

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 962**

51 Int. Cl.:

A61M 1/02	(2006.01)
A61M 1/36	(2006.01)
A61M 1/38	(2006.01)
A61M 1/00	(2006.01)
A61M 1/34	(2006.01)
G01N 33/72	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2015 PCT/GB2015/053685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2015 E 15807988 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3226927**

54 Título: **Filtro de sangre**

30 Prioridad:

02.12.2014 GB 201421403

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE,
TECHNOLOGY AND MEDICINE (50.0%)
South Kensington Campus, Faculty Building,
Exhibition Road
London SW7 2AZ, GB y
UCL BUSINESS LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SPIVEY, ALAN CHRISTOPHER;
QUINLAN, GREGORY JOHN y
DAVIES, NATHAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 796 962 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

Filtro de sangre

La presente invención se refiere a la eliminación de componentes derivados de la hemólisis de la sangre y, en particular, a un dispositivo para lograr esto.

5 Antecedentes

10 Aproximadamente 85 millones de transfusiones de sangre se administran globalmente por año. En los Estados Unidos, el período máximo de almacenamiento de sangre y productos sanguíneos es de 42 días. En el Reino Unido, el período de almacenamiento máximo para los glóbulos rojos (RBC o eritrocitos) y la sangre completa es de 35 días, con regulaciones adicionales de la Unión Europea que requieren que el nivel de hemólisis sea <0,8%, y que > 75% de los glóbulos rojos transfundidos sobrevivan en circulación 24 horas posteriores a la administración. Prolongar la vida útil de los productos sanguíneos almacenados reduciría los costes y la demanda de nuevas muestras y reduciría el desperdicio causado por tener que desechar los productos sanguíneos que han ido más allá del período de almacenamiento permitido. Las medidas para mejorar la vida útil de la sangre almacenada también mejorarían la calidad de la sangre almacenada durante los períodos de almacenamiento actuales.

15 Se ha introducido un número de enfoques para mejorar la calidad de la sangre almacenada y potencialmente extender su período de almacenamiento máximo. Estos incluyen el desarrollo de plásticos y polímeros estériles pero transpirables para permitir el intercambio de gases y el fraccionamiento y extracción de ciertos componentes sanguíneos indeseables (por ejemplo, plaquetas para evitar la coagulación).

20 La transfusión de sangre almacenada y el proceso de extracción de sangre para el almacenamiento o durante procedimientos extracorpóreos exponen la sangre a tensiones significativas, por ejemplo, tensión mecánica y fuerzas de corte, así como tensión osmótica y térmica. Estas tensiones pueden aumentar la hemólisis y la fragilidad de los glóbulos rojos, que son factores que contribuyen a la corta vida útil de la sangre almacenada y pueden conducir a patologías asociadas a la hemólisis en los receptores de sangre.

25 La presente invención aborda el problema de mejorar la calidad de la sangre almacenada, prolongar la vida útil de la sangre almacenada, así como reducir los efectos adversos causados por las tensiones asociadas con la transfusión de sangre y la circulación extracorpórea. Un dispositivo de esta naturaleza permitirá períodos de almacenamiento prolongados para los productos sanguíneos y el beneficio máximo de este importante recurso limitado, así como un beneficio mejorado para el paciente y la seguridad para los receptores de transfusiones de sangre o sangre almacenada de los circuitos extracorpóreos.

30 El documento WO2014/176573 describe un filtro formado por una resina de copolímero de estireno-divinilbenceno (Chelex®). El filtro se describe para unir iones de hierro libres en solución. No se proporciona evidencia de que el filtro se una a hemo o hemoglobina, ni se demuestra ninguna reducción en la hemólisis.

Resumen de invención

35 La hemólisis es la ruptura (lisis) de los glóbulos rojos (RBC o eritrocitos) que conduce a la liberación del contenido celular. Como resultado de la hemólisis, se libera hemoglobina libre, hemo y hierro en la circulación sanguínea. Aunque los mecanismos de protección endógenos están disponibles, si están abrumados, estos componentes derivados de la hemólisis pueden iniciar lesiones orgánicas y respuestas proinflamatorias. El aumento de la hemólisis también puede conducir a un estado alterado del hierro extracelular, lo que resulta en daño oxidativo catalizado por hierro y disfunción orgánica asociada con enfermedades críticas y mortalidad. Las poblaciones en riesgo incluyen aquellas que padecen anemia hemolítica, por ejemplo, como resultado de una infección (por ejemplo, malaria, fiebre amarilla, dengue), hemoglobinopatías hereditarias (por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemia) o adquiridas de otro modo (por ejemplo, anemia hemolítica inducida por fármacos, síndrome HELLP). Otras afecciones asociadas a la hemólisis incluyen afecciones hemorrágicas.

45 Aquellos que reciben transfusiones de sangre también están en riesgo por los efectos de estos componentes derivados de la hemólisis. La sangre para transfusión tiene el potencial de introducir los productos de la hemólisis en la circulación como la edad de la sangre almacenada, las condiciones de almacenamiento, la manipulación rutinaria de las bolsas de sangre, la irradiación de sangre para su uso en individuos que reciben trasplantes de células madre para reducir la enfermedad del huésped frente al injerto, el lavado de sangre fresca y la variabilidad del donante contribuyen a la hemólisis en este contexto. Además, existe una extensa literatura que demuestra asociaciones entre la duración del almacenamiento de sangre, los niveles de hemólisis en sangre transfundida y los resultados adversos posteriores a la transfusión, incluida la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI), la lesión renal aguda y la hipertensión pulmonar (Wang, D. y otros. (2012) Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. Transfusion 52, 1184-95; Schaer, D.J. y Buehler, P.W. (2013) Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3; Tung, J.-P. y otros. (2012) Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (TRALI). Crit. Care 16, R19; Zimrin, A.B. y Hess, J.R. (2009) Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. Vox Sang. 96, 93-103). Aunque es poco probable que la hemólisis sea el único componente involucrado en estas respuestas

adversas, puede ser un factor contribuyente. Además, la generación de especies dañinas de oxígeno reactivo (ROS) instigadas por la hemoglobina libre, el hierro y el hemo son mecánicamente la causa predominante del daño del tejido receptor visto en estas circunstancias. Las respuestas adversas relacionadas con la virulencia microbiana también pueden ser importantes dado que los productos de hemólisis que contienen hierro son factores de virulencia microbiana.

La generación de estos componentes derivados de la hemólisis no se limita solo a las respuestas dentro del receptor después de la administración de la sangre almacenada. El daño acumulativo continuo a las células empaquetadas ocurre una vez que comienza la hemólisis, y la consecuente peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas dentro de la sangre almacenada no solo propaga una mayor hemólisis de estas células (autocatálisis), sino que también contribuye a la fragilidad de los glóbulos rojos aumentando la probabilidad de ruptura y hemólisis adicional en transfusión. Además, los productos de daño por ROS, tal como los aldehídos formados como productos finales de la peroxidación lipídica, son bioactivos e incluso tóxicos en dosis suficientemente altas y, por lo tanto, pueden contribuir aún más a las respuestas proinflamatorias en y posteriormente a la transfusión.

Mientras que la protección natural contra los efectos de la hemólisis es proporcionada por mecanismos endógenos, estos sistemas se ven abrumados rápidamente. A la luz de estas circunstancias, existe una clara necesidad de reducir los niveles de estos componentes derivados de la hemólisis tanto en la sangre almacenada, como en la sangre transfundida y en la circulación de un paciente.

