

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 122**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/36** (2006.01)

**A61M 1/38** (2006.01)

**A61K 31/727** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2011 PCT/US2011/024229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11100354**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2011 E 11705110 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2533828**

54 Título: **Eliminación de factores de virulencia mediante terapia extracorpórea**

30 Prioridad:

**09.02.2010 US 302826 P**

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

**22.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MCCREA, KEITH y  
WARD, ROBERT S.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 728 122 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

Eliminación de factores de virulencia mediante terapia extracorpórea.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para eliminar agentes patógenos y/o toxinas liberadas de agentes patógenos de la sangre o del suero (sangre) mediante la puesta en contacto de la sangre con un sustrato sólido, esencialmente no poroso, cuya superficie ha sido tratada con heparina, sulfato de heparina y/u otras moléculas o grupos químicos (medios adsorbentes o medios) que tiene una afinidad de unión con respecto a los agentes patógenos y/o toxinas por eliminar (los adsorbentes). La invención puede utilizarse para eliminar factores de virulencia, por ejemplo, toxinas, que son liberadas de agentes patógenos tales como *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En un aspecto, el tamaño de los canales intersticiales dentro de dichos medios está equilibrado con la cantidad de área de superficie de los medios y con la concentración de superficie de sitios de unión en los medios para proporcionar una capacidad adsorbente adecuada, permitiendo al mismo tiempo tasas de flujo de sangre relativamente elevadas más allá de los medios.

También se describe un método para tratar una enfermedad mediante la eliminación de agentes patógenos y/o toxinas procedentes de los agentes patógenos de la sangre, para lo cual se pone en contacto la sangre con un sustrato esencialmente no poroso recubierto de heparina y/u otros materiales adsorbentes, y un dispositivo para implementar el método y el tratamiento.

## Antecedentes

Diversas condiciones patológicas se caracterizan por la presencia de elevadas concentraciones de agentes patógenos y/o de toxinas en el torrente sanguíneo. Algunas de tales condiciones se tratan mediante terapias diseñadas para matar al agente patógeno, por ejemplo, mediante la administración de agentes farmacéuticos antiinfecciosos. Algunas otras condiciones se tratan mediante terapias que intentan reducir la concentración de agentes patógenos o toxinas transmitidos por la sangre en el paciente. Otras enfermedades se tratan mediante terapias que intentan eliminar directamente solo componentes específicos de la sangre del paciente.

Por ejemplo, actualmente se entiende que el síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmune activado por una infección viral que estimula el sistema inmunológico del cuerpo para que sobreproduzca anticuerpos u otras proteínas que pueden atacar el sistema nervioso del paciente, causando mayores niveles de parálisis. La mayoría de los pacientes se recupera con el tiempo, si bien tales pacientes parecen tener cierta propensión a una reincidencia de la condición debida a infecciones virales subsiguientes. Un método para tratar el síndrome de Guillain-Barré involucra una plasmáferesis para "limpiar" la sangre del paciente mediante la eliminación de anticuerpos de los cuales se cree que atacan el sistema nervioso del paciente.

La heparina es un polisacárido que puede ser aislado de tejido de mamífero. Tiene una distribución muy específica en el tejido de los mamíferos; se encuentra presente solamente en los gránulos basófilos de los mastocitos. Desde su descubrimiento en 1916 por el científico norteamericano McLean, la heparina ha sido reconocida por su capacidad de impedir la coagulación de la sangre, y por su vida media relativamente breve en el organismo. La heparina sistémica, administrada por inyección del fármaco libre, ha sido utilizada clínicamente durante más de 50 años como un anticoagulante seguro y eficaz de la sangre y como agente antitrombótico. Los efectos de la heparina sobre la coagulación de la sangre disminuyen con cierta rapidez una vez que se detiene su administración, lo que hace que su utilización durante la cirugía y otros procedimientos sea eficaz y segura. Es decir, las propiedades anticoagulantes y antitrombogénicas de la heparina son útiles durante muchos procedimientos médicos, por ejemplo, para minimizar las interacciones indeseables entre la sangre y las superficies artificiales de los circuitos extracorpóreos. Una vez terminado el procedimiento, puede darse fin a la administración de la heparina. La concentración de heparina en la sangre del paciente disminuye hasta un nivel seguro dentro de unas pocas horas. Esto es particularmente importante después de cirugía en la que la curación depende de la capacidad de la sangre para coagularse en el sitio quirúrgico de manera que se eviten complicaciones de sangrado. Además de su utilización bien establecida y continua en el tratamiento de trastornos tromboembólicos y la prevención de la trombogénesis inducida en superficie, se ha descubierto más recientemente que la heparina tiene una amplia gama de otras funciones aparentemente no relacionadas con su función como anticoagulante. Por ejemplo, en la actualidad es sabido que un gran número de proteínas presentes en la sangre se unen con una elevada afinidad a la heparina y/o al polisacárido sulfato de heparina estrechamente relacionado que también se encuentra en el tejido animal, inclusive en la superficie luminal de los vasos sanguíneos saludables. Los ejemplos son antitrombina (AT), fibronectina, vitronectina, factores del crecimiento (por ejemplo, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores del crecimiento similares a la insulina, etc.). La albúmina de suero humana (HSA, human serum albumin) también se une, pero con una afinidad menor a pesar de su elevada concentración en sangre.

Se ha considerado previamente la utilización de las propiedades de adsorción selectivas de la heparina sistémica/libre para impedir infecciones, mediante la introducción de fragmentos de heparina y/o de los denominados fragmentos que contienen siálicos, en el sistema vascular. Esta terapia propuesta se basaba en la suposición de que

5 estos fragmentos se unirían a las lectinas sobre los microbios y las bloquearían, de manera que no podrían unirse a los receptores sobre la superficie de las células de mamífero. Si bien este enfoque ha sido investigado por muchos científicos, hasta la fecha solamente se ha informado sobre un éxito limitado. El problema más común han sido las complicaciones de sangrado asociadas con grandes cantidades de heparina libre introducida en el torrente sanguíneo para lograr una reducción clínicamente útil de los microbios patógenos. La presente invención no requiere la utilización de heparina libre sistémica y, por lo tanto, evita las complicaciones de sangrado. Esto se lleva a cabo uniendo permanentemente la heparina o el sulfato de heparina a un sustrato sólido con una elevada área de superficie, y exponiendo la sangre a un cartucho o filtro que contenga estos medios de adsorción.

10 Una enfermedad particular importante de tratar es el ántrax. La bacteria *Bacillus anthracis* es una bacteria natural que produce esporas que pueden permanecer latentes durante años, por ejemplo, en el suelo o en animales. La enfermedad puede ser fatal para los animales. Para las infecciones humanas, las esporas deben ingresar en el cuerpo, generalmente a través de un corte en la piel o al consumir carne contaminada. Pero recientemente, la preocupación por el bioterrorismo ha centrado la atención sobre las infecciones causadas por la inhalación de las esporas. Cuando se inhalan, el sistema inmunológico del cuerpo puede abrumarse rápidamente y entrar en shock.

15 La toxina del ántrax (también denominada "toxina letal del ántrax" o LT") consiste en tres proteínas no tóxicas que se asocian en combinaciones binarias o ternarias de manera que formen complejos tóxicos en la superficie de las células de mamíferos. Una de estas proteínas, el antígeno protector (PA, protective antigen), transporta las otras dos, el factor de edema (EF, edema factor) y el factor letal (LF, lethal factor) al citosol. El LF es una Zn<sup>2+</sup>-proteasa que escinde determinadas MAP quinasa quinasa, lo que conduce a la muerte del huésped a través de una secuencia de eventos mal definida. El EF, una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina y de Ca<sup>2+</sup>, es responsable del edema visto en la enfermedad. Se cree que ambas enzimas benefician a las bacterias al inhibir las células en el sistema inmunológico innato del huésped. El ensamble de los complejos tóxicos empieza después de que el PA se une a receptores celulares y es escindido en dos fragmentos mediante furina proteasas. El fragmento más pequeño se disocia, permitiendo que el fragmento unido al receptor, PA63 (63 kDa) se autoasocie y forme un precursor de poro (preporo) heptamérico en forma anular. El preporo se une con hasta tres moléculas de EF y/o LF, y los complejos resultantes son endocitosados y conducidos a un compartimiento ácido. Allí, el preporo se convierte en un poro transmembrana, que media la translocación de EF y LF en el citosol. Los estudios recientes han revelado: (a) la identidad de los receptores; (b) las estructuras cristalográficas de las tres proteínas de toxina y del preporo PA63 heptamérico; y (c) información acerca del ensamble de toxinas, la entrada y la acción dentro del citosol. El conocimiento de la estructura y modo de acción de la toxina ha divulgado aplicaciones potenciales en la medicina, incluyendo enfoques para tratar las infecciones causadas por ántrax. Collier, R. J., *Rev. Microbiol.*, 2001; 27(3):167-200.

