

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 573**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/36** (2006.01)

**A61M 1/38** (2006.01)

**A61M 39/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031744**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13791497 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2849817**

54 Título: **Sistema para la modificación extracorpórea de sangre**

30 Prioridad:

**14.05.2012 US 201261646674 P**

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

**24.09.2019**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION  
(100.0%)**

**55 Shattuck Street  
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**MCALVIN, JAMES, B.;  
MIZRAHI, BOAZ;  
KOHANE, DANIEL, S. y  
WYLIE, RYAN, G.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 725 573 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

Sistema para la modificación extracorpórea de sangre

5 **Aplicaciones relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número de serie 61/646.674, presentada el 14 de mayo de 2012, titulada "Systems and Methods for Extracorporeal Blood Modification", de McAlvin, *et al.*

10

**Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere en general a dispositivos, sistemas y métodos para la modificación de líquidos biológicos, p. ej., la eliminación dirigida de proteínas u otras biomoléculas de la sangre de un sujeto.

15

**Antecedentes**

La sepsis, la sepsis grave y el choque séptico afectan a millones de personas en todo el mundo cada año y son las principales causas de muerte en pacientes gravemente enfermos en los Estados Unidos. La teoría predominante ha sido que la sepsis representa una respuesta inflamatoria incontrolada provocada por una infección. Los modelos animales producen "tormentas de citoquinas" tras la inducción de un choque séptico, ya sea por inyección de bacterias, administración de lipopolisacáridos o ligamiento y punción cecal. Las citoquinas inflamatorias tales como TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, VEGF, y muchas más han sido implicadas como las culpables del síndrome de sepsis y sus características asociadas. Los intentos de modular la cascada inflamatoria han sido en gran medida infructuosos, incluidos los ensayos de corticosteroides, anticuerpos antiendotoxina, antagonistas de TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ), antagonistas del receptor de IL-1, ibuprofeno, y modificación extracorpórea de sangre (p. ej., plasmaféresis). Una razón de su fracaso puede ser porque el síndrome de sepsis cambia con el tiempo. La fase temprana se caracteriza por un aumento repentino de citoquinas inflamatorias. Pero a medida que persiste la sepsis, se desarrolla un cambio hacia un estado inmunosupresor y está mediado por citoquinas antiinflamatorias tales como IL-10 y TGF-beta (TGF- $\beta$ ). Las terapias antiinflamatorias que pueden ser beneficiosas durante la fase inicial pueden empeorar la supresión inmunitaria que se produce debido a sus efectos de larga duración. Aunque los efectos de la modulación inmunitaria extracorpórea (p. ej., hemofiltración, intercambio de plasma, plasmaféresis) están limitados al tiempo que están en uso, carecen de selectividad y pueden eliminar las citoquinas antiinflamatorias. En consecuencia, se necesitan mejoras en el tratamiento.

20

25

30

35

**Resumen de la invención**

En la siguiente descripción, se desvelan diversas realizaciones y aspectos a modo de ejemplo opcionales que no forman parte de la invención, pero que se describen simplemente para ayudar a comprender la invención. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la invención se describen en los siguientes párrafos numerados:

40

(1). Un dispositivo, que comprende:

un circuito extracorpóreo que comprende un tubo que tiene una superficie interna y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo unido a un sustrato que forma la superficie interna del tubo, en el que el sustrato comprende un microgel polimérico.

45

(2). El dispositivo del párrafo 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para una citoquina inflamatoria.

(3). El dispositivo del párrafo 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para IL-6 o VEGF.

50

(4). El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-3, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido al microgel polimérico, opcionalmente en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido al microgel polimérico mediante un agente de reticulación, opcionalmente en el que el agente de reticulación comprende aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o NHS-PEG-maleimida.

55

(5). El dispositivo del párrafo 4, en el que el tubo comprende silicona y/o poli(dimetilsiloxano).

Los dispositivos desvelados en la presente memoria se refieren a dispositivos que comprenden un componente de cámara de un circuito extracorpóreo, comprendiendo la cámara una superficie y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un ligando, o un receptor. En algunas opciones, la superficie comprende un polímero. En algunas opciones, la superficie comprende la superficie de una partícula contenida en el interior de la cámara. En ciertas opciones, la partícula es una partícula de gel o una partícula de hidrogel. La partícula también puede ser una micropartícula o una nanopartícula en algunos casos. En ciertas opciones, la partícula tiene un área superficial promedio de al menos aproximadamente 5 m<sup>2</sup>/g, y/o un volumen de poro promedio de al menos aproximadamente 0,005 cm<sup>3</sup>/g. En algunos casos, la superficie comprende una superficie de un tubo o un dispositivo microfluídico. En algunas opciones, la superficie y el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el ligando, o el receptor están contenidos en el interior de un vehículo contenido en el interior de la cámara.

60

65

En algunas opciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el ligando, o el receptor está unido a la superficie. En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el ligando, o el receptor se une a la superficie mediante agente de reticulación. En algunas opciones, los agentes de reticulación comprenden aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o la molécula heterobifuncional N-hidroxilsuccinimida (NHS) polietilenglicol (PEG) maleimida. En ciertas opciones, el polímero es una red de polímeros interpenetrante o semiinterpenetrante. En algunas opciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para una citoquina inflamatoria. En ciertas opciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para IL-6. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para VEGF (incluyendo todas sus isoformas).

En la presente memoria también se desvelan métodos de eliminación de proteínas dirigidas de un líquido biológico de un sujeto que lo necesite, que comprende: poner en contacto una muestra de líquido biológico tomada de un sujeto con una superficie o partícula y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un ligando, o un receptor que se une selectivamente a una proteína sospechosa de estar dentro de la muestra de líquido biológico.

En algunas opciones, el líquido biológico es sangre, líquido cefalorraquídeo o líquido linfático. En algunas opciones, el líquido biológico es suero o plasma que se ha separado de la sangre. En algunas opciones, el suero o plasma se reconstituirá con los constituyentes de la sangre originales y se devolverá al sujeto como sangre entera filtrada. En algunas opciones, los métodos comprenden además reintroducir al menos una parte de la muestra de sangre al sujeto. En algunas opciones, el ligando, receptor, o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la superficie o partícula. En algunas opciones, la sangre se extrae del sujeto a través de un circuito extracorpóreo.

En la presente memoria también se desvelan métodos de eliminación de proteínas dirigidas de la sangre de un sujeto que lo necesite, que comprende: inyectar en un sujeto una partícula magnéticamente susceptible que comprende una superficie y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un ligando, o un receptor que se une selectivamente a una proteína sospechosa de estar dentro de la sangre del sujeto; extraer una muestra de sangre que contiene la partícula magnéticamente susceptible del sujeto; y exponer la muestra de sangre que contiene la partícula magnéticamente susceptible a un campo magnético. En algunas opciones, la sangre se extrae del sujeto y las partículas magnéticamente susceptibles se añaden a la sangre. Las partículas pueden unirse a la proteína diana, la sangre se expone a un campo magnético para eliminar al menos algunas de las partículas, y la sangre puede ser devuelta al sujeto.

En algunas opciones, los métodos comprenden además reintroducir al sujeto al menos una parte de la muestra de sangre. En algunas opciones, el acto de extraer la muestra de sangre comprende extraer la muestra de sangre después de un tiempo al menos suficiente para permitir que la partícula magnéticamente susceptible circule dentro de la sangre del sujeto. En algunas opciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, el ligando, o el receptor se unen a la superficie. En algunas opciones, el campo magnético se usa para eliminar la partícula magnéticamente susceptible de la muestra de sangre. En algunas opciones, la partícula magnéticamente susceptible comprende un núcleo magnéticamente susceptible y un polímero que rodea al menos parcialmente el núcleo. En algunas opciones, la partícula magnéticamente susceptible comprende hierro.

La presente divulgación se dirige generalmente a un circuito extracorpóreo que comprende un tubo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo colocado sobre una superficie del tubo. La presente divulgación también se dirige generalmente a un artículo que comprende un tubo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo colocado sobre una superficie del tubo. La presente divulgación también se refiere a un método que comprende pasar un líquido biológico extraído de un sujeto a través de un tubo que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo colocado sobre una superficie del tubo, y devolver al sujeto al menos una parte del líquido biológico.

La presente divulgación, así como varias opciones de la misma, resultarán más evidentes en referencia a los dibujos y la descripción detallada de la divulgación.

### Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos no tienen por objeto ser dibujados a escala. En los dibujos, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en varias figuras se representa con un número similar. Para mayor claridad, no todos los componentes pueden estar etiquetados en cada dibujo. En los dibujos:

La FIG 1 proporciona un esquema de la producción de proteínas inflamatorias y antiinflamatorias durante la progresión del choque séptico.

La FIG. 2 proporciona un esquema que representa partículas altamente selectivas que exhiben anticuerpos en una sola opción.

La FIG. 3 proporciona un esquema que representa la síntesis de una red de polímeros semiinterpenetrantes funcionalizada con un anticuerpo, de acuerdo con otra opción.

La FIG. 4 proporciona una representación esquemática de un circuito extracorpóreo experimental impulsado por una bomba peristáltica, en otra opción.

La FIG. 5 proporciona un diagrama esquemático de un circuito extracorpóreo venovenoso en una rata séptica después del ligamiento y punción cecal, en otra opción. La sangre se drena de la vena femoral y se devuelve a través de la vena yugular. Parte o toda la longitud total del tubo puede comprender la superficie activa para la eliminación de proteínas.

5 La FIG. 6 proporciona un esquema que representa la síntesis de una superficie polimérica funcionalizada con un anticuerpo, en otra opción.

La FIG. 7 proporciona una gráfica de las concentraciones de citoquinas en un líquido biológico frente al tiempo que sigue a la circulación del líquido biológico a través de un circuito extracorpóreo de acuerdo con otra opción. VEGF es la citoquina dirigida. IL-6 es la proteína no dirigida.

10

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere en general a sistemas y métodos para la eliminación dirigida de una sustancia o biomolécula, tal como una proteína de un líquido biológico, tal como la sangre. En algunos casos, la sangre puede ser extraída de un sujeto, tratarse y devolverse al sujeto. Las técnicas anteriores para la eliminación de materiales biológicos de la sangre, tales como hemodiálisis y plasmáferesis, generalmente fueron no específicas (es decir, eliminaron una gran cantidad de proteínas/toxinas de la sangre). Por el contrario, los nuevos métodos y dispositivos descritos en la presente memoria son capaces de eliminar sustancias específicas o individuales, tales como proteínas de líquidos biológicos, tales como sangre de una manera específica. Esta eliminación de proteínas altamente específica tiene una amplia gama de aplicaciones clínicas, incluido el tratamiento de afecciones inflamatorias y enfermedades autoinmunes.

15

20

La presente divulgación no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes se establece en la siguiente descripción o se ilustra en los dibujos. La presente divulgación es capaz de otras opciones y de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras. Asimismo, la fraseología y la terminología utilizadas en la presente memoria son para fines de descripción y no deben considerarse como limitativas. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y las variaciones de los mismos en la presente memoria, pretende abarcar los artículos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos, así como artículos adicionales.

25

30

También divulgada en la presente memoria, la presente divulgación se refiere al uso de un circuito extracorpóreo para eliminar sustancias específicas del líquido biológico de un sujeto. Por ejemplo, un líquido biológico, tal como sangre, puede extraerse del sujeto, tratarse de alguna manera y devolverse al sujeto, es decir, el circuito permite el retorno del líquido biológico al sujeto. Debe apreciarse que cualquier líquido biológico de un sujeto puede ser compatible con la presente divulgación. En algunas opciones, por ejemplo, el líquido biológico es sangre, líquido cefalorraquídeo líquido linfático.

35

También debe apreciarse que los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden aplicarse a cualquier sustancia que se destine a la extracción del líquido biológico de un sujeto. En algunas opciones, por ejemplo, la sustancia es un fármaco, una proteína, una sal, hemoglobina, mioglobina o una hormona.

40

En algunas opciones no limitantes, la sustancia a eliminar del líquido biológico se dirige utilizando una interacción anticuerpo-antígeno, una interacción ligando-receptor, una interacción fármaco-receptor (p. ej., subunidad B de girasa y antibióticos tales como cumermicina), un aptámero de ADN, un agente quelante que incluye un agente quelante de metal (p. ej., quelación de plomo con D-penicilamina, ácido 2,3-dimercaptosuccínico y quelación de mercurio con ácido 2,3-dimercapto-1-propansulfónico), un polímero de impresión molecular (MIP, por sus siglas en inglés) (p. ej., para la eliminación de hormonas adrenérgicas), un agente de unión a sal para la eliminación de sales (p. ej., la eliminación de potasio por carragenina (α-D-galactosa vinculada en 1,4 y β-D-galactosa vinculada en 1,3 con una parte variable de grupos sulfato), iones, una interacción quiral entre una proteína y un ligando, un complejo de ADN-ligando sintético, una proteína con un sitio de unión específico (p. ej., el principio de "llave y cerradura") y una interacción ligando-célula (p. ej., a través del receptor de ácido fólico-folato). En algunas opciones, la sustancia que se elimina del líquido biológico es la heparina o un fármaco.

45

50

En ciertas opciones, la sustancia que se eliminará del líquido biológico de un sujeto es un mediador inflamatorio que estimula la inflamación, tal como una citoquina. Como se usa en la presente memoria, una "citoquina" se refiere a una proteína que es secretada por una célula del sistema inmunológico y que tiene un efecto en otras células. Varios grupos no limitantes de citoquinas incluyen interleucinas e interferones. Varios ejemplos no limitantes de interleucinas incluyen 1-18 (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18). IL-1 incluye interleucina-1 alfa e interleucina-1 beta (IL-1 alfa e IL-1 beta). La IL-5 también es conocida como factor de diferenciación de eosinófilos (EDF). La IL-6 también es conocida como factor 2 estimulante de linfocitos B (BSF-2) e interferón beta-2. Varios ejemplos no limitativos de interferones incluyen IFN-alfa (IFN-α), IFN-beta (IFN-β), IFN-omega (IFN-ω) e IFN-gamma (IFN-γ). Otros ejemplos de citoquinas incluyen TNF-alfa (TNF-α), TGF-beta-1 (TGF-β1), TGF-beta-2 (TGF-β2), TGF-beta-3 (TGF-β3) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

55

60

65

También descrito en la presente memoria, la presente divulgación se refiere a la modificación de la respuesta

inmunitaria anormal que es característica de numerosas enfermedades inflamatorias en un sujeto, p. ej., en necesidad de la misma. En algunas opciones, un sujeto tiene un equilibrio anormal de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias, y la eliminación de proteínas dirigida se dirige a una o más citoquinas para alterar el equilibrio de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias en el sujeto. El sujeto puede tener un trastorno que afecta al sistema inmunitario, tal como una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune. Ejemplos específicos se discuten con más detalle a continuación.

En algunas opciones, la enfermedad inflamatoria es sepsis o choque séptico. La sepsis es la principal causa de muerte en pacientes gravemente enfermos en los Estados Unidos. La sepsis grave y el choque séptico son problemas de atención médica importantes, que afectan a millones de personas en todo el mundo cada año y aumentan en incidencia. Por ejemplo, la sepsis se desarrolla anualmente en 750.000 personas en los Estados Unidos, lo que resulta en la muerte de más de 210.000 de ellos.