Lograr una reducción de la hemólisis y los productos derivados de la hemólisis no es sencillo; por ejemplo, se sabe que los dispositivos de filtración extracorpórea causan hemólisis. Como se demuestra en este documento (ejemplo 2), la exposición de productos sanguíneos a algunos sustratos o estructuras de filtro puede de hecho aumentar la hemólisis (figura 4). Por lo tanto, un filtro destinado a eliminar un producto de hemólisis puede de hecho empeorar la hemólisis y, por lo tanto, también aumentar la cantidad de componentes derivados de la hemólisis en los productos sanguíneos. Sorprendentemente, por lo tanto, se identifica en la presente solicitud que al usar un dispositivo que tiene una combinación de una molécula de unión a hemoglobina, una molécula de unión a hemo y una molécula quelante de hierro, la hemólisis puede reducirse, al igual que el nivel de los componentes derivados de la hemólisis. Una disminución en el nivel de los componentes derivados de la hemólisis es particularmente efectiva, ya que la reducción del nivel de los componentes derivados de la hemólisis limita el impacto de estos componentes que desencadenan una mayor hemólisis autocatalítica. Además, se supera el aumento indeseable de la hemólisis como resultado de la exposición de los RBC a las estructuras de filtro. La invención es particularmente ventajosa ya que la combinación de agentes aglomerantes proporciona un filtro de "acción única". Tal dispositivo de "acción única" permite eliminar la hemoglobina, el hemo y el hierro libre en un solo paso. Esto proporciona una ventaja mayor que el efecto aditivo de usar los 3 agentes aglomerantes por separado, ya que reduce el riesgo de hemólisis desencadenada por la exposición a sustratos de filtro que se exacerban durante los pasos de filtro secuenciales.

La invención se define en las reivindicaciones 1, 11, 12, 13 y 14 independientes. Las realizaciones preferidas se especifican en las reivindicaciones dependientes. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo que eliminará eficaz y selectivamente los productos dañinos de la hemólisis (hemoglobina, hemo y hierro libre) de la sangre. Por consiguiente, en una primera realización, la invención proporciona un dispositivo para la eliminación de componentes derivados de la hemólisis de la sangre, comprendiendo el dispositivo: un soporte, una pluralidad de agentes aglomerantes unida a dicho soporte, en donde los agentes aglomerantes comprenden al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula de hemo-unión. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende además un recipiente para el almacenamiento o pasaje de sangre, en donde el recipiente contiene el soporte.

En ciertas realizaciones, el soporte es una pluralidad de perlas. En ciertas realizaciones de este tipo, cada perla de la pluralidad de perlas está unida a no más de una de: la molécula quelante de hierro, la molécula de unión a hemoglobina y la molécula de unión a hemo. En una realización alternativa, el soporte es un elemento único al que se unen al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina y al menos una molécula de unión a hemo, preferiblemente en donde toda la pluralidad de agentes aglomerantes está unida al elemento único.

En ciertas realizaciones en donde el dispositivo comprende un recipiente que contiene el soporte, el soporte está total o parcialmente integrado con el recipiente. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el soporte no está integrado con el recipiente.

En ciertas realizaciones, el soporte comprende un vidrio o polímero insoluble. Los polímeros insolubles adecuados incluyen biopolímeros funcionalizados naturales, tales como un polímero de polisacárido (por ejemplo, agarosa), y polímeros sintéticos, tales como polímeros basados en poliestireno, poliácridamida y polietileno. En ciertas realizaciones, el polímero insoluble es un polímero de polisacárido. En ciertas de tales realizaciones, el polímero insoluble es agarosa. En ciertas realizaciones alternativas, el polímero insoluble es un polímero sintético. En ciertas de tales realizaciones, el polímero sintético es un copolímero/injertado (por ejemplo, PEGilado).

En ciertas realizaciones, la molécula quelante de hierro es la desferrioxamina (DFO). En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemoglobina es haptoglobina (Hp). En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemo es albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica humana (HSA). En ciertas realizaciones, la molécula de unión a

hemoglobina, la molécula de unión a hemo y la molécula quelante de hierro están presentes en las proporciones 50-90%, 5-50% y 1-30% respectivamente.

En ciertas realizaciones, el dispositivo es para la extracción in vitro o ex vivo de componentes derivados de la hemólisis de la sangre.

5 En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende un soporte, una pluralidad de agentes aglomerantes unido a dicho soporte, en donde los agentes aglomerantes comprenden al menos una molécula de DFO, al menos una molécula de haptoglobina y al menos una molécula de HSA. En ciertas realizaciones de este tipo, el soporte es opcionalmente una pluralidad de perlas de agarosa. En ciertas realizaciones de este tipo, el dispositivo opcionalmente comprende además un recipiente para el almacenamiento o pasaje de sangre, en donde el recipiente contiene el soporte.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un aparato que comprende un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto. En ciertas realizaciones, el aparato es adecuado para su uso como un sistema de circulación sanguínea extracorpórea. En ciertas realizaciones, el aparato es adecuado para administrar sangre desde una bolsa de sangre a un paciente.

15 En un tercer aspecto, la invención proporciona un método in vitro para eliminar componentes derivados de la hemólisis de una muestra de sangre almacenada, comprendiendo el método aplicar la muestra de sangre almacenada a un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto.

20 También se describe, aunque no forma parte de la invención, un método para tratar o prevenir la patología asociada a la hemólisis en un sujeto que comprende, aplicar sangre de un sujeto a un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto o un aparato de acuerdo con el segundo aspecto y administrar dicha sangre a un sujeto. En tales métodos, el sujeto del que se extrae la sangre y el sujeto al que se administra la sangre puede ser el mismo sujeto.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una molécula quelante de hierro para su uso en el tratamiento o prevención de la patología asociada a la hemólisis en un sujeto, en donde la molécula quelante de hierro está unida a un soporte al que también están unidas al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula de unión a hemo.

25 En un sexto aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a hemoglobina para su uso en el tratamiento o prevención de patología asociada a hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemoglobina está unida a un soporte al que también se une al menos una molécula quelante de hierro, y al menos una molécula de unión a hemo.

30 En un séptimo aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a hemo para su uso en el tratamiento o prevención de patología asociada a hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemo está unida a un soporte al que al menos una molécula quelante de hierro, y al menos una molécula de unión a hemoglobina también están unidas.

35 En ciertas realizaciones de los aspectos quinto, sexto y séptimo de la invención, la patología asociada a la hemólisis tratada o prevenida se selecciona de hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión o falla orgánica (por ejemplo, TRALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, la patología asociada a la hemólisis tratada o prevenida es la trombosis anormal o aberrante. En ciertas realizaciones, la patología asociada a la hemólisis tratada o prevenida es una infección bacteriana. Los componentes derivados de la hemólisis son factores de virulencia bacteriana y, por lo tanto, eliminar los componentes derivados de la hemólisis y reducir la hemólisis evitará o tratará la infección bacteriana.

40 En ciertas realizaciones de los aspectos quinto, sexto y séptimo de la invención, la patología asociada a la hemólisis es causada por anemia hemolítica, una hemoglobinopatía, hemólisis inducida por autoinmunidad (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)), hemólisis autoinmune inducida por fármacos, hemólisis no autoinmune inducida por fármacos, infección, síndrome HELLP, afecciones hemorrágicas, administración de sangre almacenada, administración de sangre derramada o uso de una bomba cardíaca, ya sea extracorpórea (por ejemplo, como parte
45 de diálisis u oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)) o in situ (por ejemplo, un dispositivo de asistencia ventricular).

La presente divulgación se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos/realizaciones de la divulgación. Cada aspecto/realización así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto/realización o aspectos/realizaciones a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas. La invención y el alcance de la protección, sin embargo, se definen en las reivindicaciones.

Figuras

55 Figura 1: Capacidades de unión de la albúmina sérica humana (HSA) a la matriz de agarosa en PBS. Se demostró que las perlas de HSA-agarosa se unían al hemo.

Figura 2: Capacidades de unión de desferrioxamina (DFO) a la matriz de agarosa en PBS. Se demostró que las perlas de DFO-agarosa se unen a iones de hierro.

Figura 3: Capacidad de unión de las perlas de haptoglobina-agarosa para la hemoglobina humana.

Figura 4: Curso temporal que muestra el porcentaje de hemólisis de glóbulos rojos en regulador de citrato-fosfato (A) y AS-3 (B) cuando se expone a perlas de sefarosa funcionalizadas con Hp, HSA y DFO (columna izquierda), perlas de control (columna central) y sin perlas (columna derecha). Los porcentajes se presentan para los días 0, 6 y 7.