20 Se han identificado dos receptores celulares humanos para el PA. Uno de ellos recibió la denominación de receptor de la toxina de ántrax (ATR, anthrax toxin receptor) codificado por el gen marcador endotelial de tumor 8 (TEM8, tumor endothelial marker 8). Tiene lugar más de diez mil veces sobre la superficie de las líneas de células macrófagas. Una forma soluble truncada de ATR (que carece de la secuencia de anclaje a la membrana) tiene la capacidad de proteger los cultivos celulares contra la acción letal de la toxina del ántrax. El ATR se expresa en una variedad de tejidos que incluyen el sistema nervioso central, corazón, pulmón y linfocitos. El ADNc de ATR codifica una proteína de 368 aminoácidos. Se predice que tiene una secuencia líder de 27 aminoácidos, un dominio extracelular de 293 aminoácidos, una región transmembrana de 23 residuos, y una corta cola citoplásmica en el terminal carboxi.

25 Otra proteína celular con una función del receptor para PA es la proteína de morfogénesis capilar 2 (CMG2, capillary morphogenesis protein 2). Tanto ATR como CMG2 contienen un dominio estructuralmente relacionado con el factor de Willdebrand tipo A (VWA), que interviene en la unión. La estructura de CMG2-VWA es conocida.

30 Lo mismo que otros bacilos, el *Bacillus anthracis* es capaz de diferenciarse en esporas latentes, que pueden durar años a pesar de condiciones ambientales adversas. Las esporas germinarán en células vegetativas en cuanto dispongan de nutrientes. Esto puede suceder sobre la piel o dentro de los pulmones de un ser humano o de un animal. Una vez dentro de un cuerpo, los bacilos crecen hasta alcanzar elevadas titulaciones, y ayudados por la toxina, superan la defensa del huésped. Además de la toxina, otros componentes (una cápsula de ácido poli-D-glutámico) contribuyen a la virulencia. Tanto la cápsula como las toxinas están codificadas en plásmidos alojados por las bacterias.

35 Puede obtenerse una protección contra la infección mediante vacunación. Las vacunas autorizadas son esporas obtenidas de PA libre de células absorbidas por hidróxido de aluminio de *B. anthracis* toxigénicas pero no encapsuladas. La utilización de vacunas vivas atenuadas puede tener respuestas locales adversas y no son muy eficaces. Se diseñó una vacuna aún experimental diseñando el gen de PA en una cepa bacteriana originalmente sin plásmido. La vacunación humana no se realiza habitualmente por cuanto las infecciones por ántrax natural son más bien raras.

40 En las etapas tempranas, las infecciones se curan mediante antibióticos, siendo la ciprofloxacina el fármaco preferido. Las infecciones no reconocidas son usualmente fatales. Un tratamiento con antitoxina (por ejemplo, con

inmunoglobulinas dirigidas contra PA o péptidos sintéticos que compiten por la unión de los factores de la toxina) puede ayudar a superar una infección grave.

Breve descripción de los dibujos

5 Figuras 1. A y B) Unos cultivos exponenciales de 7702 y 9131 fueron aplicados a pellas de control o de heparina, seguido por ensayo de tipo ELISA para determinar los cambios en las cantidades de PA (informados como valores de absorbancia). B) Se hizo pasar FBS sobre pellas tanto de control como de heparina 5 veces antes de la adición de sobrenadantes.

10 Figura 2. Protección de macrófagos contra PA mediante medios heparinizados.

Figura 3. Reducción de la  $\alpha$ -toxina USA300 MRSA después de pasar sobre pellas heparinizadas.

15 Compendio de la invención

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para eliminar de la sangre de un mamífero una toxina de un agente patógeno, en donde dicho agente patógeno es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, siendo la toxina de *Bacillus anthracis* un miembro seleccionado del grupo de la toxina letal de ántrax, antígeno protector contra ántrax, factor de edema de ántrax, factor letal de ántrax, cápsula de ácido poliglutámico de ántrax, antralisina O, antralisina B; en donde la toxina de *Pseudomonas aeruginosa* es Las A; y en donde la toxina de *Staphylococcus aureus* es un miembro seleccionado del grupo que consiste en  $\alpha$ -toxina de *S. aureus* y  $\beta$ -toxina de *S. aureus*, donde dicho método comprende:

25 a. poner en contacto una muestra de sangre con un carbohidrato inmovilizado sobre un sustrato sólido, teniendo dicho carbohidrato una afinidad de unión por dicha toxina, en condiciones que permiten la unión de dicho sustrato con dicha toxina en dicha muestra de sangre;

30 b. separar la muestra de dicho sustrato, con lo cual dicha toxina queda el menos parcialmente retenida o dicho sustrato y la muestra eliminada tiene una cantidad reducida de toxina.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un tratamiento extracorpóreo de sangre de mamífero, junto con una terapia para tratar enfermedades causadas por *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* por eliminación de agentes patógenos o toxinas de los agentes patógenos de la sangre de mamífero, para lo cual se pone en contacto la sangre del mamífero con un sustrato sólido esencialmente no poroso recubierto con heparina (y opcionalmente otras moléculas absorbentes) para eliminar de esta manera dichos agentes patógenos o toxinas.

40 Descripción detallada de la invención

1. Eliminación de agentes patógenos o toxinas de la sangre

45 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un método para eliminar una toxina de la sangre, tal como sangre de mamífero, poniendo en contacto la sangre con un sustrato sólido, por ejemplo, recubierto con heparina.

En este método, la heparina está inmovilizada sobre la superficie del sustrato. Los inventores han descubierto que la heparina inmovilizada unida a una superficie es eficaz para eliminar una cantidad significativa de agentes patógenos, toxinas y/o factores de virulencia de la sangre. Los factores de virulencia son toxinas liberadas de los agentes patógenos tales como *B. anthracis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* que les permiten colonizar células huésped, eludir la respuesta inmune del huésped, permitir la entrada y la salida de las células huésped, y obtener una nutrición de las células. Muchos factores de virulencia apuntan a proteoglicanos como sulfato de heparano sobre los sindecanos de la superficie celular. La heparina tiene una estructura muy similar a la del sulfato de heparano y también se unirá a los factores de virulencia. Por ello, el hacer pasar la sangre infectada a través de un cartucho de elevada área de superficie con carbohidratos unidos a la superficie, como la heparina, puede eliminar factores de virulencia que normalmente comprometerían las superficies de las células endoteliales conduciendo a una colonización. Mediante la eliminación de estos factores de virulencia, la superficie de las células endoteliales estará más protegida y permitirá que los antibióticos tradicionales maten las bacterias perjudiciales que causan la infección.

60 Los sindecanos son proteínas transmembrana que contienen segmentos de proteoglicano de sulfato de heparano (HSPGs, heparan sulphate proteoglycan segments) y que se hallan presentes en la mayoría de los tipos de células. Los HSPGs han sido conocidos durante algún tiempo por regular una variedad de procesos biológicos, que abarcan desde cascadas de coagulación, señalización de factores de crecimiento, unión y actividad de lipasas, adhesión de las células al ECM y subsiguiente organización citoesquelética, hasta infección de las células por microorganismos. Se trata de moléculas complejas, con una proteína de núcleo específica a la cual está fijado un número variable de cadenas de GAG (glicosaminoglicano). No solamente el número de cadenas varía: si bien los sindecanos llevan

principalmente GAGs de sulfato de heparano, algunos tienen cadenas adicionales de condroitina/sulfato de dermatano. Además, las cadenas de sulfato de heparano pueden variar en longitud, epimerización de ácido glucurónico en ácido idurónico, sulfatación generalizada de las cadenas, y en la posición de sulfonación de los monosacáridos. Anne Woods, J. Clin. Invest. 2001; 107(8):935-941.