El choque séptico puede ser causado por una respuesta inmunitaria no regulada a una infección grave. La respuesta inmunitaria suele ser bifásica, lo que inicialmente da como resultado una explosión inflamatoria seguida de una supresión inmunitaria. La primera fase se caracteriza por insuficiencia multiorgánica, colapso circulatorio, y muerte. Los pacientes que sobreviven a la primera fase desarrollan el síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria que se caracteriza por una supresión inmunitaria grave y una infección secundaria. Muchos pacientes que desarrollan choque séptico sucumben a una infección secundaria adquirida en el hospital durante la última fase. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la sepsis representa una respuesta inflamatoria incontrolada provocada por una infección, basándose en estudios en animales que documentaron "tormentas de citoquinas" cuando se indujo un choque séptico mediante inyección de bacterias, administración de lipopolisacáridos o ligamiento y punción cecal (CLP, por sus siglas en inglés). Citoquinas tales como factor de necrosis tisular alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, VEGF y muchas más han sido implicadas. Sin embargo, las citoquinas también tienen efectos beneficiosos en la sepsis. Además de ser una parte esencial de la respuesta inmunitaria, algunas de ellas poseen propiedades antiinflamatorias (p. ej., TGF-beta (TGF- $\beta$ ), IL-10).

Varias opciones de la divulgación se refieren a la eliminación de citoquinas específicas de la sangre de un sujeto. En algunas opciones, la citoquina que se dirige a la extracción de la sangre de un sujeto es IL-6. IL-6 es un biomarcador del estado de activación de la red de citoquinas y se sabe que refleja la influencia de varias citoquinas. La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, que participa principalmente en la regulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias. La IL-6 puede ser generada por linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliales e incluso células epiteliales mesangiales y tubulares del riñón. La IL-6 tiene muchas propiedades biológicas que resultan en la regulación ascendente de varios efectos; por ejemplo, el factor tisular y la producción de enzimas que degradan la matriz, la proteína C reactiva y la formación de fibrinógeno en hepatocitos, y también forma parte de un circuito de retroalimentación positivo para el factor alfa de necrosis tisular. Los niveles circulantes de IL-6 son detectables de forma reproducible en pacientes con sepsis, y las concentraciones más altas auguran un mal resultado. Por consiguiente, en ciertas opciones de la divulgación, se usan anticuerpos dirigidos a la eliminación de IL-6.

En algunas opciones, la citoquina que se dirige a la eliminación es VEGF. VEGF es una proteína señal que estimula la vasculogénesis y la angiogénesis; se ha notificado que estimula la permeabilidad, proliferación, migración, y supervivencia de las células endoteliales y contribuye a la inflamación y a la coagulación. La sepsis se ha asociado con la expresión elevada y los niveles circulantes de VEGF. Se ha sugerido que los niveles elevados de VEGF en pacientes con sepsis pueden sensibilizar las células endoteliales a los efectos del TNF-alfa bajo (TNF- $\alpha$ ) y promover la permeabilidad endotelial, contribuyendo así a la morbilidad y a la mortalidad en la sepsis. En ciertas opciones de la divulgación, se usaron, por lo tanto, anticuerpos dirigidos a la eliminación de VEGF.

Por ende, ciertas opciones de la presente divulgación están generalmente dirigidas a la modificación de líquidos biológicos, p. ej., modificación extracorpórea de sangre, usando un circuito extracorpóreo, es decir, un circuito para líquido que sale del sujeto para tratamiento, y el líquido se devuelve al sujeto, p. ej., de forma continua. En algunos casos, un líquido biológico, tal como sangre, puede extraerse de un sujeto y exponerse a una molécula tal como un anticuerpo o ligando, que se puede usar para eliminar específicamente una o más sustancias tales como proteínas (por ejemplo, IL-6 o VEGF), u otras especies, de la sangre. Por ejemplo, el líquido biológico, tal como sangre, puede modificarse utilizando un circuito extracorpóreo que puede contener una o más superficies y un agente adecuado, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, uno o más agentes tales como anticuerpos o ligandos pueden anclarse a una partícula o a superficies de conjuntos de circuitos, de modo que el anticuerpo es el componente funcional de un sistema que se usa para dirigirse a una especie, tal como una citoquina. La superficie puede comprender un polímero, tal como dopamina polimerizada, poli(dimetilsiloxano), u otros polímeros como se discute en la presente memoria. El sistema anticuerpo/superficie puede ser, por ejemplo: (1) para la modificación de la superficie de circuitos extracorpóreos y/o (2) la creación de partículas ferromagnéticas (haciéndolas magnéticamente susceptibles), tales como nanopartículas, con núcleos superparamagnéticos, entre otras aplicaciones.

Por ejemplo, para la modificación de una superficie de un circuito extracorpóreo, un componente de cámara de un circuito extracorpóreo puede comprender una superficie y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una opción. En otra opción, el componente de cámara de un circuito extracorpóreo puede comprender una

partícula y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. La cámara puede incluir un compartimento o espacio a través del cual la sangre de un sujeto pasa durante la circulación extracorpórea. Por ejemplo, una superficie dentro de un circuito extracorpóreo puede estar recubierta, al menos parcialmente, con un anticuerpo, lo que la hace capaz de depurar las citoquinas de la sangre que circula por el sistema.

5 La cámara puede adoptar varias formas en diferentes opciones de la divulgación, pero normalmente contiene al menos una superficie y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un ligando, o un receptor. La superficie puede ser, por ejemplo, una superficie que define una pared de la cámara, una superficie interna contenida dentro de una cámara o una superficie de una partícula. En una opción, la cámara puede ser una cámara  
10 rectangular bien definida. Sin embargo, en algunas opciones, la cámara puede comprender un tubo, p. ej., al menos una parte del tubo está recubierta con el polímero o partícula y el anticuerpo. En algunas opciones, la cámara puede comprender un dispositivo microfluídico, p. ej., al menos una parte de los canales microfluídicos está recubierta con el polímero o partícula y el anticuerpo.

15 Como ejemplo no limitativo de un circuito extracorpóreo, en un conjunto de opciones, un líquido tal como sangre se extrae de un sujeto (p. ej., un ser humano), se pasa por un tubo y se devuelve al sujeto. El tubo puede comprender una superficie como parte del tubo que define una superficie que es capaz de extraer una o más sustancias tales como proteínas (u otras especies discutidas en la presente memoria) de la sangre. Por ejemplo, al menos una parte  
20 del tubo puede comprender una superficie que está recubierta al menos parcialmente con un anticuerpo como se discute en la presente memoria. Por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 % de la superficie interna del tubo puede estar recubierta. A medida que el líquido pasa por el tubo, al menos parte del anticuerpo (o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno  
25 del mismo, o ligando o receptor, etc.) en la superficie puede ser capaz de extraer una o más sustancias tales como proteínas (u otras especies discutidas en la presente memoria) de la sangre, p. ej., a través de la unión de las proteínas.

30 En algunas opciones, la cámara o tubo comprende o contiene un vehículo que lleva la superficie y el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, ligando o receptor. Un vehículo puede, por ejemplo, comprender partículas sólidas, p. ej., que comprenden polímero, cerámica, metal y/u otros materiales. El vehículo puede tener cualquier forma adecuada, p. ej., como partículas, fibras, cintas, etc. El vehículo puede ser relativamente inerte, p. ej., el vehículo se usa para aumentar el área superficial dentro de la cámara. El vehículo puede estar contenido dentro de la cámara y/o estar unido a una superficie dentro de la cámara. En algunas opciones, el área superficial de  
35 una cámara se incrementa para aumentar la cantidad de exposición de la superficie y del anticuerpo, tal como la incorporación de vehículos, deflectores, placas, rejillas, partículas u otras superficies adecuadas dentro de la cámara. En algunas opciones, un líquido biológico como sangre se extrae de un sujeto y se modifica a través de la interacción con una superficie, y luego al menos una parte del líquido biológico se reintroduce en el sujeto.

40 Sin embargo, en otro conjunto de opciones, las partículas que contienen anticuerpos pueden inyectarse en un sujeto, permitirse que se unan a una o más proteínas u otras especies dentro del sujeto, y luego eliminarse, causando así la eliminación de una o más sustancias tales como proteínas (por ejemplo, IL-6 o VEGF), u otras especies, de la sangre, p. ej., a través de un circuito extracorpóreo. Por ejemplo, un conjunto de opciones se dirige generalmente a partículas magnéticamente susceptibles, como nanopartículas, que comprenden una superficie y un  
45 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une selectivamente a una proteína sospechosa de estar dentro de la sangre de un sujeto. En algunas opciones, las partículas magnéticamente susceptibles se inyectan en un sujeto y se les permite circular. Después de un tiempo suficiente para unirse a la proteína (u otra especie), las partículas magnéticamente susceptibles se eliminan del sujeto. Por ejemplo, la sangre del sujeto se puede extraer mediante un circuito extracorpóreo que se magnetiza de manera que las partículas (ahora unidas a la proteína u otras especies) se extraen de la sangre que circula en el circuito extracorpóreo. En algunas opciones, las partículas son biodegradables y/o biocompatibles. En algunas opciones, se permite que las partículas circulen en el líquido biológico de un sujeto durante aproximadamente 12 horas o hasta aproximadamente 24 horas.

55 Las partículas magnéticamente susceptibles, tales como partículas ferromagnéticas, pueden seleccionarse en algunos casos para poseer una mayor densidad que otros elementos de la sangre. En consecuencia, en algunas opciones, estas partículas se eliminan de la sangre mediante centrifugación, magnetización o una combinación de estas y/u otras técnicas. En ciertas opciones, se extrae una alícuota de sangre de un sujeto, se mezcla con una cantidad predeterminada de partículas ferromagnéticas en condiciones que permiten una unión óptima al producto deseado para su eliminación. Tras la formación del complejo constituyente partícula:sangre, por ejemplo, la muestra  
60 se puede centrifugar y/o magnetizar para eliminar el componente sanguíneo diana.

Los circuitos extracorpóreos analizados anteriormente se pueden usar únicamente para eliminar una sustancia tal como una proteína u otra especie de un líquido biológico, o el circuito extracorpóreo se puede usar junto con otros sistemas y/o métodos. Por ejemplo, en algunas opciones, un polímero o partícula y un anticuerpo se incorporan a un  
65 circuito de derivación cardiopulmonar durante la cirugía cardíaca para prevenir (o al menos controlar) una respuesta inflamatoria.

**Polímeros/Sustratos**

Una superficie que comprende un polímero como se describe en la presente memoria puede ser la superficie de un sustrato como se analiza en la presente memoria. El sustrato se puede usar para extraer sustancias específicas tales como proteínas (u otras especies) de un líquido tal como la sangre. En algunos casos, los sustratos pueden formarse a partir del polímero o incluir el polímero. En otros casos, el sustrato puede formarse a partir de un material sobre el que se recubre el polímero en el mismo. En algunos casos, el sustrato puede estar presente como partículas tales como partículas de microgel. Ejemplos no limitativos de sustratos y polímeros compatibles con la presente divulgación se describen con más detalle en la solicitud PCT n.º PCT/US2012/026008, presentada el 22 de febrero de 2012, y de Mizrahi *et al.* (2011) *Advanced Materials* 23: H258-H262.

El sustrato puede tener cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el sustrato puede formarse como partículas, como un sustrato plano o similar. En un conjunto de opciones, el sustrato es polimérico. Por ejemplo, el sustrato puede incluir un polímero tal como poli(acrilamida), p. ej., formado a través de la polimerización de acrilamida y un resto quelante de metal adecuado, como se analiza a continuación. Por ejemplo, la acrilamida se puede polimerizar para formar poli(acrilamida) tras la exposición a persulfato de amonio, metilbisacrilamida y/o N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina ("TEMED"). En algunos casos, la polimerización puede ocurrir en una emulsión, p. ej., para formar partículas. Por ejemplo, se puede formar una emulsión cuando los monómeros están presentes dentro de gotitas distintas (p. ej., en un entorno acuoso) contenidas en una fase continua (p. ej., un entorno orgánico u "oleoso"), y la polimerización inducida en las gotitas distintas para formar partículas poliméricas.

Otros ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse en el sustrato incluyen, pero no se limitan a, poli(estireno), poli(propileno), poli(etileno), poli(dimetilsiloxano), agarosa, y similares, p. ej., además a y/o en lugar de poli(acrilamida). Otros ejemplos incluyen polietileno, poliestireno, silicona, polifluoroetileno, ácido poliacrílico, una poliamida (p. ej., nylon), policarbonato, polisulfona, poliuretano, polibutadieno, polibutileno, poliétersulfona, poliéterimida, óxido de polifenileno, pelimetilpenteno, polivinilcloruro, cloruro de polivinilideno, poliftalamida, sulfuro de polifenileno, poliéster, poliéterétercetona, poliimida, polimetilmetilato y/o polipropileno. Las partículas poliméricas u otros sustratos formados usando estos polímeros pueden formarse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

El sustrato puede tener cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el sustrato puede estar presente como partículas, o como la superficie de una cámara o un tubo. En algunas opciones, el sustrato puede tener un área superficial relativamente alta. Por ejemplo, el sustrato que tiene el anticuerpo unido o fragmento de unión a antígeno del mismo (o un ligando o un receptor, etc.) puede tener un área superficial de unión a los anticuerpos, etc. de al menos aproximadamente 0,01 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,02 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,03 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,05 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,1 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,2 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,3 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 0,5 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 1 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 3 m<sup>2</sup>, al menos aproximadamente 5 m<sup>2</sup>, o al menos aproximadamente 10 m<sup>2</sup>. En otro conjunto de opciones, el sustrato puede tener un área superficial promedio de al menos aproximadamente 5 m<sup>2</sup>/g, al menos aproximadamente 7 m<sup>2</sup>/g, o al menos aproximadamente 10 m<sup>2</sup>/g. En algunas opciones, el sustrato puede tener un volumen de poro promedio de al menos aproximadamente 0,005 cm<sup>3</sup>/g, al menos aproximadamente 0,01 cm<sup>3</sup>/g, o al menos aproximadamente 0,02 cm<sup>3</sup>/g.

Como se ha mencionado, el sustrato puede adoptar la forma de una o más partículas. En algunos casos, las partículas pueden incluir micropartículas y/o nanopartículas. Una "micropartícula" es una partícula que tiene un diámetro promedio del orden de micrómetros (es decir, entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 1 mm), mientras que una "nanopartícula" es una partícula que tiene un diámetro promedio del orden de nanómetros (es decir, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1 micrómetro). Como ejemplos adicionales, las partículas pueden tener un diámetro promedio de menos de aproximadamente 5 mm o 2 mm, o menos de aproximadamente 1 mm, o menos de aproximadamente 500 micrómetros, menos de aproximadamente 200 micrómetros, menos de aproximadamente 100 micrómetros, menos de aproximadamente 80 micrómetros, menos de aproximadamente 60 micrómetros, menos de aproximadamente 50 micrómetros, menos de aproximadamente 40 micrómetros, menos de aproximadamente 30 micrómetros, menos de aproximadamente 25 micrómetros, menos de aproximadamente 10 micrómetros, menos de aproximadamente 3 micrómetros, menos de aproximadamente 1 micrómetro, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 30 nm o menos de aproximadamente 10 nm. En algunas opciones, la partícula puede tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 1 micrómetro o al menos aproximadamente 10 micrómetros. Además, las partículas pueden ser esféricas o no esféricas. Si la partícula no es esférica, la partícula puede tener una forma de, por ejemplo, un elipsoide, un cubo, una fibra, un tubo, una varilla o una forma irregular. El diámetro promedio de una partícula no esférica es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que la partícula no esférica.

En ciertas opciones, el sustrato puede ser un gel. Ejemplos no limitantes de geles incluyen gel de poli(acrilamida) o gel de agarosa, u otros materiales de gel tales como los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, si el sustrato es una partícula, entonces el sustrato puede adoptar la forma de partículas de microgel o micropartículas de gel. En algunas opciones, las partículas de gel pueden recogerse entre sí para formar un material de gel o un "microgel". Normalmente un gel es relativamente sólido o gelatinoso, y puede incluir un polímero reticulado para formar su

estructura. En algunos casos, el gel puede ser un hidrogel, p. ej., un gel que contiene agua.

