamatoria se eliminan de la manera más eficiente posible y que el aparato de acuerdo con la invención es extraordinariamente adecuado para el tratamiento de la sepsis, shock séptico y estados similares a la sepsis.

La expresión "medios dispensadores para alimentar un lipopéptido enlazador de endotoxina en el circuito sanguíneo extracorpóreo" se relaciona, por una parte, a medios dispensadores para alimentar el lipopéptido directamente en el circuito sanguíneo extracorpóreo. Por otra parte, esta expresión también se relaciona con medios dispensadores para alimentar indirectamente el lipopéptido en el circuito sanguíneo extracorpóreo en que el lipopéptido se dispensa en el circuito de filtrado por los medios dispensadores y el lipopéptido pasa desde allí al circuito sanguíneo extracorpóreo.

Dado que las polimixinas de origen natural, que se originan inicialmente de las bacterias *Bacillus polymyxa* y *Bacillus colistinus*, se encuentran entre los antibióticos peptídicos estudiados en mayor medida y ya se han utilizado durante décadas en el tratamiento de afecciones y estados causados por endotoxemia, es preferible si el lipopéptido enlazador de endotoxina es una polimixina. El lipopéptido se selecciona de manera particular preferiblemente del grupo que consiste en las únicas polimixinas previamente autorizadas para uso clínico: polimixina B y colistina (polimixina E) y profármacos de las mismas. Los ejemplos representativos incluyen los profármacos metanosulfonato de colistina y metanosulfonato de sodio de polimixina B. Sin embargo, la polimixina B y los profármacos de los mismos son los más preferidos dado que este ha demostrado ser el más exitoso para su uso en el campo de la medicina humana.

De acuerdo con una primera realización ventajosa, el agente de agotamiento comprende los medios de dispensación para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina, en el que la superficie del primer portador del agente de agotamiento tiene un recubrimiento de adsorción formado a partir del lipopéptido enlazador de endotoxina. En esta realización, el agente de agotamiento también actúa así como un medio de dispensación para el lipopéptido enlazador de endotoxina, ya que el primer portador se recubre de manera adsorbente con el lipopéptido. El lipopéptido se libera en el circuito de filtrado continuamente por desorción en pequeñas cantidades y se alimenta desde allí al circuito de sangre extracorpóreo. El lipopéptido de este modo se alimenta al circuito sanguíneo extracorpóreo dispensando el lipopéptido (desorción del primer portador) en el circuito de filtrado, donde luego pasa al circuito de sangre. En una subvariante, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito de filtrado abierto, que conduce corriente abajo del filtro al circuito de sangre extracorpóreo. En otra subvariante, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito que está cerrado en la región de filtrado y que conduce al filtro. Se ha encontrado en pruebas de laboratorio que el recubrimiento adsorbente de la superficie del portador con el lipopéptido no tiene efectos desventajosos sobre la adsorción de las citoquinas (véase el Ejemplo 11 a continuación).

El término "recubrimiento adsortivo" utilizado en esta divulgación debe entenderse que significa que los lipopéptidos enlazadores de endotoxina se enlazan a la superficie hidrófoba neutral del portador mediante procesos e interacciones adsortivas no covalentes. Se debe suponer que, en particular, la interacción hidrófoba juega un papel importante. La interacción hidrófoba es de gran importancia bioquímica y se basa en el fenómeno de que las moléculas hidrófobas en un entorno polar tienden a la asociación. Por lo tanto, la interacción hidrófoba no es una fuerza per se, sino que se ve forzada por un entorno polar. Otras interacciones no covalentes, que incluyen, sin limitación, enlaces iónicos, enlaces de puente de hidrógeno e interacciones de Van der Waals, también pueden desempeñar un papel en la adsorción de lipopéptidos enlazadores de endotoxinas tales como la polimixina. El enlace de lipopéptidos enlazadores de endotoxinas tales como polimixina a través de interacciones no covalentes a superficies de portador hidrófobas de diversos tamaños de poros y partículas ya se ha descrito en los documentos WO 2010/083545, WO 2011/160149, WO 2007/142611 A1 y US 5510242. El lipopéptido enlazador de endotoxina

enlazado de forma adsorptiva sobre el portador se selecciona de acuerdo con la invención del grupo que consiste en polimixinas, profármacos de los mismos y una combinación de los mismos.

Alternativamente a la primera realización, el medio dispensador para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina está dispuesto en el circuito de filtrado corriente abajo del agente de agotamiento en una segunda realización ventajosa, en la que el medio dispensador comprende un segundo portador que tiene una superficie hidrófoba neutra, en la que la superficie del segundo portador tiene un recubrimiento adsorptivo formado por el lipopéptido enlazador de endotoxina. El lipopéptido se libera continuamente en el circuito de filtrado por desorción en pequeñas cantidades y luego se alimenta desde allí al circuito sanguíneo extracorpóreo. De este modo, el lipopéptido se alimenta al circuito sanguíneo extracorpóreo dispensando el lipopéptido (desorción del segundo portador) en el circuito de filtrado, donde luego pasa al circuito de sangre. En una subvariante de la segunda realización, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito de filtrado abierto, que conduce corriente abajo del filtro al circuito de sangre extracorpóreo. En otra subvariante de la segunda realización, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito que está cerrado en la región de filtrado y que conduce al filtro. Sin embargo, debido al menor gasto de diseño/equipo, se prefiere la primera realización en comparación con la segunda realización.

El desarrollo de las dos realizaciones mencionadas anteriormente (primera y segunda realización) del aparato de perfusión de acuerdo con la invención se basa en el hecho sorprendente de que con los portadores que tienen una superficie neutra e hidrófoba y que tienen un recubrimiento adsorptivo formado de polimixina, la eliminación de endotoxinas no se implementa, como se suponía anteriormente, mediante la adsorción de las endotoxinas en las moléculas de polimixina inmovilizadas sobre el portador, sino a través de una cantidad muy pequeña de moléculas de polimixina desorbida que se han transferido a la sangre o al plasma sanguíneo. Este descubrimiento sorprendente e imprevisible se basa en el hecho de que, después del lavado selectivo de un portador recubierto de manera adsorptiva con polimixina, no se pudo determinar la adsorción de endotoxina por las moléculas de polimixina aún inmovilizadas sobre la superficie del portador. Los inventores podrían, por lo tanto, determinar que la excelente eficacia de eliminación de endotoxinas de los polímeros transportadores hidrófobos neutros, en las superficies de las cuales la polimixina es enlazada de manera adsorptiva, debe atribuirse a una cantidad muy pequeña de moléculas de polimixina libres desorbidas del material portador y liberadas en el fluido corporal, es decir sangre o plasma sanguíneo. El descubrimiento de que las pequeñas cantidades de polimixina liberada, que dependiendo de la cantidad de polimixina adsorbida en el portador, dan una concentración sérica de polimixina de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 0,8 µg/ml, ya son suficientes para inhibir la actividad de las endotoxinas, en la que se excluyen los efectos secundarios neurotóxicos y nefrotóxicos, también fue sorprendente.

Solo sobre la base de este descubrimiento sorprendente fue posible para los inventores desarrollar la primera y la segunda realizaciones ventajosas del aparato de perfusión de acuerdo con la invención. Antes de esto, siempre se suponía que la eliminación de la endotoxina se implementaba mediante el enlace de las endotoxinas a las moléculas de polimixina adsorbidas en el portador. En vista del hecho de que un filtro con un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (masa molecular relativa de 340 kDa) constituye una barrera para las endotoxinas (LPS) y las endotoxinas por lo tanto no pueden alcanzar un material adsorbedor para endotoxinas dispuestas en el circuito de filtrado, habría habido un incentivo para la primera vez, en el conocimiento de este nuevo hecho sorprendente, para combinar con un filtro de este tipo un portador que tiene un recubrimiento adsorbente con un lipopéptido enlazador de endotoxina y que dispensa una cantidad predefinible de lipopéptido en el plasma sanguíneo. Debido a los medios de dispensación dispuestos en el circuito de filtrado, una liberación prolongada de cantidades muy pequeñas y sobre todo uniformes de lipopéptidos enlazadores de endotoxina en el plasma sanguíneo transportado en el circuito de filtrado durante el período total de tratamiento, preferiblemente desde 4 a 10 horas diarias sobre un período de 2 a 8 días, es por lo tanto logrado mediante los medios dispensadores dispuestos en el circuito de filtrado. Desde aquí, los lipopéptidos pasan al circuito sanguíneo extracorpóreo, donde forman un complejo con las endotoxinas (LPS) ubicadas en la sangre y por lo tanto las vuelven inofensivas. Gracias al filtro, estos complejos como ya se ha descrito anteriormente ya no pueden pasar al circuito de filtrado y disolverse de nuevo, por lo que la seguridad del paciente se mantiene alta. Los complejos de endotoxina:lipopéptido son entonces descompuestos predominantemente en el hígado del paciente.

El lipopéptido enlazador de endotoxina adsorbido en la superficie del primer o segundo portador está presente preferiblemente en una cantidad que, cuando se dispensa el lipopéptido, proporciona una concentración de lipopéptido en suero desde 0,01 µg/ml a 0,8 µg/ml como ya se ha mencionado. Sorprendentemente, se ha descubierto que la desorción muy baja del lipopéptido del primer o segundo portador es suficiente para obtener concentraciones séricas de lipopéptido desde 0,01 µg/ml a 0,8 µg/ml. Se ha encontrado que a estas concentraciones séricas se inhibe la actividad de las endotoxinas, en la que se deben excluir los efectos neurotóxicos y nefrotóxicos. La concentración sérica de lipopéptido preferiblemente se encuentra en un intervalo desde 0,1 µg/ml a 0,6 µg/ml, preferiblemente 0,1 µg/ml a 0,4 µg/ml, lo más preferiblemente entre 0,1 µg/ml y 0,25 µg/ml, ya que a estas concentraciones séricas, incluso con progresiones graves de la enfermedad, como sepsis, sepsis grave o shock séptico, se puede llevar a cabo una terapia eficaz sin efectos secundarios neurotóxicos y nefrotóxicos.

El primer o segundo portador tiene preferiblemente una superficie total desde 100 a 1.500 m<sup>2</sup>/g, en la que 50 a 2.000 mg están enlazados de manera adsorptiva en la superficie del primer o segundo portador al lipopéptido enlazador de endotoxina en relación con la superficie total del portador. De esta manera, se puede obtener una concentración de



lipopéptido en suero desde aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 0,8 µg/ml por desorción del lipopéptido enlazador de endotoxina de la superficie del portador. Para una persona experimentada en la técnica, la concentración sérica de lipopéptidos prevista en relación con el portador usado teniendo en cuenta el tamaño medio de poro y/o el tamaño medio de partícula se puede determinar sobre la base de simples pruebas y cálculos de rutina; los ejemplos de cálculo se especifican más abajo en los ejemplos.

Alternativamente a las realizaciones mencionadas anteriormente, que se basan en la desorción de cantidades muy bajas del lipopéptido desde una superficie de portador, el medio dispensador para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina comprende un dispositivo de dosificación de acuerdo con una tercera realización ventajosa para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina en el circuito sanguíneo extracorpóreo en un punto de alimentación de lipopéptido asociado con el circuito sanguíneo extracorpóreo. El punto de alimentación del lipopéptido está preferiblemente dispuesto corriente abajo del filtro. Si un dializador está dispuesto adicionalmente en el circuito sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del filtro, es entonces favorable si el punto de alimentación del lipopéptido en el circuito de sangre extracorpóreo está dispuesto corriente abajo del dializador. En una subvariante de la tercera realización, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito de filtrado abierto, que conduce corriente abajo del filtro al circuito extracorpóreo de sangre. En otra subvariante de la tercera realización, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito que está cerrado en la región de filtrado y que conduce al filtro.

En esta realización, el lipopéptido se infunde en el circuito de sangre extracorpóreo por medio de un dispositivo de dosificación. El lipopéptido está presente preferiblemente en forma de una preparación para administración parenteral, por ejemplo como una solución de infusión. La preparación puede comprender opcionalmente al menos un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. La preparación puede comprender solo un tipo de un lipopéptido enlazador de endotoxina o una mezcla de dos o más lipopéptidos, por ejemplo una mezcla de polimixina B1, B2, B3 y B4. Un "portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable" puede ser cualquier sustancia que se conoce para la producción de formas de administración parenteral tales como inyecciones, soluciones de infusión y similares. Las formulaciones para soluciones de infusión adecuadas para la invención se especifican adicionalmente a continuación en los ejemplos 4 y 5.

El lipopéptido enlazador de endotoxina está presente preferiblemente en forma de un polvo liofilizado para la producción de una preparación de inyección acuosa estéril o preparación de infusión, en la que el polvo puede disolverse, por ejemplo, en agua estéril, solución de dextrosa al 5%, una solución de ringer o una solución fisiológica de cloruro de sodio. La polimixina B se usa preferiblemente en forma de sulfato de polimixina B. El lipopéptido está presente en la preparación en forma disuelta, preferiblemente en una concentración desde 0,04 mg/l a 13 mg/l, más preferiblemente desde 0,1 mg/l a 7 mg/l, lo más preferiblemente desde 0,5 mg/l a 4 mg/l. La dosificación se ajusta preferiblemente de manera que la concentración sérica de lipopéptido esté en el intervalo desde 0,1 µg/ml a 0,6 µg/ml, preferiblemente desde 0,1 µg/ml a 0,4 µg/ml, lo más preferiblemente desde 0,1 µg/ml a 0,25 µg/ml, ya que a estas concentraciones séricas se puede llevar a cabo una terapia eficaz sin efectos secundarios neurotóxicos y nefrotóxicos, incluso con progresiones graves de la enfermedad, como sepsis, sepsis grave o shock séptico.

El dispositivo de dosificación está formado, como es conocido per se por una persona experimentada en la técnica, por unidades de infusión que típicamente comprenden un recipiente que contiene la solución de infusión (por ejemplo, bolsa de infusión o botella de infusión), un sistema de tubo y un medio de bomba para dosificación de un volumen deseado por unidad de tiempo.

La rata de infusión depende de la vida media en suero para el lipopéptido en el paciente. A modo de ejemplo, la vida media sérica para la polimixina B en pacientes con función renal normal es típicamente de 13 horas, y la de colistina es de 6 a 7,4 horas, de acuerdo con la literatura. En el caso del tratamiento por medio del aparato de perfusión, también debe tenerse en cuenta la eliminación del filtro y/o la eliminación del agente de agotamiento para el lipopéptido administrado, como se describe en detalle más adelante. Las formulaciones para soluciones de infusión adecuadas para este fin y también las instrucciones de dosificación se especifican adicionalmente a continuación en los ejemplos.

Con el fin de controlar la concentración del lipopéptido enlazador de endotoxina y para poder ajustar la dosificación de la solución de infusión como corresponde, es ventajoso que un medio de medición para medir la concentración del lipopéptido enlazador de endotoxina esté dispuesto corriente abajo del filtro o dializador y corriente arriba del punto de alimentación del lipopéptido. Los medios de medición adecuados, por ejemplo sensores, que se pueden usar para este fin se describen en la técnica anterior, por ejemplo por Jiang et al. (Jiang et al. 2004. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. International Immunopharmacology 4:527-537). Para la medición, se transporta preferiblemente una pequeña cantidad de sangre desde el circuito de sangre extracorpóreo a través de una línea de derivación al medio de medición/sensor y se rechaza una vez que se ha determinado la concentración. Una inserción del medio/sensor de medición directamente en el circuito sanguíneo extracorpóreo es de hecho posible en principio, pero es menos preferible, ya que en este caso se requieren grandes demandas del estado del medio/sensor de medición en términos de esterilidad y biocompatibilidad. Por estas razones, se prefiere la variante con la línea de derivación al medio/sensor de medición.

Al aparato de perfusión también se le puede asignar un circuito de control controlado por medio del controlador, en el que, al accionar la bomba de infusión, la cantidad infundida del lipopéptido se controla con respecto a un valor objetivo predefinible o intervalo de valores objetivo dependiendo del valor actual del lipopéptido (concentración sérica de lipopéptido) medida por los medios de medición. El valor objetivo o el intervalo del valor objetivo de la concentración sérica de lipopéptido se encuentra típicamente en un intervalo de 0,01-0,8 µg/ml.

Con la tercera realización, también es ventajoso si el controlador del aparato de perfusión está diseñado, cuando dosifica el lipopéptido en la sangre transportada en el circuito sanguíneo extracorpóreo, para tomar en consideración la eliminación de lipopéptido del cuerpo, la eliminación de lipopéptido del agente de agotamiento y/o la depuración de eliminación del dializador. A modo de ejemplo, se sabe que los portadores formados por un copolímero de poliestireno divinilbenceno, además de componentes patofisiológicamente relevantes tales como citoquinas, también adsorben lipopéptidos tales como polimixinas, de modo que la consideración de la eliminación de lipopéptido del primer portador (es decir, portador del agente de agotamiento) es ventajoso para la dosificación del lipopéptido infundido.

Alternativamente a las realizaciones mencionadas anteriormente, los medios de dispensación para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina comprenden, en una cuarta realización, un dializador, que está dispuesto en el circuito sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del filtro y que está diseñado para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina al circuito sanguíneo extracorpóreo por medio de un fluido de diálisis transportado a través del dializador. En una subvariante, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito de filtrado abierto, que conduce corriente abajo del filtro al circuito de sangre extracorpóreo. En otra subvariante, el circuito de filtrado puede formarse como un circuito que está cerrado en la región de filtrado y que conduce al filtro. Los dializadores usados son preferiblemente membranas de polisulfona hidrófila con una superficie de 1,4-2,0 m<sup>2</sup>, que se han producido mezclando con PVP (polivinilpirrolidona). A modo de ejemplo, estas membranas se utilizan en filtros proporcionados por la compañía Fresenius Medical Care, inter alia, en los modelos AF 1000 y FX60. Estos filtros de diálisis tienen un coeficiente de cribado para la albúmina por debajo del 0,1%. También es concebible el uso de lo que se conoce como filtro de corte alto, que también se basa en el uso de membranas de polisulfona hidrófila que tienen un coeficiente de cribado de aproximadamente 4% para la albúmina. Bajo condiciones de diálisis, es decir, se utiliza principalmente una eliminación controlada por difusión de las sustancias destinadas a la eliminación, la pérdida de albúmina es inferior a 5-10 g por tratamiento. Un ejemplo de dicho filtro de diálisis lo constituye el filtro EMiC<sup>2</sup> producido por la compañía Fresenius Medical Care. Las condiciones de flujo a las que se operan dichos filtros en el uso clínico se seleccionan de manera apropiada para el flujo sanguíneo 80-300 ml/min dependiendo de las condiciones de uso: bajo las condiciones de lo que se conoce como hemodiálisis venovenosa continua, se utilizan flujos sanguíneos de 60-80 ml/min, mientras que en el caso de la hemodiálisis intermitente asistida por unidad de diálisis, se utilizan flujos sanguíneos de 150-300 ml/min en casos agudos, es decir en pacientes con insuficiencia renal aguda, que también ocurre con mucha frecuencia en el caso de la sepsis. El flujo de dializado se establece preferiblemente en 500 ml/min en el caso de hemodiálisis intermitente, mientras que en el caso de hemodiálisis venovenosa continua, son convencionales los flujos de dializado en una proporción de 1:1 al flujo sanguíneo. La concentración del lipopéptido/polimixina en el líquido de diálisis debe estar en el intervalo de 0,2-1,0 µg/l, es decir, debe ser ligeramente mayor que el valor de la concentración sérica controlada del paciente a tratar, dado que el coeficiente de cribado del filtro de diálisis antes mencionado está entre 0,8 (AF 1000) y 0,9 (EMiC<sup>2</sup>), es decir entre 80 y 90%.