Descripción detallada

Como se usa en este documento, la sangre es cualquier producto sanguíneo que comprende componentes derivados de la hemólisis, en particular productos sanguíneos que comprenden eritrocitos. Incluye sangre completa (es decir, sangre no fraccionada extraída de un paciente), sangre almacenada (por ejemplo, para transfusiones), sangre extraída ex vivo de un paciente (por ejemplo, como muestra de sangre o donación, sangre derramada (es decir, durante procedimientos quirúrgicos) o como parte de un sistema circulatorio de sangre extracorpóreo) y sangre utilizada in vitro. Como apreciará la persona experta, los productos sanguíneos adecuados para usar con la invención pueden incluir anticoagulantes y/o reguladores. Preferiblemente la sangre es de un sujeto mamífero, más preferiblemente de un sujeto humano.

La hemólisis, o la ruptura de los glóbulos rojos, conduce a la liberación de hemoglobina (Hb) libre en la sangre. Los tetrámeros de hemoglobina libre se degradan primero a dímeros y luego liberan hemo libre, con el potencial de liberar hierro libre en cualquier etapa. Cada uno de estos componentes (Hb, hemo y hierro libre) es un componente derivado de la hemólisis como se usa en este documento. Como se usa en este documento, la hemoglobina (Hb), o hemoglobina libre, abarca Hb en forma tetramérica y en forma dimérica y en todos los estados de oxidación conocidos, incluidas las formas met, oxi y ferro. Como se usa en este documento, el hemo o hemo libre incluye las diferentes moléculas fisiológicas del hemo, por ejemplo, hemo A, hemo B, hemo C y hemo O, y todos sus estados de oxidación. Como se usa en este documento, el hierro, o hierro libre, incluye iones Fe^{2+} y Fe^{3+} y todos los demás estados de oxidación.

La presente invención proporciona un dispositivo para eliminar componentes derivados de la hemólisis de la sangre, en donde el dispositivo comprende un soporte, una pluralidad de agentes aglomerantes unido a dicho soporte y en donde los agentes aglomerantes comprenden al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula de unión a hemo. La invención también proporciona un aparato que comprende dicho dispositivo y métodos para usar dicho dispositivo. La presente divulgación proporciona además métodos para tratar patologías asociadas a la hemólisis que no forman parte de la invención usando al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina y al menos una molécula de unión a hemo unida a un soporte.

Las ventajas de la presente invención incluyen tanto la reducción de los efectos de la hemólisis cuando se administra sangre, como la reducción de la hemólisis en la sangre almacenada. La hemólisis puede ser causada por tensiones mecánicas y osmóticas, así como por cambios de temperatura. Cuando se transfunde sangre a un paciente, ya sea como parte de un sistema de circulación extracorpórea o de una muestra de sangre almacenada, la hemólisis ocurre debido a las fuerzas mecánicas a las que está expuesta la sangre, por ejemplo, cuando se fuerza a una tasa de flujo alta a través de una abertura o cuando pasa a través de una bomba. Como ya se describió, los componentes derivados de la hemólisis pueden desencadenar respuestas proinflamatorias no deseadas en un paciente y provocar daños oxidativos y lesiones y fallas en los órganos. El uso de un dispositivo de acuerdo con la invención puede actuar para filtrar los componentes derivados de la hemólisis de la sangre que se transfunde y, por lo tanto, limitar los efectos nocivos de los subproductos hemolíticos en un paciente sometido a una transfusión de sangre. Sin estar limitada por la teoría, la eliminación de componentes derivados de la hemólisis y la reducción de la hemólisis también tienen el efecto de limitar la hemólisis autocatalítica desencadenada por la presencia de componentes derivados de la hemólisis.

Además, la eliminación de los componentes derivados de la hemólisis y la reducción de la hemólisis cuando se usa la invención es particularmente efectiva ya que la combinación de agentes aglomerantes proporciona un filtro de "acción única". Tal dispositivo de "acción única" permite que la hemoglobina, el hemo y el hierro libre se eliminen en un paso único, reduciendo así el riesgo demostrado de hemólisis desencadenada por la exposición a sustratos de filtro que se exacerban durante los pasos de filtro secuenciales.

Un número de enfermedades y afecciones pueden conducir a hemólisis patológica en el propio sistema circulatorio de un paciente, por ejemplo, anemia hemolítica. Las infecciones hemolíticas incluyen malaria, fiebre amarilla y dengue. La hemólisis también puede ser causada por afecciones hereditarias, por ejemplo, hemoglobinopatías tal como la talasemia alfa, beta y delta y la enfermedad de células falciformes. Otras causas de la liberación de componentes derivados de la hemólisis incluyen la hemólisis autoinmune inducida por fármacos, la hemólisis no inmunitaria inducida por fármacos, la hemólisis autoinmune, el síndrome HELLP y las afecciones hemorrágicas. Como resultado, el paciente puede sufrir patologías asociadas a la hemólisis tales como insuficiencia orgánica, hipertensión, síndrome de dificultad respiratoria aguda, hemocromatosis y desregulación inmune. Estos síntomas y afecciones pueden tratarse o prevenirse usando dispositivos y aparatos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, uno o más de los síntomas y afecciones pueden tratarse o prevenirse usando un sistema circulatorio extracorpóreo que incorpora un

dispositivo de acuerdo con la invención. En dicho sistema, la sangre extraída del paciente se pone en contacto con el dispositivo para eliminar los componentes derivados de la hemólisis, de modo que la sangre reintroducida en el paciente contiene niveles reducidos de componentes derivados de la hemólisis, lo que reduce la patología asociada a la hemólisis.

- 5 Cuando se almacena sangre, por ejemplo, donaciones de sangre para usar en futuras transfusiones, una de las limitaciones de la vida útil de tales muestras de sangre es la acumulación de componentes derivados de la hemólisis que serían perjudiciales si se administraran a un paciente. El uso de un dispositivo de acuerdo con la invención durante el almacenamiento también tiene las ventajas de eliminar los componentes derivados de la hemólisis descritos anteriormente, es decir, tratar y prevenir las patologías asociadas a la hemólisis. A los fines del almacenamiento de
10 sangre, la invención proporciona además la ventaja adicional de reducir la degradación acelerada como resultado de la hemólisis autocatalítica, así como reducir la generación de ROS catalizada por hierro o hemo durante el almacenamiento, reduciendo así los efectos relacionados con la fragilidad de los glóbulos rojos. Cada uno de estos efectos, ya sea solo o en combinación, significa que el uso de la presente invención puede prolongar significativamente la vida útil de la sangre almacenada. En ciertas realizaciones, la extensión en la vida útil máxima de almacenamiento de la sangre almacenada como resultado de la presente invención es de al menos 5 días, al menos 10 días, al menos
15 15 días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos 50 días.

El dispositivo y los métodos de acuerdo con la presente invención comprenden al menos una molécula quelante de hierro unidas a un soporte. Las moléculas quelantes de hierro adecuadas para ser utilizadas de acuerdo con la invención son moléculas con alta afinidad por los iones de hierro. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula
20 quelante de hierro se selecciona de desferrioxamina (DFO) (también conocida como deferoxamina), deferiprona, deferasirox, transferrina y lactoferrina. En ciertas realizaciones preferidas, la molécula quelante de hierro es DFO. En ciertas realizaciones, solo un tipo de molécula quelante de hierro está unida al soporte. En ciertas de tales realizaciones, el único tipo de molécula quelante de hierro unida al soporte es DFO. En ciertas realizaciones alternativas, más de un tipo de molécula quelante de hierro está unida al soporte.

- 25 En ciertas realizaciones, la al menos una molécula quelante de hierro está unida covalentemente al soporte. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula quelante de hierro está unida covalentemente al soporte a través de una unidad estructural espaciadora. Alternativamente, en ciertas realizaciones, la al menos una molécula quelante de hierro se une covalentemente de forma directa al soporte. Un experto en la técnica de la química de soporte sólido apreciaría los enlaces adecuados apropiados para cualquier combinación dada de molécula de unión a soporte.
30 En ciertas realizaciones en donde la al menos una molécula quelante de hierro es DFO, el DFO está unida al soporte a través de un enlace amina, éter, amida, éster, sulfona o sulfonamida, por ejemplo un enlace amina.