El sustrato puede ser poroso, en ciertas opciones de la divulgación. En algunas opciones, el sustrato puede tener un área superficial relativamente alta, por ejemplo, con un área superficial promedio de al menos aproximadamente 5 m<sup>2</sup>/g, al menos aproximadamente 7 m<sup>2</sup>/g, o al menos aproximadamente 10 m<sup>2</sup>/g. En algunas opciones, el sustrato puede tener un volumen de poro promedio de al menos aproximadamente 0,005 cm<sup>3</sup>/g, al menos aproximadamente 0,01 cm<sup>3</sup>/g, o al menos aproximadamente 0,02 cm<sup>3</sup>/g. En otras opciones, el sustrato puede tener una anchura de poro promedio de al menos aproximadamente 5 nm, al menos aproximadamente 7 nm o al menos aproximadamente 8 nm. Dichas porosidades y dimensiones pueden determinarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, TEM, SEM, BET o similares. La porosidad se puede crear, por ejemplo, debido a la naturaleza del polímero (p. ej., ciertos polímeros de gel, tales como los descritos en la presente memoria formarán normalmente estructuras relativamente porosas), o la porosidad se puede inducir al añadir otro material al sustrato que pueda ser eliminado, creando así porosidad en el sustrato. Por ejemplo, las sales u otras especies que pueden disolverse posteriormente pueden incorporarse en el sustrato.

En un conjunto de opciones, el sustrato adopta la forma de una o más partículas magnéticamente susceptibles, p. ej., con dimensiones, etc., como se describe en la presente memoria. En algunos casos, una partícula magnéticamente susceptible comprende al menos un material que es magnéticamente susceptible, p. ej., de manera que la partícula puede manipularse usando un campo magnético adecuado. Por ejemplo, la partícula puede comprender un material ferromagnético o un material superparamagnético, p. ej., hierro, cobalto, níquel o similares. En algunos casos, la parte de la partícula magnéticamente susceptible es un núcleo de la partícula, recubierto con polímero y/o un anticuerpo tal como se analiza en la presente memoria.

En varias opciones, el polímero puede ser un polímero interpenetrante o semiinterpenetrante, tal como una red de polímeros semiinterpenetrantes con un anticuerpo fijado a subunidades poliméricas a lo largo de la red. Una "red de polímeros interpenetrantes" o una "IPN, por sus siglas en inglés" comprende normalmente un material polimérico que comprende dos o más redes de dos o más polímeros (que pueden incluir copolímeros), al menos dos polímeros diferentes de los cuales están al menos parcialmente entrelazados uno con respecto al otro en una escala molecular, pero no unida covalentemente entre sí. Estas redes de polímeros no se pueden separar, ni siquiera en teoría, a menos que se rompan uno o más enlaces covalentes. Por ende, una mezcla de dos o más polímeros preformados (p. ej., como en una mezcla o en una combinación) no es una red de polímeros interpenetrantes. Ejemplos no limitativos específicos de una red interpenetrante incluyen [net-poli(estireno-stat-butadieno)]-ipn-[net-poli(acrilato de etilo)], poliHEMA-ipn-poliuretano, o poliHEMA-ipn-polisiloxano, en el que "poliHEMA" es poli(2-hidroxietilmetacrilato).

Los expertos en la materia son capaces de preparar IPNs usando técnicas adecuadas, por ejemplo, combinando diferentes precursores de polímeros que tienen la capacidad en condiciones determinadas para reaccionar para formar dos o más polímeros interpenetrantes diferentes que no se unen covalentemente entre sí, formando un primer polímero y permitiendo que un precursor de un segundo polímero se difunda en el primer polímero de manera interpenetrante y reaccione para formar el segundo polímero en condiciones que no promuevan la unión entre el primer y el segundo polímero, mezclando dos o más familias diferentes de monómeros, cada uno capaz de polimerizarse a través de diferentes mecanismos (por ejemplo, una reacción radical y una reacción de condensación) pero no son capaces de reaccionar entre sí y polimerizar secuencial o simultáneamente los monómeros usando calor y/o luz UV, al combinar dos o más polímeros lineales o ramificados con al menos un polímero que tiene grupos reactivos colgantes y posteriormente añadiendo una extensor de cadena para reticular cada uno de los polímeros en redes separadas, y/o al proceder un proceso de polimerización multietapas que incluye una primera red de polímeros que está parcialmente polimerizada para permitir una alta capacidad de hinchamiento y/o una fácil difusión de un segundo precursor de polímeros, permitiendo que el segundo precursor de polímeros penetre en la primera red de polímeros, y luego polimerice ambas redes de polímeros, etc.

Una "red de polímeros semiinterpenetrantes" o una "SIPN, por sus siglas en inglés", comprende normalmente un material polimérico que comprende una combinación de al menos una red de polímeros (que puede incluir un copolímero o copolímeros) y uno o más polímeros lineales o ramificados, caracterizada por la penetración, en una escala molecular, de al menos una de las redes por al menos algunas de las macromoléculas lineales o ramificadas. Las redes de polímeros semiinterpenetrantes también pueden definirse como similares a las redes de polímeros interpenetrantes, pero se distinguen porque un polímero(s) lineal(es) o ramificado(s) constituyente(s) puede(n) separarse (al menos en teoría) de la(s) red(es) de polímeros sin romper ningún enlace covalente. Sin embargo, tal separación requeriría un "desenroscado" del(los) polímero(s) lineal(es) o ramificado(s) de la red de polímeros, una imposibilidad para la mayoría de estos sistemas. Un ejemplo específico no limitativo de una red semiinterpenetrante es (net-poliestireno)-sipn-poli(cloruro de vinilo).

Como ejemplos adicionales, las redes de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes también se pueden formar a partir de combinaciones de polietilenos (p. ej., tetrafluoroetilenos) y polímeros de silicona, o acrilatos (p. ej., metilmetacrilatos) y uretanos y/o ureas. Los expertos en la materia son capaces de formar SIPNs mediante técnicas conocidas, por ejemplo, utilizando técnicas como las descritas anteriormente con referencia a redes interpenetrantes, o permitiendo que una solución de un polímero lineal o ramificado se difunda en una red de



polímeros, combinando dos o más redes poliméricas lineales o ramificadas con al menos un polímero que tiene grupos reactivos colgantes y luego añadiendo un extensor de cadena para reticular una de las redes poliméricas, al proceder un proceso de polimerización multietapas que incluye una primera red polimérica que está parcialmente polimerizada para permitir una alta capacidad de hinchamiento y/o una fácil difusión de un segundo precursor de polímero en la misma, y luego polimerizar la primera red de polímeros, etc.

Debe entenderse que un material de la divulgación puede incluir una red interpenetrante que incluye un componente o componentes semiinterpenetrantes; p. ej., un material de la divulgación puede incluir dos redes de polímeros que son interpenetrantes, y una tercera que es semiinterpenetrante con respecto a una o ambas redes interpenetrantes (y puede incluir cualquier número de componentes adicionales interpenetrantes o semiinterpenetrantes). Una red interpenetrante puede incluir un componente o componentes semiinterpenetrantes.

Los expertos en la técnica conocerán técnicas adecuadas para identificar y/o determinar redes de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes. Ejemplos de técnicas de caracterización para la identificación y/o determinación de un polímero a partir de una red de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes incluyen técnicas que permiten la observación de microdominios, a diferencia de polímeros o combinaciones de polímeros que se separan en macrodominios. Ejemplos de tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), que permite la identificación y/o determinación de múltiples temperaturas de transición vítrea (es decir, en una red de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes, cada uno de los polímeros que comprende la red puede tener diferentes temperaturas de transición vítrea); microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), que permite la identificación microscópica de los microdominios de las redes de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes; RMN CP-MAS de sólidos de  $^{13}\text{C}$  o  $^{29}\text{Si}$ , que permite la visualización de puntos de reticulación en las redes interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes en polímeros que tienen puntos de reticulación; técnicas de dispersión de neutrones a un ángulo pequeño (SANS, por sus siglas en inglés), que permiten la visualización de dominios en una muestra; análisis mecánico diferencial (DMA, por sus siglas en inglés), que permite determinar el módulo de cada polímero en la red de polímeros interpenetrantes y/o semiinterpenetrantes; o similares.

Debe apreciarse que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos asociados con ciertas opciones de la divulgación se pueden complejar o asociar de otro modo con un sistema polimérico de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. En algunas opciones, el sistema polimérico se activa a través de la oxidación de la superficie, tal como la oxidación por plasma u oxidación ácida. El sistema polimérico activado puede estar aminado en algunos casos por un aminosilano, tal como aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o aminopropiltriethoxisilano (APTES). En algunas opciones, el anticuerpo está unido a dopamina polimerizada por un enlazador de histidina. En algunas opciones, el enlazador de histidina es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de 15 histidinas. En ciertas opciones, el enlazador de histidina se forma a partir de 6-8 histidinas. En algunas opciones, el anticuerpo está unido al sistema polimérico mediante un enlazador APTMS-PEG-maleimida. Otros ejemplos de tipos adecuados de agentes de reticulación que están disponibles comercialmente y son conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, haloacetilos y piridilditioles. En algunas opciones, el anticuerpo se modifica químicamente, por ejemplo, al acoplarlo con N-succinimidilacrilato (NSA) o con una funcionalidad de furano (p. ej., para una reacción de Diels-Alder). En algunas opciones, la copolimerización se logra combinando el anticuerpo modificado con acrilamida, persulfato de amonio acuoso y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED).

Debe apreciarse que una superficie, tal como una superficie de un componente de cámara de un circuito extracorpóreo, puede modificarse con un polímero y/o hidrogel como se desvela en la presente memoria de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. En algunas opciones, los métodos de funcionalización de una superficie con películas de microgel polimérico se derivan de los métodos basados en la polimerización de injerto inducida por plasma de poli(ácido acrílico), como se describe en Singh *et al.* (2007) *Biomacromolecules* 8(10): 3271-5. En algunas opciones, una etiqueta de fotoafinidad, es decir, aminobenzofenona se introduce en la superficie.

En un conjunto de opciones, el sustrato puede estar cargado positiva o negativamente, p. ej., para facilitar la separación de proteínas u otros analitos. Por ejemplo, un analito puede estar cargado positivamente y un sustrato cargado negativamente puede facilitar la atracción del analito. Por ejemplo, una proteína puede estar cargada positivamente debido a residuos tales como glutamina o asparagina en la proteína, que puede ser atraída hacia partículas cargadas negativamente u otros sustratos. Como otro ejemplo, un analito puede estar cargado negativamente, y una partícula cargada positivamente puede facilitar la atracción del analito. Por ejemplo, un ácido nucleico tal como ADN o ARN puede estar cargado negativamente, y el ácido nucleico puede ser atraído hacia partículas cargadas positivamente u otros sustratos. En un conjunto de opciones, un ácido acrílico u otro monómero que produce residuos cargados negativamente puede incorporarse en el polímero o, de lo contrario, añadirse al sustrato para impartir una carga negativa en el sustrato. En otro conjunto de opciones, se puede usar un monómero que produce residuos cargados positivamente (p. ej., etilenimina) para impartir una carga positiva en un sustrato, p. ej., a través de la incorporación en el polímero u otra adición al sustrato.

El sustrato también puede comprender un resto quelante de metal, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o NTA (ácido nitrilotriacético), o derivados del mismo, al que pueden unirse iones metálicos, incluidos iones metálicos divalentes. Otros ejemplos no limitantes de restos quelantes de metal incluyen

varios ácidos poliamino carboxílicos tales como Fura-2, ácido iminodiacético, ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), o similares, y derivados de los mismos. El resto quelante de metal puede ser uno que sea capaz de unirse o formar complejos con iones metálicos, tales como iones metálicos divalentes. Ejemplos no limitantes de iones que pueden ser quelados por restos quelantes de metal incluyen níquel, cobalto, calcio, hierro o similares. Como ejemplo específico no limitativo, un resto quelante de metal puede unirse a iones níquel, de modo que un sustrato que contiene el resto quelante de metal también puede contener iones níquel distribuidos dentro del sustrato.

En algunas opciones, el resto quelante de metal puede incorporarse en la estructura polimérica de un sustrato. El resto quelante de metal puede estar presente como un monómero ya que diversos monómeros se polimerizan y/o se reticular para formar un sustrato polimérico, p. ej., formando un copolímero o una red de polímeros interpenetrantes o semiinterpenetrantes. Por ejemplo, el resto quelante de metal puede incorporarse en un polímero como un monómero de manera que cuando se forma el polímero, uno de los monómeros o residuos dentro del polímero es el resto quelante de metal. Como ejemplo específico no limitativo, se puede usar un derivado de NTA tal como ácido 2,20-(5-acrilamido-1-carboxipentilazanodiiil)diacético, que forma residuos de NTA cuando se incorpora dentro de un polímero.

En algunos casos, el resto quelante de metal puede distribuirse de manera esencialmente uniforme en todo el sustrato. Por ejemplo, la concentración del resto quelante de metal en la superficie del sustrato y en la masa o el centro del sustrato puede ser esencialmente la misma. Por ejemplo, la diferencia en la concentración del resto quelante de metal entre la superficie del sustrato y la masa o centro del sustrato no puede ser más de aproximadamente 40 %, no más de aproximadamente 35 %, no más de aproximadamente 30 %, no más de aproximadamente 25 %, no más de aproximadamente 20 %, no más de aproximadamente 15 %, no más de aproximadamente 10 % o no más de aproximadamente 5 %, en el que el porcentaje se toma en relación con el promedio de estas concentraciones en la superficie y en la masa o centro del sustrato.

La distribución del resto quelante de metal dentro del sustrato puede ser relativamente uniforme, por ejemplo, si el resto quelante de metal se forma como parte integral del sustrato a medida que se forma el sustrato. Por ejemplo, el resto quelante de metal puede incorporarse dentro de un polímero como un monómero dentro del polímero, dando como resultado una distribución relativamente uniforme del resto quelante de metal dentro del sustrato polimérico.

En algunas opciones, se puede permitir que los iones metálicos se distribuyan dentro del sustrato, p. ej., al exponerse o el sustrato a un líquido que contiene los iones metálicos, por ejemplo, de tal manera que los iones sean capaces de penetrar en el sustrato mediante difusión o otras fuerzas (p. ej., atracción de carga). En algunos casos, el sustrato puede sumergirse en el líquido. Los iones metálicos pueden distribuirse dentro del sustrato de manera uniforme o no uniforme, p. ej., dependiendo de la duración de la exposición. Por ejemplo, si el resto quelante de metal se distribuye de manera relativamente uniforme dentro del sustrato, entonces los iones metálicos atraídos por el resto quelante de metal también pueden volverse relativamente uniformes dentro del sustrato.

40

### **Anticuerpos**

La divulgación puede relacionarse con anticuerpos que se unen selectivamente a proteínas sospechosas de estar dentro de la sangre de un sujeto. Un anticuerpo es una proteína que normalmente incluye al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) entre los enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  están compuestas por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa en la presente memoria, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., una citoquina). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL y CH1; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de

65

un anticuerpo, (v) un fragmento dAb que consiste en un dominio V<sub>H</sub> o el dominio variable de un anticuerpo de cadena pesada, tal como un anticuerpo de cadena pesada de camélido (p. ej., V<sub>HH</sub>); (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); y (vii) construcciones polipeptídicas que comprenden los fragmentos de unión a antígeno de (i)-(vi). Además, aunque los dos dominios del fragmento F<sub>v</sub>, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, se pueden unir, por métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que el par de regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> forma moléculas monovalentes (conocidas como F<sub>v</sub> de cadena sencilla (scFv)). Estos anticuerpos de cadena sencilla también tienen por objeto incluirse dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando procedimientos convencionales, tales como procedimientos de fragmentación proteolítica, expresión de ácidos nucleicos recombinantes o similares. Los fragmentos se identifican sistemáticamente para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos aislados de la divulgación abarcan diversos isotipos de anticuerpos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE. Como se usa en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (p. ej., IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. Los anticuerpos, como se desvelan en la presente memoria, pueden ser de longitud completa o pueden incluir solo un fragmento de unión a antígeno tal como la constante de anticuerpo y/o el dominio variable de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE o podría consistir en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento F<sub>v</sub>.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser policlonales, monoclonales, o una mezcla de anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos de la divulgación pueden producirse mediante métodos desvelados en la presente memoria o mediante varias técnicas conocidas en la técnica, y muchos de dichos anticuerpos pueden obtenerse comercialmente.