En la práctica, es particularmente conveniente si el primer o segundo portador es un polímero neutro, preferiblemente sintético. Por lo tanto, se puede garantizar una buena reproducibilidad del material portador. Si se trata de un polímero poroso, se puede asegurar una buena reproducibilidad en particular en términos de la porosidad y el tamaño de partícula. La porosidad y el tamaño de partícula también pueden variar muy ampliamente. El polímero puede ser tanto un homopolímero como un heteropolímero. Estos polímeros también se conocen con el nombre de "resinas de polímero macrorreticular no iónico" y, por ejemplo, se pueden obtener bajo los nombres comerciales "Amberchrom" y "Amberlite XAD" (Rohm & Haas/Dow Chemical Company).

Para la aplicación práctica, los polímeros de poliestireno entrecruzados y los polímeros de etilvinilbenceno entrecruzados han demostrado ser particularmente favorables. En el caso de purificación de sangre extracorpórea, se exige mucho a la esterilidad de las partes del aparato que entran en contacto con los fluidos corporales del paciente. Los polímeros de poliestireno entrecruzados y los polímeros de etilvinilbenceno entrecruzados se caracterizan por una alta estabilidad al calor y a los productos químicos, y ya están establecidos en la práctica clínica. En una variante ventajosa, el polímero de poliestireno entrecruzados es un copolímero de poliestireno divinilbenceno. En una variante ventajosa adicional, el polímero de etilvinilbenceno entrecruzado es un copolímero de etilvinilbenceno divinilbenceno.

Por supuesto, también es posible, en lugar del copolímero de poliestireno divinilbenceno preferido o copolímero de etilvinilbenceno divinilbenceno, usar otras resinas neutras de alta hidrofobicidad, que son bien conocidas por una persona experimentada en la técnica relevante. Ejemplos representativos para otros polímeros hidrófobos neutros adecuados para la invención incluyen, por ejemplo, polímeros de monómeros de estireno y etilvinilbenceno entrecruzados con trivinilciclohexano, trivinilbenceno, divinilnaftaleno, divinilsulfona, triacrilato de trimetilopropano, trimetacrilato de trimetilopropano o resinas en base a ésteres alifáticos y mezclas del mismo.

El primer o el segundo portador es ventajosamente poroso y tiene un tamaño medio de partícula de 100 nm o menor, preferiblemente en un intervalo de 1 a 100 nm. De este modo, se crea una superficie interna particularmente grande para el agotamiento de componentes indeseables, tales como citoquinas, o para el recubrimiento adsorbente con lipopéptido enlazador de endotoxina.

5 Aunque una persona experimentada en la técnica está familiarizada con el significado del término "tamaño medio de poro" y la forma en que la porosidad o el tamaño medio de poro se puede ajustar a propósito, este término se definirá brevemente en este punto por razones de claridad. El tamaño medio de poro se relaciona con el diámetro medio de los poros. Con una distribución de tamaño gaussiana de los diámetros de poro de un material poroso, el diámetro medio de poro es el correspondiente al máximo de la curva de distribución. El diámetro medio de poro puede determinarse, por ejemplo, mediante adsorción de nitrógeno (como se describe en Weber et al. 2008; Neutral styrene divinylbenzene copolymers for adsorption of toxins in liver failure. *Biomacromolecules* 9(4):1322-1328) o por medios de la intrusión de mercurio. El tamaño de poro de un polímero se ajusta variando la concentración de los monómeros o comonómeros implicados, el disolvente o el modulador. Cuanto más pequeños se eligen los poros del polímero, mayor es la superficie interna del polímero que está disponible para la adsorción de moléculas (en este caso componentes sanguíneos indeseables tales como citoquinas y/o lipopéptidos enlazadores de endotoxinas). Cuanto más grandes son los poros, mejor es la accesibilidad de los poros para moléculas más grandes. Un método de producción para un polímero hidrófobo sintético de tamaño de poro definido, como se puede usar para la invención, se describe en la publicación mencionada anteriormente por Weber et al.

20 La producción de dichos portadores por copolimerización de monómeros aromáticos de monovinilo y polivinilo, llevada a cabo como polimerización en suspensión, también se conoce por el documento US 4 382 124. Los monómeros aromáticos de polivinilo se usan como entrecruzadores de los polímeros. Por ejemplo, estireno y/o etilestireno, preferiblemente etilestireno, se usa o se usan como compuestos aromáticos de monovinilo. El divinilbenceno se usa preferiblemente como compuesto aromático de polivinilo. La porosidad se obtiene mediante la adición de porógenos a los monómeros, que se eliminan nuevamente después de la polimerización. Los porógenos pueden tener propiedades hidrófobas o hidrófilas. Los ejemplos incluyen tolueno y xileno para porógenos hidrófobos y alcoholes C4-C10 para porógenos hidrófilos. Sin embargo, también se pueden usar mezclas de estas dos clases de porógenos. Los tamaños de poro de los portadores de polímero se pueden variar dentro de amplios límites por el grado de entrecruzamiento de los polímeros, el tipo y la cantidad de los porógenos y las condiciones de reacción durante la polimerización. Una persona experimentada en la técnica relevante sabrá qué parámetros seleccionar para obtener un portador hidrófobo neutro con un tamaño de poro deseable.

35 Una realización especial de la producción de portadores hidrófobos porosos está constituida por copolímeros de estireno divinilbenceno preferiblemente postentrecruzamiento por "hiperentrecruzamiento" (Davankov et al. *J. Polymer Science*, 47, 95-101 (1974)). Ejemplos de tales portadores incluyen los sorbentes Hypersol-Macronet de Purolite Company. Por lo tanto, se pueden producir portadores con una superficie interior muy grande, que contienen prácticamente solo microporos <2 nm.

40 Los portadores con superficie neutra e hidrófoba y tamaño medio de poro variable y tamaño de partícula variable pueden adquirirse, por ejemplo, en Rohm & Haas/Dow Chemical Company y pueden obtenerse bajo los nombres comerciales "Amberchrom CG" y "Amberlite XAD". Los portadores de poro fino con superficie neutra e hidrófoba y un tamaño medio de poro de aproximadamente 2,5 nm y más pequeños se pueden obtener de la compañía Purolite (por ejemplo, Hypersol-Macronet MN270, polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de poro de 2,5 nm (25 Å)).

La porosidad total de un portador que tiene un tamaño medio de poro de 1 a 100 nm es preferiblemente 0,3-0,8 cm<sup>3</sup>/g de polímero. Las superficies internas (o superficies totales) preferiblemente se encuentran en un intervalo de 100 a 1.500 m<sup>2</sup>/g.

45 El tamaño medio de poro del primer o del segundo portador se encuentra ventajosamente en un intervalo de 20 nm más pequeño, preferiblemente de 1 a 20 nm, o en un intervalo desde 80 a 100 nm, ya que en estos intervalos de tamaños de poro específicos, una adsorción de proteína C por el primer portador o el segundo portador es mucho menos pronunciada que en un intervalo de tamaño de poro de más de 20 nm y menos de 80 nm. Con tamaños de poro <20 nm, pasa a los poros menos proteína C. La adsorción de proteína C por parte del portador aumenta al aumentar el tamaño de poro y disminuye nuevamente con tamaños de poro superiores a 80 nm. Aunque el enlace de proteína C puede reducirse al mínimo con tamaños de poro seleccionados mayores (mayores de 80 nm), es favorable para la aplicación clínica si el tamaño medio de poro se selecciona de manera que no sea mayor de 100 nm, ya que la superficie interna del portador puede volverse demasiado pequeña. La proteína C, una proteína dependiente de la vitamina K en el plasma sanguíneo, puede pasar a través del filtro utilizado de acuerdo con la invención y, por consiguiente, entra en contacto con el primer o segundo portador dispuesto en el circuito de filtrado. La proteína C es un importante regulador del proceso de coagulación de la sangre y tiene un efecto anticoagulante. Se puede suponer que la adsorción de proteína S también es mucho menor, ya que la proteína S (62.000 Da) tiene un peso molecular relativo similar en comparación con la proteína C (69.000 Da). Las mismas consideraciones se aplican a los factores de coagulación de peso molecular similar, como el factor VII, el factor IX y el factor X.

La porosidad total de un portador que tiene un tamaño medio de poro de 20 nm o menos es preferiblemente de 0,4 a 0,8 cm<sup>3</sup>/g de polímero. Las superficies internas (o superficies totales) preferiblemente se encuentran en un intervalo de 300 a 1.500 m<sup>2</sup>/g.

5 La porosidad total de un portador que tiene un tamaño medio de poro desde 80 a 100 nm es preferiblemente de 0,4 a 0,8 cm<sup>3</sup>/g de polímero. Las superficies internas (o superficies totales) preferiblemente se encuentran en un intervalo desde 100 a 500 m<sup>2</sup>/g.

En variantes adicionales, el primer y el segundo portador pueden ser de tipo fibra o pueden estar en forma de partículas. El primer y el segundo portador, sin embargo, están preferiblemente en forma de partículas. Los portadores en forma de partícula son más fáciles de manejar en comparación con los portadores fibrosos. Además, la porosidad de las partículas se puede producir y ajustar más fácilmente.

10 El tamaño medio de partícula de los portadores de polímero se puede ajustar durante la polimerización de la manera conocida, por ejemplo, por tipo y cantidad de estabilizador de suspensión y geometría y velocidad de rotación del agitador. Los portadores hidrófobos con superficie neutra e hidrófoba y tamaño medio de poro variable y tamaño medio de partícula variable pueden adquirirse, por ejemplo, por Rohm&Haas/Dow Chemical Company y pueden obtenerse bajo los nombres comerciales "Amberchrom CG" y "Amberlite XAD". Los portadores de poro fino de tamaño medio de poro variable y tamaño medio de partícula se producen, por ejemplo, por la compañía Puralite.

Las fibras de AC de la compañía Mast Carbon (Reino Unido) constituyen ejemplos de un portador tipo fibra adecuado.

20 El primer o el segundo portador tienen preferiblemente la forma de micropartículas que tienen un tamaño medio de partícula de 300 µm o menor, preferiblemente de 2 a 300 µm. Con tamaños de partícula más grandes de este intervalo, la superficie externa más pequeña proporciona compatibilidad de sangre mejorada, mientras que las partículas más pequeñas se caracterizan por una mayor eficacia dinámica.

25 En una realización particularmente preferida, el primer portador tiene un tamaño medio de poro de 10 a 20 nm o un tamaño medio de poro de 80 a 100 nm y un tamaño medio de partícula de 75 a 150 µm. Se ha encontrado que este intervalo de tamaño de partícula es ventajoso en términos de la adsorción indeseable de la proteína C (véase el ejemplo 8 a continuación). Las complicaciones de la coagulación (trombosis venosa, embolias pulmonares), que son causadas por una adsorción indeseable de proteína C, pueden de este modo ser minimizadas. Con un tamaño de partícula desde 75 a 150 µm, la superficie exterior del portador parece ser lo suficientemente pequeña como para enlazar la proteína C en un grado insignificante, si es que lo hace; sin embargo, es claramente lo suficientemente grande como para mantener pequeños los caminos de difusión para las sustancias que se van a adsorber. En esta realización preferida, el tamaño de partícula es al menos 75 µm, ya que las cantidades fisiológicamente relevantes de proteína C todavía permanecen aquí en la sangre o plasma sanguíneo, incluso después de una incubación relativamente larga. En una subvariante ventajosa, el primer portador tiene un tamaño medio de poro de 10 a 20 nm y un tamaño medio de partícula desde 75 a 150 µm.

35 Con un tamaño medio de poro de menos de 10 nm, la eficacia de la adsorción para los mediadores de la inflamación a eliminar, tales como las citoquinas, en particular TNF- $\alpha$ , disminuye nuevamente. Con un tamaño de poro de más de 20 nm, la superficie interna es más pequeña y la capacidad de adsorción para citoquinas disminuye. Esta realización del aparato de perfusión de acuerdo con la invención que incluye las subvariantes ventajosas descritas a continuación es, por lo tanto, extraordinariamente adecuada para el tratamiento de la sepsis, en particular el choque séptico y los estados similares a la sepsis.

40 En una subvariante particularmente ventajosa y preferida de esta realización, el primer portador tiene un tamaño medio de poro desde 10 a 20 nm o un tamaño medio de poro desde 80 a 100 nm, preferiblemente un tamaño medio de poro desde 10 a 20 nm y un tamaño medio de partícula desde 75 a 150 µm, en el que la superficie del primer portador tiene un recubrimiento adsorbente formado del lipopéptido enlazador de endotoxina, es decir en esta subvariante el agente de agotamiento también actúa, como se describió anteriormente en detalle con referencia a la primera realización, como un medio dispensador para el lipopéptido enlazador de endotoxina (ver también la Figura 1 y 2 más adelante). Como ya se mencionó, se ha encontrado en pruebas de laboratorio que el recubrimiento adsorbente de la superficie del portador del lipopéptido no tiene efectos desventajosos sobre la adsorción de las citoquinas. En realizaciones en las que se proporciona un segundo portador (véase más arriba o los comentarios a continuación con respecto a la figura 5), es ventajoso de acuerdo con una subvariante adicional si el segundo portador tiene un tamaño de poro de 20 nm o menor.

55 Dado que la adsorción de proteína C disminuye al aumentar el tamaño medio de partícula, el primer portador en una subvariante ventajosa adicional tiene un tamaño medio de partícula de 100 a 150 µm. El portador tiene más preferiblemente un tamaño medio de partícula de 110 a 130 µm, idealmente un tamaño medio de partícula de aproximadamente 120 µm, ya que a estos tamaños de partículas, por un lado, las sustancias tóxicas, como las citoquinas, y por otro, factores de coagulación importantes, como la proteína C, difícilmente pueden seguir adsorbiéndose, incluso si el fluido corporal (plasma sanguíneo) se pone en contacto con el primer portador durante un período de tiempo relativamente largo.

En una variante del aparato de perfusión extracorpóreo, el circuito de filtrado conduce al circuito de sangre extracorpóreo en una posición corriente abajo del filtro. En esta variante, el circuito de filtrado está abierto y el plasma fraccionado se alimenta directamente al circuito sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del filtro pasando a través del circuito de filtrado (véase la ilustración esquemática de esta variante en las Figuras 1, 3, 5 y 7). El principio básico de esta variante se usa actualmente en inmunoadsorción (por ejemplo, aparatos de aféresis de la compañía AsahiKasei, Japón). El agente de agotamiento o los medios dispensadores (primer o segundo portador) están dispuestos preferiblemente en esta variante en un dispositivo que está dispuesto en el circuito de filtrado y a través del cual puede fluir plasma sanguíneo y que, por ejemplo, puede formarse como columna o cartucho.

En otra variante del circuito sanguíneo extracorpóreo, el circuito de filtrado se cierra y el plasma fraccionado pasa a través de la membrana del filtro de regreaso a la sangre que fluye en el circuito sanguíneo extracorpóreo (véase la ilustración esquemática de esta variante en las figuras 2, 4 y 6). El principio básico de la segunda variante es conocido por el sistema de purificación de sangre Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Alemania) [Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G, Schrefl A, Linsberger I, Gerner FJ, Schoenhofen M.: Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs*. 1999 Jan;23(1):81-6]. El agente de agotamiento o los medios de dispensación (primer o segundo portador) pueden disponerse en un dispositivo que está dispuesto en el circuito de filtrado y a través del cual puede fluir plasma sanguíneo y que, por ejemplo, puede formarse como una columna o cartucho.

En una realización ventajosa, el circuito de filtrado conduce al filtro y forma así un circuito que se cierra en la región de filtrado, en la que el primer portador tiene la forma de micropartículas y el circuito de filtrado comprende una suspensión de estas micropartículas, en el que las micropartículas tienen un tamaño medio de partícula de 20  $\mu\text{m}$  o menor, preferiblemente un tamaño medio de partícula de 8  $\mu\text{m}$  o menor, idealmente un tamaño medio de partícula de 5  $\mu\text{m}$  o menor. Esta realización es un desarrollo de las realizaciones mencionadas anteriormente, en la que solo el primer portador (con o sin un recubrimiento adsorptivo con lipopéptido enlazador de endotoxina) está dispuesto en el circuito de filtrado. El primer portador en forma de micropartícula (con o sin recubrimiento de lipopéptido) circula aquí como una suspensión en el circuito de filtrado. Debido a los tamaños de partícula seleccionados para que sean muy pequeños, puede evitarse el riesgo de una embolia pulmonar, si las micropartículas pasan, por ejemplo, por medio de una fuga de filtro al circuito sanguíneo extracorpóreo y luego al cuerpo del paciente. Un circuito de plasma extracorpóreo, en el que está contenida una suspensión de micropartículas, constituye un componente clave de un sistema de destoxificación con base en microesferas (MDS) y ya se ha descrito en los documentos EP 0776223 B y US 5855782.

La invención se usa ventajosamente para el tratamiento de una infección con bacterias gram negativas, en particular para la profilaxis o el tratamiento de una reacción inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave o shock séptico. Los ejemplos representativos de patrones de enfermedad que pueden tratarse por medio del aparato de perfusión de acuerdo con la invención son los que se producen después de una infección con bacterias gram negativas y pueden conducir a SIRS, sepsis, sepsis grave con falla de múltiples órganos o shock séptico.

Los ejemplos representativos para bacterias gram negativas incluyen *Escherichia* spp, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. La invención es particularmente ventajosa en el caso de bacterias gram negativas para las que se ha observado una mayor aparición de cepas multirresistentes, en la que se debe destacar *Pseudomonas aeruginosa* como un ejemplo particularmente relevante.

Como ya se mencionó anteriormente, se produce o puede producirse una mayor distribución de endotoxinas con el uso de antibióticos en el caso de una infección con bacterias gram negativas y como resultado de la lisis celular inducida por la administración de antibióticos. Se ha descrito una mayor distribución de endotoxinas, por ejemplo, para antibióticos que se enlazan preferiblemente a PBP-3 (proteína-3 enlazadora de penicilina), por ejemplo, los antibióticos más comúnmente usados en el grupo de cefalosporinas, tales como ceftazidima. Por lo tanto, la invención se usa ventajosamente como una medida terapéutica o profiláctica adicional en el alcance del tratamiento convencional de infecciones bacterianas por medio de antibióticos para resistir la distribución de endotoxinas inducida por la administración de antibióticos y la inducción de citoquinas.