El sindecano más común en las células endoteliales es Synd1 y es responsable de la unión y la regulación de una amplia variedad de moléculas. Incluyen el factor de crecimiento y las citoquinas. El sindecano-1 fue el primer HSPG de esta familia en ser identificado y clonado. Se limita principalmente a células epiteliales, pero también se encuentra en el mesenquima en condensación durante el desarrollo y en linfocitos pre-B y en las células plasmáticas. De manera compatible con un papel en la adhesión, el sindecano-1 está presente en una distribución basolateral en los epitelios, y parece regular la morfología epitelial, ya que la transfección de células epiteliales con ARNm antisentido para el sindecano-1 tiene como resultado una conmutación epitelial-mesenquimal y activa las células para que invadan los geles de colágeno. La pérdida concomitante de E-cadherina en estas células sugiere una regulación coordinada de sindecano-1 y E-cadherina y, de hecho, una reducida expresión de E-cadherina puede resultar también en una disminución de la producción de sindecano-1.

Los estudios tempranos indicaron que el sindecano-1 vuelve estar involucrado en la adhesión de las células al ECM. La transfección de sindecano-1 en las células de Schwann, que normalmente carecen de sindecano, incrementa la distribución y promueve la formación de adhesiones focales y de fibras de estrés. Si bien el sindecano-1 se distribuye juntamente con el sistema de microfilamentos en la membrana durante la distribución y llega a ser insoluble en detergente, no se localiza en las adhesiones focales. De hecho, ha habido un único informe de la presencia de sindecano-1 presente en adhesiones focales. Es interesante observar que la solubilidad en los detergentes, que usualmente se utiliza para indicar un enlace al citoesqueleto, no requiere la presencia del dominio citoplásmico; un estudio reciente indica que los dominios de transmembrana de sindecano-1 se asocian con series de lípidos insolubles en detergente como parte de un tipo especializado de endocitosis. Anne Woods, J. Clin. Invest. 2001;107(8):935-941.

Los sindecanos también ayudan en la morfogénesis, defensa del huésped y reparación de los tejidos. Se cree que los sindecanos pueden ayudar a prevenir la colonización y entrada de bacterias y virus en las células y que tiene lugar un mecanismo potencial de virulencia por los agentes patógenos cuando los agentes patógenos liberan factores de virulencia que se unen a los segmentos de sulfatos de heparina en los sindecanos y a continuación acelera el desprendimiento de los sindecanos desde la superficie celular. Esto permite seguidamente que las células bacterianas y los virus colonicen la superficie celular e ingresen en la célula propiamente dicha. Este mecanismo ha sido propuesto para diversos agentes patógenos, inclusive B. anthracis, S. aureas y P. aeruginosa que han sido caracterizados por subvertir el Synd1 durante la patogénesis. Estos agentes patógenos han demostrado que aceleran el desprendimiento del ectodominio de Synd1 de las células epiteliales, con lo cual comprometen la integridad de la barrera epitelial. Popova, T. et al., BMC Microbiology, 2006,6:8, 7 de febrero de 2006, "Acceleration of epithelial cell syndecan-1 shedding by anthrax hemolytic virulence factor". La totalidad de esos tres agentes patógenos parece apuntar a synd1. Chen Y. et al., Mol. Cells, 26, 415-426, nov. 30, 2008, "Microbial Subversion of Heparan Sulfate Proteoglycans".

En la presente invención, se utiliza un cartucho de filtración/adsorción de sangre con una elevada área de superficie de heparina unida a la superficie, en la cual se hace pasar sangre infectada por sobre la superficie de la heparina unida a la superficie. Los factores de virulencia excretados en la sangre se unirán a la heparina unida a la superficie, por lo que podrán ser eliminados de la sangre. Mediante la eliminación de una gran concentración de factores de virulencia de la sangre, tendrá lugar una menor colonización y daño en la superficie de las células endoteliales y se proporcionará un mayor tiempo para que tenga lugar una terapia antimicrobiana convencional. Además, cuando las bacterias presentes en la sangre entren en contacto con el cartucho de heparina de elevada área de superficie, las bacterias liberarán factores de virulencia que se unirán directamente a la heparina unida a superficie.

Esta herramienta terapéutica puede utilizarse seguidamente para tratar enfermedades infecciosas graves tales como las infecciones causadas en la sangre por B. anthracis, S. aureus, y P. aeruginosa. El tratamiento de las infecciones por la presente invención causadas por cualquiera de los tres agentes patógenos puede eliminar parcial o totalmente las siguientes toxinas de la sangre:

a) para B. anthracis

La toxina proteína tripartita (toxina de ántrax) que comprende:

Antígeno protector (PA)

Factor de edema (EF)

Factor letal (LF)

Cápsula de ácido poliglútamico

Antralisina O (AnIO)

Antralisina B (AnIB)

5

Toxina letal (LT)

b) para *S. aureus*

10

$\alpha$ -toxina

$\beta$ -toxina

c) para *P. aeruginosa*

15

Las A

Las tasas de flujo típicas para los circuitos de sangre extracorpóreos requieren que el "lecho" adsorbente esté diseñado para permitir tasas de flujo relativamente elevadas para operar con seguridad.

20

En un aspecto de la presente invención, el sustrato está diseñado con dimensiones intersticiales suficientemente grandes para permitir una elevada tasa de flujo de sangre por sobre el sustrato sin una gran caída de la presión. Es decir, a medida que se extrae sangre del paciente mamífero, se la hace pasar por sobre el sustrato con una tasa de flujo a la que la administración de los adsorbatos a la superficie del lecho adsorbente se caracteriza primariamente por una convección forzada. Esto forma un contraste con el proceso, mucho más lento, de la difusión molecular característica de los medios altamente porosos (por ejemplo, sílice porosa, sephadex, medios de exclusión de tamaño de poliestireno reticulado, fibras huecas densas o microporosas o membranas en forma de láminas, etc.), utilizado, por ejemplo, en la cromatografía de exclusión por tamaño o en otras formas de terapia de afinidad.

25

Este aspecto de la invención proporciona una capacidad de adsorción suficiente dentro del intervalo de las tasas de flujo seguras de más de 50 ml/minuto, lo que forma un contraste directo con el transporte difusivo, mucho más lento, de los adsorbatos típico de muchos medios adsorbentes porosos, que requieren que los adsorbatos se difundan a través de una membrana microporosa, y/o en poros microscópicos de los medios adsorbentes antes de la unión con sitios de adsorción sobre o dentro de los medios y que, por lo tanto, requieren tasas muy lentas para lograr separaciones significativas durante cada paso de la sangre.

30

35

La unión de las toxinas por heparina durante el transporte por convección es particularmente eficaz en las condiciones de un flujo relativamente elevado utilizadas en la operación (segura) de los circuitos de sangre extracorpóreos, por ejemplo, de aproximadamente más de 50 mL/minuto y preferiblemente de más de 150 mL/minuto pero inferior a aproximadamente 2000 mL/minuto. La adsorción dentro de los poros de los medios microporosos, en cambio, puede requerir tasas de flujo mucho más bajas a través de los lechos de adsorción de tamaño práctico a efectos de lograr una separación o purificación adecuadas, es decir, inferior a 50 mL/minuto y a valores más bajos, por ejemplo, de menos de 1 mL/minuto.

40

Se reconoce que, estrictamente hablando, es el "tiempo de residencia" en la columna de adsorción que debe ser mucho más prolongado para un medio que requiera el transporte difusivo de adsorbatos al sitio del adsorbente dentro del medio y/o a través de una membrana microporosa, en comparación con el menor tiempo de residencia necesario para transportar un adsorbato al sitio de unión (en un medio esencialmente no poroso) por convección forzada. Sin embargo, existen límites prácticos para las dimensiones de un cartucho, columna, filtro, etc. adsorbentes seguros y eficaces, especialmente con respecto al volumen de retención máximo de sangre que pueda contener, y con respecto a la velocidad de flujo de la sangre o del suero más allá de los medios de adsorción. Por esta razón, se considera que el coeficiente de tasa de flujo promedio a través del dispositivo de adsorción es una importante variable del diseño.