La presente divulgación abarca tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, incluyendo anticuerpos preparados usando técnicas que se conocen en la técnica. Un anticuerpo monoclonal se refiere normalmente a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal puede mostrar una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal puede mostrar una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. El anticuerpo policlonal se refiere normalmente a una preparación de moléculas de anticuerpo que comprende una mezcla de anticuerpos activos que se unen específicamente a un antígeno específico.

Un proceso de producción de anticuerpos monoclonales puede incluir la obtención de células somáticas inmunes con el potencial para producir anticuerpos, en particular linfocitos B, que se han inmunizado previamente con el antígeno de interés *in vivo* o *in vitro* y que son adecuados para la fusión con una línea de mieloma de linfocitos B. Los linfocitos de mamíferos se inmunizan normalmente por inmunización *in vivo* del animal (p. ej., un ratón) con la proteína o polipéptido deseado, p. ej., una citoquina. Dichas inmunizaciones se repiten según sea necesario a intervalos de hasta varias semanas para obtener un título suficiente de anticuerpos. Una vez inmunizados, los animales se pueden usar como una fuente de linfocitos productores de anticuerpos que se pueden clonar y expresar de forma recombinante, como se explica más adelante. Tras el último refuerzo de antígeno, los animales se sacrifican y se extraen las células del bazo. Los linfocitos de ratón dan un mayor porcentaje de fusiones estables con las líneas de mieloma de ratón descritas en la presente memoria. De estos, se prefiere el ratón BALB/c. Sin embargo, otras razas de ratones, ratas, conejos, hámsteres, ovejas, cabras, camellos, llamas, ranas, etc. también pueden usarse como huéspedes para preparar células productoras de anticuerpos. También se pueden usar razas de ratón que tienen genes de inmunoglobulina humana insertados en el genoma (y que no pueden producir inmunoglobulinas de ratón). Los ejemplos incluyen las razas de ratón HuMAb producidas por Medarex/GenPharm International, y las cepas Xenomouse producidas por Abgenix. Tales ratones producen moléculas de inmunoglobulina completamente humanas en respuesta a la inmunización.

Las células productoras de anticuerpos que se encuentran en la etapa de división de plasmablastos se fusionan preferentemente. Las células somáticas pueden obtenerse a partir de los ganglios linfáticos, bazo y sangre periférica de animales cebados con antígeno, y las células linfáticas de elección dependen en gran medida de su utilidad empírica en el sistema de fusión particular. Los linfocitos secretores de anticuerpos se fusionan luego con células de mieloma de linfocitos B (de ratón) o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares, produciendo así una estirpe celular inmortal, secretora de inmunoglobulina. Las células fusionadas resultantes, o hibridomas, se cultivan, y las colonias resultantes se identifican sistemáticamente para la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Las colonias que producen dichos anticuerpos se clonan y se cultivan *in vivo* o *in vitro* para producir grandes cantidades de anticuerpo.

Las estirpes celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión que producen hibridomas son preferentemente no productoras de anticuerpos, tienen una alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de cultivarse en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de los hibridomas deseados. Los ejemplos de dichas estirpes celulares de mieloma que pueden usarse para la producción de estirpes celulares fusionadas incluyen, pero no se limitan a, Ag8, P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todos derivados de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3,

IR983F y 4B210 derivados de ratas y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todos derivados de humanos. Los expertos en la materia conocerán numerosos métodos de rutina para producir anticuerpos monoclonales.

- 5 La fusión con células de mieloma de mamífero u otras parejas de fusión capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular se efectúa mediante técnicas convencionales y bien conocidas, por ejemplo, usando polietilenglicol ("PEG") u otros agentes de fusión.

10 Los métodos para producir anticuerpos policlonales son bien conocidos por los expertos en la materia. Como ejemplo no limitativo, los anticuerpos policlonales pueden generarse administrando un polipéptido por vía subcutánea a conejos blancos de Nueva Zelanda que primero se han desangrado para obtener suero preinmunitario. El polipéptido puede inocularse (p. ej., inyectarse a) un volumen total de 100 microlitros por sitio en seis sitios diferentes, normalmente con uno o más adyuvantes. Luego, los conejos se desangran dos semanas después de la primera inyección y se refuerzan periódicamente con el mismo antígeno tres veces cada seis semanas. Una muestra de suero se recoge 10 días después de cada refuerzo. Los anticuerpos policlonales se recuperan del suero, preferentemente mediante cromatografía de afinidad utilizando citocromo acetilado para capturar el anticuerpo. Los expertos en la materia conocerán numerosos métodos de rutina para producir anticuerpos policlonales.

20 En otras opciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes generalmente incluyen anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina de otras especies, anticuerpos genomanipulados, anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

30 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación están, preferentemente, aislados. En algunos casos, el anticuerpo aislado no está presente en un organismo que produce endógenamente el anticuerpo, es decir, el anticuerpo se ha aislado del organismo. En algunos casos, los anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se refieren a un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) que está esencialmente libre de otros anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno) con diferentes especificidades antigénicas. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de un polipéptido (p. ej., una citoquina) puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, p. ej., una forma mutante de la citoquina, o un polipéptido de otras especies (p. ej., homólogos en otras especies). Además, un anticuerpo aislado (o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede estar esencialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.

40 Los anticuerpos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a anticuerpos que se unen específicamente a una citoquina. Como se usa en la presente memoria, "unión selectiva" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado con una preferencia que permite que el anticuerpo se use para distinguir el antígeno de otros. En algunas opciones, el anticuerpo se une a una sola proteína y puede distinguir esa proteína de todas las demás proteínas. En otras opciones, el anticuerpo se une a varias proteínas relacionadas diferentes y es capaz de distinguir esas proteínas de todas las demás proteínas.

45 En algunas opciones, múltiples anticuerpos, tales como múltiples anticuerpos monoclonales diferentes, se incorporan en el sistema polimérico en cualquier momento dado, dando como resultado un circuito extracorpóreo que es capaz de eliminar más de una citoquina a la vez. Al hacerlo, la naturaleza altamente específica del sistema se conserva y aún se expande para eliminar grupos de proteínas de una manera nunca antes descrita.

50 En algunas opciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, puede unirse específicamente a un antígeno con afinidad sub-nanomolar. Las constantes de disociación pueden ser aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  M o menos, preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M o menos, más preferentemente  $1 \times 10^{-11}$  M o menos. En una opción particular, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M.

60 Asimismo desvelado en la presente memoria, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a un epítipo conformacional de un polipéptido tal como una citoquina. Para determinar si los anticuerpos seleccionados se unen a epítopos conformacionales, cada anticuerpo se puede someter en ensayos que utilizan proteínas nativas (p. ej., inmunoprecipitación no desnaturizante, análisis de citometría de flujo de la unión de la superficie celular) y proteínas desnaturizadas (p. ej., membrana Western, inmunoprecipitación de proteínas desnaturizadas). Una comparación de los resultados indicará si los anticuerpos se unen a epítopos conformacionales. Los anticuerpos que se unen a la proteína nativa pero no a la proteína desnaturizada son aquellos anticuerpos que se unen a epítopos conformacionales, y son anticuerpos preferidos.

65 En algunas opciones, se usa un ligando, en lugar de un anticuerpo, para la unión selectiva a una sustancia tal como

una proteína en un líquido biológico tal como sangre.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación se puede enlazar a un marcador detectable. Un marcador detectable de la divulgación puede unirse a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención mediante protocolos convencionales conocidos en la técnica. En algunas opciones, los marcadores detectables pueden unirse covalentemente a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación. La unión covalente se puede lograr ya sea por condensación directa de las cadenas laterales existentes o por la incorporación de restos de puente externos. Muchos agentes bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteínas a otras proteínas, polipéptidos o funciones aminas, etc. Por ejemplo, la literatura está repleta de agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y diazobencenos. Este listado no tiene por objeto ser exhaustivo de los diversos agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino que, más bien, es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes.

**Tratamiento**

Los métodos desvelados en la presente memoria son útiles en algunas opciones para tratar a un sujeto que lo necesite. En algunas opciones, un sujeto que lo necesite puede ser un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, un sujeto que lo necesite puede ser un sujeto que tenga sepsis o choque séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) relacionada con un circuito de derivación cardiopulmonar, miastenia gravis, etc. En otras opciones, un sujeto en necesidad de los mismos puede ser un sujeto que tiene una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer. En su sentido más amplio, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a tratamientos tanto terapéuticos como profilácticos. Si el sujeto en necesidad de tratamiento experimenta una afección (es decir, tiene o está teniendo una afección particular), entonces "tratar la afección" se refiere a mejorar, reducir o eliminar uno o más síntomas asociados con el trastorno o la gravedad de la enfermedad o prevenir cualquier progresión posterior de la enfermedad. Si el sujeto en necesidad de tratamiento es alguien que está en riesgo de tener una afección, entonces tratar al sujeto se refiere a reducir el riesgo de que el sujeto tenga la afección o evitar que el sujeto la desarrolle.

Un sujeto, como se usa en la presente memoria, significa un humano o otro animal o mamífero vertebrado que incluye, pero no se limita a, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, roedor, ave y primate, p. ej., mono.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un polímero o partícula y un agente tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo asociado con la divulgación puede ser esa cantidad suficiente para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad tal como una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. Combinado con las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, al sopesar factores tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que sea eficaz para tratar al sujeto particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se trata, el tamaño del sujeto y la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de materiales asociados con la divulgación sin necesidad de experimentación indebida.

La presente divulgación también se refiere a sujetos que estratifican el riesgo basado en su perfil genético. Mediante el uso de tecnologías como los micromatrices genéticos, basados en un perfil de expresión génica, los niños y adultos con choque séptico ahora pueden ser estratificados por el riesgo de mortalidad predicho con gran precisión. El examen de los genes regulados al alza que conducen a la mortalidad en la sepsis revela que muchos de ellos son proteínas inflamatorias. Por lo tanto, la tecnología descrita en la presente memoria se puede utilizar para adaptar el circuito bioactivo a pacientes individuales para eliminar mediadores inflamatorios basados en la huella genética de la tecnología de micromatrices.

La presente divulgación también se refiere al uso de métodos y composiciones descritos en la presente memoria para detectar o analizar la presencia de una sustancia en un líquido biológico, tal como para fines de diagnóstico y/o pronóstico. En algunas opciones, el líquido biológico, tal como sangre, se extrae de un sujeto y se pone en contacto con un polímero o partícula unido a un agente, tal como un anticuerpo, y se analiza durante o después del contacto con el polímero o partícula. En algunas opciones, el líquido biológico, tal como sangre, se analiza durante o después de la circulación a través de un circuito extracorpóreo. Por ejemplo, en algunos casos, la sangre de un sujeto circula a través de un circuito extracorpóreo que contiene una cámara, en la que al menos una superficie de la cámara está cubierta con un agente específico tal como un anticuerpo, lo que permite la presencia y/o cantidad de una sustancia específica tal como una proteína en el líquido biológico a analizar.

Las partículas magnéticamente susceptibles asociadas con la divulgación, cuando se desea administrarlas sistémicamente, pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes

de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los ejemplos no limitantes de trastornos inflamatorios que pueden tratarse como se analiza en la presente memoria incluyen: sepsis o choque séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (ALI), acné vulgar, asma, enfermedades autoinmunitarias, celiaquía, prostatitis crónica, glomerulonefritis, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, rechazo al trasplante, vasculitis, cistitis intersticial, aterosclerosis, alergias, miopatías inflamatorias tales como dermatomiositis, polimiositis, y miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Chediak-Higashi y enfermedad granulomatosa crónica.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse como se analiza en la presente memoria incluyen: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerodermia, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina, colitis ulcerativa, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome de la antisintetasa, alergia atópica, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmunitaria, cardiomiopatía autoinmunitaria, enteropatía autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, neuropatía periférica autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, síndrome polendocrino autoinmunitario, dermatitis de progesterona autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide bulloso, cáncer, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Chrug-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, deficiencia del componente 2 del complemento, dermatitis por contacto, arteritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, angiitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Deigo, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus inducido por fármacos, lupus eritematoso discoide, eczema, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, epidermolísis ampollosa adquirida, eritema nodoso, eritoblastosis fetal, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante progresiva, alveolitis fibrosante (fibrosis pulmonar idiopática), gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestationis (penfagoide gestacional), hidradenitis supurativa, hipogammaglobulinemia, enfermedad desmielinizante inflamatoria idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (púrpura trombocitopénica autoinmunitaria), nefropatía por IgA, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, cistitis intersticial, artritis idiopática juvenil (artritis reumatoide juvenil), enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad por IgA lineal (LAD), enfermedad de Lou Gehrig (también esclerosis lateral amiotrófica), hepatitis lupoide (hepatitis autoinmunitaria), lupus eritematoso, síndrome de Majeed, enfermedad de Ménière, poliangiitis microscópica, síndrome de Miller-Fisher (síndrome de Guillain-Barre), enfermedad del tejido conectivo mixto, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann (pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda), esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuropelitis óptica (enfermedad de Devic), neuromiotonia, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclono-mioclono, tiroiditis de Ord, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos relacionados con estreptococos), degeneración cerebelar paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, encefalomiелitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenosa, aplasia pura de células rojas, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recurrente, síndrome de Reiter, síndrome de pierna inquieta, fibrosis retroperitoneal, artritis reumatoide, fiebre reumática, sarcoidosis, esquizofrenia, síndrome de Schmidt, síndrome de Schnitzler, escleritis, escleroderma, enfermedad de suero, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, enfermedad de Still (artritis reumatoide juvenil), síndrome de persona rígida, endocarditis bacteriana sub-aguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, corea de Sydenhan (PANDAS), oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico (lupus eritematoso), arteritis de Takayasu, arteritis temporal (también

conocida como "arteritis de células gigantes"), trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversal, colitis ulcerativa (un tipo de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática "IBD"), enfermedad de tejido conector no diferenciado, espondiloartropatía no diferenciada, vasculitis urticaria, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

5

### **Canales microfluídicos**

Como se ha mencionado, ciertas opciones pueden usar canales microfluídicos, p. ej., como una superficie que está al menos parcialmente cubierta con un agente adecuado, tal como un anticuerpo. Los canales microfluídicos generalmente tienen anchuras o diámetros de menos de aproximadamente 1 mm, y menos de aproximadamente 100 micrómetros en algunos casos. En algunas opciones, se pueden usar canales más grandes en lugar de, o junto con, canales microfluídicos para cualquiera de las opciones que se analizan en la presente memoria. Por ejemplo, en ciertos casos, se pueden usar canales con anchuras o diámetros de menos de aproximadamente 10 mm, menos de aproximadamente 9 mm, menos de aproximadamente 8 mm, menos de aproximadamente 7 mm, menos de aproximadamente 6 mm, menos de aproximadamente 5 mm, menos de aproximadamente 4 mm, menos de aproximadamente 3 mm, o menos de aproximadamente 2 mm. En todas las opciones, las anchuras especificadas pueden ser la anchura más pequeña (es decir, una anchura como la especificado en la que, en esa ubicación, el artículo puede tener una anchura mayor en una dimensión diferente), o una anchura mayor (es decir, en la que, en esa ubicación, el artículo tiene una anchura que no es más ancha que la especificada, pero puede tener una longitud que sea mayor). Así, por ejemplo, el canal microfluídico puede tener una dimensión de sección transversal media (p. ej., perpendicular a la dirección del flujo del líquido en el canal microfluídico) de menos de aproximadamente 1 mm, menos de aproximadamente 500 micrómetros, menos de aproximadamente 300 micrómetros, o menos de aproximadamente 100 micrómetros. En algunos casos, el canal microfluídico puede tener un diámetro promedio de menos de 60 micrómetros, menos de 50 micrómetros, menos de 40 micrómetros, menos de 30 micrómetros, menos de 25 micrómetros, menos de 10 micrómetros, menos de aproximadamente 5 micras, menos de aproximadamente 3 micras, o menos de aproximadamente 1 micrómetro.