En un aspecto adicional, la invención se usa ventajosamente para la profilaxis o el tratamiento de una reacción inflamatoria como resultado de insuficiencia hepática aguda o descompensación aguda en el caso de insuficiencia hepática crónica, en particular una reacción inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, grave sepsis con falla múltiple de órganos o shock séptico. En pacientes con funciones hepáticas intactas, las endotoxinas que pasan del intestino al torrente sanguíneo se eliminan del sistema reticuloendotelial (RES) o células de Kupffer por endocitosis. La descompensación aguda puede ocurrir en pacientes con insuficiencia hepática crónica. En este caso, las endotoxinas de la flora intestinal normal pasan la barrera intestinal y, por lo tanto, pasan sin impedimentos al hígado y conducen a una reacción inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave con insuficiencia de múltiples órganos o shock séptico.

La invención también se relaciona con un método para la profilaxis o el tratamiento de afecciones y estados causados por endotoxemia por medio del aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención. Las definiciones y desarrollos especificados anteriormente deben aplicarse por igual al método.

Antes de comenzar el tratamiento del paciente por medio del aparato de perfusión de acuerdo con la invención, se administra preferiblemente un bolo una vez para romper rápidamente y ajustar una concentración de lipopéptido en suero desde preferiblemente 0,01 µg/ml a 0,8 µg/ml. Dentro del alcance de esta divulgación, se entiende que el término "bolo" significa una administración parenteral de una sola vez del lipopéptido enlazador de endotoxina en forma de la preparación, preferiblemente en la forma de una preparación de inyección o infusión. La administración en bolo puede usarse ventajosamente junto con todas las realizaciones mencionadas anteriormente del aparato de acuerdo con la invención. Los ejemplos de soluciones de inyección para la administración en bolo se especifican a continuación en el Ejemplo 4.

La invención se explicará a continuación en mayor detalle sobre la base de ejemplos y dibujos no limitativos. En los dibujos:

La figura 1 muestra una ilustración esquemática de una realización de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado abierto, en el que el agente de agotamiento dispuesto en el circuito de filtrado también actúa simultáneamente como medio de dispensación de polimixina B,

La figura 2 muestra una ilustración esquemática de una realización adicional de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado cerrado, en el que el agente de agotamiento dispuesto en el circuito de filtrado también actúa simultáneamente como medio de dispensación para polimixina,

La figura 3 muestra una ilustración esquemática de una realización adicional de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado abierto y un dispositivo de dosificación para polimixina,

La figura 4 muestra una ilustración esquemática de dos realizaciones adicionales de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado cerrado y un dispositivo de dosificación para polimixina,

La figura 5 muestra una ilustración esquemática de una realización adicional de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado abierto, en el que los medios de dispensación para polimixina están dispuestos corriente abajo del agente de agotamiento en el circuito de filtrado,

La figura 6 muestra una ilustración esquemática de una realización adicional de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado cerrado, en el que los medios de dispensación para polimixina están presentes en el circuito de filtrado como suspensión de micropartículas, y

La figura 7 muestra una ilustración esquemática de una realización adicional de un aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la invención con circuito de filtrado abierto y un dializador para dispensar polimixina dispuesto corriente abajo del filtro en el circuito de sangre extracorpóreo.

La figura 1 muestra una ilustración esquemática de un aparato 100 de perfusión extracorpóreo (aparato 100 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 100 de perfusión tiene un circuito 102 sanguíneo extracorpóreo con un flujo 102a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 101 a un filtro 104 y un flujo 102b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 104 al paciente 101. La sangre del paciente es transportada en el circuito 102 de sangre por medio de una bomba 103 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 60-300$  ml/min dependiendo del método de tratamiento). El filtro 104 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 104 y se alimenta a un circuito 105 de filtrado. Un filtro con un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que el plasma fraccionado pase, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular tales como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños, tales como albúmina o proteína C, pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 105 de filtrado está formado como un circuito abierto, que conduce corriente abajo del filtro 104 hacia la rama 102b venosa. El plasma sanguíneo fraccionado se transporta a través del circuito 105 de filtrado por medio de una bomba 106 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-20\%$  de  $Q_{Blut}$ ). Al aparato 100 de perfusión también se le asigna un controlador 110 para el control automático del aparato 100, estando dicho controlador también conectado a las bombas 103, 106 mediante conexiones de señal. El controlador 110 también está configurado de manera útil para la adquisición central de datos y la salida de datos.

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 105 de filtrado es guiado a través de una columna 107 dispuesta en el circuito 105 de filtrado. La columna 107 contiene un lecho 107a adsorbedor formado por un portador que tiene una superficie hidrófoba neutra, en el que la superficie del portador tiene un recubrimiento adsorbente formado de moléculas de lipopéptido, aquí polimixina. En la figura 1, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120 µm y un tamaño medio de poro de 15 a 20 nm, en el que la superficie del polímero tiene un recubrimiento adsorbente con polimixina (producción de un polímero recubierto con polimixina, ver ejemplo 1). El lecho 107a adsorbedor por lo tanto funciona por un lado como un agente de agotamiento para citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, ya que éstas se adsorben en el portador y se eliminan

del plasma. Por otro lado, el lecho 107a adsorbedor también actúa como un medio dispensador para dispensar continuamente polimixina en el plasma sanguíneo dispensando continuamente una cantidad muy pequeña de polimixina en el plasma sanguíneo fraccionado transportado en el circuito 105 de filtrado (desorción). La polimixina pasa desde allí al flujo 102b de salida venoso del circuito 102 sanguíneo extracorpóreo, donde forma un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre y las hace inofensivas.

La figura 2 muestra una ilustración esquemática de un aparato 200 de perfusión extracorpóreo (dispositivo 200 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 200 de perfusión tiene un circuito 202 de sangre extracorpóreo con un flujo 202a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 201 a un filtro 204 y un flujo 202b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 204 al paciente 201. La sangre del paciente es transportada en el circuito 202 de sangre por medio de una bomba 203 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 30-70$  ml/min). El filtro 204 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 204 de plasma y se alimenta a un circuito 205 de filtrado. Un filtro que tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que el plasma fraccionado pase, de modo que se retengan los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños como la albúmina o la proteína C pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 205 de filtrado está formado como un circuito que está cerrado en la región de filtrado, en el que el plasma sanguíneo fraccionado es transportado a través del circuito 205 de filtrado por medio de una bomba 206 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-25\%$  de  $Q_{Blut}$ ). Al aparato de perfusión 200 también se le asigna un controlador 210 para el control automático del aparato 200, estando dicho controlador también conectado a las bombas 203, 206 a través de conexiones de señal. El controlador 210 también está configurado de forma útil para la adquisición central de datos y la salida de datos.

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 205 de filtrado es guiado a través de una columna 207 dispuesta en el circuito 205 de filtrado. La columna 207 contiene un lecho 207a adsorbedor formado por un portador que tiene una superficie hidrófoba neutra, en el que la superficie del portador tiene un recubrimiento adsorbente formado de moléculas de lipopéptido, aquí polimixina. En la figura 2, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de poro de 15 a 20 nm, en el que la superficie del polímero tiene un recubrimiento adsorbente con polimixina (producción de un polímero recubierto con polimixina, ver ejemplo 1). El lecho 207a de adsorción por lo tanto funciona por un lado como un agente de agotamiento para citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, ya que éstas se adsorben en el portador y se eliminan del plasma. Por otro lado, el lecho 207a adsorbedor también actúa como un medio dispensador para dispensar continuamente polimixina en el plasma sanguíneo dispensando continuamente una cantidad muy pequeña de polimixina en el plasma sanguíneo fraccionado transportado en el circuito 205 de filtrado (desorción). La polimixina pasa desde allí al circuito 202 de sangre extracorpóreo. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

La figura 3 muestra una ilustración esquemática de un aparato 300 de perfusión extracorpóreo (aparato 300 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 300 de perfusión tiene un circuito 302 sanguíneo extracorpóreo con un flujo 302a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 301 a un filtro 304 y un flujo 302b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 304 al paciente 301. La sangre del paciente es transportada en el circuito 302 de sangre por medio de una bomba 303 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 60-300$  ml/min). El filtro 304 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 304 y se alimenta a un circuito 305 de filtrado. Un filtro con un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que pase el plasma fraccionado, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular tales como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños, tales como albúmina o proteína C, pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 305 de filtrado está formado como un circuito abierto, que conduce corriente abajo del filtro 304 a la rama venosa 302b. El plasma sanguíneo fraccionado se transporta a través del circuito 305 de filtrado por medio de una bomba 306 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-25\%$  de  $Q_{Blut}$ ).

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 305 de filtrado es guiado a través de una columna 307 dispuesta en el circuito 305 de filtrado. La columna 307 contiene un lecho 307a adsorbedor formado de un portador con una superficie neutra e hidrófoba. En la figura 3, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de poro desde 15 a 20 nm. El lecho 307a adsorbedor funciona como un agente de agotamiento para citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, adsorbiéndolos en el portador y eliminándolos del plasma.

Para dispensar un lipopéptido enlazador de endotoxina, se le asigna al aparato 300 de perfusión un dispositivo 308 de infusión conocido per se que comprende un recipiente 309 de infusión (por ejemplo, botella de infusión o bolsa de infusión) que contiene una solución de infusión de lipopéptido, aquí una solución de infusión de polimixina, tubo 311 de infusión y una bomba 312 de infusión. Las soluciones de infusión adecuadas se describen más adelante en el

ejemplo 5. La polimixina se infunde en un punto 313 de alimentación de lipopéptido en el flujo 302b de salida venoso del circuito 302 sanguíneo extracorpóreo. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

La figura 3 también muestra un desarrollo ventajoso, en el que un sensor 314 de polimixina está dispuesto corriente abajo del filtro 304 y corriente arriba del punto 313 de alimentación del lipopéptido. A modo de ejemplo, un sensor de polimixina como se describió previamente por Jiang et al. (Jiang et al. 2004. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. International Immunopharmacology 4:527-537) puede usarse para este propósito. Para la medición, se transporta preferiblemente una pequeña cantidad de sangre desde el circuito 302 de sangre extracorpóreo a través de una línea de derivación al sensor 314 y se rechaza una vez que se ha determinado la concentración de la polimixina. Al aparato 300 de perfusión también se le asigna un controlador 310 para el control automático del aparato 300, estando dicho controlador también conectado a las bombas 303, 306, 311 y cuando sea aplicable al sensor 314 de polimixina a través de conexiones de señal. El controlador 310 también está configurado convenientemente para adquisición de datos central y para salida de datos. Al aparato 300 de perfusión también se le puede asignar un circuito de control controlado por el controlador 310, en el que, accionando la bomba 312 de infusión, la cantidad infundida de polimixina se controla con respecto a un valor objetivo predefinido o intervalo de valores objetivo dependiendo del valor actual de la polimixina (concentración en suero de polimixina) medido por el sensor 314. El valor objetivo o el intervalo del valor objetivo de la concentración en suero de polimixina está típicamente en un intervalo desde 0,01-0,8 µg/ml.

La figura 4 muestra una ilustración esquemática de un aparato 400 de perfusión extracorpóreo (dispositivo 400 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 400 de perfusión tiene un circuito 402 de sangre extracorpóreo con un flujo 402a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 401 a un filtro 404 y un flujo 402b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 404 al paciente 401. La sangre del paciente es transportada en el circuito 402 de sangre por medio de una bomba 403 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 60-300$  ml/min). El filtro 404 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 404 y se alimenta a un circuito 405 de filtrado. Un filtro que tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que pase el plasma fraccionado, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños como la albúmina o la proteína C pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 405 de filtrado está formado como un circuito que está cerrado en la región de filtrado, en el que el plasma sanguíneo fraccionado es transportado a través del circuito 405 de filtrado por medio de una bomba 406 de filtrado (tasa de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-25\%$  de  $Q_{Blut}$ ).

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 405 de filtrado es guiado a través de una columna 407 dispuesta en el circuito 405 de filtrado. La columna 407 contiene un lecho 407a adsorbedor formado por un portador que tiene una superficie neutra e hidrófoba. En la figura 4, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120 µm y un tamaño medio de poro desde 15 a 20 nm. El lecho 407a adsorbedor actúa como un agente de agotamiento para citoquinas tales como TNF-α, IL-6 e IL-10, adsorbiéndolos en el portador y eliminándolos del plasma.

Para dispensar un lipopéptido enlazador de endotoxina, el aparato 400 de perfusión es un dispositivo 408 de infusión conocido per se que comprende un recipiente 409 de infusión (por ejemplo botella de infusión o bolsa de infusión) que contiene una solución de infusión de lipopéptido, aquí una solución de infusión de polimixina, un tubo 411 de infusión y una bomba 412 de infusión. Las soluciones de infusión adecuadas se describen adicionalmente más abajo en el ejemplo 5. La polimixina se infunde en un punto 413 alimentador de lipopéptido en el flujo 402b de salida venoso del circuito 402 de sangre extracorpóreo. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

De manera similar a la figura 3, la figura 4 muestra además un desarrollo ventajoso, en el que un sensor 414 de polimixina está dispuesto corriente abajo del filtro 404 y corriente arriba del punto 413 de alimentación del lipopéptido. A modo de ejemplo, un sensor de polimixina como fue descrito previamente por Jiang et al. (Jiang et al. 2004. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. International Immunopharmacology 4:527-537) puede usarse para este propósito. Para la medición, se transporta preferiblemente una pequeña cantidad de sangre desde el circuito 402 de sangre extracorpóreo a través de una línea de ramificación al sensor 414 y se rechaza una vez que se ha determinado la concentración de la polimixina. Al aparato 400 de perfusión también se le asigna un controlador 410 para el control automático del aparato 400, estando dicho controlador también conectado a las bombas 403, 406, 411 y donde sea aplicable al sensor 414 de polimixina a través de conexiones de señal. El controlador 410 también está configurado convenientemente para adquisición central de datos y para salida de datos. Al aparato 400 de perfusión también se le puede asignar un circuito de control controlado por el controlador 410, en el que, al accionar la bomba 412 de infusión, la cantidad de polimixina infundida se controla con respecto a un valor objetivo predefinido o intervalo de valores objetivo dependiendo del valor actual de polimixina (concentración en suero de polimixina) medido por el



sensor 414. El valor objetivo o el intervalo del valor objetivo de la concentración en suero de polimixina está típicamente en un intervalo desde 0,01-0,8 µg/ml.

La figura 5 muestra una ilustración esquemática de un aparato 500 de perfusión extracorpóreo (dispositivo 500 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 500 de perfusión tiene un circuito 502 sanguíneo extracorpóreo con un flujo 502a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 501 a un filtro 504 y un flujo 502b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 504 al paciente 501. Se transporta la sangre del paciente en el circuito de sangre por medio de una bomba 503 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 60-300$  ml/min). El filtro 504 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 504 y se alimenta a un circuito 505 de filtrado. Un filtro que tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que pase el plasma fraccionado, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños como la albúmina o la proteína C pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 505 de filtrado está formado como un circuito abierto, que conduce corriente abajo del filtro 504 a la rama 502 venosa. El plasma sanguíneo fraccionado es transportado a través del circuito 505 de filtrado por medio de una bomba 506 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-25\%$  de  $Q_{Blut}$ ). Al aparato 500 de perfusión también se le asigna un controlador 510 para el control automático del aparato 500, estando dicho controlador también conectado a las bombas 503, 506 a través de conexiones de señal. El controlador 510 también está configurado de manera útil para la adquisición central de datos y la salida de datos. En la figura 5, el circuito 505 de filtrado está formado como un circuito abierto. Sin embargo, el circuito 505 de filtrado también se puede formar como un circuito cerrado.

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 505 de filtrado es guiado a través de una columna 507 dispuesta en el circuito 505 de filtrado. La columna 507 contiene un lecho 507a adsorbedor formado de un portador con una superficie neutra e hidrófoba. En la figura 5, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120 µm y un tamaño medio de poro de 15 a 20 nm. El lecho 507a adsorbedor funciona como un agente de agotamiento para citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, adsorbiéndolos en el portador y eliminándolos del plasma.

Para dispensar un lipopéptido, se dispone otra columna 508 en el circuito 505 filtrado, corriente abajo de la columna 507. La columna 508 contiene un lecho 508a portador formado de un portador que tiene una superficie neutra e hidrófoba, en el que la superficie del portador tiene una recubrimiento adsorbente formado de moléculas de lipopéptido, aquí polimixina. En la figura 5, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de 120 µm y un tamaño medio de poro desde 15 a 20 nm, en el que la superficie del polímero tiene un recubrimiento adsorbente con polimixina (producción de un polímero recubierto con polimixina, ver el Ejemplo 1). El lecho 508a portador actúa como un medio dispensador para dispensar continuamente polimixina en el plasma sanguíneo dispensando continuamente una cantidad muy pequeña de polimixina en el plasma sanguíneo fraccionado transportado en el circuito 505 de filtrado (desorción). Desde allí, la polimixina pasa al circuito 502 sanguíneo extracorpóreo. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

La figura 6 muestra una ilustración esquemática de un aparato 600 de perfusión extracorpóreo (dispositivo de purificación de sangre extracorpóreo 600). El aparato de perfusión 600 tiene un circuito 602 sanguíneo extracorpóreo con un flujo 602a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 601 a un filtro 604 y un flujo 602b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 604 al paciente 601. Se transporta la sangre del paciente en el circuito 602 de sangre por medio de una bomba 603 de sangre (rata de bombeo  $Q_{Blut} = 60-300$  ml/min). El filtro 604 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de 340.000 g/mol (340 kDa), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 604 y se alimenta a un circuito 605 de filtrado. Un filtro que tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de 340 kDa permite que pase el plasma fraccionado, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños como la albúmina o la proteína C pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 605 de filtrado está formado como un circuito que está cerrado en la región de filtrado, donde el plasma sanguíneo fraccionado es transportado a través del circuito 605 de filtrado por medio de una bomba 606 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{frakt. Plasma} = 15-25\%$  de  $Q_{Blut}$ ).

Al aparato 600 de perfusión también se le asigna un controlador 610 para el control automático del aparato 600, estando dicho controlador también conectado a las bombas 603, 606 a través de conexiones de señal. El controlador 610 también está configurado convenientemente para la adquisición central de datos y la salida de datos.