El dispositivo y los métodos de acuerdo con la presente invención comprenden al menos una molécula de unión a hemoglobina (Hb) unida a un soporte. Las moléculas de unión a Hb adecuadas para usarse de acuerdo con la invención son agentes aglomerantes con alta afinidad por la hemoglobina, ya sea como dímero o tetrámero o ambos.
35 Dichos agentes aglomerantes adecuados incluyen proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas e inmunoglobulinas de origen natural o sintéticas, por ejemplo anticuerpos. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a Hb es haptoglobina (Hp). En tales realizaciones, la haptoglobina puede estar presente como la isoforma Hp1, la isoforma Hp2, la isoforma Hp2-1 o cualquier combinación de las mismas. En ciertas realizaciones alternativas, la molécula de unión a Hb es un péptido sintético.

- 40 En ciertas realizaciones, solo un tipo de molécula de unión a Hb está unida al soporte. En ciertas de tales realizaciones, el único tipo de molécula de unión a Hb unida al soporte es la haptoglobina. En ciertas de tales realizaciones, el único tipo de molécula de unión a Hb unida al soporte es Hp1. En ciertas realizaciones, el único tipo de molécula de unión a Hb unida al soporte es Hp2. En ciertas realizaciones, el único tipo de molécula de unión a Hb unida al soporte es Hp2-1. En ciertas realizaciones alternativas, más de un tipo de molécula de unión a Hb está unida al soporte.

- 45 En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a Hb se vincula covalentemente al soporte. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a Hb se vincula covalentemente al soporte mediante una unidad estructural espaciadora. Alternativamente, en ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a Hb se vincula covalentemente de forma directa al soporte. En realizaciones en donde la al menos una molécula de unión a Hb es haptoglobina (que incluye una o más isoformas de la misma), la haptoglobina se vincula al soporte mediante un enlace
50 amina en un residuo de aminoácido lisina. En una realización alternativa, la haptoglobina se vincula al soporte con un enlace a través de un grupo de azufre de un residuo de cisteína.

El dispositivo y los métodos de acuerdo con la presente invención comprenden al menos una molécula de unión a hemo unida a un soporte. Las moléculas de unión a hemo para uso de acuerdo con la invención son agentes aglomerantes con alta afinidad por el hemo. El hemo como se usa en este documento abarca cualquiera o todas las
55 diferentes moléculas fisiológicas del hemo, por ejemplo, hemo A, hemo B, hemo C y hemo O, y todos sus estados de oxidación. Dichos agentes aglomerantes adecuados incluyen proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas e inmunoglobulinas de origen natural o sintéticas, por ejemplo anticuerpos. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a hemo es la albúmina sérica. En ciertas de tales realizaciones, la molécula de unión a hemo es la albúmina sérica humana (HSA). En ciertas realizaciones alternativas, la molécula de unión a hemo es hemopexina.
60 En ciertas realizaciones, solo un tipo de molécula de unión a hemo está unida al soporte. En ciertas de tales

realizaciones, el único tipo de molécula de unión a hemo unida al soporte es la albúmina sérica. En ciertas de tales realizaciones, el único tipo de molécula de unión a hemo unida al soporte es HSA. En ciertas realizaciones alternativas, más de un tipo de molécula quelante de hierro está unida al soporte.

5 En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a hemo está unida covalentemente al soporte. En ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a hemo se vincula covalentemente al soporte mediante una unidad estructural espaciadora. Alternativamente, en ciertas realizaciones, la al menos una molécula de unión a hemo se une covalentemente de forma directa al soporte. En realizaciones en donde la al menos una molécula de unión a hemo es albúmina sérica, preferiblemente HSA, la albúmina sérica se une al soporte mediante un enlace amina en un residuo de aminoácido lisina. En una realización alternativa, el HSA está unida al soporte con un enlace a través de un grupo de azufre de un residuo de cisteína.

En ciertas realizaciones de la presente invención, una mayor cantidad de la molécula de unión a Hb está unida al soporte que la cantidad de molécula de unión a hemo unida al soporte, y una mayor cantidad de la molécula de unión a hemo está unida al soporte que la cantidad de molécula quelante de hierro unida al soporte. Es decir, la cantidad de cada agente aglomerante unida al soporte sigue la siguiente relación:

15 Molécula de unión a Hb > molécula de unión a hemo > molécula quelante de hierro

En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte que son moléculas de unión a Hb es al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas de unión a Hb es del 50% al 90%, opcionalmente 60%-80%, opcionalmente 65%-80%, opcionalmente 60%-70%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas de unión a Hb es 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%.

En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte que son moléculas de unión a hemo es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas de unión a hemo es de 5% a 50%, opcionalmente 10%-40%, opcionalmente 10-20%, opcionalmente 15%-30%, opcionalmente 20%-30%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas de unión a Hb es 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%. En ciertas realizaciones, el porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte que son moléculas de unión a hemo es al menos 0,5%, al menos 0,6%, al menos 0,7%, al menos 0,8%, al menos 0,9%, al menos 1%, al menos 1,1%, al menos 1,2%, al menos 1,3%, al menos 1,4%, al menos 1,5%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%.

En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte que son moléculas quelantes de hierro es al menos 1%, al menos 2%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas quelantes de hierro es 1% a 30%, opcionalmente 1%-20%, opcionalmente 5%-20%, opcionalmente 5%-15%, opcionalmente 5%-10%. En ciertas realizaciones, la proporción de moléculas de unión unidas al soporte que son moléculas quelantes de hierro es 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.

En ciertas realizaciones, las cantidades relativas de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte son moléculas de unión a Hb al 50%-90%, moléculas de unión a hemo al 5%-50% y 1%-30% de moléculas quelantes de hierro como porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas de quelación de hierro unidas al soporte. En ciertas realizaciones preferidas, las cantidades relativas son 60%-70% de moléculas de unión a Hb, 10%-20% de moléculas de unión a hemo y 5%-15% de moléculas quelantes de hierro como porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte. En ciertas otras realizaciones preferidas, las cantidades relativas son 65%-80% de moléculas de unión a Hb, 10%-20% de moléculas de unión a hemo y 5%-10% de moléculas quelantes de hierro como porcentaje del total de moléculas de unión a Hb, moléculas de unión a hemo y moléculas quelantes de hierro unidas al soporte.

En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemoglobina está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de toda la pluralidad de agentes aglomerantes unido al soporte, la hemoglobina es al menos el 85% del peso molecular de los componentes derivados de la hemólisis unidos. Es decir, en tales realizaciones, si todos los agentes aglomerantes en el soporte tuvieran su ligando vinculado, la hemoglobina representaría al menos el 85% del peso molecular total de los ligandos unidos. En ciertas realizaciones de este tipo, la molécula de unión a la hemoglobina está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de toda la pluralidad de agentes aglomerantes unido al soporte, la hemoglobina está opcionalmente al menos al 90%, al menos al 95%, al menos al 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% del peso molecular de los componentes derivados de la hemólisis unidos.

5 En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemo está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de todos los agentes aglomerantes unidos al soporte, el hemo es del 0,5% al 5% de la masa molecular de los componentes derivados de la hemólisis unida. Es decir, en tales realizaciones, si todos los agentes aglomerantes en el soporte tuvieran su ligando unido, el hemo representaría del 0,5% al 5% del peso molecular total de los ligandos unidos. En ciertas realizaciones de este tipo, la molécula de unión a hemo está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de todos los agentes aglomerantes unidos al soporte, el hemo es opcionalmente 0,6% a 4%, 0,7%-3%, 0,8%- 2%, 0,9%-1% del peso molecular de los componentes derivados de la hemólisis unidos.

10 En ciertas realizaciones, la molécula quelante de hierro está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de todos los agentes aglomerantes unidos al soporte, el hierro es 0,01% a 2% de la masa molecular de los componentes derivados de la hemólisis unida. Es decir, en tales realizaciones, si todos los agentes aglomerantes en el soporte tuvieran su ligando unido, el hierro representaría del 0,01% al 2% del peso molecular total de los ligandos unidos. En ciertas realizaciones de este tipo, la molécula quelante de hierro está unida al soporte en una cantidad tal que bajo la unión máxima de todos los agentes aglomerantes unidos al soporte, el hierro es opcionalmente 0,02% a 1,5%, 0,05%-1%, 0,1%- 1%, 0,5%-1% del peso molecular total de los componentes derivados de la hemólisis unidos.