Un canal puede tener cualquier relación de aspecto, p. ej., una relación de aspecto (longitud a la dimensión de sección transversal promedio) de al menos aproximadamente 1:1, al menos aproximadamente 2:1, más normalmente al menos aproximadamente 3:1, a al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 10:1, etc. Como se usa en la presente memoria, una "dimensión de sección transversal", en referencia a un canal fluido o microfluídico, se mide en una dirección generalmente perpendicular al flujo del líquido dentro del canal. Un canal generalmente incluirá características que facilitan el control sobre el transporte de líquidos, p. ej., características estructurales y/o características físicas o químicas (hidrofobicidad frente a hidrofiliidad) y/u otras características que pueden ejercer una fuerza (p. ej., una fuerza de contención) en un líquido. El líquido dentro del canal puede llenar parcial o completamente el canal. En algunos casos, el líquido puede mantenerse o confinarse dentro del canal o una parte del canal de alguna manera, por ejemplo, usando tensión superficial (p. ej., de tal manera que el líquido se mantenga dentro del canal dentro de un menisco, tal como un menisco cóncavo o convexo). En un artículo o sustrato, algunos (o todos) los canales pueden poseer un tamaño particular o inferior, por ejemplo, teniendo una dimensión mayor perpendicular al flujo de líquido de menos de aproximadamente 5 mm, menos de aproximadamente 2 mm, menos de aproximadamente 1 mm, menos de aproximadamente 500 micrómetros, menos de aproximadamente 200 micrómetros, menos de aproximadamente 100 micrómetros, menos de aproximadamente 60 micrómetros, menos de aproximadamente 50 micrómetros, menos de aproximadamente 40 micrómetros, menos de aproximadamente 30 micrómetros, menos de aproximadamente 25 micrómetros, menos de aproximadamente 10 micrómetros, menos de aproximadamente 3 micrómetros, menos de aproximadamente 1 micrómetro, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 30 nm o menos de aproximadamente 10 nm o menos en algunos casos. En una opción, el canal es un capilar. En algunos casos, el dispositivo puede contener una o más cámaras o depósitos para contener el líquido. En algunos casos, las cámaras pueden estar en comunicación fluida con uno o más transportadores de líquido y/o uno o más canales microfluídicos.

Se puede usar varios materiales y métodos, de acuerdo con la presente divulgación, para formar el dispositivo, p. ej., canales microfluídicos. Por ejemplo, varios componentes de la divulgación pueden formarse a partir de materiales sólidos, en los que los canales pueden formarse mediante micromaquinado, procesos de deposición de película tales como revestimiento por centrifugación y deposición química de vapor, fabricación por láser, técnicas fotolitográficas, métodos de grabado que incluyen química en húmedo o procesos de plasma, y similares. Véase, por ejemplo, *Scientific American*, 248:44-55, 1983 (Angell, *et al*).

En un conjunto de opciones, varios componentes de los sistemas y dispositivos desvelados en la presente memoria pueden estar formados por un polímero, por ejemplo, un polímero elastomérico como polidimetilsiloxano ("PDMS"), politetrafluoroetileno ("PTFE" o Teflon®), o similares. Por ejemplo, de acuerdo con una opción, se puede implementar un canal microfluídico fabricando el sistema fluido por separado utilizando PDMS u otras técnicas de litografía suave (los detalles de las técnicas de litografía suave adecuadas para esta opción se analizan en las referencias tituladas "Soft Lithography", de Younan Xia y George M. Whitesides, publicado en *Annual Review of Material Science*, 1998, Vol. 28, páginas 153-184, y "Soft Lithography in Biology and Biochemistry", de George M. Whitesides, Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang y Donald E. Ingber, publicado en *Annual Review of*

Biomedical Engineering, 2001, Vol. 3, páginas 335-373).

Otros ejemplos de polímeros potencialmente adecuados incluyen, pero no se limitan a, tereftalato de polietileno (PET), poliacrilato, polimetacrilato, policarbonato, poliestireno, polietileno, polipropileno, polivinilcloruro, politetrafluoroetileno, un polímero fluorado, una silicona tal como polidimetilsiloxano, cloruro de polivilideno, bis-benzociclobuteno ("BCB"), una poliimida, un derivado fluorado de una poliimida, o similares. También se contemplan combinaciones, copolímeros o combinaciones que incluyen polímeros, incluidos los descritos anteriormente. El dispositivo también puede estar formado de materiales compuestos, por ejemplo, un compuesto de un polímero y un material semiconductor.

En algunas opciones, varios componentes de la divulgación se fabrican con materiales poliméricos y/o flexibles y/o elastoméricos, y pueden formarse convenientemente de un líquido endurecible, facilitando la fabricación a través del moldeo (p. ej., moldeo de réplica, moldeo por inyección, moldeo por colada), etc.). El líquido endurecible puede ser esencialmente cualquier líquido que pueda inducirse para solidificarse, o que se solidifique espontáneamente, en un sólido capaz de contener y/o transportar líquidos contemplados para su uso en y con la red fluídica. En una opción, el líquido endurecible comprende un líquido polimérico o un precursor polimérico líquido (es decir, un "prepolímero"). Los líquidos poliméricos adecuados pueden incluir, por ejemplo, polímeros termoplásticos, polímeros termoestables, ceras, metales o mezclas o compuestos de los mismos calentados por encima de su punto de fusión. Como otro ejemplo, un líquido polimérico adecuado puede incluir una solución de uno o más polímeros en un disolvente adecuado, cuya solución forma un material polimérico sólido al eliminar el disolvente, por ejemplo, mediante evaporación. Dichos materiales poliméricos, que pueden solidificarse a partir de, por ejemplo, un estado de fusión o por evaporación del disolvente, son bien conocidos por los expertos en la materia. Varios materiales poliméricos, muchos de los cuales son elastoméricos, son adecuados, y también son adecuados para formar moldes o matrices de moldes, para opciones en las que una o ambas matrices de moldes están compuestas de un material elastomérico. Una lista no limitativa de ejemplos de tales polímeros incluye polímeros de las clases generales de polímeros de silicona, polímeros epoxi y polímeros de acrilato. Los polímeros epoxi se caracterizan por la presencia de un grupo éter cíclico de tres miembros comúnmente denominado grupo epoxi, 1,2-epóxido u oxirano. Por ejemplo, pueden usarse diglicidil éteres de bisfenol A, además de compuestos basados en aminas aromáticas, triazina y cadenas principales cicloalifáticas. Otro ejemplo incluye los conocidos polímeros Novolac. Los ejemplos no limitantes de elastómeros de silicona adecuados para su uso de acuerdo con la divulgación incluyen los formados a partir de precursores que incluyen clorosilanos tales como metilclorosilanos, etilclorosilanos, fenilclorosilanos, etc.

Los polímeros de silicona se usan en ciertas opciones, por ejemplo, el elastómero de silicona polidimetilsiloxano. Los ejemplos no limitativos de polímeros PDMS incluyen aquellos vendidos bajo la marca registrada Sylgard de Dow Chemical Co., Midland, MI y particularmente Sylgard 182, Sylgard 184 y Sylgard 186. Los polímeros de silicona, incluido el PDMS, tienen varias propiedades beneficiosas que simplifican la fabricación de las estructuras microfluídicas divulgadas en la presente memoria. Por ejemplo, tales materiales son baratos, son fácilmente disponibles y se pueden solidificar a partir de un líquido prepolimérico mediante curado con calor. Por ejemplo, los PDMS suelen curarse mediante la exposición del líquido prepolimérico a temperaturas de aproximadamente, por ejemplo, aproximadamente 65 °C a aproximadamente 75 °C para tiempos de exposición de, por ejemplo, aproximadamente una hora. Además, los polímeros de silicona, como el PDMS, pueden ser elastoméricos y, por ende, pueden ser útiles para formar características muy pequeñas con relaciones de aspecto relativamente altas, necesarias en ciertas opciones desveladas en la presente memoria. Los moldes o matrices flexibles (p. ej., elastoméricos) pueden ser ventajosos a este respecto.

Una ventaja de formar estructuras tales como estructuras microfluídicas de la divulgación a partir de polímeros de silicona, tales como PDMS, es la capacidad de tales polímeros para ser oxidados, por ejemplo, por exposición a un plasma que contiene oxígeno, como un plasma de aire, de modo que las estructuras oxidadas contienen, en su superficie, grupos químicos capaces de reticularse con otras superficies poliméricas de silicona oxidadas o con las superficies oxidadas de otros varios materiales poliméricos y no poliméricos. De este modo, los componentes se pueden fabricar y luego oxidar y esencialmente sellar de manera irreversible a otras superficies de polímeros de silicona, o a las superficies de otros sustratos reactivos con las superficies de polímeros de silicona oxidadas, sin la necesidad de adhesivos distintos u otros medios de sellado. En la mayoría de los casos, el sellado se puede completar simplemente poniendo en contacto una superficie de silicona oxidada con otra superficie sin la necesidad de aplicar presión auxiliar para formar el sello. Es decir, la superficie de silicona preoxidada actúa como un adhesivo de contacto contra las superficies de acoplamiento adecuadas. Específicamente, además de ser sellables irreversiblemente en sí, la silicona oxidada, tal como PDMS oxidado, también puede sellarse irreversiblemente a un intervalo de materiales oxidados distintos de la misma, que incluyen, por ejemplo, vidrio, silicio, óxido de silicio, cuarzo, nitruro de silicio, polietileno, poliestireno, carbono vítreo y polímeros epoxi, que se han oxidado de manera similar en la superficie de PDMS (por ejemplo, a través de la exposición a un plasma que contiene oxígeno). Los métodos de oxidación y sellado útiles en el contexto de la presente divulgación, así como las técnicas generales de moldeo, se describen en la técnica, por ejemplo, en un artículo titulado "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems and Polydimethylsiloxane", *Anal. Chem.*, 70:474-480, 1998 (Duffy *et al.*).



**Kits**

También desvelado en la presente memoria, la presente divulgación se refiere a un kit que incluye una o más de las composiciones previamente analizadas. Un "kit", como se usa en la presente memoria, define normalmente un paquete o un conjunto que incluye una o más de las composiciones de la divulgación, y/u otras composiciones asociadas con la divulgación, por ejemplo, como se ha descrito previamente. Cada una de las composiciones del kit, si está presente, se puede proporcionar en forma líquida (p. ej., en solución) o en forma sólida (p. ej., un polvo seco). En ciertos casos, algunas de las composiciones pueden ser constituibles o procesables de otra manera (p. ej., a una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie, que puede o no proporcionarse con el kit. Los ejemplos de otras composiciones que pueden estar asociadas con la divulgación incluyen, pero no se limitan a, disolventes, tensioactivos, diluyentes, sales, tampones, emulsionantes, agentes quelantes, cargas, antioxidantes, agentes aglutinantes, agentes de espesantes, conservantes, agentes de secado, antimicrobianos, agujas, jeringas, materiales de embalaje, tubos, botellas, matraces, vasos de precipitados, placas, fritas, filtros, anillos, abrazaderas, envoltorios, parches, recipientes, cintas, adhesivos y similares, por ejemplo, para usar, administrar, modificar, ensamblar, almacenar, empaquetar, preparar, mezclar, diluir y/o conservar los componentes de las composiciones para un uso particular, por ejemplo, para una muestra y/o un sujeto.

Un kit como se desvela en la presente memoria puede, en algunos casos, incluir instrucciones en cualquier forma que se proporcionen en relación con las composiciones de la divulgación de tal manera que un experto en la materia reconozca que las instrucciones deben ser asociadas a las composiciones de la divulgación. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir instrucciones para el uso, modificación, mezcla, dilución, conservación, administración, ensamblaje, almacenamiento, empaque y/o preparación de las composiciones y/u otras composiciones asociadas con el kit. En algunos casos, las instrucciones también pueden incluir instrucciones para el uso de las composiciones, por ejemplo, para un uso particular, p. ej., para una muestra. Las instrucciones pueden proporcionarse en cualquier forma reconocible por un experto en la materia como un vehículo adecuado para contener tales instrucciones, por ejemplo, escritas o publicadas, verbales, audibles (p. ej., telefónicas), digitales, ópticas, visuales (p. ej., cintas de video, DVD, etc.) o comunicaciones electrónicas (incluidas las comunicaciones basadas en web o en Internet), proporcionadas de cualquier manera.

En algunas opciones, la presente divulgación está dirigida a métodos para promover una o más opciones de la divulgación como se analiza en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, "promovido" incluye todos los métodos de hacer negocios, incluidos, entre otros, los métodos de venta, publicidad, asignación, licencia, contratación, instrucción, educación, investigación, importación, exportación, negociación, financiamiento, préstamo, comercialización, venta, reventa, distribución, reparación, reemplazo, aseguramiento, demanda, patentamiento, o similares, que estén asociados con los sistemas, dispositivos, aparatos, artículos, métodos, composiciones, kits, etc. de la divulgación como se analiza en la presente memoria. Los métodos de promoción pueden ser realizados por cualquier parte, incluidos, entre otros, agentes personales, empresas (públicas o privadas), sociedades, corporaciones, fideicomisos, agencias contractuales o subcontractales, instituciones educativas tales como institutos y universidades, instituciones de investigación, hospitales u otras instituciones clínicas, agencias gubernamentales, etc. Las actividades promocionales pueden incluir comunicaciones de cualquier forma (p. ej., comunicaciones escritas, orales y/o electrónicas, tales como, entre otras, correo electrónico, telefonía, Internet, basado en web, etc.) que están claramente asociados con la divulgación.

En un conjunto de opciones, el método de promoción puede implicar una o más instrucciones. Como se usa en la presente memoria, las "instrucciones" pueden definir un componente de la utilidad instruccional (p. ej., indicaciones, guías, advertencias, etiquetas, notas, FAQs o "preguntas frecuentes", etc.), y generalmente incluyen instrucciones escritas o relacionadas con la divulgación y/o con el embalaje de la divulgación. Las instrucciones también pueden incluir comunicaciones instruccionales en cualquier forma (p. ej., oral, electrónica, audible, digital, óptica, visual, etc.), siempre que el usuario reconozca claramente que las instrucciones deben estar asociadas con la divulgación, p. ej., como se analiza en la presente memoria.

Las tecnologías descritas en la presente memoria ofrecen ventajas significativas sobre las tecnologías desarrolladas previamente. Por ejemplo, en algunos casos la ventaja sobre los sistemas extracorpóreos existentes (como plasmaféresis o hemofiltración) de conferir una gran especificidad a través de la modificación de la superficie; la ventaja sobre las técnicas de anticuerpos monoclonales existentes de proporcionar un efecto limitado en el tiempo; y la capacidad de eliminar múltiples proteínas a la vez (en función de la cantidad de anticuerpos monoclonales que se incorporan al sistema) al tiempo que conserva la especificidad.