45

50

La cinética de convección y la cinética de difusión pueden compararse en cuanto a la eliminación de citoquinas o de agentes patógenos de la sangre que fluye: los medios de adsorción que dependen del transporte de difusión generalmente utilizan materiales muy porosos con un área de superficie interna extremadamente elevada debido a la presencia de poros microscópicos. Los medios adecuados para el transporte por convección, por otro lado, por lo general se basan en "canales" macroscópicos o intersticios visibles entre el material sólido, esencialmente no poroso, como partículas, perlas, fibras, espumas reticuladas o cartuchos enrollados en espiral.

55

60

Los medios que dependen del transporte por convección forzada son generalmente más adecuados para tasas de flujo elevadas, mientras que los medios que dependen del transporte de difusión mucho más lento son mucho menos efectivos cuando se emplean tasas de flujo elevadas y tiempos de permanencia más breves. Por esta razón, en un dispositivo de purificación de sangre extracorpórea, se prefiere muchos medios de adsorción que no requieran que el adsorbato se difunda lentamente en los poros dentro de los medios adsorbentes. Cuando la sangre se

65

bombea a través de circuitos fabricados con materiales artificiales, es una práctica general emplear tasas de flujo sanguíneo relativamente elevadas para evitar el estancamiento y reducir el riesgo de coagulación. Por otro lado, deben evitarse tasas de flujo extremadamente elevadas porque pueden exponer a las células de la sangre a altas tasas de cizallamiento y daños por impacto que pueden romper las células sanguíneas. La presente invención, por lo tanto, proporciona un método y un dispositivo para eliminar las citoquinas o agentes patógenos de la sangre utilizando las características preferidas del transporte por convección y su cinética más rápida deseable. Esto se logra haciendo pasar/fluir la sangre sobre un sustrato esencialmente no poroso cuya superficie haya sido tratada con moléculas adsorbentes, por ejemplo, heparina y que, por lo tanto, es capaz de unir la citoquina o agentes patógenos deseados para eliminarlos de la sangre.

Los métodos de la invención están destinados a aplicarse en terapias o procedimientos extracorpóreos, aunque también se describen dispositivos implantables. La expresión "terapias extracorpóreas" se refiere a procedimientos que se realizan fuera del cuerpo, como terapias en las que se pueden agregar productos deseados como oxígeno, anticoagulantes de la sangre, anestésicos, etc. Por el contrario, los productos no deseados como toxinas o venenos naturales también pueden ser eliminados de los fluidos corporales con tipos específicos de circuitos extracorpóreos. Algunos ejemplos son la hemodiálisis y la hemofiltración, que representan tecnologías mediante las cuales se libera la sangre de productos de desecho. La adsorción sobre carbón activado se ha utilizado para eliminar los venenos transportados por la sangre, y así sucesivamente. La sangre completa y el suero sanguíneo de mamíferos se pueden usar en la presente invención. La cantidad de sangre o de suero sanguíneo que se puede usar en los métodos reivindicados no pretende ser limitada. Puede variar desde menos de 1 ml hasta a más de 1 L, inclusive todo el volumen de sangre del paciente cuando se emplea la recirculación continua de regreso al paciente. En caso de necesidad pueden utilizarse uno o más "pasajes" a través del lecho de adsorción, si es necesario. La sangre puede ser sangre humana o de animal.

Los medios de adsorción heparinizados en la superficie para eliminar los agentes patógenos o toxinas de la sangre pueden optimizarse de acuerdo con la presente invención para su uso en la circulación sanguínea extracorpórea tradicional con tasas de flujo >50 mL/min y, con preferencia, entre aproximadamente 150 y 2000 mL/min. Estas elevadas tasas de flujo crean tiempos de permanencia breves dentro de la columna de adsorción y el transporte por convección domina sobre el transporte de difusión browniano. Esto es particularmente importante para unir proteínas de gran MW o citoquinas como el TNF- $\alpha$  y partículas más grandes tales como virus, bacterias y parásitos porque se difunden muy, muy lentamente. En la presente invención, los sitios de adsorción dominantes disponibles para eliminar agentes patógenos y toxinas se encuentran en las superficies dentro de los intersticios del lecho de los medios a través de los cuales fluye la sangre o se la hace llegar por convección forzada. Para tratar la sangre, los canales intersticiales han de ser suficientemente grandes como para permitir el transporte de los glóbulos rojos, que tienen un diámetro promedio de 6 micrones. Para permitir la colocación de un cartucho de adsorción empaquetado en un circuito extracorpóreo con una tasa de flujo de sangre elevada, los canales intersticiales deben ser varias veces más grandes que el diámetro de los glóbulos rojos. Esto puede evitar elevadas tasas de cizallamiento que conducen a hemólisis y, al mismo tiempo, permite minimizar la caída de presión en la sangre que fluye a través del lecho o cartucho empaquetado. Además, los medios son preferiblemente rígidos para minimizar la deformación que podría obstruir el cartucho del filtro por compactación. En base a estas preferencias, un medio rígido optimizado equilibra el tamaño del canal intersticial y el área de superficie total, por ejemplo, para la eliminación eficaz de citoquinas en los circuitos de sangre extracorpórea de elevada tasa de flujo.

## 2. El sustrato utilizado en la invención

Como sustrato en la presente invención, pueden utilizarse materiales variados en forma y composición. Todos los sustratos adecuados proporcionan una elevada área de superficie y al mismo tiempo promueven el transporte de adsorbatos a los sitios adsorbentes que los unen (principalmente) mediante transporte por convección forzada. Típicamente, los medios se proporcionan empaquetados como un relleno dentro de un contenedor, tal como una columna, que está diseñado para contener los medios de manera que no sean arrastrados por la sangre que fluye (fenómeno éste también conocido como "migración del medio") y permite que el flujo de la sangre pase esencialmente por la totalidad de la superficie del medio. Los sustratos útiles para crear el medio de adsorción incluyen perlas o partículas rígidas no porosas, micropartículas, espumas reticuladas, un lecho monolítico rígido (por ejemplo, formado a partir de perlas o partículas sinterizadas), una columna empaquetada con tela tejida o no tejida, una columna empaquetada con una hilaza o con fibras de monofilamento sólidas o huecas (pero no microporosas), un cartucho enrollado en espiral formado por una película plana o una membrana densa, o una combinación de medios tales como un cartucho mixto de perla/tela. Un sustrato adecuado para su uso en la presente invención puede ser inicialmente microporoso si se hace esencialmente no poroso durante el proceso de la modificación de la superficie, por ejemplo.

En determinadas realizaciones de la invención, el material de dicho sustrato sólido puede ser vidrio, celulosa, acetato de celulosa, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarosa reticulada, polipropileno, polietileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, silicona, teflón o poliuretanos.

La concentración de heparina en superficie sobre el sustrato sólido puede estar en el intervalo de 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Un lecho de adsorción/filtración de tipo columna de la presente invención tiene una estructura macroporosa que presenta una elevada área de superficie a la sangre o al suero y al mismo tiempo previene una gran caída de presión y altas tasas de cizallamiento. Además de la posibilidad de dañar la sangre por hemólisis, deben evitarse las elevadas caídas de presión, ya que pueden apagar los circuitos extracorpóreos equipados con cierres automáticos que responden a una caída de la presión.

### 2.1 Perlas como sustrato

Un sustrato útil se encuentra en forma de perlas o partículas sólidas. Las "perlas" pueden estar hechas de materiales lo suficientemente rígidos como para resistir la deformación/compactación bajo las tasas de flujo encontradas. La resistencia a la deformación es necesaria para mantener el volumen libre y la baja caída de presión posterior del "contactor" del lecho empaquetado. La falta sustancial de poros en la mayor parte del sustrato elimina la necesidad de que los adsorbatos se difundan en los poros antes de la adsorción. Los sitios de adsorción de la presente invención se encuentran principalmente en la superficie del medio y, por lo tanto, están posicionados de manera de sean accesibles a los adsorbatos en la sangre suministrada a dicha superficie en gran parte por transporte de convección forzada. No es necesario que los sustratos sean perfectamente lisos en su superficie, ya que la rugosidad produce un aumento deseable en el área de superficie para la fijación de los sitios de unión, por ejemplo, por unión covalente o iónica de la heparina.