15 Cada agente aglomerante se une al dispositivo en una cantidad efectiva para reducir la cantidad de cada componente derivado de la hemólisis respectiva en el producto sanguíneo para el cual se usará el dispositivo. Se apreciará que la cantidad necesaria dependerá del volumen de sangre en el que se pretende utilizar el dispositivo. Naturalmente, esto variará dependiendo, por ejemplo, del tamaño de la bolsa de sangre o la tasa de flujo y el volumen de una línea de flujo. En ciertas realizaciones, la cantidad mínima de cada agente aglomerante unido al dispositivo por mililitro de
20 sangre a la que estará expuesto el dispositivo, es una cantidad suficiente para proporcionar una capacidad de unión óptima equivalente a:

Molécula de unión a la hemoglobina: 0,003 micro moles de haptoglobina

Molécula de unión a hemo: 0,006 micro moles de HSA

Molécula quelante de hierro: 0,066 micro moles de DFO.

25 En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemoglobina está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una capacidad de unión óptima equivalente a al menos 0,003, al menos 0,004, al menos 0,005, al menos 0,006, al menos 0,007, al menos 0,008, al menos 0,009, al menos 0,01, al menos 0,015, al menos 0,02, al menos 0,025 micro moles de haptoglobina.

30 En ciertas realizaciones, la molécula de unión a hemo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una capacidad de unión óptima equivalente a al menos 0,006, al menos 0,007, al menos 0,008, al menos 0,009, al menos 0,01, al menos 0,011, al menos 0,012, al menos 0,013, al menos 0,014, al menos 0,015, al menos 0,02, al menos 0,025 micro moles de HSA.

35 En ciertas realizaciones, la molécula quelante de hierro está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una capacidad de unión óptima equivalente a al menos 0,066, al menos 0,07, al menos 0,075, al menos 0,08, al menos 0,085, al menos 0,09, al menos 0,095, al menos 0,1, al menos 0,11, al menos 0,12, al menos 0,13, al menos 0,14, al menos 0,15, al menos 0,2 micro moles de DFO.

En ciertas realizaciones, el dispositivo reduce la hemólisis en al menos 40%, opcionalmente al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%. Tal disminución porcentual en la hemólisis se compara con un producto sanguíneo equivalente que no ha sido expuesto al dispositivo.

40 En ciertas realizaciones, el dispositivo reduce la cantidad de hemoglobina en sangre tratada con el dispositivo en al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%. Dicho porcentaje de disminución de la hemoglobina se compara con los niveles en un producto sanguíneo equivalente que no ha sido expuesto al dispositivo.

45 En ciertas realizaciones, el dispositivo reduce la cantidad de hemo en sangre tratada con el dispositivo en al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%. Dicho porcentaje de disminución de hemo es en comparación con los niveles en un producto sanguíneo equivalente que no ha sido expuesto al dispositivo.

50 En ciertas realizaciones, el dispositivo reduce la cantidad de hierro en sangre tratada con el dispositivo en al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%. Dicho porcentaje de disminución de hierro se compara con los niveles en un producto sanguíneo equivalente que no ha sido expuesto al dispositivo.

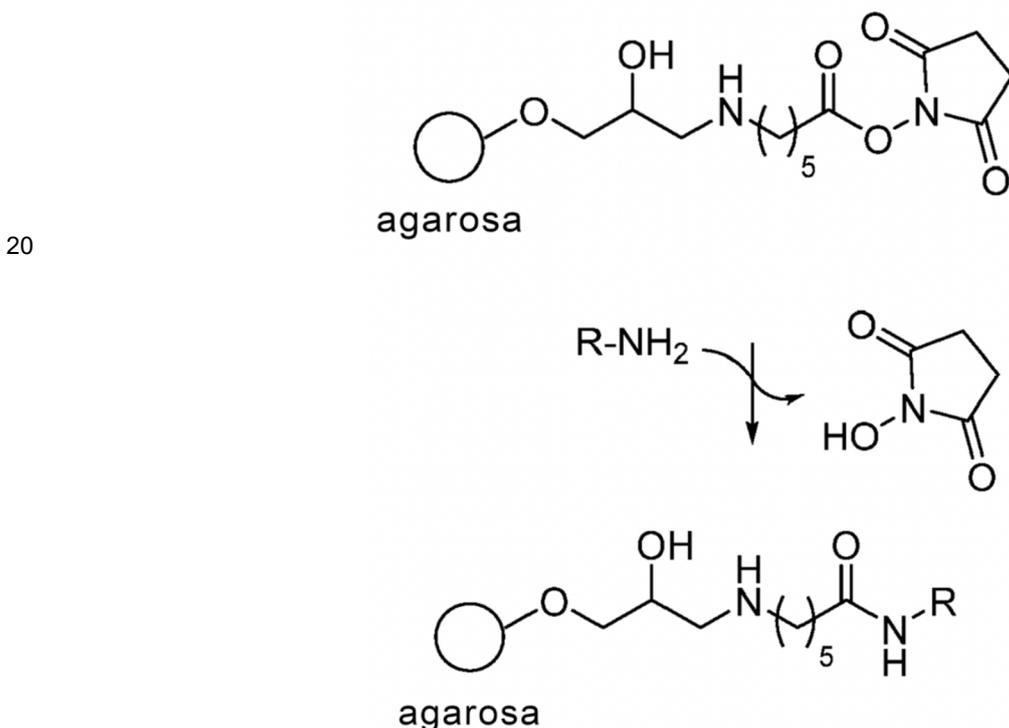
En ciertas realizaciones, el dispositivo reduce la cantidad de componentes derivados de hemólisis en sangre tratada con el dispositivo en al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, a al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%. Dicho porcentaje de disminución en los componentes

derivados de la hemólisis se compara con los niveles en un producto sanguíneo equivalente que no ha sido expuesto al dispositivo.

Un soporte para su uso de acuerdo con la presente invención es un sustrato al que los agentes aglomerantes pueden unirse e inmovilizarse. En ciertas realizaciones de la presente invención, el soporte está en forma de una pluralidad de perlas. Las perlas de acuerdo con esta realización de la invención pueden tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, formas esféricas, cilíndricas, cónicas, tubulares, cuboides, piramidales o poligonales irregulares. Las perlas apropiadas para usar en la invención incluyen aquellas adecuadas para usar en cromatografía en columna y para química orgánica de soporte sólido, por ejemplo perlas análogas a las usadas en cromatografía de afinidad y química combinatoria. En ciertas realizaciones, las perlas son perlas de polisacárido, tales como perlas de agarosa. En ciertas realizaciones, las perlas son perlas macroporosas. El experto apreciará otras perlas adecuadas para su uso en la invención.

En ciertas realizaciones en donde el soporte es una pluralidad de perlas, cada perla de la pluralidad de perlas está unida a no más de una de la molécula quelante de hierro, la molécula de unión a hemoglobina y la molécula de unión a hemo. Es decir, cada perla tiene solo un tipo de agente aglomerante unido a ella. Para evitar dudas, en tales realizaciones, cada perla puede tener múltiples moléculas de agente aglomerante unidas, pero esas moléculas son del mismo tipo. En tales realizaciones, las proporciones de los agentes aglomerantes descritos anteriormente se pueden lograr combinando perlas, cada una unida a un tipo de agente aglomerante, en los porcentajes requeridos.

En ciertas realizaciones, las perlas son perlas de agarosa. En tales realizaciones, los agentes aglomerantes pueden unirse a las perlas usando el siguiente esquema de reacción:



En este esquema de reacción, las perlas de agarosa comprenden un éster de N-hidroxisuccinimidilo activado en el extremo de un espaciador de 10 átomos. Los agentes aglomerantes se unen luego a las perlas mediante una reacción de sustitución entre una amina primaria en el agente aglomerante y el grupo saliente de N-hidroxisuccinimidilo.