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar ciertas opciones de la presente divulgación, pero no ejemplifican el alcance completo de la invención.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: Construcción de un circuito extracorpóreo funcionalizado con anticuerpos capaz de reducir los niveles circulantes de una sustancia específica, tal como una citoquina, en líquidos biológicos**

5 La sepsis puede ser causada por una infección grave y puede llevar a la inducción de citoquinas inflamatorias o antiinflamatorias, dependiendo de numerosos factores. Se cree que la sepsis implica al menos dos etapas: un estallido inflamatorio inicial responsable de la hipotensión y la disfunción orgánica, seguido de una respuesta antiinflamatoria que produce una supresión inmunológica. Usando los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria, el síndrome septicémico se modula mediante la eliminación dirigida de citoquinas que se personaliza temporalmente para la etapa de la enfermedad. Se han realizado numerosos ensayos en el pasado con agentes destinados a modular el sistema inmunológico en la sepsis. Aunque la supervivencia temprana mejoró, la supervivencia a largo plazo no fue diferente (y quizás incluso peor). La eliminación de citoquinas por fésesis, filtración y hemodiálisis atenúa eficazmente los niveles de citoquinas (no específicamente, eliminando ambos tipos de citoquinas), pero no mejora los resultados clínicos. Aquí, se desarrolla un circuito extracorpóreo biológicamente activo, capaz de una eliminación de citoquinas altamente específica que se limita temporalmente a la fase apropiada del síndrome septicémico.

20 Usando los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria, el síndrome septicémico puede atenuarse en cualquier punto a lo largo de su progresión mediante la manipulación de citoquinas candidatas en puntos temporales distintos. Se describen circuitos extracorpóreos biológicamente activos que son capaces de modificar la composición de líquidos biológicos circulantes con gran especificidad. Inicialmente, la interleucina-6 (IL-6) está dirigida como un ejemplo de una citoquina específica. Ya sea mediante microgeles funcionales fijados a una superficie, o mediante la circulación de nanopartículas ferromagnéticas funcionales (FFN, por sus siglas en inglés) que pueden eliminarse con un campo magnético, o mediante cualquier otro sistema polimérico funcional, el resultado es atenuar los niveles de IL-6 en un sujeto séptico. La atenuación de una citoquina, tal como IL-6, con los circuitos biológicamente activos descritos en la presente memoria puede modificar el grado en que el corazón y los riñones desarrollan disfunción en sujetos sépticos.

### **30 Uso de microgeles para diseñar, producir y caracterizar un circuito extracorpóreo biológicamente activo (BAEC) capaz de reducir los niveles circulantes de una sustancia específica, tal como IL-6, en líquidos biológicos**

35 Aquí, los microgeles se funcionalizan con anticuerpos monoclonales (MAb) para crear microgeles funcionales capaces de eliminar las citoquinas de los líquidos biológicos. Un ejemplo de un líquido biológico de ensayo consiste en suero bovino fetal enriquecido deliberadamente con IL-6 y una citoquina de control TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ). Los microgeles funcionales se utilizan para construir nanopartículas ferromagnéticas (FFN) (micropartículas de microgel con un núcleo de hierro particulado), o se utilizan para la modificación de la superficie de circuitos extracorpóreos experimentales (EC, por sus siglas en inglés). Con la primera estrategia, los complejos FFN:IL-6 se eliminan mediante la aplicación de un campo magnético externo al circuito. En el segundo sistema, el conjunto de circuitos extracorpóreos modificados inmovilizan la IL-6 en la superficie luminal del líquido biológico de ensayo circulante a medida que pasa por el circuito. La eficiencia de eliminación, la capacidad y la especificidad se caracterizan por la cuantificación de las concentraciones de citoquinas en el líquido de ensayo antes y después del tratamiento con cada sistema BAEC.

45 Como ejemplo, se construye una red de polímeros semiinterpenetrante con anticuerpos monoclonales (tales como anticuerpos anti-IL-6 de rata) anclados a subunidades en todas partes. El microgel resultante se utiliza para desarrollar dos tipos de circuitos extracorpóreos bioactivos (dirigidos a la circulación de IL-6).

50 Para el primer BAEC, la red de polímeros semiinterpenetrante se modifica para crear nanopartículas con núcleos superparamagnéticos. Estas nanopartículas ferromagnéticas se unen a una proteína específica como IL-6 y forman complejos que se eliminan de la circulación cuando se aplica un campo magnético externo a un depósito en el circuito. La encapsulación de partículas magnéticas dentro de partículas de hinchamiento orgánico se realiza de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. La unión exitosa de IL-6 y la eficiente eliminación de la circulación impulsada magnéticamente se utiliza para modificar los líquidos biológicos complejos.

60 El segundo sistema BAEC se desarrolla al recubrir una superficie, tal como la superficie luminal, de un circuito extracorpóreo con una red de polímeros semiinterpenetrante. La modificación de la superficie con sistemas de microgel se realiza de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y se usa aquí para inmovilizar covalentemente el microgel a la superficie del circuito.

65 Ambos sistemas se someten a ensayos de especificidad, eficiencia de eliminación y capacidad de eliminación para determinar que pueden eliminar IL-6 de soluciones biológicas complejas en condiciones que se aproximan a la realidad clínica.

Un sistema de microgel capaz de inmovilizar proteínas específicas de una mezcla de moléculas biológicas se

describe en la solicitud PCT n.º PCT/US2012/026008, presentada el 22 de febrero de 2012. En algunas opciones, se producen partículas que tienen un resto quelante de ligando distribuido en toda la matriz. Este sistema tiene una alta densidad de ligandos, un rendimiento superior en comparación con las tecnologías anteriores y es fácilmente penetrado por las proteínas en solución.

5 Los polímeros, tales como polímeros dentro de sistemas de microgel, pueden funcionalizarse con anticuerpos para proteínas dirigidas y anclarse a superficies. Alternativamente, las partículas de magnetita superparamagnéticas se incorporan en el núcleo de la matriz para crear partículas de depuración magnética que se inyectan y luego se recogen mediante la magnetización del líquido en el que están suspendidas (figura 2).

10

## Métodos

### **Síntesis del microgel: MAb**

15 La síntesis del hidrogel de la red del polímero semiinterpenetrante del anticuerpo se realiza modificando químicamente la IgG monoclonal anti-rata de rata (RAIL-6) mediante su acoplamiento con N-succinimidilacrilato (NSA) en una solución tampón fosfato, utilizando métodos conocidos en la técnica. (Miyata *et al.* (1999) Nature 399(6738):766-9; Shoemaker *et al.* (1987) Applied Biochemistry and Biotechnology 15(1):11-24). Se añade NSA a una solución tampón fosfato (0,02 M, pH 7,4) que contiene IgG RAIL-6 (la relación molar de NSA/IgG RAIL-6 es 6:1),  
20 y la reacción se incuba a 36 °C durante una hora para introducir los grupos vinílicos en IgG RAIL-6. El vinilo resultante (IG RAIL-6) se purifica con un tubo de diálisis. Se añade acrilamida a la solución de vinilo (IG RAIL-6), junto con persulfato de amonio acuoso 0,1 M y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina acuosa (TEMED) 0,8 M como iniciadores redox, y la copolimerización se realiza a 25 °C durante 3 horas para sintetizar la IgG RAIL-6 polimerizada (figura 3).

### 25 **Modificación de superficie de BAEC**

Los métodos para funcionalizar tubos con películas de microgel polimérico se derivan de métodos anteriores basados en la polimerización de injerto inducida por plasma de poli(ácido acrílico) (Singh *et al.* (2007) Biomacromolecules 8(10):3271-5. Con el fin de hacer que el método sea más general y para dar a la película de  
30 microgel adherente más estabilidad en entornos biológicos, se puede introducir una etiqueta de fotoafinidad, es decir, aminobenzofenona en la superficie. Tras la excitación con irradiación UV, las moléculas de la familia de las benzofenonas tienen la capacidad de extraer un átomo de hidrógeno alifático de cualquier cadena polimérica cercana que forme un enlace covalente carbono-carbono. Cuando un microgel está presente en las inmediaciones de la benzofenona, la benzofenona puede servir como un pegamento entre el sustrato y la película de microgel.

35

### **Partículas ferromagnéticas**

Las nanopartículas de microgel magnéticas se producen incrustando la magnetita superparamagnética dentro del polímero utilizando la suspensión, la emulsión o la polimerización por precipitación habitual durante la fabricación del  
40 microgel.

### **Preparación de la solución biológica de ensayo**

Se añade interleucina-6 al suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) en tres concentraciones: 20, 110 y 200  
45 pg/ml. Estos valores se derivan de investigadores anteriores que midieron las concentraciones de IL-6 en ratas sépticas con el tiempo. Como control, se añade TNF-alfa a la solución a 20 pg/ml.

### **Configuración experimental**

50 Para ambos sistemas BAEC, los circuitos consisten en una bomba de rodillo y un circuito de tubo de cloruro de polivinilo de 30 cm (diámetro interno de 3 mm) que contiene una vejiga del depósito de silicona Medtronic R-14 y una válvula de cierre de 3 vías (figura 4). El circuito se llena con la solución biológica de ensayo y la bomba de rodillo se opera para obtener un caudal de 30-40 ml/min. Estos caudales son análogos a 100 ml/kg / min para ratas Sprague-Dawley macho adultas (350-450 gramos), que se utilizan en los estudios con animales. Dependiendo de la  
55 investigación, la superficie de la vejiga se modifica con un microgel funcional para depurar IL-6 o se aplica un campo magnético externo para eliminar los complejos FFN:IL-6 circulantes que se forman después de la inyección de FFN en el circuito. La solución biológica se somete a tratamiento mediante uno de los dos métodos.

60 1. EC de superficie modificada para la eliminación de IL-6: la suspensión biológica se somete a circulación a través del circuito durante duraciones predeterminadas a fin de caracterizar la eficiencia de eliminación de IL-6 y la capacidad de eliminación. La especificidad se evalúa utilizando TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ) como control. Inicialmente estos intervalos son de 1, 2 y 4 horas. Los ajustes en la duración y la química de la superficie se realizan según sea necesario para optimizar el rendimiento antes de continuar con los ensayos con animales. La solución biológica de ensayo tratada se extrae de la válvula de cierre de 3 vías para los experimentos de ELISA y cultivo celular.

65

2. Eliminación de IL-6 asistida magnéticamente: Las micropartículas se inyectan en uno de los puertos de la

vejiga de reservorio y se dejan circular durante intervalos de tiempo predeterminados (inicialmente 1, 2 y 4 horas). Al final del tiempo de circulación, se aplica un campo magnético externo a la vejiga de reservorio para inmovilizar los complejos funcionales de nanopartículas ferromagnéticas:IL-6 de la circulación. La suspensión biológica tratada se retira de la válvula de cierre de 3 vías para los experimentos de ELISA y cultivo celular. La cantidad de micropartículas necesarias para atenuar los niveles de IL-6 se determina a medida que se caracteriza su rendimiento.

### **Evaluación de concentraciones de citoquinas**

Las concentraciones de TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6 en la solución biológica de ensayo tratada se miden mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales de rata anti-citoquina de rata.

### **Ejemplo 2: Caracterización del impacto biológico *in vitro* del tratamiento de líquidos biológicos enriquecidos con IL-6 con circuitos extracorpóreos biológicamente activos.**

Aquí, el líquido de ensayo enriquecido con citoquinas se hace circular a través de uno de los dos sistemas BAEC. Para el primer grupo de tratamiento, los FFN dirigidos a IL-6 se inyectan en el circuito y se dejan circular durante intervalos de tiempo predeterminados, seguido de la eliminación de los complejos FFN:IL-6 mediante la aplicación de un campo magnético externo. El segundo grupo de tratamiento consiste en una EC en la cual la superficie luminal ha sido modificada por la FM dirigida a IL-6, lo que resulta en la inmovilización de IL-6 en el lumen de EC. Los cardiomiocitos de rata se cultivan en el líquido biológico antes y después del tratamiento con BAEC y se evalúan para determinar la contractilidad y la viabilidad. Estos experimentos demuestran la influencia de BAEC sobre la viabilidad celular y la contractilidad por la eliminación de IL-6.

Existe una creciente evidencia de que la IL-6 posee propiedades inotrópicas negativas, basadas en experimentos que implican el cultivo de cardiomiocitos en medios que contienen líquidos biológicos enriquecidos con citoquinas. Parámetros *in vitro* de contractilidad, así como la citotoxicidad, deben estar influenciados por la concentración de IL-6. Los líquidos biológicos enriquecidos con citoquinas tratados con los sistemas BAEC descritos en la presente memoria dan como resultado la delección de IL-6 del líquido de ensayo. La capacidad de cada sistema BAEC para modificar la depresión y la citotoxicidad de los cardiomiocitos es demostrable al comparar estos parámetros en células cultivadas en líquidos biológicos antes y después de la eliminación de IL-6. Estos experimentos proporcionan información sobre la influencia biológica de estos circuitos bioactivos. Además, estos experimentos proporcionan la estructura para el tratamiento del líquido biológico para eliminar la(s) proteína(s) candidata(s) y la caracterización del efecto de la eliminación de proteínas en la función celular (selección de tipo celular guiada por la influencia hipotética de la proteína en la función celular).

### **Métodos**

Los miocitos ventriculares se obtienen de ratas Sprague-Dawley macho adultas (300-400 g) y se preparan mediante el método de perfusión con colagenasa utilizando técnicas enzimáticas convencionales descritas anteriormente (Lee *et al.* (1979) *Nature* 278(5701):269-71; Louch *et al.* (2011) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51(3):288-98). Las células aisladas se diluyen a una concentración de  $10^4$  células/ml y se incuban en placas de 24 pocillos (alícuotas de 2 ml) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> con solución biológica de ensayo durante periodos de 0-48 horas.

### **Detección de la actividad depresora del miocardio**

El método utilizado está adaptado del descrito anteriormente por Pathan *et al.* (2002) *Critical Care Medicine* 30(10):2191-8. Miocitos ventriculares en solución de Tyrode (NaCl 140 mM, KCl 6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, glucosa 10 mM, ácido N-hidroxietilpiperazina-N-2-etansulfónico 10 mM, con NaOH para ajustar el pH a 7,3-7,4) se colocan en una cámara de Perspex en la platina de un microscopio invertido y se les permite unir espontáneamente a la superficie. Después de 5 minutos, las células se sobrefunden con solución de Tyrode a una velocidad de 1 ml/min y se calientan a 37 °C. La contracción se induce mediante la estimulación de campo (0,5 Hz, 30 V, 0.2 ms). Una célula individual se muestra en un monitor. Un dispositivo de detección de bordes se usa para medir la longitud de la célula, de modo que los cambios en la longitud con las contracciones se transmiten como una señal eléctrica. La contractilidad de los miocitos se caracteriza por la amplitud de la contracción, la velocidad de contracción y la velocidad de relajación.

### **Determinación de la viabilidad de los miocitos ventriculares**

Para evaluar cuantitativamente la viabilidad celular después de añadir la solución de ensayo, se utiliza un ensayo colorimétrico (kit de [MTT] (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro, Promega G4100; Madison, WI). En los miocitos cardíacos vivos, la sal de tetrazolio amarilla se metaboliza en cristales de formazán púrpura insolubles. Se añade un detergente para solubilizar los cristales y luego se cuantifica el color por medios espectrofotométricos.

**Efecto de la sustancia de ensayo sobre los miocitos ventriculares**

La contractilidad celular se caracteriza inmediatamente antes y 5 minutos después de la exposición a la sustancia de ensayo para evaluar los cambios agudos en la contracción del miocito. Los efectos latentes se miden después de 24-48 horas de incubación. La viabilidad celular se cuantifica después de 24 y 48 horas de incubación en la solución de ensayo.