Por otra parte, los poros internos con gran dimensión molecular se evitan en gran medida para eliminar la necesidad de que los adsorbatos se difundan en los poros antes de su fijación en los sitios de unión.

Se pueden usar varios tipos de perlas en la invención. Las perlas útiles deberían tener suficiente rigidez para evitar su deformación/compactación durante su utilización en el método, y tener un área de superficie suficiente para poder ser recubiertas con heparina para su utilización en el método.

La evidencia de una rigidez suficiente del sustrato es la ausencia de un aumento significativo en la caída de presión a través del lecho de adsorción durante aproximadamente una hora de flujo de agua o de solución salina con coeficientes típicos de uso clínico: por ejemplo, <10-50% de aumento en relación con la caída de presión inicial (medida dentro del primer minuto de flujo) cuando se mide con una tasa de flujo similar, por ejemplo, de solución salina.

Las perlas u otros sustratos de elevada área de superficie pueden estar hechos de materiales biocompatibles, tales como polímeros o material no polimérico, que está esencialmente libre de impurezas lixiviables que incluyen vidrio, celulosa, acetato de celulosa, quitina, quitosano, dextrano reticulado, alansa reticulada, poliuretano, metacrilato de polimetilo, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilimina, polipropileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, silicona y poliisobutileno. Los ejemplos de sustratos útiles incluyen polietileno de peso molecular ultraelevado no poroso (UHMWPE, Ultra High Molecular Weight PolyEthylene). Otras perlas adecuadas son: poliestireno, polietileno de alta densidad y de baja densidad, sílice, poliuretano y quitosano.

Los métodos para preparar tales perlas son conocidos per se en la técnica. Las perlas de polietileno y otras perlas de poliolefina se producen directamente durante el proceso de síntesis y, a menudo, se pueden usar sin mayores alteraciones.

Como se señaló en lo que precede, para su utilización en el método de la invención, el tamaño de los canales o espacio intersticial entre las perlas individuales para la filtración de sangre extracorpórea debería estar optimizada para evitar una caída de presión elevada entre la entrada y la salida del cartucho, para permitir un paso seguro de las células sanguíneas entre las perlas individuales en un entorno de alto flujo y para proporcionar un área de superficie intersticial apropiada para la unión de la heparina a las citoquinas o agentes patógenos en la sangre. En un lecho apretadamente empaquetado con perlas de 300 micrones, un tamaño adecuado de los poros intersticiales es de aproximadamente 68 micrones de diámetro. Las perlas útiles tienen un tamaño que varía de 100 a 500 micrones de diámetro. El tamaño promedio de las perlas puede ser de 150 a 450 micrones. Por ejemplo, son adecuadas las perlas de polietileno de DSM PTG, Berkeley, CA (anteriormente The Polymer Technology Group) que tienen un diámetro promedio de 0,3 mm. El poro intersticial es una función del tamaño de la perla.

Para su utilización, las perlas adecuadas se alojan en un contenedor, tal como una columna.

### 2.2 Otras formas de sustrato adecuadas

Las espumas reticuladas tienen células abiertas y pueden fabricarse a partir de, por ejemplo, poliuretanos y polietilenos. El control del tamaño de los poros se puede lograr mediante el control del método de fabricación. En general, las espumas reticuladas pueden tener entre 3 y 100 poros/pulgada y pueden presentar un área de superficie de hasta 66 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.

Las perlas se pueden sinterizar en forma de una estructura porosa monolítica mediante medios químicos o físicos. Las perlas de polietileno se pueden sinterizar calentando las perlas por arriba de su temperatura de fusión en un

cartucho y aplicando presión. El tamaño del poro intersticial resultante se reduce ligeramente con respecto a al tamaño del poro intersticial del lecho de perlas empaquetado.

5 Una columna se puede empaquetar con tela heparinizada tejida o no tejida. Al controlar el tamaño de las fibras de la tela, es posible controlar el tamaño del poro intersticial. Las telas no tejidas también se conocen como fieltros, y tienen una orientación aleatoria unida por el entrelazamiento de las fibras y por adhesión. Las telas tejidas tienen una estructura no aleatoria definida.

10 Una columna se puede empaquetar con fibras o hilazas hechas de fibras. El polietileno y otras fibras pueden estirarse en forma de finas fibras huecas o sólidas, que se pueden empaquetar en cartuchos similares a los cartuchos de hemodiálisis convencionales. Además, estas fibras se pueden tejer en una hilaza. Dyneema Purity® es una fibra tejida de alta resistencia hecha de UHMWPE. La fibra de Dyneema se puede heparinizar y empaquetar en un cartucho y proporcionar un soporte de área de elevada superficie para la eliminación de citoquinas y de agentes patógenos.

15 Un cartucho enrollado en espiral contiene una membrana delgada que está firmemente enrollada junto con materiales separadores opcionales para evitar el contacto con las superficies adyacentes. La membrana puede estar hecha de polímeros tales como poliuretano, polietileno, polipropileno, polisulfona, policarbonato, PET, PBT, etc.

### 20 2.3 Fijación de la heparina

25 Los medios de adsorción de la presente invención pueden comprender heparina unida covalentemente a la superficie del sustrato sólido. Se pueden utilizar varios métodos conocidos per se para fijar la heparina al sustrato deseado, como se describe en un artículo de reseña de Wendel and Ziemer (H. P. Wendel and G. Ziemer, European Journal of Cardiothoracic Surgery 16 (1999), 342-350). En una realización, la heparina se une al sustrato sólido por fijación de punto terminal covalente. Este método aumenta la seguridad del dispositivo al reducir o eliminar la liberación de heparina de la superficie del sustrato que podría entrar en el torrente sanguíneo. Se debe evitar la "lixiviación" de la heparina porque puede aumentar el riesgo de sangrado y de trombocitopenia inducida por heparina.

30 La fijación covalente de heparina a un sustrato sólido proporciona un mejor control de parámetros tales como la densidad de la superficie y la orientación de las moléculas inmovilizadas en comparación con la fijación no covalente. Los inventores han demostrado que estos parámetros son importantes para proporcionar una unión óptima de citoquinas o de agentes patógenos a las moléculas de carbohidrato inmovilizadas. La concentración en superficie de la heparina en el sustrato sólido puede estar en el intervalo de 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . La fijación de punto terminal covalente significa que la heparina está unida covalentemente al sustrato sólido por intermedio del residuo terminal de la molécula de heparina. La heparina también se puede unir en múltiples puntos. Se prefiere la fijación de punto terminal.

40 Si se usan perlas, se las puede hidrofilar antes de su fijación a la heparina u otro compuesto. Los posibles métodos para preparar las perlas incluyen el grabado con ácido, el tratamiento con plasma y la exposición a oxidantes fuertes como el permanganato de potasio.

### 45 2.4 Cantidad de heparina/gramo de sustrato

50 La cantidad de heparina por gramo de sustrato puede variar. Si se usan perlas, la cantidad de heparina por gramo de perla se determina por el número de capas utilizadas y también por el tamaño de las perlas. Cuanto más grande sea la perla, tanto menor será la heparina que se obtiene por gramo de perla. La concentración de la superficie de la heparina sobre el sustrato sólido puede estar en el intervalo de 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Una cantidad preferida es de  $2,0 \pm 0,5$  mg de heparina/g de perla según el método MBTH.

55 El peso molecular de la heparina utilizada en los métodos reivindicados puede variar. Por ejemplo, la heparina nativa tiene un peso molecular promedio de 22 kDa. La heparina degradada por ácido nítrico tiene un peso molecular de 8 kDa.

Los sustratos útiles en la presente invención también pueden prepararse mediante los métodos descritos en la solicitud de patente publicada US N° 2009/0136586 A1.