En ciertas realizaciones de la invención, la pluralidad de perlas puede proporcionarse suelta, es decir, no contenida. Alternativamente, en ciertas realizaciones, puede estar contenida la pluralidad de perlas. En ciertas realizaciones de este tipo, las perlas pueden proporcionarse en una estructura de "bolsa de té". Como apreciará la persona experta, una "bolsa de té" es una estructura que puede suspenderse en un líquido, la estructura está compuesta por una membrana capaz de contener las perlas y que es lo suficientemente porosa como para permitir que el líquido se mueva a través de la membrana (en ambas direcciones) y permitiendo así que el líquido circule alrededor de las perlas. Preferiblemente, la estructura de la bolsa de té es adecuada para su uso en sangre.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el soporte se forma como un elemento único. Es decir, en tales realizaciones, todos los agentes aglomerantes están unidos a un soporte único continuo. Ejemplos de soportes formados como elementos únicos incluyen: una capa laminada a la que se unen todos los agentes aglomerantes o un

sólido tridimensional cuya superficie o superficies están recubiertas con los agentes aglomerantes. Dicho sólido puede tener la forma de un disco rígido o cartucho, una malla, una matriz capilar o una matriz de panal, por ejemplo, una matriz de poliestireno reticulada.

5 En ciertas realizaciones, el soporte puede estar formado por fibras. En ciertas realizaciones de este tipo, las fibras se forman en una malla. En ciertas realizaciones de este tipo, las fibras forman un filtro, opcionalmente un filtro de exclusión por tamaño.

10 En ciertas realizaciones, el dispositivo de la presente invención comprende además un recipiente para el almacenamiento o pasaje de sangre, en donde el recipiente contiene el soporte. Los recipientes adecuados para el almacenamiento o pasaje de sangre incluyen aquellos recipientes que son fisiológicamente inertes y clínicamente adecuados para contener sangre y productos sanguíneos para ser administrados a un sujeto. Estos incluyen bolsas de sangre (por ejemplo, bolsas de sangre utilizadas para almacenar sangre donada para transfusiones futuras), catéteres, cánulas, una porción de una línea de flujo (una línea de flujo es un aparato que se utiliza para administrar fluidos a un sujeto, por ejemplo por vía intravenosa o intraarterial), jeringas y los componentes de circuitos extracorpóreos (por ejemplo, aquellos utilizados para derivación cardiopulmonar o hemodiálisis y bombas cardíacas).
15 La persona experta apreciará que tales recipientes se pueden usar en combinación: por ejemplo, la sangre que ha pasado a través de un circuito extracorpóreo puede pasar a través de una línea de flujo y al sujeto a través de una cánula, cualquiera de los cuales puede incluir un dispositivo de acuerdo a la presente invención.

20 En ciertas realizaciones preferidas, el recipiente es una bolsa de sangre. En ciertas realizaciones de este tipo, la bolsa de sangre es para el almacenamiento de sangre que se utilizará en futuras transfusiones. En ciertas realizaciones preferidas, el recipiente es una línea de flujo para el suministro de sangre a un paciente, por ejemplo, desde una bolsa de sangre o circuito extracorpóreo. En ciertas realizaciones de este tipo, el soporte contenido por la línea de flujo puede alojarse en una cámara de flujo. Una cámara de flujo de acuerdo con esta realización está dispuesta para permitir que un volumen suficiente de la sangre entre en contacto con los agentes aglomerantes unidos al soporte para que se eliminen los componentes derivados de la hemólisis, pero para mantener una tasa de flujo aceptable de la sangre a través del cámara de flujo y en el paciente. En una de tales realizaciones, la cámara de flujo es una columna de perlas dispuesta en la línea de flujo, con un diámetro de lumen y una densidad de perlas suficiente para permitir una tasa de flujo de sangre aceptable, por ejemplo, una tasa de flujo de 100-500 ml/min, por ejemplo una tasa de flujo de 200 ml/min.

30 En ciertas realizaciones de la invención en donde el dispositivo comprende un recipiente para el almacenamiento o pasaje de sangre que contiene el soporte, el soporte puede integrarse parcial o totalmente con el recipiente. En ciertas realizaciones en donde el soporte está parcialmente integrado con el recipiente, el soporte puede anclarse al recipiente desde un sitio en el soporte. Por ejemplo, en realizaciones en donde el soporte es un elemento único o una bolsa de té de perlas, el soporte puede estar anclado o atado al recipiente en una o más posiciones en el soporte, pero de otra manera puede moverse libremente. Tal disposición tendría la ventaja adicional de que, en uso, el soporte puede circular dentro de la sangre o el flujo de sangre, pero no correrá el riesgo de bloquear el flujo de sangre, como puede suceder si el soporte flotara libremente.

40 En ciertas otras realizaciones, el soporte está totalmente integrado con el recipiente. En tales realizaciones, el soporte puede formar la superficie luminal interna del recipiente, por ejemplo, el soporte puede ser la superficie interna de la bolsa de sangre o la superficie interna de la línea de flujo. En otras de tales realizaciones, el soporte puede estar alojado y formar la estructura de una cámara de flujo. Por ejemplo, la estructura interna de la cámara de flujo puede ser el soporte en forma de matriz capilar o matriz de panal.

45 En ciertas realizaciones alternativas, el soporte no está integrado con el recipiente. En tales realizaciones, el soporte no está fijado a la superficie luminal interna del recipiente. Por ejemplo, en realizaciones en donde el soporte es una pluralidad de perlas y el recipiente es una línea de flujo, las perlas pueden estar sueltas pero contenidas en una cámara de flujo. En realizaciones en donde el soporte es una pluralidad de perlas y el recipiente es una bolsa de sangre, la pluralidad de perlas puede proporcionarse como una bolsa de té de perlas que no está anclada al recipiente.

50 En ciertas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el soporte se fabrica a partir de un polímero o vidrio insoluble. Los polímeros o vidrios insolubles adecuados son aquellos que están clínicamente aprobados para el contacto con productos sanguíneos que se administrarán a un paciente y a los que se pueden unir los agentes aglomerantes. Dichos polímeros insolubles adecuados incluyen biopolímeros funcionalizados naturales, tales como un polímero de polisacárido (por ejemplo, agarosa) y polímeros sintéticos, tales como polímeros basados en poliestireno, poliácridamida y polietileno. En ciertas realizaciones, el polímero sintético es un copolímero/injertado, por ejemplo, PEGilado. En ciertas realizaciones, el polímero insoluble es agarosa.

55 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato que comprende un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En ciertas realizaciones, el aparato es para circulación sanguínea extracorpórea, tal como en derivación cardiopulmonar, hemodiálisis, oxigenación de membrana extracorpórea, o es para uso in situ, por ejemplo como parte de un dispositivo de asistencia ventricular.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método in vitro para eliminar componentes derivados de la hemólisis de la sangre almacenada, que comprende aplicar la sangre almacenada a un dispositivo de acuerdo con la invención. En ciertas realizaciones, el método se aplica a la sangre antes de la transfusión de la sangre a un paciente, por ejemplo, a la sangre almacenada de una bolsa de sangre. También se proporcionan, aunque no forman parte de la invención, métodos en los que el método se aplica a la sangre que se ha extraído de un sujeto en un circuito extracorpóreo, antes de que la sangre con los componentes derivados de la hemólisis eliminados se reintroduzca en el paciente.

Se proporciona un método in vitro para reducir la hemólisis en sangre, el método comprende aplicar la sangre a un dispositivo o aparato de acuerdo con la invención. El método no forma parte de la invención. En ciertas realizaciones, el método se aplica a la sangre antes de la transfusión de la sangre a un paciente, por ejemplo, a la sangre almacenada de una bolsa de sangre. También se proporcionan métodos en los que el método se aplica a la sangre que se ha extraído de un sujeto a un circuito extracorpóreo, antes de que la sangre con los componentes derivados de la hemólisis eliminados se reintroduzca en el paciente.

La eliminación de los componentes derivados de la hemólisis cuando se usa el método de la invención es particularmente efectiva ya que la combinación de agentes aglomerantes proporciona un filtro de "acción única". Tal dispositivo de "acción única" permite que todos los tipos de componentes derivados de la hemólisis se eliminen en un paso único, reduciendo así el riesgo demostrado de hemólisis desencadenada por la exposición a sustratos de filtro que se exacerban durante los pasos de filtro secuenciales.