**Ejemplo 3: Inmovilización de citoquinas circulantes de ratas sépticas utilizando el circuito extracorpóreo biológicamente activo.**

La interleucina-6 se ha implicado en el desarrollo de depresión miocárdica en la sepsis meningocócica, así como en la lesión renal aguda. Aquí, las técnicas del conjunto de circuitos extracorpóreos se utilizan en ratas que se han convertido en sépticas mediante el modelo de ligamiento y punción cecal (CLP) y luego se conectaron a los sistemas BAEC para la eliminación de IL-6. Las concentraciones de citoquinas se miden en intervalos de tiempo predeterminados. La función miocárdica se evalúa mediante ecocardiografía y la lesión renal se caracteriza por BUN y creatinina en suero, así como histología postmortem. Los niveles de IL-6 se correlacionan con las mediciones de la función miocárdica y la lesión renal.

La ecocardiografía es el método más importante para obtener imágenes del sistema cardiovascular en animales pequeños ya que es no invasivo, versátil, está ampliamente disponible y es adecuado para estudios en serie. Los índices de función sistólica global se pueden obtener de manera fácil y confiable. Las elevaciones en el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina en suero se midieron con la lesión renal asociada a IL-6 en ratones y se correlacionaron con los marcadores histológicos de lesión post-mortem. Por estas razones, la ecocardiografía se usa para medir en serie la función miocárdica, y el BUN y la creatinina para medir la función renal a medida que se elimina la IL-6 de la circulación.

Además de poseer propiedades inotrópicas negativas, se ha demostrado que la IL-6 media en la lesión renal aguda (AKI, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, las ratas que se convierten en sépticas por ligamiento y punción cecal deben manifestar depresión miocárdica y AKI que se correlaciona directamente con la concentración de IL-6 circulante. Aquí, el sistema BAEC se somete a ensayo para la atenuación de los niveles de IL-6 en ratas sépticas. Los niveles de IL-6 se miden a lo largo del tiempo durante el tratamiento con los circuitos bioactivos. La ecocardiografía se usa para medir la función del miocardio; el nitrógeno ureico en sangre, la creatinina y la histología postmortem se utilizan para medir el grado de AKI. Estos parámetros se correlacionan con los niveles de IL-6 circulantes, lo que permite conocer cómo funcionan estos sistemas *in vivo*.

**Métodos****Inducción de choque séptico e iniciación del circuito venovenoso**

Aquí, se conectan ratas sépticas a un circuito venovenoso (figura 5). Después de la inducción de la anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/kg), las ratas Sprague-Dawley adultas macho se convierten en sépticas por ligamiento y punción cecal (CLP). Se administra un bolo subcutáneo de solución salina normal de 50 ml/kg como resucitación con líquidos y los animales regresan a sus jaulas y se les permite alimentación y agua *ad libitum*. Siete horas después de la CLP, los animales se vuelven a anestesiarse e intubar con un angiocatéter a través de una traqueotomía. La ventilación mecánica se realiza con un ventilador de roedores Harvard a un volumen tidal de 10 ml/kg para mantener una PO<sub>2</sub> arterial entre 35 y 45 mm Hg. La vena femoral derecha y las venas yugulares derechas están aisladas y canuladas con angiocatéteres de tamaño apropiado. La heparina (1000 UI) se administra antes del inicio del flujo en el circuito. El circuito está configurado para fluir a una velocidad de 30-40 ml/min (100 ml/kg/min). Los animales se someten a tratamiento con una EC modificada en la superficie o con la eliminación de IL-6 asistida magnéticamente. A intervalos de tiempo predeterminados, la función miocárdica se controla mediante ecocardiografía (fracción de eyección, fracción de acortamiento). Se toman muestras de BUN y de creatinina en suero para identificar una lesión renal aguda (AKI). Las concentraciones de IL-6 y TNF-alfa circulantes se controlan mediante ELISA específico de rata durante todo el tratamiento.

**EC modificada en superficie para la eliminación de IL-6**

Siete horas después de la CLP, los animales asignados al grupo EC modificado en superficie se someten a ventilación mecánica y se colocan en el circuito. La sangre se extrae de la válvula de cierre de 3 vías y la ecocardiografía se realiza a las 8, 12, 16 y 20 horas después de la CLP.

**Eliminación de IL-6 asistida magnéticamente**

Siete horas después de la CLP, los animales asignados al grupo funcional de micropartículas ferromagnéticas se someten a ventilación mecánica y se colocan en el circuito. Las micropartículas ferromagnéticas se inyectan por vía intravenosa durante el procedimiento de canulación. Se aplica un campo magnético externo al reservorio venoso a las 8, 12 y 16 horas después de la CLP para eliminar las citoquinas opsonizadas de la circulación. Se extrae sangre

y se realiza un ecocardiograma a las 8, 12, 16 y 20 horas después de la CLP.

#### **Evaluación histológica de los riñones**

5 Se han propuesto varios mecanismos patofisiológicos diferentes para la AKI inducida por sepsis, con una tormenta sistémica de citoquinas o reacciones locales de citoquinas como característica principal. Recientemente, se ha demostrado que la inflamación mediada por IL-6 mejora la lesión renal después de la isquemia. Los riñones se extraen de las ratas después de la eutanasia y se fijan en formaldehído, seguido de deshidratación con etanol. El tejido se incrusta en Paraplast y se secciona, seguido de desparafinización con xileno y tinción con hematoxilina y eosina. Luego, las muestras se evalúan para determinar el influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los tejidos renales. El número total de leucocitos infiltrantes en los espacios intersticiales corticales se evalúa cuantitativamente al contar el número de PMN en 20 campos de alta potencia.

#### **Medición de malondialdehído (MDA)**

15 Los niveles de MDA en muestras de riñón se determinan como un indicador de la peroxidación lipídica resultante de la inflamación. Las muestras de tejido renal se homogeneizan en una solución de KCl al 1,15 % y el homogeneizado se añade a una mezcla de reacción de SDS, ácido acético, ácido tiobarbitúrico y agua destilada. Después de hervir la mezcla, la MDA se cuantifica por medios espectrofotométricos (650 nm).

#### **Análisis inmunohistoquímico de ICAM-1 y P-selectina**

25 La localización de la ICAM-1 y la P-selectina en las secciones de riñón se determina como se ha descrito previamente (Patel *et al.* (2005) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312(3): págs. 1170-8. Las secciones de riñón se incuban durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario anti-ICAM-1 o anti-P-selectina [1:500 (v/v) en PBS]. Después de bloquear la avidina endógena y la biotina, se visualiza el marcaje específico del complejo antígeno-anticuerpo utilizando el cromógeno diaminobencidina.

#### **Análisis estadístico**

30 Todos los análisis se realizan utilizando el software IBM SPSS Statistics 19. A menos que se indique lo contrario, todos los resultados se miden en una escala continua. Las comparaciones de la amplitud de la contracción, el cambio porcentual en la amplitud de la contracción y la viabilidad celular entre los grupos se evalúan con los ensayos de Mann-Whitney. El ensayo de Kruskal-Wallis se utiliza para evaluar la diferencia en las concentraciones de interleucina 6, BUN y creatinina entre los grupos. La comparación entre los grupos clínicos para la fracción de acortamiento y la fracción de eyección también se realiza con los ensayos de Kruskal-Wallis. Para la puntuación histológica, los datos se analizan mediante un análisis de varianza unidireccional.

#### **Ejemplo 4: Construcción de un circuito extracorpóreo biológicamente activo (BAEC) que implica la modificación de la superficie de un tubo de polímero que es capaz de eliminar selectivamente las citoquinas circulantes de los líquidos biológicos.**

45 Se desarrolló un BAEC utilizando un tubo de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) con un diámetro interno de 3 mm. Inicialmente, el VEGF se dirigió como un ejemplo de una citoquina específica, y la superficie interna del tubo de PDMS se funcionalizó de tal manera que el sustrato polimérico se conectó a través de enlazadores de APTMS-NHS PEG maleimida a anticuerpos anti-VEGF. Esto creó una superficie capaz de eliminar selectivamente el VEGF de los líquidos biológicos que pasan por el tubo.

#### **Métodos**

##### **Funcionalización superficial de BAEC**

50 La funcionalización de la superficie luminal del tubo de PDMS se realizó a través de cuatro reacciones secuenciales (figura 6). Primero, la superficie de PDMS se oxidó para crear restos de Si-OH reactivos usando un oxidante de plasma durante dos minutos. En segundo lugar, la superficie de PDMS activada se incubó con aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) al 5 % (p/v) en acetona seca durante 60 minutos para injertar de forma covalente APTMS en los restos de silanol. En tercer lugar, se añadió NHS-PEG-maleimida a pH 8,5, dando como resultado un ancla (APTMS)-(maleimida PEG) fijada a la superficie de PDMS. Para evitar la hidrólisis, los tubos se almacenaron en ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) a pH 5,5. En cuarto lugar, se añadió un anticuerpo anti-VEGF, y el ancla (APTMS)-(maleimida PEG) se unió covalentemente a grupos tiol en el anticuerpo. Para reducir la unión no específica, la superficie se incubó con 5 % (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante 48 horas.

##### **Preparación de la solución biológica de ensayo**

65 Se prepararon suspensiones de VEGF (citoquina dirigida) e IL-6 (citoquina de control no dirigida) a una

concentración de 2000 pg/ml en una solución de BSA al 5 % (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) a 37 °C.

**Configuración experimental**

5 La solución de ensayo biológico se colocó en un depósito con una salida y una entrada conectada por un tubo de PDMS funcionalizado con anticuerpo anti-VEGF. La circulación continua del líquido del depósito a través del circuito fue impulsada por una bomba peristáltica a un caudal fisiológicamente relevante de 40 ml/min a 37 °C.

**Evaluación de concentraciones de citoquinas**

10 Las concentraciones de VEGF e IL-6 en la solución biológica de ensayo tratada se cuantificaron a lo largo del tiempo mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Todo el VEGF circulante se eliminó de la solución después de 4 horas, mientras que la IL-6 no se vio afectada en gran medida (figura 7).

**15 Ejemplo 5: Construcción de un circuito extracorpóreo biológicamente activo (BAEC) que implica la modificación de la superficie de los canales microfluídicos que es capaz de eliminar selectivamente las citoquinas circulantes de los líquidos biológicos.**

20 Los BAEC se desarrollarán utilizando canales microfluídicos. Los canales microfluídicos de PDMS se han construido con diámetros internos que varían de 20 a 80 micrómetros (µm). Usando los métodos del Ejemplo 4, la superficie interna de los canales microfluídicos de PDMS se funcionalizará de tal manera que el sustrato polimérico esté conectado mediante enlazadores de maleimida a anticuerpos anti-VEGF. Esto creará un sistema capaz de eliminar VEGF selectivamente de los líquidos biológicos que pasan por los canales microfluídicos.

**25 Ejemplo 6: Demostración de los efectos biológicos de la depuración de citoquinas en un modelo de cultivo celular.**

30 El VEGF y la IL-6 aumentan la permeabilidad microvascular (es decir, la fuga capilar) *in vivo* y aumentan la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales *in vitro*. Las monocapas de células endoteliales que se cultivan en membranas semipermeables son impermeables a la albúmina. Cuando se incuban en VEGF y/o IL-6, se vuelven permeables con el tiempo (análogo al desarrollo de la fuga capilar). Esto se puede cuantificar mediante el ensayo de permeabilidad de albúmina difusiva. Las células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC, por sus siglas en inglés) se incuban con medios que contienen VEGF y/o IL-6 durante intervalos de tiempo predeterminados (medios de citoquinas no tratados). Las monocapas de HUVEC separadas se incuban en medios enriquecidos con citoquinas que han sido sometidos a circulación a través de circuitos funcionalizados durante  
35 varias duraciones de tiempo para eliminar VEGF y/o IL-6 (es decir, medios tratados). La permeabilidad difusiva de la albúmina se cuantifica en cada población para documentar la influencia de la filtración selectiva de citoquinas en el desarrollo de la fuga capilar.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo, que comprende:  
un circuito extracorpóreo que comprende un tubo que tiene una superficie interna y un anticuerpo o un fragmento de  
5 unión a antígeno del mismo unidos a un sustrato que forma la superficie interna del tubo, en donde el sustrato  
comprende un microgel polimérico.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo son  
10 específicos para una citoquina inflamatoria.
3. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo son  
específicos para IL-6 o VEGF.
4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno  
15 del mismo están fijados al microgel polimérico, opcionalmente en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a  
antígeno del mismo están fijados al microgel polimérico mediante un agente de reticulación, opcionalmente en donde  
el agente de reticulación comprende aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o NHS-PEG-maleimida.
- 20 5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que el tubo comprende silicona y/o poli(dimetilsiloxano).