### 60 Dispositivo para utilizar en los métodos de la invención

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un dispositivo que comprende el sustrato sólido modificado con heparina, teniendo la heparina una afinidad de unión por una citoquina o agente patógeno, para la eliminación extracorpórea de la citoquina o agente patógeno de la sangre de mamífero.

Un dispositivo como se menciona en el uso y método de acuerdo con la invención puede comprender un dispositivo convencional para el tratamiento extracorpóreo de sangre y suero de pacientes que, por ejemplo, sufren de insuficiencia renal.

5 Es sabido que los patrones locales del flujo sanguíneo en los dispositivos médicos que entran en contacto con la sangre para la circulación extracorpórea influyen en la formación de coágulos mediante la activación por cizallamiento y la agregación de plaquetas en zonas estancadas. En consecuencia, un dispositivo como se utiliza en los diversos aspectos de la invención debe diseñarse de una manera que no cree estos problemas.

10 Un dispositivo como se utiliza en algunas realizaciones de la invención puede tener, por ejemplo, las siguientes propiedades:

Un flujo sanguíneo en el intervalo de 150-2000 mL/minuto.

15 Baja resistencia al flujo.

Gran área de superficie de sustrato que tiene carbohidratos inmovilizados sobre ella, por ejemplo, de aproximadamente 1-40 m<sup>2</sup>.

20 Recubrimiento adecuado (sin que existan fugas de carbohidrato hacia la sangre en su contacto con el mismo).

Adecuadas propiedades hemodinámicas en el dispositivo (no debe haber zonas de estancamiento).

Óptima biocompatibilidad.

25 Un ejemplo no limitante de un dispositivo de este tipo, que se puede usar en una utilización o en un método de acuerdo con la presente invención, es un dializador de hemoflujo pediátrico como el dispositivo de filtración extracorpórea de sangre para eliminar moléculas de citoquinas para que sea compatible con las elevadas tasas de flujo de Exthera Medical. También se pueden usar otros modelos o tipos de dispositivos para el tratamiento extracorpóreo de sangre o suero, tales como el hemofiltro/dializador Prisma M10 de Gambro AB, Suecia.

30 Las condiciones de flujo elevado pueden definirse como un flujo de sangre superior al límite de difusión.

#### 4. Agentes patógenos

35 Además, se describe un método para tratar una enfermedad mediante la eliminación de agentes patógenos y/o toxinas de la sangre de mamíferos mediante la puesta en contenedor de sangre de mamíferos con el sustrato sólido descrito en el método precedente. Los ejemplos de agentes patógenos que pueden eliminarse de la sangre utilizando un sustrato heparinizado de acuerdo con la invención incluyen: las bacterias *Bacillus anthracis*,  
40 *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Como se señaló anteriormente, un ejemplo de una enfermedad por tratar es el ántrax. En la mayoría de los casos, el tratamiento temprano puede curar el ántrax. La forma cutánea (de la piel) del ántrax se puede tratar con antibióticos comunes como la penicilina, la tetraciclina, la eritromicina y la ciprofloxacina (Cipro). La forma pulmonar de ántrax es una emergencia médica. La terapia intravenosa temprana y continua con antibióticos puede salvar la vida. En un ataque bioterrorista, las personas expuestas al ántrax recibirán antibióticos antes de enfermarse. Existe una vacuna, pero aún no está disponible para el público en general. Hay tres formas de enfermedad causada por el ántrax: ántrax cutáneo (piel), ántrax por inhalación y ántrax gastrointestinal (intestino). El ántrax por inhalación es una enfermedad muy grave y, desafortunadamente, la mayoría de las personas afectadas morirán, aunque obtengan los antibióticos apropiados. Los antibióticos son eficaces para matar las bacterias, pero no destruyen las toxinas mortales que ya  
50 hayan sido liberadas por las bacterias del ántrax.

Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse ya sea antes o después de otros tratamientos convencionales, como la administración de antibióticos.

55 5. Combinación de las invenciones con etapas adicionales de filtración/separación

En un aspecto adicional, los métodos descritos anteriormente se pueden combinar con otros métodos para filtrar o tratar la sangre de mamíferos. Por ejemplo, un cartucho que se basa en la cinética de convección se puede usar en serie con circuitos extracorpóreos convencionales, tales como CPB, hemodiálisis y oxigenación.

## 6. Ejemplos

Los diversos aspectos de la invención se describen con mayor detenimiento en los siguientes ejemplos.

65 6.1. Ejemplo 1: Preparación de la columna de heparina

Unas perlas de polietileno (PE), con un diámetro promedio de 0,3 mm (lote N° 180153) son provistas por Polymer Technology Group (Berkeley, EE. UU.), y las columnas (Mobicol, 1 mL) son provistas por MoBiTec (Alemania). La heparina y la polietilenimina (PEI) se adquieren de Scientific Protein Laboratories (Waukegan, Wisconsin, EE. UU.) y BASF (Ludwigshafen, Alemania), respectivamente. Todos los productos químicos utilizados son de grado analítico o superior. La inmovilización de heparina sobre las perlas se realiza según lo descrito por Larm et al. (Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983; 11: 161-173). La superficie polimérica se hepariniza utilizando el procedimiento general que se describe a continuación.

La superficie polimérica se trata con un agente oxidante (permanganato de potasio, peroxisulfato de amonio) para introducir características hidrófilas junto con algunos grupos funcionales reactivos (-SO<sub>3</sub>H, -OH, -C=O, -C=C-). La superficie también puede ser tratada con plasma o corona. Por ejemplo, las perlas de PE son grabadas con un agente oxidante (permanganato de potasio en ácido sulfúrico). Estas perlas hidrofílicas, que entre otras cosas contienen grupos OH y enlaces dobles, se usan más tarde como controles.

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

El recubrimiento se estabiliza luego por reticulación iónica con un polisacárido sulfatado (sulfato de dextrano o heparina). Si es necesario, estas etapas se repiten y se construye una estructura tipo sándwich. Se debe realizar un enjuague cuidadoso (agua, reguladores adecuados) entre cada etapa. Después de una última adición de PEI o de quitosano, se efectúa la fijación de punto terminal (EPA) a la superficie aminada de la heparina nativa mediante aminación reductora, utilizando la función aldehído en el residuo terminal reductor en la heparina nativa.

Se puede lograr una función aldehído más reactiva en el residuo terminal reductor mediante la degradación nitrosa parcial de la heparina. Esto acorta el tiempo de reacción, pero la heparina inmovilizada tendrá un peso molecular más bajo. El acoplamiento se realiza en solución acuosa, por aminación reductora (cianoborhidruro, CNBH<sub>3</sub><sup>-</sup>).

En este método alternativo, el medio aminado se suspendió en regulador de acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0) y se agregaron 4 g de heparina degradada con ácido nitroso (heparina de Pharmacia, Suecia). Después de agitar durante 0,5 h, se añadió NaBH<sub>3</sub>CN (0,4 g). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y seguidamente se procesó como anteriormente, con lo que se obtuvo un medio heparinizado.

Es posible acoplar 1-10 µg/cm<sup>2</sup> de heparina a todas las superficies hidrofílicas tales como vidrio, celulosa, quitina, etc., y más o menos a todos los polímeros hidrófobos tales como cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, poliestireno, PTFE, etc.

Las perlas de PE resultantes, con heparina fijada covalentemente en punto terminal, se esterilizan con óxido de etileno (ETO) y se enjuagan con cloruro de sodio al 0,9% y agua ultrapura. La cantidad de heparina determinada era de 2,0 mg de heparina/g de perla con el método MBTH (Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983; 11: 161-173 and Riesenfeld J, Roden L. Quantitative analysis of N-sulfated, N-acetylated, and unsubstituted glucosamine amino groups in heparin and related polysaccharides. *Anal Biochem* 1990; 188: 383-389).

Las perlas de polietileno tienen un diámetro medio de 0,3 mm y se heparinizan con una tecnología que garantiza que las moléculas de heparina se fijen covalentemente en punto terminal a la superficie, lo que hace que las cadenas de carbohidratos sean más accesibles para las proteínas con afinidad por la heparina/sulfato de heparina. El peso molecular medio de la heparina inmovilizada es de aproximadamente 8 kDa, mientras que 2 mg (igual a aproximadamente 360 UI) se acoplan a cada gramo de perlas. La integridad de esta superficie se verifica mediante la eliminación prevista del 75% de las concentraciones de antitrombina (AT) de la sangre que se hace pasar sobre las perlas heparinizadas, pero no sobre las en perlas no heparinizadas.