También se describe, aunque no forma parte de la invención, un método para tratar o prevenir una patología asociada a la hemólisis en un sujeto, el método comprende aplicar sangre de un sujeto a un dispositivo o un aparato de acuerdo con la presente invención y administrar dicha sangre a un sujeto. El sujeto del que se toma la sangre y el sujeto al que se puede administrar la sangre es el mismo sujeto. De acuerdo con este método, a la sangre administrada al sujeto se le han eliminado componentes derivados de la hemólisis. Por lo tanto, el método previene las patologías asociadas a la hemólisis que pueden ser causadas por la administración o transfusión de sangre que contiene componentes derivados de la hemólisis, por ejemplo, como resultado del almacenamiento, estrés mecánico, osmótico o térmico. El método también trata la patología asociada a la hemólisis ya que la sangre administrada tiene bajos niveles de componentes derivados de la hemólisis y, por lo tanto, diluye los niveles de estos componentes derivados de la hemólisis que circulan en el sujeto. Además, cuando la sangre a la que se aplica el método proviene del mismo paciente al que se administra de acuerdo con el método, luego el método actúa para eliminar los componentes derivados de la hemólisis que causan patología asociada a la hemólisis que circulan en el sujeto en un tratamiento de tipo diálisis.

Las patologías asociadas a la hemólisis adecuadas para prevenirse y tratarse mediante dichos métodos incluyen hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión orgánica (por ejemplo, insuficiencia renal, daño hepático, lesión tubular renal, hematopoyesis extramedular y lesión pulmonar aguda), síndrome de dificultad respiratoria aguda y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Las patologías asociadas a la hemólisis pueden ser causadas por lo siguiente, cada una de las cuales puede tratarse mediante los métodos divulgados en este documento: anemia hemolítica, hemoglobinopatía (por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemia (alfa, beta o delta)), hemólisis inducida por autoinmunidad (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), hemólisis autoinmune inducida por fármacos, hemólisis no autoinmune inducida por fármacos, infección (por ejemplo, malaria, fiebre amarilla, dengue), afecciones hemorrágicas, síndrome HELLP. Las patologías asociadas a la hemólisis también pueden ser causadas por la administración de sangre almacenada, la administración de sangre derramada o el uso de una bomba cardíaca, ya sea extracorpórea (por ejemplo, como parte de la diálisis o la oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)) o in situ (por ejemplo, una asistencia ventricular dispositivo). El uso de dispositivos o aparatos de acuerdo con la invención puede tratar o prevenir patologías asociadas a la hemólisis causadas por estas afecciones eliminando los componentes derivados de la hemólisis de la sangre antes de administrar una transfusión de sangre a un sujeto o como parte de un circuito extracorpóreo para eliminar componentes derivados de la hemólisis que están presentes en la sangre circulante del sujeto.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula quelante de hierro para su uso en el tratamiento o prevención de la patología asociada a la hemólisis en un sujeto, en donde la molécula quelante de hierro está unida a un soporte al que también están unidas al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula de unión a hemo.

En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a la hemólisis tratada o prevenida se selecciona de hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión orgánica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a la hemólisis es causada por anemia hemolítica, una hemoglobinopatía, hemólisis inducida por autoinmunidad (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)), hemólisis autoinmune inducida por droga, no inducida por droga -hemólisis autoinmune, infección, una condición hemorrágica, administración de sangre almacenada, administración de sangre derramada o uso de una

bomba cardíaca, ya sea extracorpórea (por ejemplo, como parte de diálisis o oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)) o in situ (por ejemplo, ventricular dispositivo de asistencia).

5 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de unión a hemoglobina para uso en el tratamiento o prevención de patología asociada a hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemoglobina está unida a un soporte al que al menos una molécula quelante de hierro, y al menos una molécula de unión a hemo también están unidas.

En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a la hemólisis tratada o prevenida se selecciona de hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión orgánica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

10 En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a la hemólisis es causada por anemia hemolítica, una hemoglobinopatía, hemólisis inducida por autoinmunidad (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)), hemólisis autoinmune inducida por droga, no inducida por droga -hemólisis autoinmune, infección y afección hemorrágica, administración de sangre almacenada, administración de sangre derramada o uso de una bomba cardíaca, ya sea extracorpórea (por ejemplo, como parte de diálisis o oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)) o in situ (por ejemplo, ventricular dispositivo de asistencia).

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de unión a hemo para su uso en el tratamiento o prevención de patología asociada a hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemo está unida a un soporte al que al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula quelante de hierro también están unidas.

20 En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a hemólisis tratada o prevenida se selecciona de hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión orgánica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

25 En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la patología asociada a la hemólisis es causada por anemia hemolítica, una hemoglobinopatía, hemólisis inducida por autoinmunidad (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)), hemólisis autoinmune inducida por droga, no inducida por droga -hemólisis autoinmune, infección, afección hemorrágica, administración de sangre almacenada, administración de sangre derramada o uso de una bomba cardíaca, ya sea extracorpórea (por ejemplo, como parte de diálisis o oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)) o in situ (por ejemplo, ventricular dispositivo de asistencia).

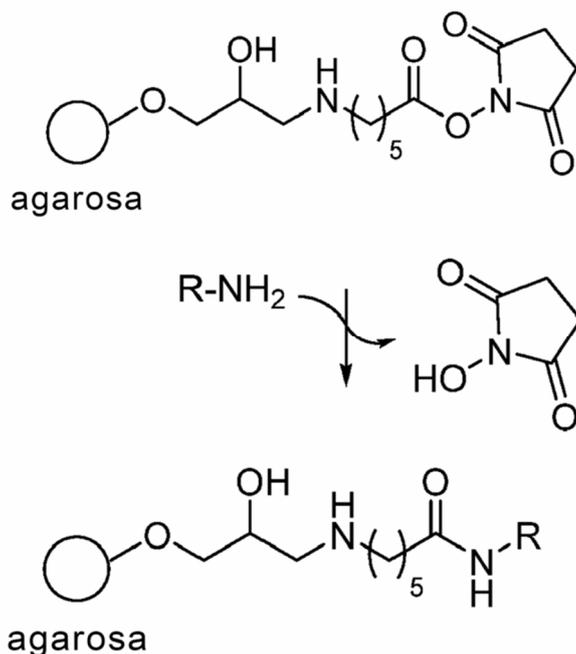
30 En todos los aspectos y realizaciones relevantes de la presente invención, el sujeto o sujetos es preferiblemente un sujeto mamífero, más preferiblemente un sujeto humano.

A menos que se indique lo contrario o sea claramente incompatible, cualquiera de las realizaciones de la invención puede usarse en combinación con una cualquiera o más de las otras realizaciones de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Inmovilización de agentes aglomerantes

35 Una molécula de unión a hemoglobina (Hb) (haptoglobina), una molécula de unión a hemo (albúmina sérica humana (HSA) y una molécula quelante de hierro (desferrioxamina (DFO)) se unen a perlas de agarosa en tres lotes separados, de manera que una perla se une solo a una de haptoglobina, HSA y DFO. Cada agente aglomerante se une a las perlas usando el siguiente esquema de reacción:



En este esquema de reacción, las perlas de agarosa comprenden un éster de N-hidroxisuccinimidil activado en el extremo de un espaciador de 10 átomos. Los agentes aglomerantes se inmovilizan luego en las perlas mediante una reacción de sustitución entre una amina primaria en el agente aglomerante y el grupo saliente de N-hidroxisuccinimidil.

Se determinó que la carga máxima de cada perla de cada agente aglomerante era: HSA - 22,23 mg de HSA/ml de perlas; DFO – 24,2 mg de DFO/ml de perlas; haptoglobina (Hp): 10,3 mg de Hp/ml de perlas.

Se demostró que las perlas funcionalizadas respectivas sacaban de la solución cada uno de los componentes derivados de la hemólisis (hemoglobina, hemo y hierro libre). Usando perlas cargadas con 2,7 HSA mg/ml de perlas y una existencia de hemo de 18.6 $\mu\text{g/ml}$, se vinculó un total de $1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ de perlas después de 2 horas (50% de unión). De manera similar, las perlas de agarosa cargadas con DFO podrían unir y eliminar iones férricos libres de la solución. Usando una existencia de Fe^{2+} (3,4 $\mu\text{g/mL}$) o Fe^{3+} (3,7 $\mu\text{g/mL}$), se observó la unión al DFO (22,3 mg/mL de carga de la perla) (2,59 mg/mL de la perla, 3,05 mg/mL de la perla respectivamente).