Aquí, el circuito 605 de filtrado, como agente de agotamiento/medios 607 de dispensación, comprende una suspensión (no ilustrada en detalle) del portador 607a, es decir el agente de agotamiento/medios de dispensación

607 o el portador 607a está en forma de micropartículas y está presente como suspensión distribuida en el plasma fraccionado y circula como suspensión en el circuito 605 de filtrado. El portador 607a en forma de micropartícula tiene una superficie neutra e hidrófoba, en el que la superficie del portador tiene un recubrimiento adsorbente formado por moléculas de lipopéptido, aquí polimixina. En la figura 6, el portador 607a es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de  $5 \mu\text{m} \pm 3-4 \mu\text{m}$  y un tamaño medio de poro de 15 a 20 nm (fuente de adquisición de polímero: Rohm&Haas), en el que la superficie del polímero tiene un recubrimiento adsorptivo con polimixina (producción de un polímero recubierto con polimixina, véase el ejemplo 1). El portador 607a en forma de micropartículas funciona así por un lado como un agente de agotamiento para citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, adsorbiéndolos en el portador y eliminándolos del plasma. Por otro lado, el portador 607a en forma de micropartículas también actúa como un medio dispensador para dispensar continuamente polimixina en el plasma sanguíneo dispensando continuamente una cantidad muy pequeña de polimixina en el plasma sanguíneo fraccionado transportado en el circuito 605 de filtrado (desorción). Desde allí, la polimixina pasa al circuito 602 sanguíneo extracorpóreo. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

La figura 7 muestra una ilustración esquemática de un aparato 700 de perfusión extracorpóreo (dispositivo 700 de purificación de sangre extracorpóreo). El aparato 700 de perfusión tiene un circuito 702 de sangre extracorpóreo con un flujo 702a de entrada arterial (rama arterial) desde un paciente 701 a un filtro 704 y un flujo 702b de salida venoso (rama venosa) desde el filtro 704 al paciente 701. La sangre del paciente es transportada en el circuito 702 de sangre por medio de una bomba 703 de sangre (rata de bombeo  $Q_{\text{Blut}} = 60-300 \text{ ml/min}$ ). El filtro 704 tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar de  $340.000 \text{ g/mol}$  ( $340 \text{ kDa}$ ), aquí un filtro del tipo Albuflow® (fabricante: Fresenius Medical Care; material: fibras huecas de polisulfona; coeficiente de cribado para la albúmina de  $\geq 0,6$  y para el fibrinógeno  $\leq 0,1$ ). Parte del plasma sanguíneo (= plasma fraccionado) se filtra por el filtro 704 y se alimenta a un circuito 705 de filtrado. Un filtro que tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias con una masa molar relativa de  $340 \text{ kDa}$  permite que pase el plasma fraccionado, de modo que se retienen los componentes del plasma sanguíneo de alto peso molecular como fibrinógeno, inmunoglobulinas, LDL, HDL, etc., mientras que los componentes sanguíneos más pequeños como la albúmina o la proteína C pasan a través de la membrana del filtro. El circuito 705 de filtrado está formado como un circuito abierto, que conduce corriente abajo del filtro 704 a la rama 702b venosa. El plasma sanguíneo fraccionado es transportado a través del circuito 705 de filtrado por medio de una bomba 706 de filtrado (rata de bombeo  $Q_{\text{frakt. Plasma}} = 15-25\%$  de  $Q_{\text{Blut}}$ ). En la figura 7, el circuito 705 de filtrado está formado como un circuito abierto. Sin embargo, el circuito 705 de filtrado también se puede formar como un circuito cerrado.

El plasma fraccionado transportado a través del circuito 705 de filtrado es guiado a través de una columna 707 dispuesta en el circuito 705 de filtrado. La columna 707 contiene un lecho 707a adsorbedor formado de un portador con una superficie neutra e hidrófoba. En la figura 7, el portador es un polímero de poliestireno divinilbenceno con un tamaño medio de partícula de  $120 \mu\text{m}$  y un tamaño medio de poro de 15 a 20 nm. El lecho 707a adsorbedor funciona como un agente de agotamiento para citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, adsorbiéndolos en el portador y eliminándolos del plasma.

Para dispensar un lipopéptido, se dispone un dializador 708 (filtro 708 de diálisis) en la rama 702b venosa del circuito 702 de sangre extracorpóreo. En el dializador, la sangre se pone en contacto con la solución de diálisis a través de una membrana semipermeable. La solución de diálisis se bombea por medio de una bomba 709 de solución de diálisis al dializador 708 a través de un flujo 708a de entrada de solución de diálisis. Después de haber pasado a través del dializador 708, el dializado se elimina y se descarta a través de un flujo 708b de salida de dializado. El lipopéptido, aquí polimixina, se alimenta a la sangre por medio de la solución de diálisis. En la realización ilustrada en la figura 7, el dializador 708 actúa así como un medio dispensador para dispensar el lipopéptido (polimixina) en el circuito 702 extracorpóreo de sangre. Las moléculas de polimixina forman luego un complejo con las endotoxinas presentes en la sangre.

El dializador 708 comprende preferiblemente una membrana de polisulfona hidrófila con una superficie de  $1,4-2,0 \text{ m}^2$ , que se ha producido mezclando con PVP (polivinilpirrolidona). A modo de ejemplo, estas membranas se utilizan en los filtros de la compañía Fresenius Medical Care en los modelos AF 1000 y FX60, inter alia. Estos filtros de diálisis tienen un coeficiente de cribado para la albúmina inferior al 0,1%. También es concebible el uso de lo que se conoce como filtro de corte alto, que también se basa en el uso de membranas de polisulfona hidrófila que tienen un coeficiente de cribado de aproximadamente 4% para la albúmina. Bajo condiciones de diálisis, es decir, se utiliza principalmente una eliminación controlada por difusión de las sustancias destinadas a la eliminación, la pérdida de albúmina es inferior a 5-10 g por tratamiento. El filtro EMIc<sup>2</sup> producido por la compañía Fresenius Medical Care se puede citar como ejemplo de un filtro de diálisis de este tipo. Las condiciones de flujo bajo las cuales se operan los filtros de este tipo en uso clínico se seleccionan en consecuencia para un flujo sanguíneo de 60-300 ml/min dependiendo de las condiciones de uso: se usan flujos sanguíneos de 60-80 ml/min bajo las condiciones de lo que es conocido como hemodiálisis venovenosa continua, mientras que los flujos sanguíneos de 150-300 ml/min se utilizan con hemodiálisis intermitente asistida por dispositivo de diálisis en casos agudos, es decir, en pacientes con insuficiencia renal aguda, que también ocurre con mucha frecuencia en el caso de sepsis. El flujo de dializado en el caso de hemodiálisis intermitente se establece preferiblemente en 500 ml/min, mientras que los flujos de dializado en una proporción de 1:1 al flujo sanguíneo son habituales en el caso de la hemodiálisis venovenosa continua. La

concentración del lipopéptido/polimixina en el fluido de diálisis debe estar en el intervalo de 0,2-1,0 µg/l, es decir, debe ser ligeramente mayor que el valor de la concentración sérica controlada del paciente a tratar, ya que el coeficiente de cribado del filtro de diálisis anteriormente mencionado está entre 0,8 (AF 1000) y 0,9 (EMiC<sup>2</sup>), es decir, entre 80 y 90%.

5 El aparato de perfusión 700, para el control automático del aparato 700, también tiene asignado un controlador 710, que también está conectado a las bombas 703, 706, 709 a través de conexiones de señal. El controlador 710 también está configurado convenientemente para adquisición de datos central y para salida de datos.

10 **1. Ejemplo 1:** desorción de polimixina B (PMB) en plasma y plasma fraccionado (uso de un filtro de Albuflow) con portador recubierto de manera diferente de PMB (tamaño medio de partícula: 120 µm, tamaño medio de poro: 15-20 nm)

1.1 recubrimiento PMB

Portador: Amberchrom CG161c (copolímero de poliestireno divinilbenceno, Dow Chemical Company), tamaño medio de partícula 120 µm, tamaño medio de poro 15 nm; superficie accesible 900 m<sup>2</sup>/g de polímero (seco). El peso seco por ml de portador húmedo es del 18% (p/v).

15 Polimixina B (PMB): sulfato de polimixina B (Sigma Aldrich)

La solución de PMB (10 mg/ml en agua destilada) se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 30 minutos, y el portador se recubre luego en tubos Greiner de 15 ml con PMB de la siguiente manera (Tabla 1.1): 3 ml de portador con 7,5 ml de solución de PMB

Tabla 1.1

Recubrimiento PMB en mg por ml de portador	Portador [ml]	solución PMB [ml]	NaCl [ml]
0	3	0	7,5
1	3	0,3	7,2
2,5	3	0,75	6,75
5	3	1,5	6
7,5	3	2,25	5,25
10	3	3	4,5

20 El recubrimiento se lleva a cabo durante la noche en un mezclador de rodillo a temperatura ambiente. El portador es luego lavado dos veces con 10 ml de solución de NaCl (estéril) y se produce una suspensión al 50%.

1.2 Prueba por lotes

25 El plasma recién congelado (plasma de citrato) se fraccionó con la ayuda del filtro Albuflow® (Fresenius Medical Care, Alemania) y se congeló a -20 °C junto con el plasma completo.

A: plasma completo

B: plasma fraccionado

Tabla 1.2: metodología por lotes

	0 mg/ml	1 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	7,5 mg/ml	10 mg/ml
<b>A</b> plasma completo	0A 1+2	1A 1+2	2,5A 1+2	5A 1+2	7,5A 1+2	10A 1+2
<b>B</b> plasma fraccionado	0B 1+2	1B 1+2	2,5B 1+2	5B 1+2	7,5B 1+2	10B 1+2

5 En la metodología duplicada (ver Tabla 1.2), cada 0,5 ml de portador se incuban con 4,5 ml de plasma = 10% (v/v) metodología a 37 °C durante 60 minutos en un Enviro-genie. El portador se separa luego por centrifugación y el sobrenadante se usa para la cuantificación de PMB por medio de ELISA (ELISA de polimixina de Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., China).

### 1.3 Resultados

10 Con el aumento de la concentración de PMB, la solución de PMB utilizada para recubrir el portador desorbe una mayor cantidad de PMB en el plasma. El resultado se muestra en la Fig. 8 (desorción de PMB de acuerdo con la concentración de recubrimiento de PMB).

Con el fin de lograr en el plasma fraccionado un nivel plasmático de PMB de aproximadamente 150 ng/ml mediante la desorción, el portador utilizado en esta prueba debe recubrirse con 10 mg de PMB por ml de adsorbedor.

## 2. Ejemplo 2: lote de endotoxinas con portador recubierto de PMB de manera diferente en suero

### 2.1 Estructura de prueba

15 Portador acondicionado (Amberchrom CG161c: copolímero de etilvinilbenceno divinilbenceno (Dow Chemical Company), tamaño medio de partícula 120 µm, tamaño medio de poro 15 nm) es recubierto con una cantidad diferente de polimixina B (PMB): 0, 5, 10, 15 y 25 mg/g de portador húmedo. Estos se prueban por en metodología por triplicado en una prueba por lotes de endotoxinas para la inactivación de LPS de los mismos en el suero.

### 2.2 Ejecución de prueba

#### 20 Recubrimiento PMB:

Se producen muestras de portador con diferentes concentraciones de PMB (5 mg, 10 mg, 15 mg y 25 mg por g de portador húmedo) (véase el protocolo anterior en el Ejemplo 1). La solución de PMB (10 mg/ml en agua destilada) y el portador en suspensión al 50% se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 30 minutos, y el portador se recubre en tubos Greiner de 15 ml con PMB de la siguiente manera (Tabla 2.2):

25 Tabla 2.2:

PMB mg/g de adsorbedor	suspensión de adsorbedor al 50 % [ml]	solución PMB [ml]	NaCl [ml]
0	2	0	3
5	2	0,5	2,5
10	2	1	2
15	2	1,5	1,5
25	2	2,5	0,5

El recubrimiento se realiza durante 4 horas en un agitador de ubicación superior (Enviro-Genie, frecuencia: 25:50) a temperatura ambiente. El portador se lava dos veces con 10 ml de solución de NaCl (estéril) y se produce una suspensión al 50%.

Producción de suero:

- 5 Se extraen 7 tubos de sangre del donante (vacuete con perlas de suero para la activación de la coagulación) que miden 8 ml. Los tubos llenos de sangre se dejan reposar durante 30 minutos. La sangre coagulada se centrifuga y se obtiene el suero (se enfría en un matraz Erlenmeyer estéril).

Solución de endotoxina (LPS):

- 10 LPS: *Pseudomonas aeruginosa*, L-7018 compañía Sigma lote: 128K4115, almacenamiento -70 °C, a 100 µl 10<sup>-3</sup> g/ml (1mg/ml)

Se produce una solución de LPS con una concentración de 10 µg/ml a partir de esta solución madre de LPS con solución estéril de NaCl. El LPS se usa en el lote con una concentración final de 5 ng/ml. Se pipetea 10 µl de solución de LPS con una concentración de 10 µg/ml en 20 ml de suero. La metodología por lotes se realiza en tubos de muestreo de sangre de 2 ml en una metodología por triplicado.

- 15 2.3 Resultados:

La inactivación de LPS de más del 50% se pudo lograr ya a la concentración más baja de PMB recubierto. El resultado se ilustra en la figura 9 (EU = unidades de endotoxina).

3. **Ejemplo 3:** inactivación de endotoxina (LPS) de acuerdo con la concentración de polimixina en base a endotoxinas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- 20 3.1. Objetivo

El objetivo de esta prueba es determinar la activación de la endotoxina dependiente de la concentración de polimixina B (PMB) en el plasma (prueba I de lote). Además, debe examinarse el grado en que esta activación de la endotoxina da como resultado una inhibición de la distribución de citoquinas (prueba II de lote).

3.2. Donador de sangre

- 25 Se extrajeron 9 tubos de muestras de sangre (cada uno de 9 ml) con 5 UI de heparina por siembra. El plasma se separa por centrifugación y el sedimento celular se incuba en un mezclador de rodillos. El plasma se siembra con endotoxina (LPS) y se usa para la prueba I por lote:

3.3. siembra de LPS, soluciones de polimixina B y prueba I por lote

LPS: *Pseudomonas aeruginosa* (L-7018 compañía Sigma lote: 128K4115, -70°C, a 100 µl 10<sup>-3</sup> g/ml (1mg/ml))

- 30 LPS: *E. coli* (L-4130 compañía Sigma lote: 110M4086M, -70 °C, a 100 µl 10<sup>-3</sup> g/ml (1mg/ml))

El LPS se usa en el lote con una concentración final de 0,5 ng/ml. Las pruebas se llevan a cabo en viales de vidrio sin pirógenos de 3 ml. En la prueba I por lotes, se añaden diferentes concentraciones de PMB (compañía Sigma, P-1004) en la metodología por duplicado y se incuban durante 60 minutos en un agitador de ubicación superior a 37 °C (ver Tabla 3.5).

- 35 En la prueba I por lotes, se usan las concentraciones de PMB con 0 (sin PMB), 10, 100, 250, 500 y 1000 ng/ml. Las soluciones de PMB estériles (esterilizadas en autoclave libres de pirógenos a 121 °C, 90 minutos) se producen para este propósito con las siguientes concentraciones (Tabla 3.3):

Tabla 3.3:

	PMB [ng/ml]	PMB [ng/ml] en lote (1:15)
Solución A de PMB	15	10
Solución B de PMB	1500	100
Solución C de PMB	3750	250
Solución D de PMB	7500	500
Solución E de PMB	15000	1000
Solución de NaCl	0	0

3.4. Análisis de endotoxinas

Las endotoxinas se miden en forma de EU/ml con la ayuda de una prueba de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) por Charles River.

5 3.5. Lote de citoquinas (prueba II por lote)

10 El plasma por siembra con LPS y PMB se retroalimenta después de la prueba 1 de lote al concentrado celular obtenido del donante de sangre en la proporción 1:1 (ver Tabla 3.5). Para el lote de citoquinas, las muestras de la prueba I de lote se usaron con una concentración de PMB de 0 (sin PMB), 250, 500 y 1.000 ng/ml. Como control, se incluyó una muestra sin LPS y con PMB de 1.000 ng/ml. Después de los tiempos de incubación de 4 horas y 12 horas a 37 °C en un mezclador de rodillo (5 revoluciones/minuto), se tomaron muestras, se separaron por centrifugación y se congelaron 50 µl de plasma a -80 °C para la posterior cuantificación de citoquina. Los datos de prueba para el lote de citoquina se enumeran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5:

LPS Pseudomonas aeruginosa								
PMB [ng/ml]	Solución PMB	Plasma + 0,5ng/ml LPS	Incubación	LAL	EU/ml	Lote de citoquina	Muestra 4h	Muestra 12 h
0	100 µl NaCl	1.400 µl	60 min	#1	0,333	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
0	100 µl NaCl	1.400 µl	60 min	#2	0,229			
10	100 µl sol A	1.400 µl	60 min	#3	0,178			
10	100 µl sol A	1.400 µl	60 min	#4	0,167			
100	100 µl sol B	1.400 µl	60 min	#5	0,112			
100	100 µl sol B	1.400 µl	60 min	#6	0,137			
250	100 µl sol C	1.400 µl	60 min	#7	0,108	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
250	100 µl sol C	1.400 µl	60 min	#8	0,123			
500	100 µl sol D	1.400 µl	60 min	#9	0,091	1.500µl concentrado celular + 1.500µl	250µl → 50µl	250µl → 50µl

500	100 µl sol D	1.400 µl	60 min	#10	0,081	plasma LPS-PMB	plasma -80 °C	plasma -80 °C
1.000	100 µl sol E	1.400 µl	60 min	#11	0,062	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
1.000	100 µl sol E	1.400 µl	60 min	#12	0,061			
<b>LPS E. coli</b>								
PMB [ng/ml]	Solución PMB	Plasma + 0,5ng/ml LPS	Incubación	LAL	EU/ml	Lote de citoquina	Muestra 4h	Muestra 12 h
0	100 µl NaCl	1.400 µl	60 min	#13	1,8	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
0	100 µl NaCl	1.400 µl	60 min	#14	1,841			
10	100 µl sol A	1.400 µl	60 min	#15	0,77			
10	100 µl sol A	1.400 µl	60 min	#16	0,871			
100	100 µl sol B	1.400 µl	60 min	#17	0,379			
100	100 µl sol B	1.400 µl	60 min	#18	0,382			
250	100 µl sol C	1.400 µl	60 min	#19	0,281	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
250	100 µl sol C	1.400 µl	60 min	#20	0,29			
500	100 µl sol D	1.400 µl	60 min	#21	0,209	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
500	100 µl sol D	1.400 µl	60 min	#22	0,209			
1.000	100 µl sol E	1.400 µl	60 min	#23	0,154	1.500µl concentrado celular + 1.500µl plasma LPS-PMB	250µl → 50µl plasma -80 °C	250µl → 50µl plasma -80 °C
1.000	100 µl sol E	1.400 µl	60 min	#24	0,16			

### 3.6. Resultados

Lote de endotoxina (prueba l por lote):

5 La figura 10 muestra la inhibición de LPS de E. coli en plasma (concentración de LPS original: 0,5 ng/ml) de acuerdo con la concentración de PMB (n=2) después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

La figura 11 muestra la inhibición de LPS de Pseudomonas aeruginosa en plasma (concentración de LPS original: 0,5 ng/ml) de acuerdo con la concentración de PMB (n=2) después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

10 Los resultados muestran claramente que, incluso con una concentración de PMB muy baja en el plasma, es decir, en un intervalo desde 50 a 300 ng/ml (0,05 a 0,3 µg/ml), se produce una fuerte inhibición de LPS de E. coli y Pseudomonas aeruginosa, en el que la inhibición de LPS ya no aumenta significativamente con el aumento de la

concentración de PMB. Como resultado, incluso concentraciones muy bajas de PMB son suficientes para inhibir la actividad de LPS (endotoxinas). Los efectos secundarios neurotóxicos y nefrotóxicos deben descartarse a estas bajas concentraciones.