## 6.2 Ejemplo 2 - Eliminación de toxinas

Se extrae sangre arterial de los hemodializadores de los pacientes. La sangre se recolecta en tubos de vacío con EDTA e inmediatamente se aplica 1 mL a las columnas preparadas previamente y se hace pasar mediante una bomba de rodillo, por ejemplo, con uno de los siguientes valores: 1, 5 y 10 mL/min. La sangre que ha pasado a través de las columnas se recolecta inmediatamente en el otro extremo y se centrifuga en frío (4500 G). Los sobrenadantes se recolectan y se congelan luego a -80°C para su posterior análisis.

En pocas palabras, el paso a través de las perlas heparinizadas da como resultado una disminución significativamente mayor en las toxinas de la sangre en comparación con las perlas no heparinizadas.

6.3 Ejemplo 3: Eliminación in vitro de *B. anthracis* PA

Sobrenadantes bacterianos: unos cultivos nocturnos de *B. anthracis* 7702 o 9131 se cultivaron en caldo de Luria (LB) a 37°C mientras se agitaba a 250 RPM. Se inocularon 20 mL de LB con bicarbonato de sodio al 0,8% (NaHCO<sub>3</sub>) a pH 8 (pH con HEPES 1 M) con 1 mL de cultivo nocturno de 7702 y se cultivaron hasta fase exponencial tardía (aproximadamente 7 horas) bajo agitación a 250 RPM a 37°C. Los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 RPM para eliminar las células bacterianas y los residuos. Los materiales sobrenadantes se recolectaron y se hicieron pasar a través de un filtro de 0,2 µm y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C.

Preparación de las perlas: 1 g de heparina o de perlas de control se agregaron a jeringas con un filtro colocado en la parte inferior y en la parte superior de las perlas. Antes de los experimentos, las perlas se prepararon mediante la adición de 2 mL de solución salina tamponada con Tris (TBS). Cuando se usó suero bovino fetal (FBS), las perlas se prepararon mediante la adición de 2 mL de TBS seguido de 2 mL de FBS, que se hicieron pasar sobre las perlas 5 veces. Cuando las gotas de TBS o FBS ya no se liberaban más de las jeringas, se hicieron pasar los sobrenadantes bacterianos.

Pasaje del sobrenadante: se aplicaron 2 mL de sobrenadante bacteriano a las perlas. Después del pasaje, se recolectó el sobrenadante y se lo hizo pasar 4 veces más. Cuando ya no se liberaban más gotas de sobrenadante de las jeringas, el sobrenadante se recolectó y se mantuvo a una temperatura de -20°C.

ELISA: Se añadieron 100 µL de sobrenadante a cada pocillo de una placa de microtitulación de elevada unión Immulon 4HBX y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un basculador. Se removió el sobrenadante y los pocillos se lavaron 3 veces con TBS que contenía Tween al 0,05% (TBST). Los pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente en un basculador. Los pocillos se lavaron de nuevo. Los pocillos se incubaron con antiPA de cabra (List Biological Laboratories) (dilución 1:2000 en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en un basculador. Los pocillos se lavaron como se describe. Los pocillos se incubaron con anti-cabra-HRP de conejo (Invitrogen) (dilución 1:2000 en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en un basculador. Los pocillos se lavaron como se describió. Los pocillos fueron desarrollados mediante la adición de SigmaFast-OPD (Sigma) en dH<sub>2</sub>O durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Transferencia Western: Se obtuvieron sobrenadantes bacterianos como se describió y se agregaron volúmenes de 2,5 µL o 5 µL a una membrana de PVDF (BioTrace) que se preparó en metanol, seguido de TBS durante 3 minutos. Después de 5 minutos, la membrana se bloqueó con leche desnatada al 2% en TBST durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces con TBST y se incubó con dilución 1:3000 de anti-PA de cabra durante 45 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces y se incubó con fosfatasa alcalina anti-cabra de conejo 1:3000 durante 45 minutos a temperatura ambiente. La membrana se desarrolló con NBT/NCIP de 1 etapa (Piercenet).

## Resultados

Primero se verificó que la toxina se producía en nuestras condiciones de cultivo utilizando un ensayo de transferencia Western/de punto. El antígeno protector (PA) se detectó en los cultivos de 7702 con y sin condiciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C en cultivos tanto durante la noche como a las 8 horas. Se utilizó FBS como control para la detección de anticuerpos de fondo.

Se hicieron pasar sobrenadantes 7702 y 9131 a través de perlas de control y heparinizadas. Encontramos una reducción de aproximadamente el 75% con las perlas de control y heparinizadas (Figura 1, B). Las compilaciones de réplicas, hasta la fecha, indican una reducción del 43,3% sin remojo previo y una reducción del 75% con un remojo previo después de la aplicación a perlas heparinizadas. La reducción del 75% hace que la medición de la PA se acerque a los niveles de fondo de 9131, lo que indica que puede haber una reducción del 100%. Las reducciones en PA se recuperaron después de un pasaje de sobrenadantes sobre las perlas. La realización de múltiples pasajes no tuvo efecto en la reducción de PA.

## 6.4 Ejemplo 4: Demostración de la protección celular por perlas heparinizadas

En este estudio, el sobrenadante de PA y la preparación de perlas se realizaron como se señala en el Ejemplo 3. Los sobrenadantes 7702 y 9131 se concentraron a 10x. El sobrenadante se diluyó seguidamente hasta la concentración deseada en medio de cultivo de células DMEM (rojo de fenol). Los macrófagos se cultivaron, contaron y resuspendieron a 1x10<sup>6</sup> células/mL. Se agregaron 1x10<sup>5</sup> células a cada pocillo en 500 µL de DMEM+FBS y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron 0,05 g de perlas a cada pocillo. Seguidamente se hizo pasar DMEM +/- FBS o FBS a través del pocillo de transición en incrementos de 100 µL ((total 300 µL). Luego se retiró el medio de los pocillos de cultivo y se lavaron las perlas una vez con DMEM. Luego se agregaron 500 µL de sobrenadantes diluidos a cada pocillo de transición. Los pocillos se cultivaron a continuación durante 20 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Se tomaron muestras de 50 mL de cada pocillo de transición y se midieron los niveles de LDH (citotoxicidad). La Figura 2 muestra los resultados. Se midió una reducción significativa en la muerte celular de

macrófagos independientemente de la dilución del sobrenadante. Para las perlas que se trataron con FBS y DMEM, la muerte celular se redujo a niveles de fondo.