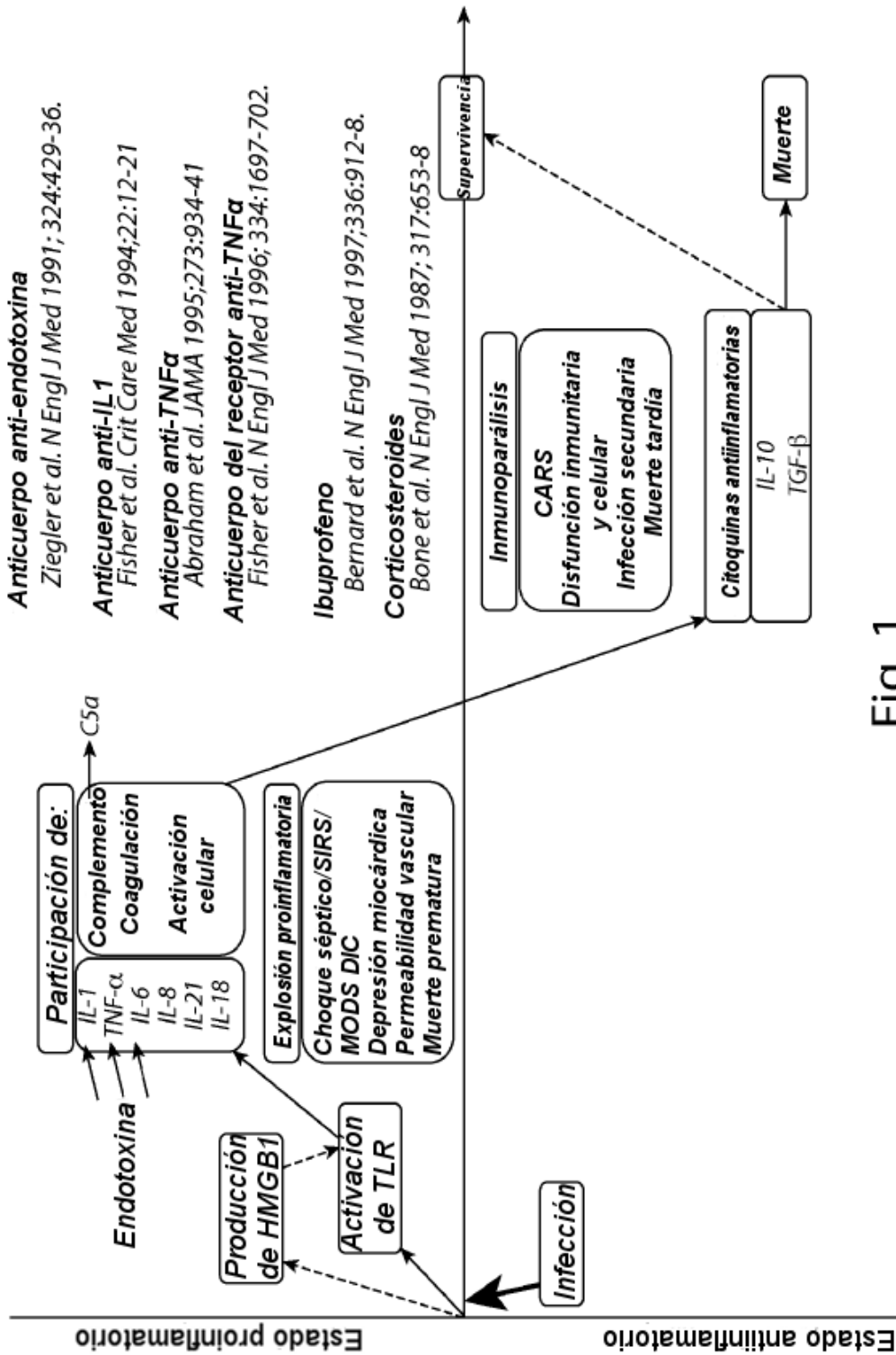


Fig. 1

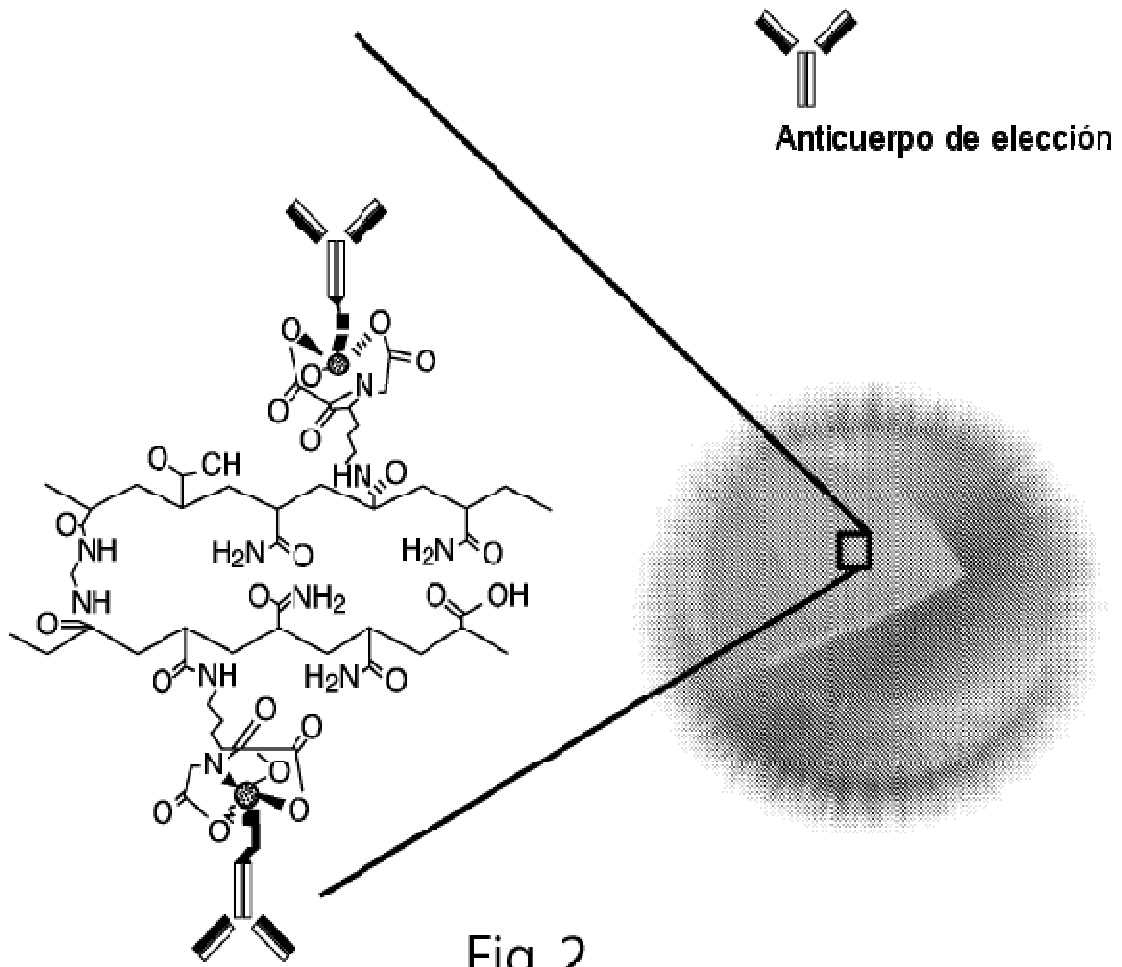


Fig. 2

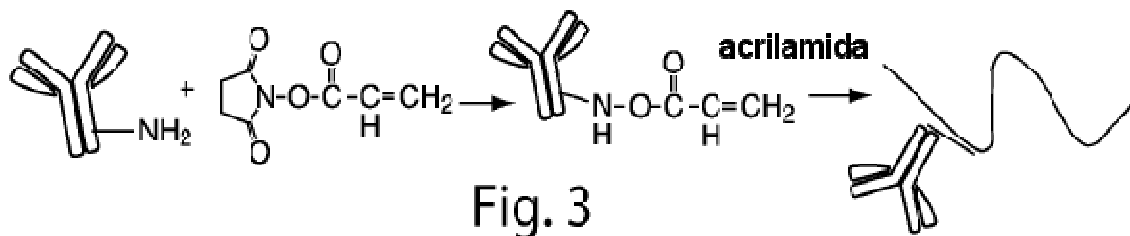


Fig. 3

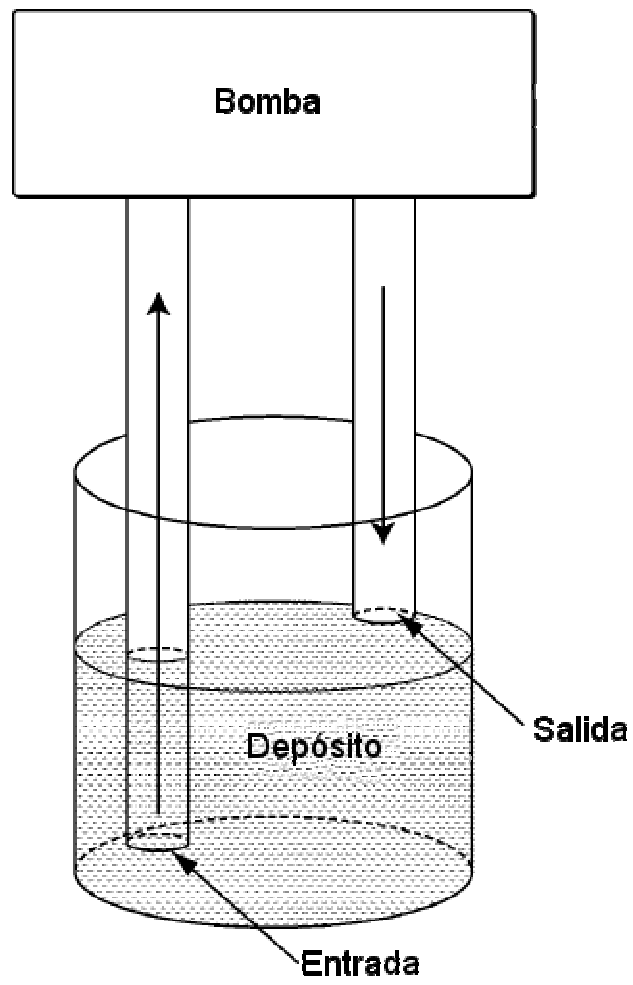


Fig. 4

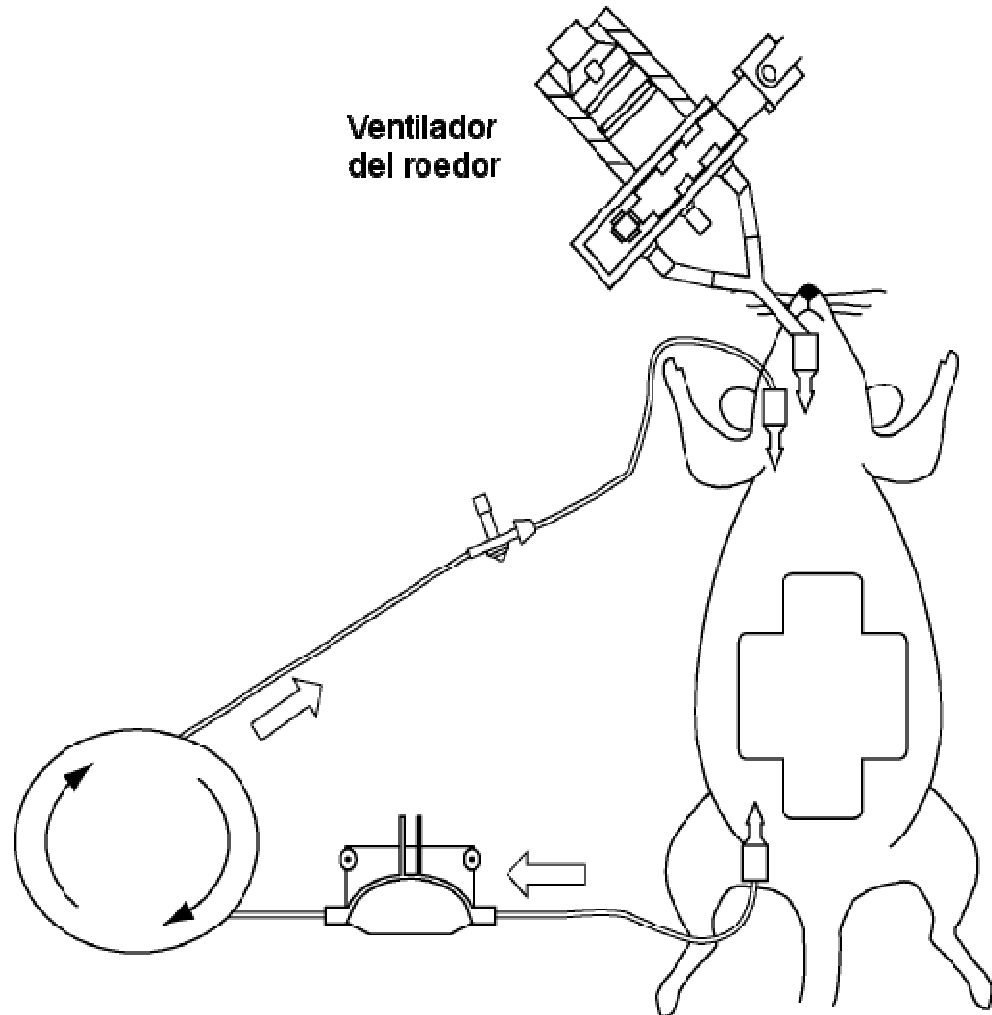


Fig. 5

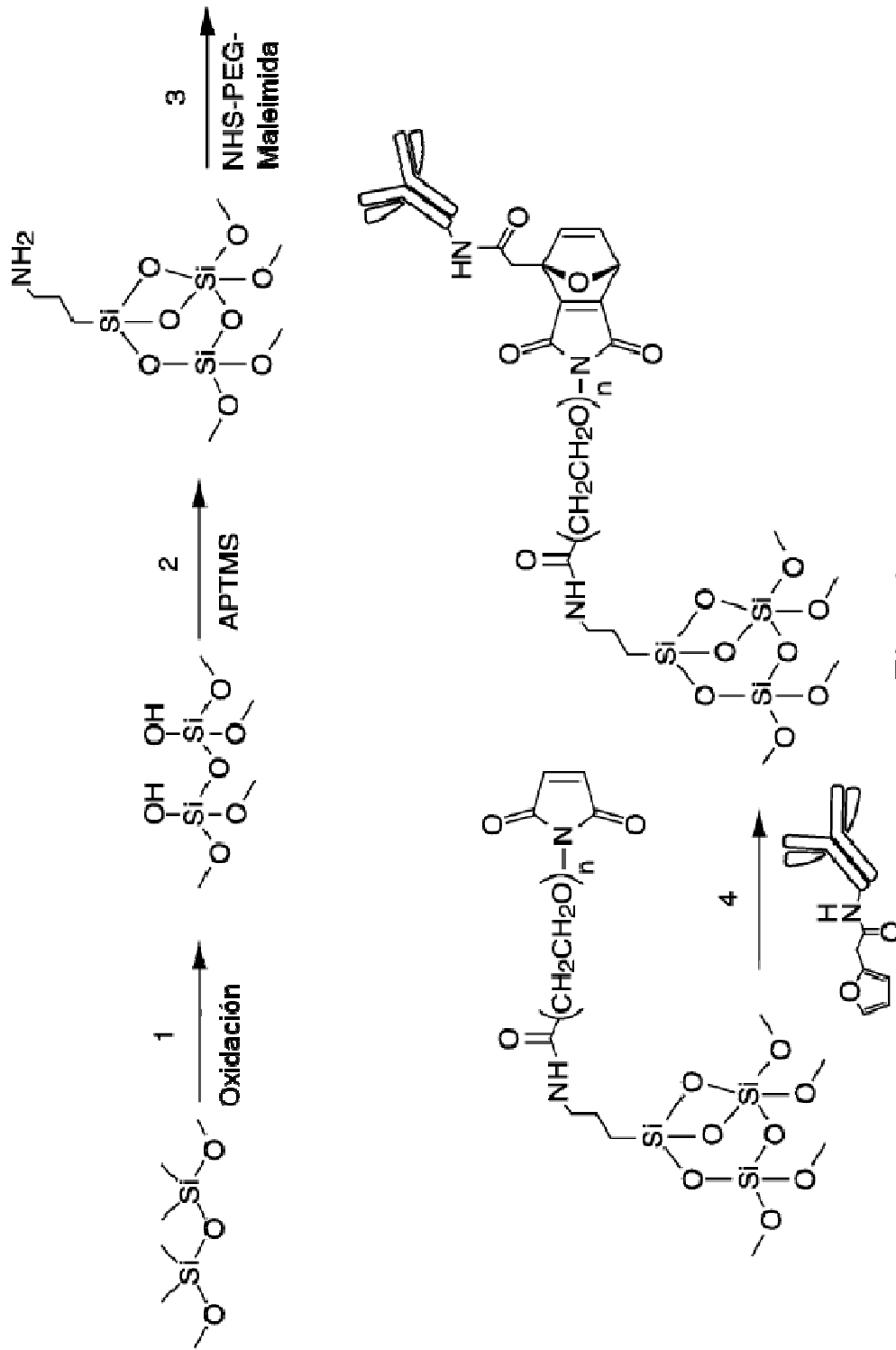


Fig. 6

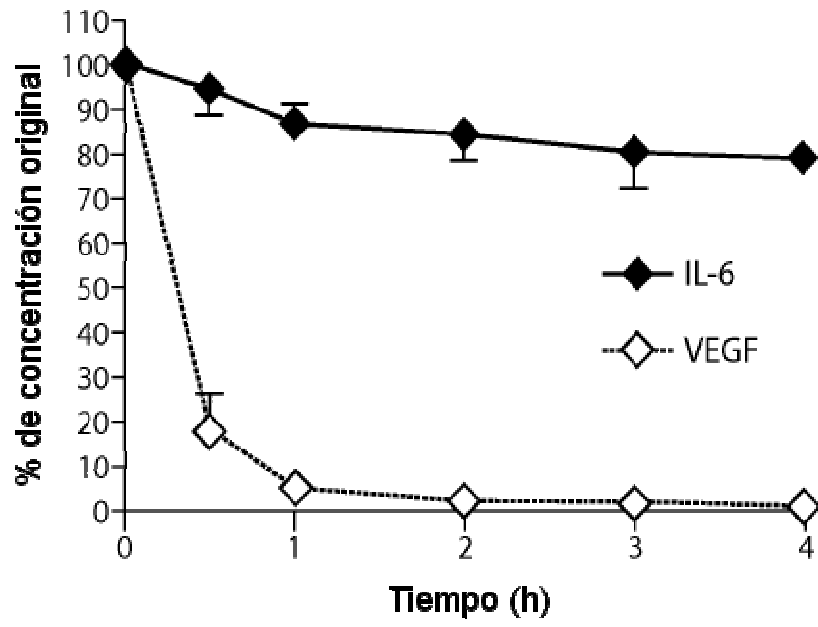


Fig. 7