Lote de citoquina (prueba II por lote):

- 5 La distribución de las citoquinas TNF-alfa (figura 12), IL-1beta (figura 13), IL-6 (figura 14) e IL-8 (figura 15) por las células sanguíneas de acuerdo con la concentración de PMB (sin PMB, 250 ng/ml, 500 ng/ml y 1.000 ng/ml; control con 1.000 ng/ml sin LPS) en plasma con LPS por siembra de (*E. coli*) después de 4 horas de incubación se ilustra en las figuras 3 a 4. Los resultados de la prueba II de lote muestran claramente que, incluso a concentraciones muy bajas de PMB, no solo tiene lugar una fuerte inhibición de LPS (ver la prueba I de lote), sino que también tiene lugar una fuerte inhibición de la distribución de citoquinas. Esto es particularmente pronunciado en el caso de la inhibición del mediador clave TNF-alfa (figura 12).

4. **Ejemplo 4:** Ejemplos para formulaciones para preparaciones para administración parenteral de soluciones de inyección de polimixina B (PMB) (para administración en bolo):

4.1. Administración en bolo para una concentración sérica de PMB de 100 ng/ml de plasma

- 15 Suposición: paciente con 70 kg de peso corporal y 60% del peso corporal son volúmenes de distribución para PMB → volúmenes de distribución de 42.000 ml.

Se busca una concentración sérica de PMB de 100 ng de PMB /ml de plasma → se requiere un total de 4,2 mg de PMB.

- 20 Solución de inyección para administración en bolo durante un período de 60 min: 4,2 mg de PMB en 100 ml de solución salina fisiológica = solución de inyección final para administración en bolo durante un período de 60 min.

4.2. Administración en bolo para una concentración sérica de PMB de 250 ng/ml de plasma

Suposición: paciente con 70 kg de peso corporal y 60% del peso corporal son volúmenes de distribución para PMB → volúmenes de distribución de 42.000 ml.

- 25 Se busca una concentración sérica de PMB de 250 ng de PMB/ml de plasma → se requiere un total de 10,5 mg de PMB.

Solución de inyección para administración en bolo durante un período de 120 min: 10,5 mg de PMB en 100 ml de solución salina fisiológica = solución de inyección final para administración en bolo durante un período de 120 minutos.

- 30 Tan pronto como se establece la concentración en suero de PMB deseada mediante la administración del bolo, esto se mantiene mediante la liberación de PMB por medio de los medios de dispensación asociados con el aparato de perfusión de acuerdo con la invención, como se describió anteriormente.

5. **Ejemplo 5:** ejemplos para soluciones de infusión para infusión de polimixina B (PMB) en el circuito de sangre extracorpóreo en un punto de alimentación de lípidos y también instrucciones de dosificación

- 35 Suposición: paciente con un 70 kg → volumen de distribución para PMB (60% de la masa corporal) 42.000 ml de fluido corporal con 100 ng de PMB/ml → 4,2 mg de PMB en el volumen de distribución (ver bajo 2.1.1.).

Solución de infusión para una infusión de 24 horas con una vida media en suero de 6 horas: vida media supuesta para PMB en suero 6 horas: 2,1 mg de PMB por 6 horas o 8,4 mg de PMB/día se descomponen → 8,4 mg de PMB en 1 L de solución salina fisiológica = solución de infusión para infusión de 24 horas.

- 40 Solución de infusión para una infusión de 24 horas con una vida media en suero de 14 horas: vida media para PMB en suero 14 horas: 4,2 mg de PMB/14 horas o 7,2 mg de PMB/día se descomponen → 7,2 mg de PMB en 1 L de solución salina fisiológica = solución de infusión para infusión de 24 horas.

6. **Ejemplo 6:** Instrucciones de dosificación para la infusión de polimixina B (PMB) en el circuito sanguíneo extracorpóreo en un punto de alimentación de lípidos teniendo en cuenta la eliminación total de PMB del aparato de perfusión

- 45 El siguiente ejemplo de cálculo, además de la eliminación por parte del paciente de PMB, también tiene en cuenta la eliminación de un dializador (filtro de diálisis) dispuesto en el circuito sanguíneo extracorpóreo y la eliminación del portador del agente de agotamiento. El ejemplo de cálculo presupone una concentración sérica de PMB existente. Esto se proporciona mediante la administración de un bolo antes del inicio del tratamiento, en el que las soluciones de inyección descritas bajo el ejemplo 4 se pueden usar para este fin.



Para el cálculo de la dosificación de polimixina B por infusión en el circuito sanguíneo extracorpóreo en un punto de alimentación de lípidos, se tienen en cuenta la eliminación de PMB del cuerpo del paciente, del dializador y del agente de agotamiento:

5 -La eliminación de PMB por diálisis (CDial) se puede determinar experimentalmente y depende del flujo de plasma y también del tipo de filtro de diálisis utilizado. En el ejemplo especificado, esto es 60 ml/min.

-La eliminación de PMB del agente de agotamiento (Cads) depende del material de soporte utilizado y también del flujo de filtrado. En el ejemplo especificado, esto es 45 ml/min.

-La eliminación de PMB del paciente se determinó en el ejemplo especificado a partir de la vida media para PMB de 13,6 y es de 36 ml/min.

10 La eliminación total de PMB (Ctotal) viene dado por la suma de las ratas de eliminación de PMB individuales. La disminución resultante de PMB se ilustra en la figura 16. El aumento negativo evidente de la disminución de PMB (Ctotal) en un momento determinado en el tiempo claro en la figura 16 corresponde a la infusión necesaria de PMB para mantener la concentración sérica de PMB del momento asociado en el tiempo.

Las siguientes ratas de infusión se dan para el ejemplo especificado:

15 => 0,84 mg PMB/hora durante el tratamiento con diálisis y adsorción

Con un tratamiento extracorpóreo de 6 horas, esto proporciona la siguiente cantidad de PMB que se debe infundir:

6 horas de tratamiento con diálisis y adsorción: 5.1 mg

20 **7. Ejemplo 7:** adsorción mejorada de citoquinas mediante el uso de un filtro Albuflow (comparación de plasma y plasma fraccionado)

7.1 Prueba de lote de adsorción de citoquinas

Descripción de la prueba:

Los adsorbentes con diferentes tamaños de poro (30 nm y 15-20 nm) deben probarse en términos de adsorción de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-10 en plasma entero y en plasma fraccionado.

25 Estructura de prueba:

Portador: copolímero de poliestireno divinilbenceno, CG300c (portador A), CG161c (portador B), Dow Chemical Group

portador A: tamaño de partícula: 120  $\mu$ m, tamaño de poro: 30 nm

portador B: tamaño de partícula: 120  $\mu$ m, tamaño de poro: 15-20 nm

30 plasma: plasma de citrato no fraccionado en congelación profunda (plasma fresco congelado, obtenido mediante centrifugación de sangre)

plasma de citrato fraccionado: obtenido mediante el uso de filtros Albuflow (Fresenius Medical Care, Alemania).

Por siembra de citoquina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) de acuerdo con la Tabla 7.1 a continuación.

35 Los portadores A y B están condicionados: el portador se lava con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y el portador se separa por centrifugación. El sobrenadante se rechaza y el portador se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con 2,5 veces el volumen de etanol absoluto, luego se separa por centrifugación, y el sobrenadante se rechaza una vez más. El mismo procedimiento se lleva a cabo con agua destilada dos veces y finalmente con solución salina fisiológica. Después del acondicionamiento, el portador se lava adicionalmente 3 veces con solución de NaCl al 0.9%

40 La prueba de lote se lleva a cabo por metodología de triplicado tanto en plasma completo como en plasma fraccionado (pretratamiento con el filtro Albuflow).

Antes de iniciar la prueba, los portadores se incuban con plasma entero sin siembra o con plasma fraccionado durante 15 minutos, se lavan, 1x con NaCl y luego se usan para la prueba por lote.

Prueba por lotes: en cada caso, 1 ml de adsorbente (húmedo) + 9 ml de plasma de citrato en un mezclador de rodillo

45

a 37 °C durante 60 minutos.

Tabla 7.1: siembra de citoquina

	Número de lote	Concentración de solución madre [µg/mL]	Dilución de solución madre 1:10	Dilución de solución madre a 40 ml de Plasma	Concentración final esperada en el plasma [pg/ml]	Concentración final medida en el plasma
TNF- $\alpha$	AA27/1082	10	10 solución madre + 90 NaCl	8 µL	500	625
IL-6	OJZ0411121	10	10 solución madre + 90 NaCl	35 µL	200	355
IL-10	EYB0211041	10	10 solución madre + 90 NaCl	80 µL	300	517

Análisis:

- 5 TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 se cuantificaron mediante ELISA comercial de la compañía R&D Systems.

#### 7.2 Resultados

Fue posible determinar la adsorción mejorada de citoquinas en el plasma fraccionado.

La figura 17-19 muestra la adsorción mejorada de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 mediante el uso de un filtro Albuflow en comparación con un filtro de plasma.

- 10 **8. Ejemplo 8:** Prueba de copolímeros de etilvinilbenceno divinilbenceno de tamaño de poro idéntico y tamaño de partícula diferente en términos de las propiedades de adsorción de los mismos

Se comparan los copolímeros de etileno vinilbenceno divinilbenceno (portador) con tamaños de poros medios idénticos (15-20 nm), pero con tamaños de partícula medios diferentes de 3-5 µm, 35 µm, 75 µm y 120 µm en términos de la propiedad de adsorción para proteína C.

- 15 **8.1 Suministro de polímeros hidrófobos neutros**

Los copolímeros de etileno vinilbenceno divinilbenceno usados en este ejemplo (Amberchrom CG 161, Rohm&Haas/Dow Chemical Company) con tamaño medio de poro idéntico y tamaño medio de partícula diferente se enumeran en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: copolímeros de etilvinilbenceno divinilbenceno

Nombre de los copolímeros de etilvinilbenceno divinilbenceno	Tamaño medio de poro [nm]	Tamaño medio de partícula [µm]
#2000	15-20	3-5
#1785	15-20	35
#1760	15-20	75
#2004	15-20	120

20

#### 8.2. Preparación del portador y prueba por lotes

Los portadores #2000, #1785, #1760 y #2004 especificados en la Tabla 8.1 se probaron en la prueba por lotes en términos de las propiedades de adsorción de la misma para la proteína C y se compararon entre sí.

Los portadores se acondicionaron e incubaron durante 15 minutos en plasma directamente antes de la prueba por lotes, se separaron por centrifugación y luego se usaron en la prueba por lotes.

5 Acondicionamiento de los portadores: los portadores secos deben acondicionarse antes del uso para permitir una buena humectación con soluciones acuosas o con plasma. Los portadores hidrófobos secos se pretratan de la siguiente manera: la cantidad requerida de portador seco se coloca en un tubo Greiner de 50 ml y se lava con 5 veces el volumen de etanol no desnaturalizado (suspendido y centrifugado durante 5 minutos a 4.000 rpm). El sobrenadante se elimina y descarta y se suspende de nuevo con etanol fresco no desnaturalizado y se incuba durante 1 hora (Enviro Genie, frecuencia 25:50). Después de la incubación, la suspensión del portador se separa por centrifugación (se centrifuga durante 5 minutos a 4.000 rpm) y se descarta el sobrenadante. El portador se lava con 10 5 veces el volumen de agua destilada (suspendido y centrifugado durante 5 minutos a 4.000 rpm). El sobrenadante se elimina y descarta y se suspende nuevamente con agua destilada fresca y se incuba durante 1 hora (Enviro Genie, frecuencia 25:50). Después de la incubación, la suspensión del portador se separa por centrifugación (se centrifuga durante 5 min a 4.000 rpm) y se descarta el sobrenadante. El portador se lava luego con 5 veces el volumen de solución salina fisiológica (suspendida y centrifugada durante 5 minutos a 4.000 rpm). El sobrenadante se elimina y descarta y se suspende de nuevo con solución salina fisiológica fresca y se incuba durante 1 hora (Enviro Genie, frecuencia 25:50). Después de la incubación, la suspensión del portador se separa por centrifugación (se centrifuga durante 5 minutos a 4.000 rpm) y se descarta el sobrenadante. Una suspensión del 50% del portador se produce finalmente con una solución salina fisiológica y se almacena en un refrigerador hasta su uso.

20 Para la metodología por lotes (metodología por triplicado, n=3), 150 µl de portadores (húmedos) se recubrieron cada uno con 1.350 µl de plasma de citrato en tubos Greiner de 15 ml. Los tubos se agitaron en el Enviro-Genie a 25/50 rpm a 37 °C durante 60 minutos. Como control (120 µl de NaCl + 1.350 µl de plasma de citrato), se incluyó un tubo sin portador.

25 Se tomaron muestras que miden cada una 500 µl después de 15 minutos y después de 60 minutos para el análisis de Proteína C. La proteína C se analizó en el Sysmex (Siemens, CA560) con los reactivos asociados (Siemens, OUVV17).

### 8.3. Análisis y resultados

30 La figura 20 muestra la concentración de proteína C (especificación en [%] en relación con la concentración fisiológica de proteína C en plasma humano) a lo largo del tiempo para los portadores individuales. Sobre la base de las curvas, la dependencia de la adsorción de proteína C en el tamaño medio de partícula es claramente evidente. Se determinó una adsorción pronunciada de proteína C con los portadores #2000 y #1785. En el caso del portador #2000, la proteína C se eliminó casi por completo del plasma después de solo 15 minutos. Por el contrario, la proteína C fue adsorbida del plasma en un grado mucho menor por los portadores #1760 y #2004. La reducción de la proteína C de ~25% observada para el portador #1760 (después de una incubación de 60 minutos) todavía está en un intervalo en el que las cantidades fisiológicamente relevantes de proteína C permanecen en el plasma. La menor adsorción de proteína C, que fue solo del 8% en relación con la concentración inicial de proteína C después de una incubación de 60 minutos, se determinó para el portador #2004. La adsorción de proteína C (en % en relación con la concentración inicial de proteína C) por los portadores individuales se enumera en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3:

Portador:	Adsorción de proteína C después de 15 min de incubación	Adsorción de proteína C después de 60 min incubación
#2000	94 %	99 %
#1785	14 %	52%
#1760	5 %	25 %
#2004	1 %	8 %

9. **Ejemplo 9:** Comparación de la desorción de PMB en plasma entre adsorbedores con diferentes poros y tamaño de partícula y, por lo tanto, diferente superficie de adsorción disponible

9.1 Portadores

CG161c:

- 5 El portador (Rohm & Haas/Dow Chemical Company, también denominado en lo sucesivo adsorbedor) consiste en una matriz porosa de poliestireno divinilbenceno. El tamaño de poro promedio es de 15 nm, el tamaño de partícula promedio es de 120 µm y la superficie accesible es de 900 m<sup>2</sup>/g de adsorbedor (seco). El peso seco por ml de adsorbedor húmedo es del 18% (p/v).

HPR10:

- 10 El portador (Rohm & Haas/Dow Chemical Company, también denominado en lo sucesivo adsorbedor) consiste en una matriz porosa de poliestireno divinilbenceno. El tamaño de poro promedio es de 30-40 nm, el tamaño medio de partícula es de 10 µm y la superficie accesible es de 500 m<sup>2</sup>/g de adsorbedor (seco). El peso seco por ml de portador húmedo es del 30% (p/v).

9.2 Recubrimiento del portador con polimixina B (PMB)

15

La solución de PMB (Sigma Aldrich, 10 mg/ml en agua destilada) se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 30 minutos, y el portador respectivo (CG161c o HPR10) se recubre luego en tubos Greiner de 15 ml con PMB de la siguiente manera (Tabla 9.2): 3 ml de portador con 7,5 ml de solución de PMB

Tabla 9.2:

Recubrimiento de PMB en mg por ml de portador	Portador [ml]	Solución de PMB [ml]	NaCl [ml]
0	3	0	7,5
2,5	3	0,75	6,75
5	3	1,5	6
10	3	3	4,5
15	3	4,5	3
20	3	1,5	6
25	3	0	7,5

20

El recubrimiento se realiza durante la noche en un mezclador de rodillo a temperatura ambiente. El adsorbedor se lava dos veces con 10 ml de solución de NaCl (estéril) y se produce una suspensión al 50%.

9.3 Prueba por lotes

- 25 En la metodología por duplicado, se incuban 0,5 ml de suspensión de portador en cada caso con 4,5 ml de plasma de citrato = 10% (v/v) a 37 °C durante 60 min en un Enviro-genie. El portador se centrifuga y el sobrenadante se utiliza para la cuantificación de PMB por medio de ELISA (polimixina-ELISA de Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., China).

9.4 Resultado

- 30 Está claro por el resultado (ver figura 21, figura 22, figura 23 y figura 24) que la tasa de desorción de polimixina en plasma depende en gran medida de la superficie de portador disponible. Esto significa que la desorción de polimixina depende de la cantidad de polimixina enlazada hidrofólicamente por m<sup>2</sup>. Esto también es claro a partir de las siguientes tablas de cálculo (Tabla 9.4.1 y Tabla 9.4.2).

Tabla 9.4.1: Ejemplo CG161c

mg PMB/ml adsorbador	Desorción de PMB [ng/ml]	Superficie [m <sup>2</sup> /g adsorbador (seco)]	Componente seco % [p/v]	Superficie [m <sup>2</sup> /ml adsorbador (húmedo)]	PMB [µg/m <sup>2</sup> superficie del adsorbador]
2,5	152	900	18	162	15
5	409	900	18	162	31
10	1.215	900	18	162	62
15	2.747	900	18	162	93
20	5.732	900	18	162	123
25	7.514	900	18	162	154

Tabla 9.4.2: Ejemplo HPR10

mg PMB/ml adsorbador	Desorción de PMB [ng/ml]	Superficie [m <sup>2</sup> /g adsorbador (seco)]	Componente seco % [p/v]	Superficie [m <sup>2</sup> /ml adsorbador (húmedo)]	PMB [µg/m <sup>2</sup> superficie del adsorbador]
2,5	488	300	30	90	28
5	4.776	300	30	90	56
10	7.082	300	30	90	111
15	14.100	300	30	90	167
20	19.752	300	30	90	222
25	31.359	300	30	90	278

5 **9.5 Ejemplos de cálculos**

Para definir con precisión la concentración de PMB en el plasma durante un tratamiento mediante la desorción de PMB del portador (también denominado adsorbador en lo sucesivo), son necesarios experimentos de desorción in vitro (como se llevó a cabo en el Ejemplo 9) para el adsorbador respectivo. Es posible ajustar de forma muy precisa la desorción en el plasma y, por lo tanto, la concentración de PMB en el plasma por el grado de recubrimiento del portador (cantidad de PMB por g de adsorbador) sobre la base de los datos obtenidos en los experimentos (ver figuras 21 a 24). Como se muestra en el Ejemplo 1, la rata de desorción en el plasma fraccionado podría ser menor y, por lo tanto, podría determinarse por separado.