6.5. Ejemplo 5: Eliminación de la  $\alpha$ -toxina de *S. Aureus* resistente a la metilina de cepa USA300

5 Se prepararon sobrenadantes con la  $\alpha$ -toxina de USA300 MRSA usando la cepa USA300 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. Las perlas heparinizadas también se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. La Figura 3 muestra los resultados. La concentración de la  $\alpha$ -toxina se redujo de modo significativo, independientemente de la dilución del sobrenadante, medida por un ensayo de tipo ELISA.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para eliminar de la sangre de mamíferos una toxina de un agente patógeno, en donde dicho agente patógeno es un miembro seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, en donde la toxina de *Bacillus anthracis* es un miembro seleccionado del grupo de toxina letal del ántrax, antígeno protector del ántrax, factor de edema del ántrax, factor letal del ántrax, cápsula de ácido poliglutámico del ántrax, antralisina O, antralisina B; en donde la toxina de *Pseudomonas aeruginosa* es Las A; y en donde la toxina de *Staphylococcus aureus* es un miembro seleccionado del grupo que consiste en la  $\alpha$ -toxina de *S. aureus* y la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*, método que comprende:
- 5 a. poner en contacto una muestra de sangre con carbohidrato inmovilizado sobre un sustrato sólido, teniendo dicho carbohidrato una afinidad de unión por dicha toxina, en condiciones que permiten la unión de dicho sustrato a dicha toxina en dicha muestra de sangre;
- 10 b. separar la muestra de dicho sustrato, por lo que dicha toxina es retenida al menos parcialmente o dicho sustrato y la muestra eliminada tiene una cantidad reducida de toxina.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente patógeno es *Bacillus anthracis*.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sustrato tiene afinidad por toxinas que son capaces de unirse a segmentos de sulfato de heparina sobre sindecanos.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sustrato tiene afinidad por el antígeno protector en la toxina del ántrax.
- 30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho sustrato sólido se compone de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en vidrio, celulosa, acetato de celulosa, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarosa reticulada, poliuretano, metacrilato de polimetilo, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, silicona y poliisobutileno.
- 35 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho carbohidrato es heparina.
- 40 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- 45 hacer que una muestra de sangre o de suero fluya por arriba y más allá de un sustrato sólido de elevada área de superficie con una tasa de flujo igual o superior a 50 ml/min, en donde la superficie de dicho sustrato sólido comprende heparina con una afinidad de unión por la toxina, en donde dicho sustrato es suficientemente no poroso de manera que los adsorbentes en la sangre no necesiten pasar a través de los poros en dicho sustrato antes de la adsorción, y en donde el tamaño de los espacios de canales intersticiales entre las porciones individuales de dicho
- 50 sustrato y la cantidad de área de superficie del sustrato intersticial es de tal manera que cuando dicha sangre o suero fluye en contacto con dicho sustrato con una tasa de flujo igual o superior a 50 ml /min, dicha toxina se une a dicha heparina para separarse de dicha sangre o suero y el transporte de dicha sangre o suero y de los adsorbentes contenidos en ellos más allá de dicho sustrato tiene lugar mediante transporte por convección en mayor grado que el transporte de difusión browniana.
- 55 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho sustrato comprende una columna empaquetada de perlas o partículas rígidas no porosas, una columna empaquetada con una espuma reticulada rígida, una columna empaquetada con un lecho monolítico rígido de perlas sinterizadas con canales de flujo internos, una columna empaquetada con tela rígida tejida o no tejida, una columna empaquetada con una hilaza rígida o un monofilamento opcionalmente hueco, un cartucho enrollado en espiral, o una combinación de al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste en perlas, espuma reticulada rígida, perlas sinterizadas, tela, hilaza y monofilamento.
- 60 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el sustrato sólido comprende perlas de polietileno recubiertas con uno o más polisacáridos.
- 65 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde al menos uno de dichos polisacáridos se selecciona del grupo que consiste en heparina, ácido hialurónico, ácido salicílico y quitosano.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- hacer que una muestra de sangre fluya en contacto con perlas de polietileno rígidas en un contenedor con una tasa de flujo igual o superior a 50 ml/min, en donde la superficie de dichas perlas comprende heparina con una afinidad de unión por la toxina, en donde dichas perlas son lo suficientemente rígidas de manera que la sangre no pase a través de los poros en dichas perlas, y en donde el tamaño de los espacios de los canales intersticiales entre las perlas individuales y la cantidad de área de superficie intersticial de dichas perlas es tal que cuando dicha muestra

de sangre se halla en un contacto de flujo con dicho sustrato con una tasa de flujo superior o igual a 50 mL/min, dicha toxina se une a dicha heparina para separarse de dicha sangre y el transporte de flujo de dicha sangre más allá de dicho sustrato es por medio del transporte por convección más por medio del método de transporte de difusión browniana.

5 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde la tasa de flujo de la sangre o suero varía entre aproximadamente 150 y 2000 mL/minuto.

10 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde la perla comprende un polímero de polietileno.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde dichas perlas tienen un diámetro en el intervalo de 100 a 450 micrones, tal como un diámetro promedio de 0,3 mm.

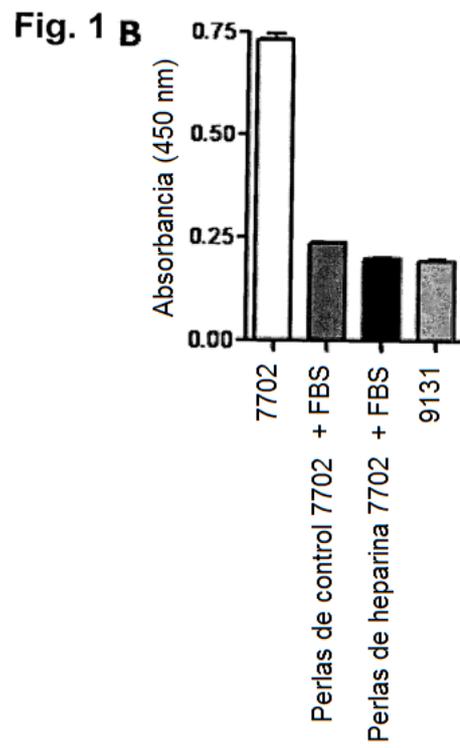
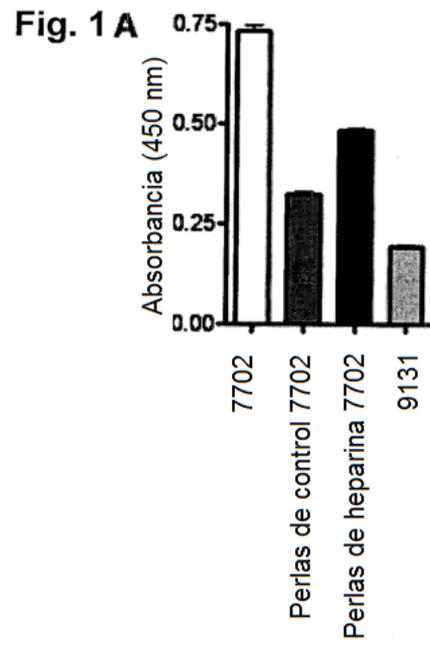
15 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde las perlas están recubiertas con 0,5-10 mg de heparina por gramo de perla, como recubiertas con  $2 \pm 0,5$  mg de heparina por gramo de perla.

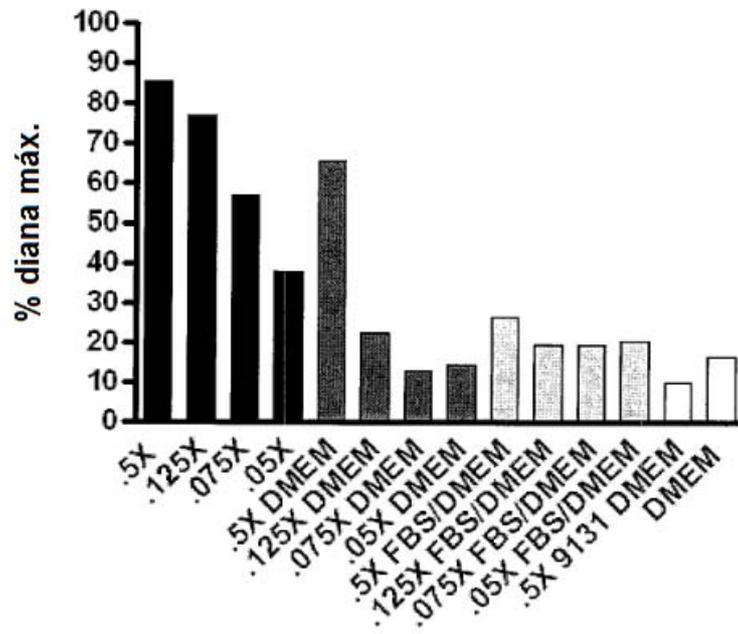
20 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la heparina tiene un peso molecular medio de aproximadamente 8 kDa.

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la heparina está fijada a la perla mediante fijación de punto terminal covalente.

25 18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde dicho método para la eliminación es adecuado para ser llevado a cabo en combinación con por lo menos otro tratamiento extracorpóreo de dicha sangre.

30 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho por lo menos un tratamiento extracorpóreo adicional comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en bypass cardiopulmonar (CPB, cardiopulmonary bypass), hemodiálisis y oxigenación.





**Ensayo ELISA para determinar si las perlas de heparina secuestran la toxina alfa de USA300  
1 mL de sobrenadante a través de 1 g de columna empapada con FBS**