**Ejemplo de cálculo 1:**

15 Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,8 µg/ml mediante el uso del adsorbador HPR10 recubierto con PMB en el circuito de sangre extracorpóreo. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 23), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbador y la cantidad de PMB desorbida en el plasma. En este caso, es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbador}} \right] = 0.00000001x^2 + 0.0012x + 1.258$$

x = concentración de PMB deseada en plasma= 0,8 µg/ml = 800 ng/ml

20 Si x = si se usan 800 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 2,224 mg por g de portador (HPR10)

**Ejemplo de cálculo 2:**

Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,8 µg/ml mediante el uso del adsorbedor CG161c recubierto con PMB en el circuito extracorpóreo de sangre. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 23), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbedor y la cantidad de PMB desorbida en el plasma. En este caso, es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbedor}} \right] = 0.00000003x^2 + 0.0048x + 3.0442$$

x = concentración de PMB deseada en plasma = 0,8 µg/ml = 800 ng/ml

Si x = si se usan 800 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 7,076 mg por g de adsorbedor (CG161c)

**Ejemplo de cálculo 3:**

Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,1 µg/ml mediante el uso del adsorbedor HPR10 recubierto de PMB en el circuito sanguíneo extracorpóreo. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 23), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbedor y la cantidad de PMB desorbida en el plasma. En este caso, es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbedor}} \right] = 0.00000001x^2 + 0.0012x + 1.258$$

x = concentración de PMB deseada en plasma = 0,1 µg/ml = 100 ng/ml

Si x = si se usan 100 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 1,378 mg por g de adsorbedor (HPR10)

**Ejemplo de cálculo 4:**

Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,1 µg/ml mediante el uso del adsorbedor CG161c recubierto con PMB en el circuito sanguíneo extracorpóreo. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 23), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbedor y la cantidad de PMB desorbida en el plasma. En este caso, es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbedor}} \right] = 0.00000003x^2 + 0.0048x + 3.0442$$

x = concentración de PMB deseada en plasma = 0,1 µg/ml = 100 ng/ml

Si x = si se usan 100 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 3,527 mg por g de adsorbedor (CG161c)

**Ejemplo de cálculo 5 (plasma fraccionado)**

Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,15 µg/ml mediante el uso del adsorbedor CG161c recubierto de PMB en el circuito sanguíneo extracorpóreo. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 24), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbedor y la cantidad de PMB desorbida en el plasma fraccionado. En este caso, esta es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbedor}} \right] = 2.6718 \ln(x) - 3.3628$$

x = concentración de PMB deseada en plasma = 0,15 µg/ml = 150 ng/ml

Si x = si se usan 150 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 10,025 mg por g de adsorbedor (CG161c)

**Ejemplo de cálculo 6 (plasma fraccionado):**

Se debe obtener una concentración de PMB en el plasma de 0,8 µg/ml mediante el uso del adsorbedor CG161c recubierto con PMB en el circuito extracorpóreo de sangre. Debido a las pruebas preliminares (véase la figura 24), se pudo determinar a modo de experimento la función que describe la correlación entre la cantidad de PMB recubierto por g de adsorbedor y la cantidad de PMB desorbida en el plasma fraccionado. En este caso, esta es la siguiente:

$$PMB \left[ \frac{mg}{g \text{ adsorbedor}} \right] = 2.6718 \ln(x) - 3.3628$$

x = concentración de PMB deseada en plasma = 0,8 µg/ml = 800 ng/ml

Si x = si se usan 800 ng/ml, la cantidad de PMB que tiene que ser enlazada de manera hidrófoba por g de portador es: 14,497 mg por g de adsorbedor (CG161c)

10 **10. Ejemplo 10:** desorción de polimixina B (PMB) a lo largo del tiempo

Esta prueba pretende demostrar que la reacción de equilibrio (adsorción y desorción de polimixina (B)) es rápida y estable en plasma.

10.1 portador

15 HPR10: el portador HPR10 (Rohm & Haas/Dow Chemical Company, también denominado en lo sucesivo adsorbedor) consiste en una matriz porosa de poliestireno divinilbenceno. El tamaño de poro promedio es de 30-40 nm, el tamaño medio de partícula es de 10 µm y la superficie accesible es de 500 m<sup>2</sup>/g de portador (seco). El peso seco por ml de portador húmedo es del 30% (p/v).

10.2 Recubrimiento del portador con polimixina B (PMB)

20 La solución de PMB (Sigma, 10 mg/ml en agua destilada) se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 30 min, y el portador (HPR10) se recubre luego en tubos Greiner de 15 ml con PMB de la siguiente manera (ver Tabla 10.2): 3 ml de portador con 7,5 ml de solución de PMB

Tabla 10.2: El portador/adsorbedor está recubierto con diferentes cantidades de PMB

Recubrimiento de PMB en mg por ml de adsorbedor	Adsorbedor [ml]	Solución de PMB [ml]	NaCl [ml]
5	3	1,5	6
10	3	3	4,5
25	3	0	7,5

25 El recubrimiento se lleva a cabo durante la noche en un mezclador de rodillo a temperatura ambiente. El portador recubierto luego se lava dos veces con 10 ml de solución de NaCl (estéril) y se produce una suspensión al 50%. Se incluyó un tubo sin adsorbedor como control.

10.3 Prueba por lotes

30 El plasma con 5 IU de heparina se siembra con 5 ng/ml de LPS (L-7018 Pseud. Aerug. Compañía Sigma lote: 128K4115). En la metodología por triplicado, 1% del portador recubierto de PMB se incubaba con el plasma con LPS por siembra (30 µl de portador + 2.970 µl de plasma con LPS por siembra) a 37 °C en un agitador de ubicación superior y se toman muestras a intervalos (5, 15 y 60 minutos) para el análisis LAL.

10.4 Análisis

El análisis se realizó utilizando una prueba LAL.

Materiales usados para la prueba por lotes y pruebas LAL:

35

Lote:

	Placas de microtítulo MT 1007	compañía Charles River	1721599k.A.
	Tubos de ensayo Lal T 200	Ch. River Endosafe	53351 Dk.A.
	Combitips plus 5ml Biopur	Eppendorf	X131667I
5	Puntas de pipeta	Eppendorf	V125542M
	Puntas de pipeta	Eppendorf	W130324Q
	0.9% de NaCl	Mayerhofer	8G5523 2011-07
	Tubos de microcentrifuga	Greiner	05200108
	Charles RiverEndosafe	Endochrome	Kit. lote: A2112EK1

10 10.5 Resultado

La concentración de equilibrio de PMB desorbida en el plasma se alcanza muy rápidamente. La inactivación de LPS después de 5 minutos es casi la misma que después de 60 minutos de incubación (ver figura 25).

11. **Ejemplo 11:** Influencia del recubrimiento de un portador recubierto con polimixina B (PMB) en la adsorción de citoquinas

15 11.1 Descripción de la prueba

El grado en que el adsorbedor CG161c recubierto con PMB es adecuado para la adsorción de citoquinas en comparación con el adsorbedor CG161c no recubierto se probó en una prueba por lotes al 10% (v/v). Se añadieron también 5 ng/ml de endotoxina (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*.

11.2 Estructura de prueba

20 Portador: Amberchrom CG161 (tamaño medio de partícula 120 µm, tamaño medio de poro 15 nm)

Recubrimiento con PMB:

La solución de PMB (Sigma Aldrich, 10 mg/ml en agua destilada) y el portador en una suspensión del 50% se recubren en tubos Greiner de 15 ml con PMB de la siguiente manera (Tabla 11.2.1):

Tabla 11.2.1:

	Suspensión de adsorbedor al 50 % [ml]	Solución de PMB [ml]	NaCl [ml]
Metodología 3x	2	1	2

25 El recubrimiento se realizó durante la noche en un Enviro-Genie (25:50) a temperatura ambiente. El portador entonces se lavó dos veces con 10 ml de solución de NaCl (estéril) y se produjo una suspensión al 50%.

Metodología por lotes:

Metodología por triplicado: en cada caso 1 ml de adsorbedor (húmedo) + 9 ml de siembra

30 Se agitan tubos Greiner de 15 ml en el Enviro-Genie durante 60 minutos a 25/50 rpm a 37 °C.

Citoquinas:

La solución madre se diluye 1:10 en plasma (plasma recién congelado, centro donante de plasma Retz) (1:10; 5 µL de solución madre + 45 µL de plasma). La concentración final del plasma sembrado (100 ml) para las citoquinas usadas se presenta en la Tabla 11.2.2 a continuación:

35



Tabla 11.2.2:

	Lote Nr	Concentración de solución madre [µg/mL]	Dilución de solución madre 1:10	Dilución de solución madre a plasma [100 mL]	Concentración final en el plasma [pg/mL]
TNF- $\alpha$		10	5 µL + 45 µl	15 µL	500
IL-1 $\alpha$		5	5 µL + 45 µl	65 µL	250
IL-6		10	5 µL + 45 µl	35 µL	200
IL-8		10	5 µL + 45 µl	35 µL	200
IL-10		10	5 µL + 45 µl	40 µL	300

Endotoxinas (LPS):

Pseudomonas aeruginosa: L-7018 compañía Sigma lote: 128K4115, -70 °C, a 100 µl 10<sup>-3</sup> g/ml (1mg/ml).

5 LPS se usa en el lote con una concentración final de 5 ng/ml

→50 µl 10<sup>-5</sup> de solución en 100 ml de plasma (Tablas 11.2.3 y 11.2.4)

Tabla 11.2.3:

10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	
0,9	0,900	NaCl
0,1	0,100	LPS
100 µg/ml	10 µg/ml	concentración de LPS

Tabla 11.2.4:

	0 min	60 min
Siembra sin adsorbedor	1	2
CG161c – 1 sin PMB		3
CG161c – 2 sin PMB		4
CG161c – 3 sin PMB		5
CG161c – 4 con PMB		6
CG161c – 5 con PMB		7
CG161c – 6 con PMB		8

10

= 8 muestras, es decir 100 ml de plasma de citrato con siembra

11.3 Análisis:

El análisis de citoquinas se realiza con la ayuda de un aparato Luminex (con base en anticuerpos) de la empresa Biorad.

15 11.4 Resultados:

Los resultados se muestran en la figura 26, a partir de los cuales se puede ver claramente que un recubrimiento adsorbente de la superficie del portador con polimixina B no tiene efectos sobre la adsorción de las citoquinas.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700) de perfusión extracorpóreo que comprende un circuito (102, 202, 302, 402, 502, 602, 702) de sangre extracorpóreo para transportar sangre, un circuito (105, 205, 305, 405, 505, 605, 705) de filtrado para transportar plasma sanguíneo, y un controlador (110, 210, 310, 410, 510, 610, 710),
- 5 en el que el circuito (105, 205, ... 705) de filtrado está conectado al circuito (102, 202, ... 702) de sangre extracorpóreo por medio de un filtro (104, 204, 304, 404, 504, 604, 704), en el que el filtro (104, 204 ... 704) tiene un coeficiente de cribado del 5% para sustancias que tienen una masa molar de 340.000 g/mol (masa molecular relativa de 340 kDa), y
- 10 en el que un agente (107, 207, 307, 407, 507, 607, 707) de agotamiento que comprende un primer portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 607a, 707a) que tiene una superficie no iónica, hidrófoba está dispuesto en el circuito (105, 205, ... 705) de filtrado,
- caracterizado porque
- 15 el aparato de perfusión comprende un medio (107, 207, 308, 408, 508, 607, 708) dispensador en el que el medio dispensador alimenta un lipopéptido enlazador de endotoxina en el circuito (102, 202, ... 702) sanguíneo extracorpóreo, en el que el lipopéptido enlazador de endotoxina es seleccionado del grupo que consiste en polimixinas, derivados de polimixina, profármacos de los mismos y una combinación de los mismos.
2. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el lipopéptido enlazador de endotoxina es una polimixina seleccionada del grupo que consiste en polimixina B, colistina y profármacos de los mismos.
- 20 3. El aparato (100, 200, 600) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el agente (107, 207, 607) de agotamiento comprende los medios (107, 207, 607) de dispensación para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina, en el que la superficie del primer portador (107a, 207a, 607a) tiene un recubrimiento adsorbente formado por el lipopéptido enlazador de endotoxina.
- 25 4. El aparato (500) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los medios (508) dispensadores para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina están dispuestos en el circuito (505) de filtrado corriente abajo del agente (507) de agotamiento, en el que los medios (508) dispensadores comprenden un segundo portador (508a) que tiene una superficie neutra e hidrófoba, en el que la superficie del segundo portador (508a) tiene un recubrimiento adsorbente formado por el lipopéptido enlazador de endotoxina.
- 30 5. El aparato (300, 400) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los medios (308, 408) de dispensación para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina comprenden un dispositivo (308, 408) de dosificación para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina en el circuito (302, 402) sanguíneo extracorpóreo en un punto (313, 413) de alimentación de lipopéptido asociado con el circuito (302, 402) sanguíneo extracorpóreo.
- 35 6. El aparato (300, 400) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el punto (313, 413) de alimentación del lipopéptido está dispuesto en el circuito (302, 402) de sangre extracorpóreo corriente abajo del filtro (304, 404).
7. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque un dializador está dispuesto en el circuito sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del filtro, en el que el punto de alimentación del lipopéptido está dispuesto en el circuito sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del dializador.
- 40 8. El aparato (300, 400) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque un medio (314, 414) de medición para medir la concentración del lipopéptido enlazador de endotoxina está dispuesto corriente abajo del filtro (304, 404) o del dializador y corriente arriba del punto (313, 413) de alimentación del lipopéptido.
- 45 9. El aparato (300, 400) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque el controlador (310, 410) del aparato de perfusión está configurado, cuando el lipopéptido se dosifica en la sangre transportada en el circuito (302, 402) sanguíneo extracorpóreo, para tener en cuenta la eliminación del lipopéptido del cuerpo, la eliminación del lipopéptido del agente (307, 407) de agotamiento y/o la eliminación del lipopéptido del dializador.
- 50 10. El aparato (700) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el medio dispensador para alimentar el lipopéptido enlazador de endotoxina comprende un dializador (708) dispuesto en el circuito (702) sanguíneo extracorpóreo corriente abajo del filtro (704), estando configurado dicho dializador para suministrar el lipopéptido enlazador de endotoxina al circuito (702) sanguíneo extracorpóreo por medio de un fluido de diálisis transportado a través del dializador (708).

11. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el primer y el segundo portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 508a, 607a, 707a) están formados a partir de un polímero no iónico, preferentemente sintético.
- 5 12. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque el polímero se selecciona de un polímero de poliestireno entrecruzado o un polímero de etileno divinilbenceno entrecruzado, preferiblemente un copolímero de poliestireno divinilbenceno o un copolímero de etilvinilbenceno divinilbenceno.
- 10 13. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el primer o el segundo portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 508a, 607a, 707a), respectivamente, es poroso y tiene un tamaño medio de poro de 100 nm o menos, en el que el tamaño medio de poro se refiere al diámetro medio de los poros.
14. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque el primer o el segundo portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 508a, 607a, 707a), respectivamente, tiene un tamaño medio de poro de 20 nm o menos o un tamaño medio de poro desde 80 a 100 nm, en el que el tamaño medio de poro se refiere al diámetro medio de los poros.
- 15 15. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el primer o el segundo portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 508a, 607a, 707a), respectivamente, son tipo fibra o están en forma de partículas.
- 20 16. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el primer o el segundo portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 508a, 607a, 707a), respectivamente, tienen la forma de micropartículas con un tamaño medio de partícula de 300  $\mu\text{m}$  o menor.
- 25 17. El aparato de perfusión extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque el primer portador (107a, 207a, 307a, 407a, 507a, 607a, 707a) tiene un tamaño medio de poro desde 10 a 20 nm u 80 a 100 nm, en el que el tamaño medio de poro se refiere al diámetro medio de los poros, y un tamaño medio de partícula desde 75 a 150  $\mu\text{m}$ , preferiblemente un tamaño medio de partícula desde 110 a 130  $\mu\text{m}$ , idealmente un tamaño medio de partícula de 120  $\mu\text{m}$ .
- 30 18. El aparato (600) de perfusión extracorpóreo de acuerdo con una de las reivindicaciones 3, 5 o 10, caracterizado porque el circuito (605) de filtrado conduce al filtro (604), y porque el primer portador (607a) tiene la forma de micropartículas y el circuito (605) de filtrado comprende una suspensión de estas micropartículas, en el que las micropartículas tienen un tamaño medio de partícula de 20  $\mu\text{m}$  o menor, preferiblemente un tamaño medio de partícula de 8  $\mu\text{m}$  o menor, idealmente un tamaño medio de partícula de 5  $\mu\text{m}$  o menor.

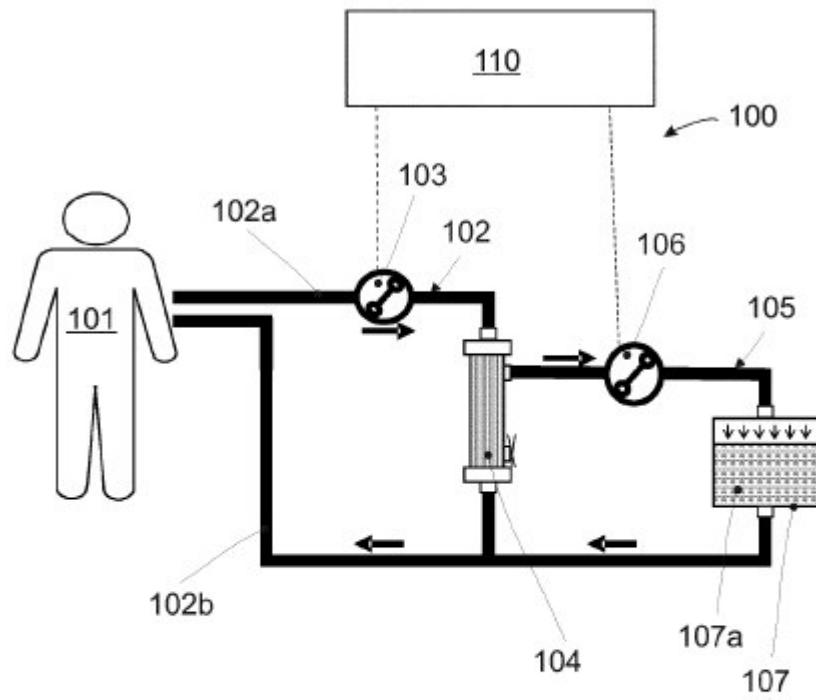


Fig. 1

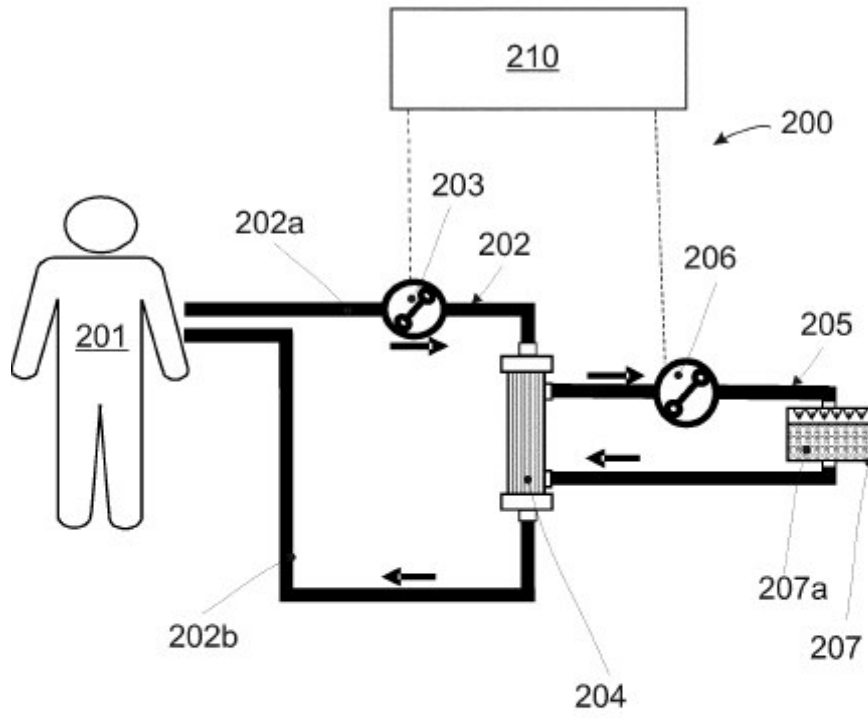


Fig. 2

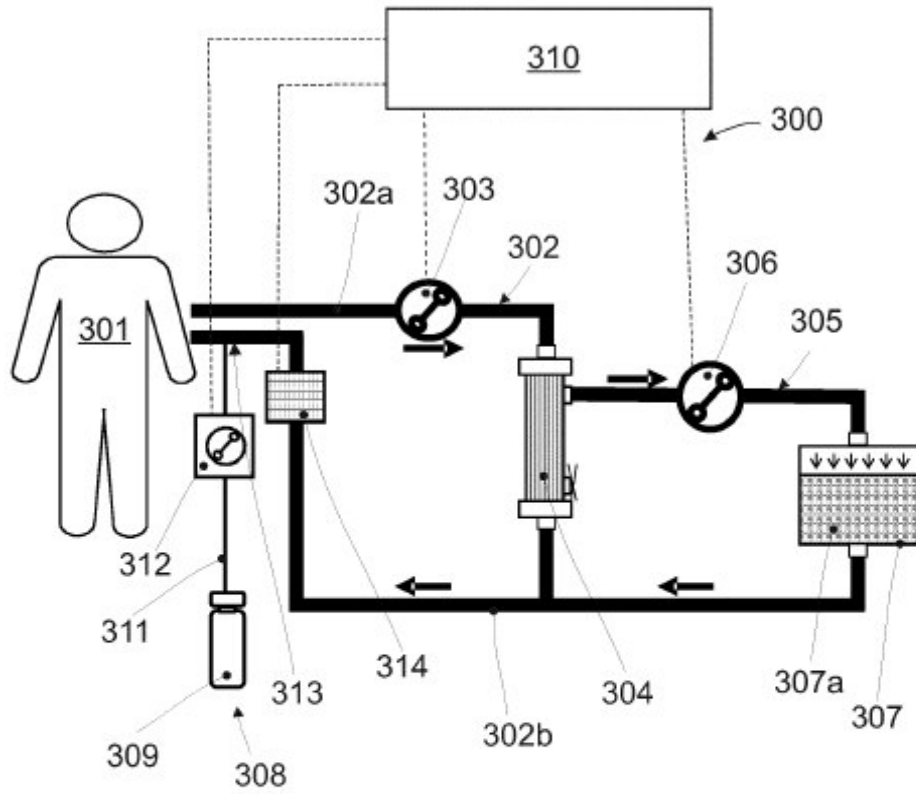


Fig. 3





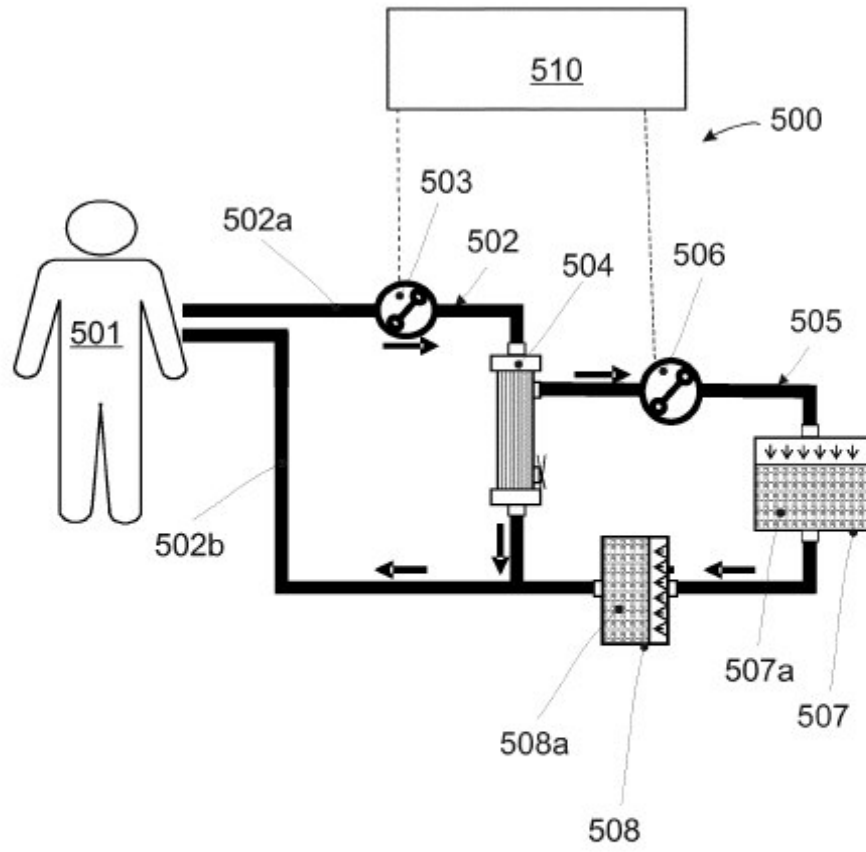


Fig. 5



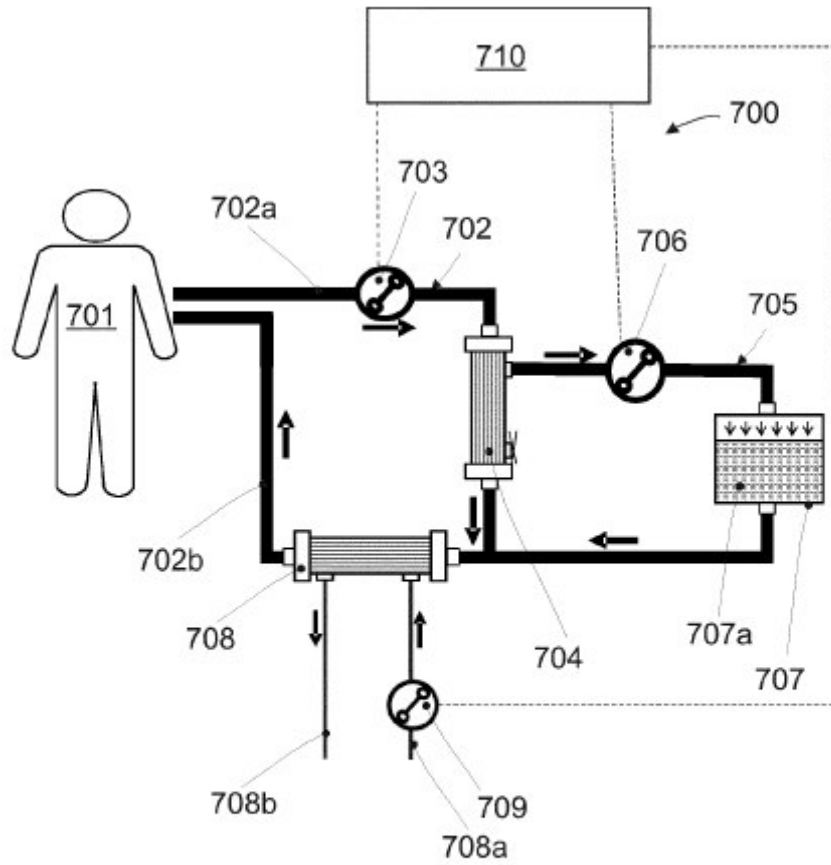


Fig. 7

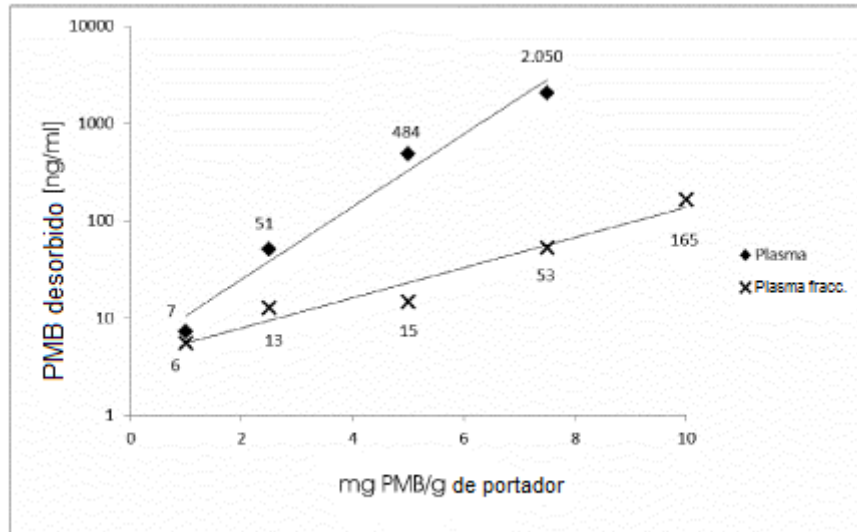


Fig. 8

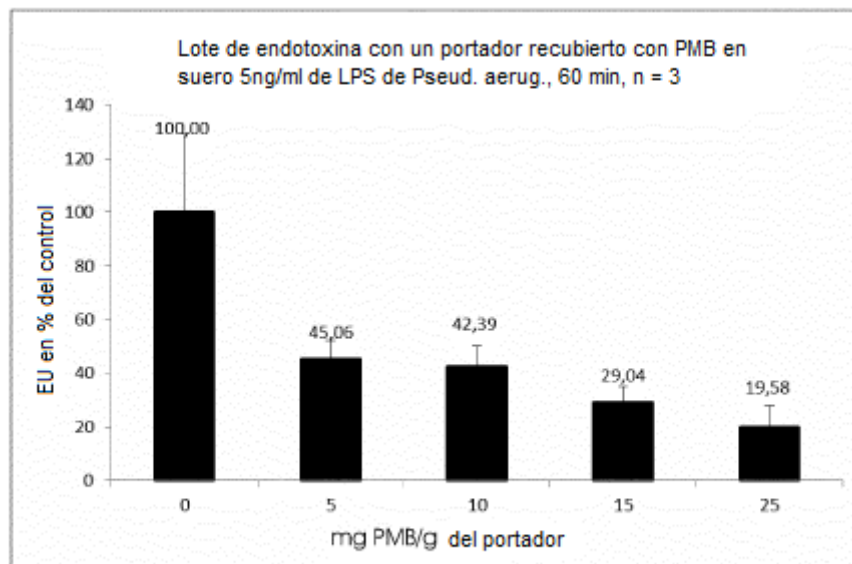


Fig. 9

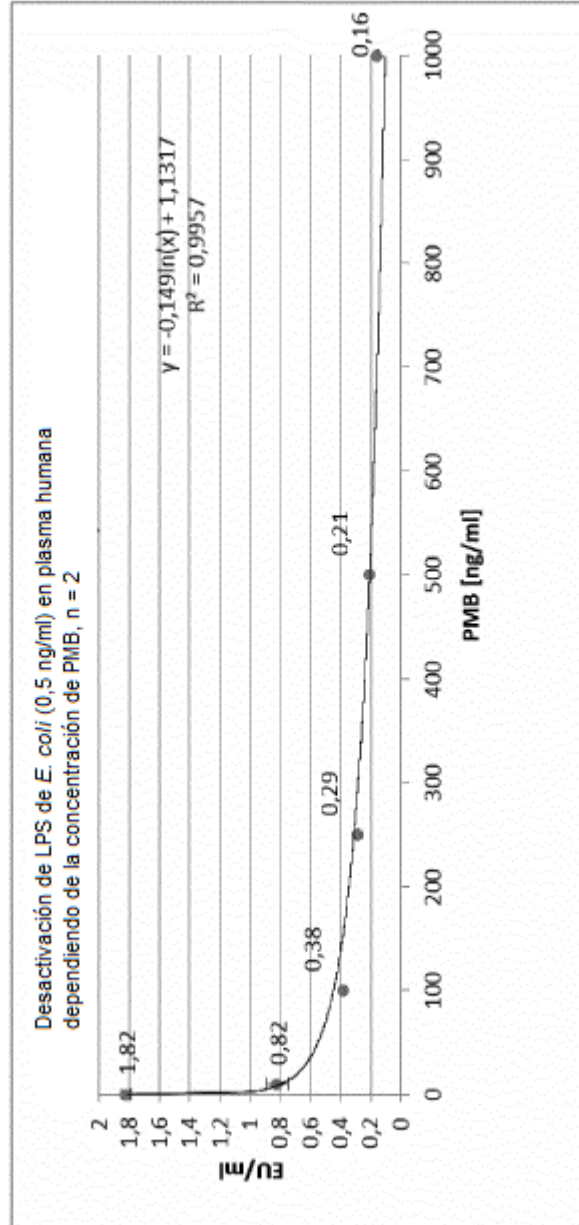


Fig. 10

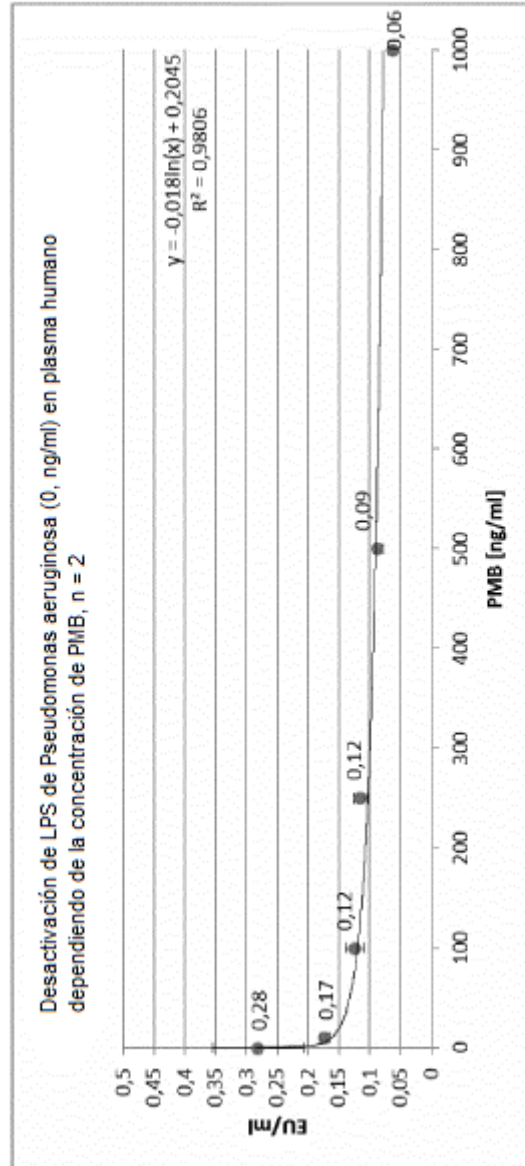


Fig. 11

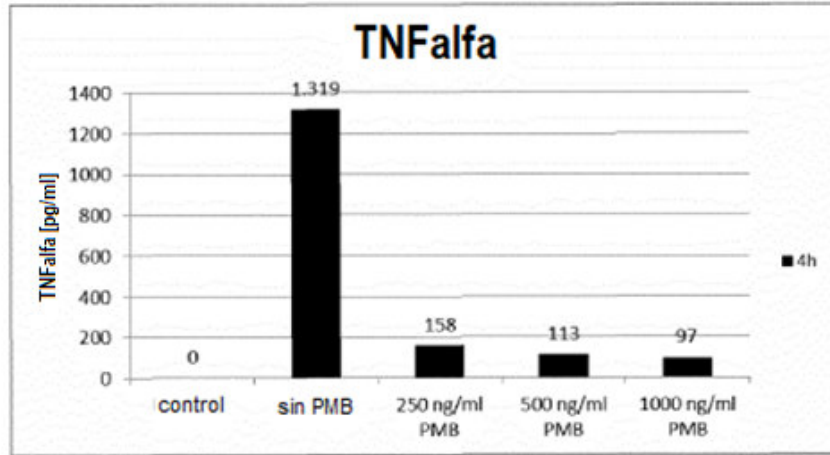


Fig. 12

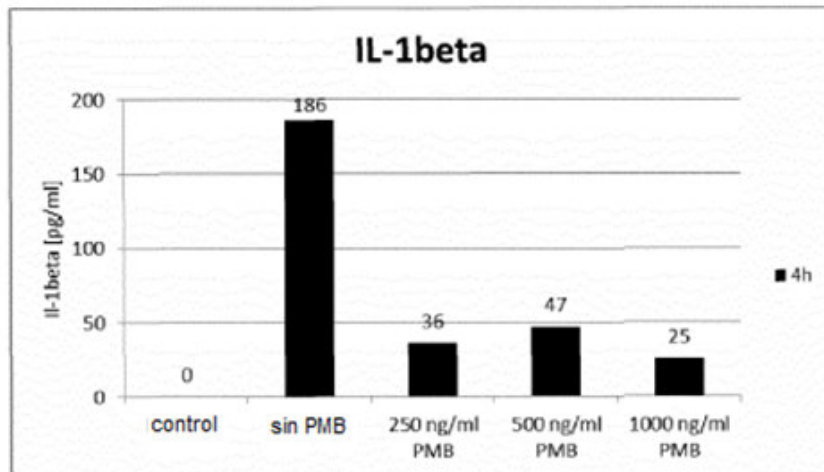


Fig. 13

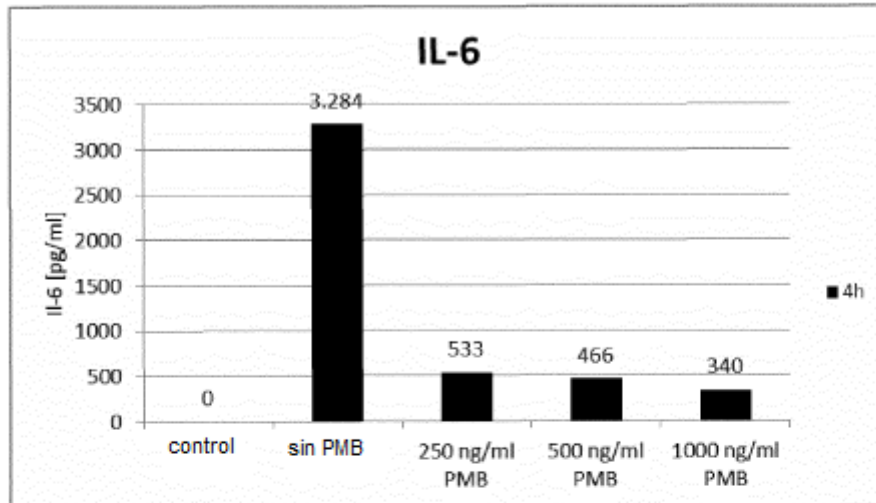


Fig. 14

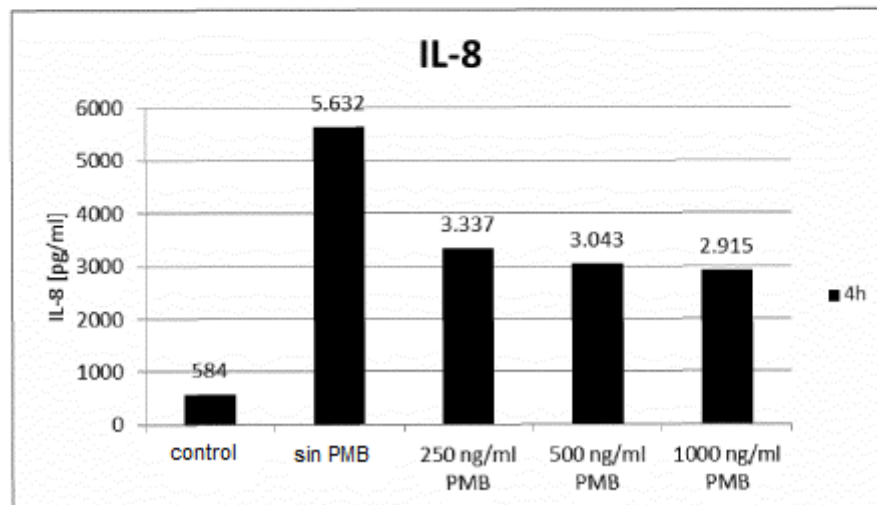


Fig. 15



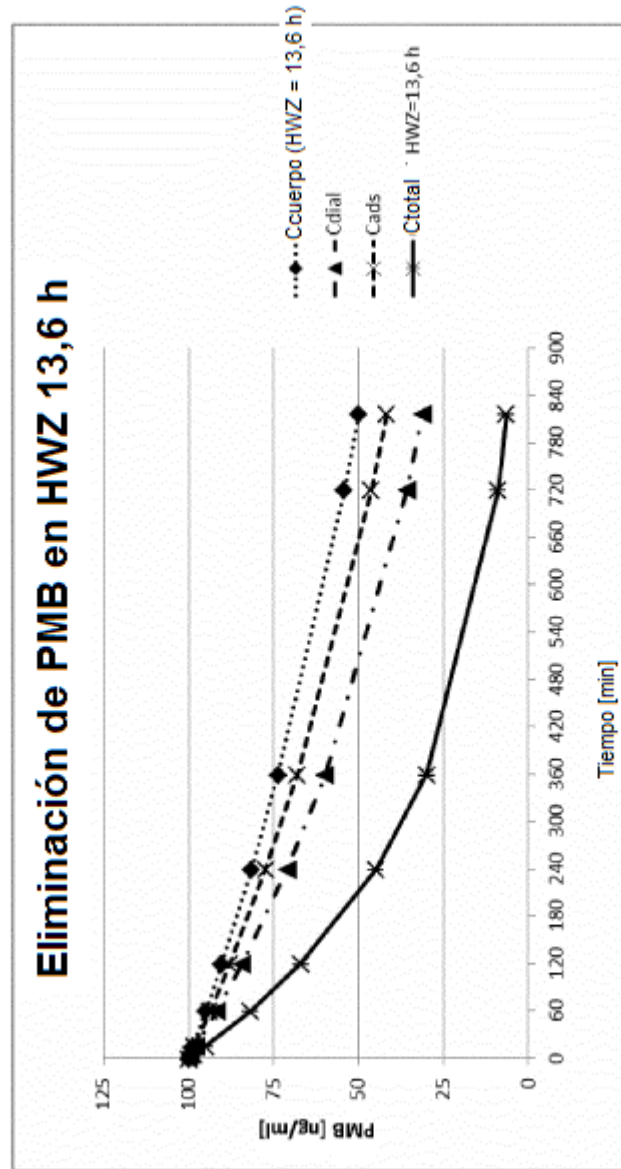


Fig. 16

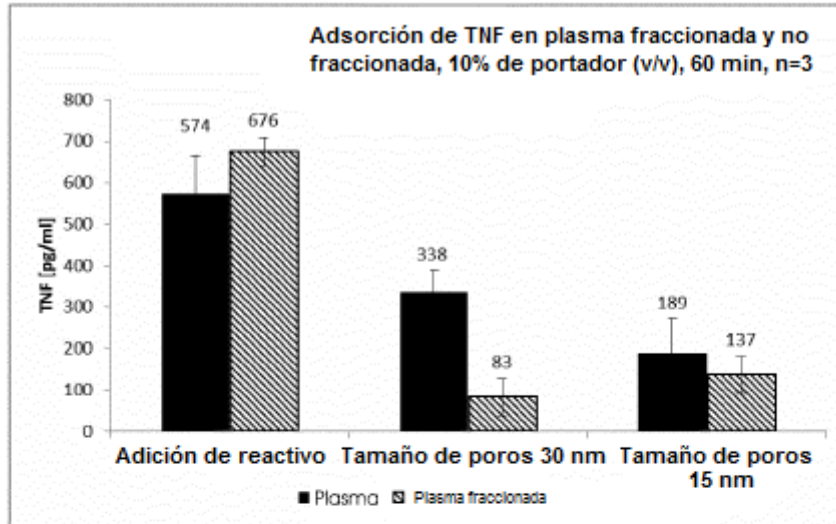


Fig. 17

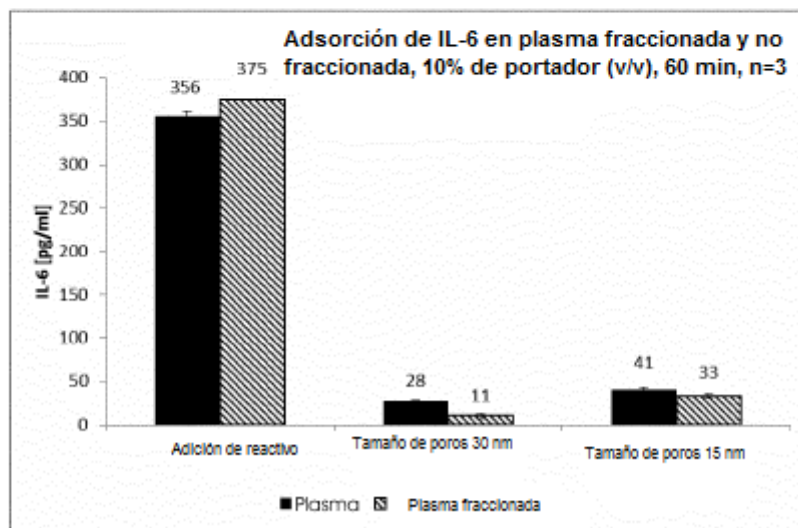


Fig. 18

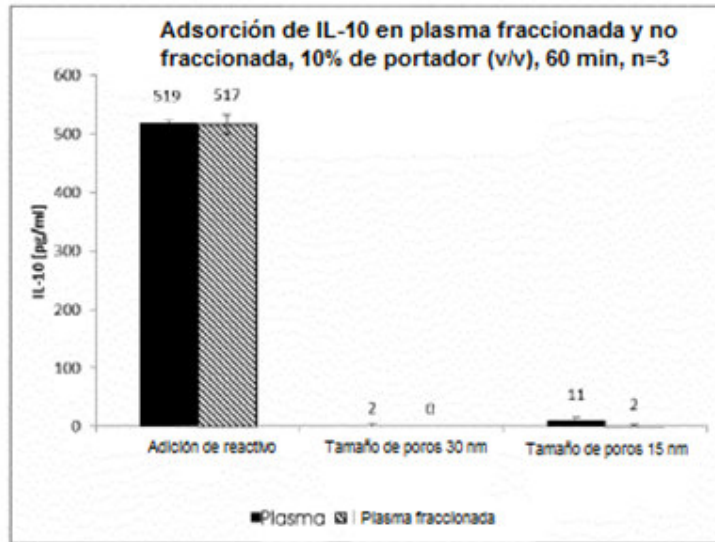


Fig. 19

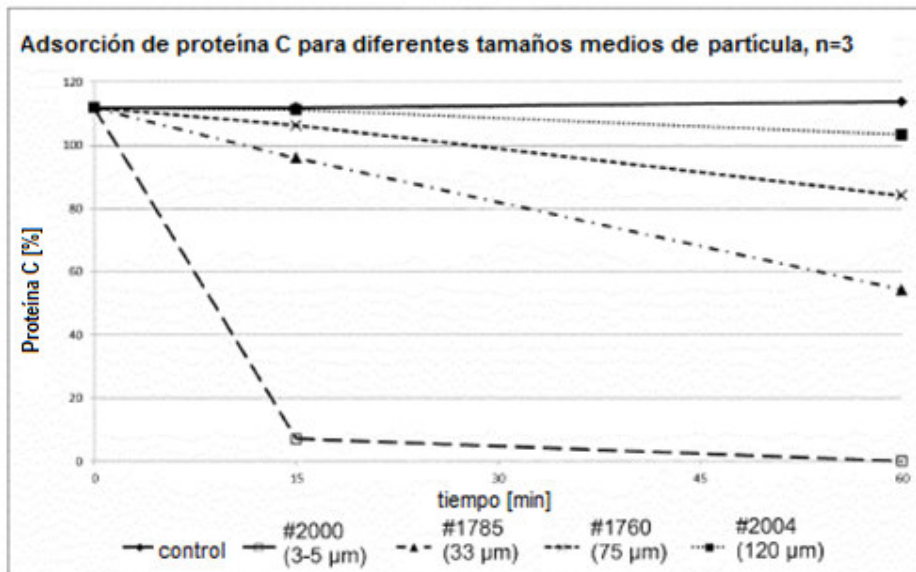


Fig. 20

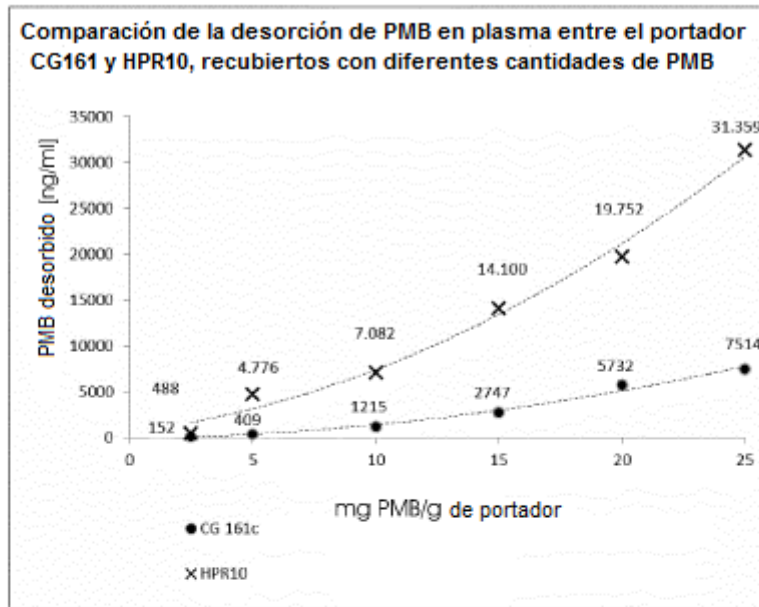


Fig. 21

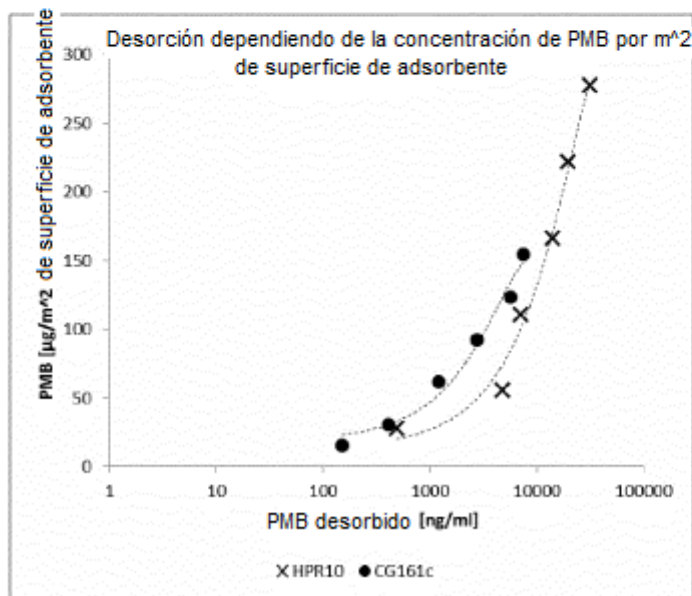


Fig. 22

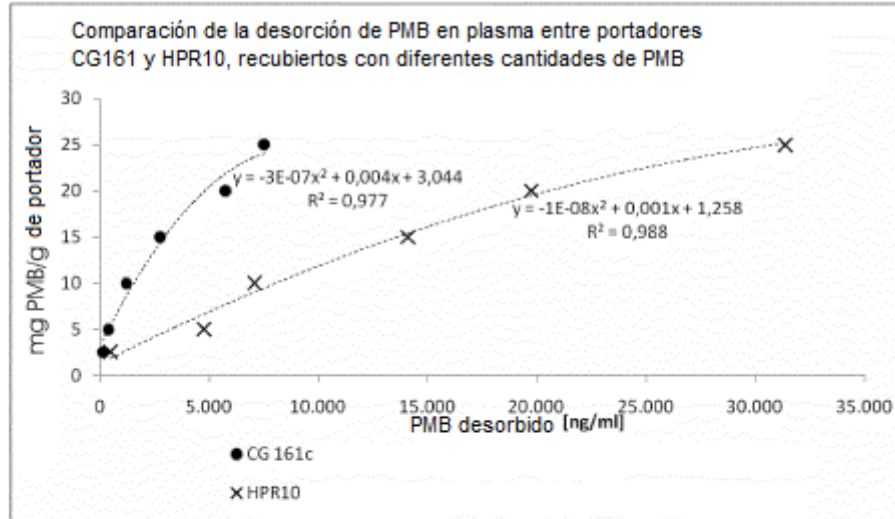


Fig. 23

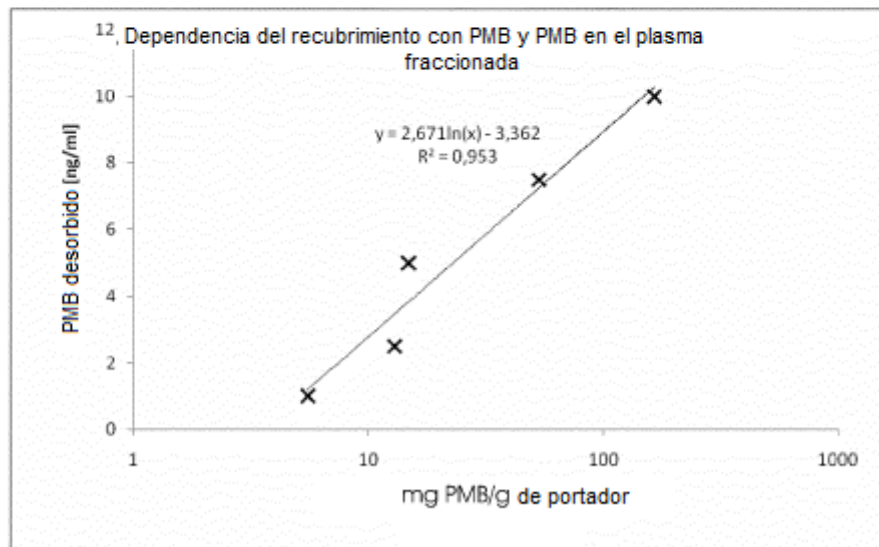


Fig. 24

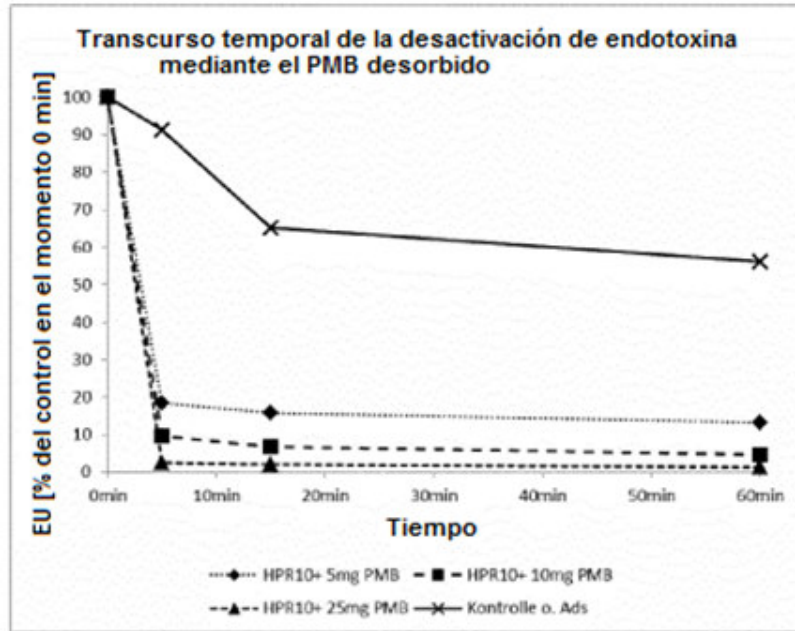


Fig. 25



Fig. 26