Para la haptoglobina (Hp), se determinó la capacidad máxima de unión a hemoglobina (Hb) (figura 3).

15 Ejemplo 2 - curso de tiempo de RBCs almacenados

Materiales y métodos

Aislamiento y almacenamiento

Se recogió sangre completa (450 ml \pm 10%) de un voluntario único sano en una bolsa de sangre (Fernesus) que contenía anticoagulante CPDA-1 (63 ml). Después de la separación del plasma por centrifugación (10 min, 2000 \times g), la muestra se agotó, luego de lo cual se reintrodujo el plasma (17% del volumen total). En esta etapa, los RBC se dividieron en pocillos individuales (4,1 ml en cada uno, véase infra), a los que se añadieron 2,9 ml de una solución aditiva (ya sea regulador de citrato-fosfato isotónico 10 mM o AS-3, ambos pH 5,8) para hacer un volumen final de 7 ml. Perlas funcionalizadas (perlas a las que se habían unido haptoglobina, HSA y DFO), y se añadieron perlas de control (sin ningún agente aglomerante) de acuerdo con el siguiente esquema en la tabla 1. Las placas se prepararon por triplicado. Las perlas funcionalizadas eran una mezcla de perlas funcionalizadas con haptoglobina, HSA y DFO en las proporciones 80%, 15% y 5% respectivamente.

Las placas se incubaron con balanceo suave a temperatura ambiente durante 7 días, para acelerar la hemólisis.

Tabla 1

FP	CP	BP	Regulador de citrato-fosfato
FA	CA	BA	Regulador AS-3
Perlas Funcionalizadas	Perlas de control	En blanco (sin perlas)	

El pH extracelular se midió diariamente usando un electrodo de microvolumen (Jenway). El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la comparación de la hemoglobina libre en el sobrenadante (Hbs) versus la hemoglobina total (HbT), y corrigiendo el hematocrito (Hct):

$$\% \text{ hemólisis} = (Hb_s \times (100 - \%Hct)) / Hb_T$$

5

El sobrenadante se preparó usando dos pasos de centrifugación. La muestra se sometió primero a centrifugación a 2000 × g durante 10 minutos, después de lo cual se retiró el sobrenadante y se centrifugó a 15 000 × g durante 10 minutos. El sobrenadante de las segundas centrifugaciones se analizó para determinar la concentración de HbS usando el kit de ensayo de hemoglobina QuantiChrom™ (BioAssay Systems).

10 La hemoglobina total se determinó diluyendo 10 µl de muestra en 990 µl de agua MilliQ e incubando durante una hora para causar hemólisis completa. La solución resultante se centrifugó a 15 000 × g durante 10 minutos y el sobrenadante se sometió a ensayo para determinar la concentración de HbT usando el kit de ensayo de hemoglobina QuantiChrom™ (BioAssay Systems). Para las muestras que contenían perlas, la muestra se filtró primero para eliminar las perlas usando un filtro de células de malla de 40 µm con la ayuda de una centrifugación suave (500 por ejemplo, 15 1 min).

El hematocrito se determinó manualmente recogiendo (filtrada) la muestra en tubos microcapilares y girando en una centrífuga convencional (3500 g durante 10 minutos) colocando un inserto de espuma en un tubo de centrífuga. La muestra Hct se midió luego cuantificando visualmente el porcentaje de células empaquetadas usando un lector microcapilar.

20 Resultados

Se observó una disminución considerable en la hemólisis para los pocillos que contienen perlas funcionalizadas en comparación con los pocillos de control (perlas en blanco y sin perlas) (figura 4). Este efecto se observó para ambos reguladores utilizados, y se observó en todos los puntos de tiempo medidos (figura 4 A y B).

25 La reducción en la hemólisis al usar las perlas funcionalizadas con los 3 agentes aglomerantes fue aún más notable dado que la exposición a las perlas solas (perlas de control) puede hacer que aumenten las tasas de hemólisis (figura 4 - perlas de control frente a blanco). Esto demuestra que el uso de perlas funcionalizadas con una molécula de unión a hemoglobina (Hb), una molécula de unión a hemo y una molécula quelante de hierro puede reducir en gran medida la hemólisis y, además, superar el aumento de la hemólisis observada cuando los glóbulos rojos están expuestos a sustratos de filtro.

30

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para la eliminación de componentes derivados de la hemólisis de la sangre, el dispositivo comprende:
un soporte y
una pluralidad de agentes aglomerantes unida a dicho soporte,
- 5 en donde los agentes aglomerantes comprenden al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina y al menos una molécula de unión a hemo.
2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un recipiente para el almacenamiento o pasaje de sangre, en donde el recipiente contiene el soporte.
3. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el soporte es:
- 10 (i) una pluralidad de perlas, opcionalmente en donde cada perla de la pluralidad de perlas está unida a no más de una de: la molécula quelante de hierro, la molécula de unión a hemoglobina y la molécula de unión a hemo; o
- (ii) un elemento único al que se unen al menos una molécula quelante de hierro, al menos una molécula de unión a hemoglobina y al menos una molécula de unión a hemo, opcionalmente en donde toda la pluralidad de agentes aglomerantes está unida al elemento único.
- 15 4. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en donde el soporte está total o parcialmente integrado con el recipiente.
5. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 en el que el soporte no está integrado con el recipiente.
- 20 6. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el soporte comprende un polímero insoluble o un vidrio, opcionalmente en donde el polímero insoluble es un biopolímero funcionalizado natural o un polímero sintético.
7. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula quelante de hierro es desferrioxamina; y/o
- en donde la molécula de unión a hemoglobina es haptoglobina; y/o
- 25 en donde la molécula de unión a hemo es albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica humana.
8. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el dispositivo es para la eliminación in vitro o ex vivo de componentes derivados de la hemólisis de la sangre.
9. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la molécula de unión a hemoglobina, la molécula de unión a hemo y la molécula quelante de hierro están presentes en las proporciones 50-90%, 5-50% y 1-30% respectivamente.
- 30 10. Un aparato que comprende un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, opcionalmente en donde el aparato es adecuado para usar como un sistema de circulación sanguínea extracorpórea o para administrar sangre desde una bolsa de sangre a un paciente.
11. Un método in vitro para eliminar componentes derivados de la hemólisis de una muestra de sangre almacenada, que comprende aplicar la muestra de sangre almacenada a un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 35 12. Una molécula quelante de hierro para usar en el tratamiento o prevención de una patología asociada a la hemólisis en un sujeto, en donde la molécula quelante de hierro está unida a un soporte al que también están unidas al menos una molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula de unión a hemo.
- 40 13. Una molécula de unión a hemoglobina para usar en el tratamiento o prevención de una patología asociada a la hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemoglobina está unida a un soporte al que también se unen al menos una molécula quelante de hierro y al menos una molécula de unión a hemo
14. Una molécula de unión a hemo para uso en el tratamiento o prevención de una patología asociada a la hemólisis en un sujeto, en donde la molécula de unión a hemo está unida a un soporte a la que también se unen al menos una
- 45 molécula de unión a hemoglobina, y al menos una molécula quelante de hierro.
15. La molécula quelante de hierro, la molécula de unión a la hemoglobina o la molécula de unión al hemo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 12-14, en donde la patología asociada a la hemólisis se selecciona de hipertensión, vasooclusión, lesión vascular, aterosclerosis, lesión orgánica, síndrome de dificultad respiratoria agudo

- 5 y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; o en donde la patología asociada a la hemólisis es causada por anemia hemolítica, una hemoglobinopatía, hemólisis autoinmune inducida, tal como hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), hemólisis autoinmune inducida por fármacos, hemólisis no autoinmune inducida por fármacos, infección, una condición hemorrágica, administración de sangre almacenada, administración de sangre derramada o uso de una bomba cardíaca, ya sea extracorpórea, tal como parte de la diálisis o la oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) o in situ, tal como un dispositivo de asistencia ventricular.

Figura 1

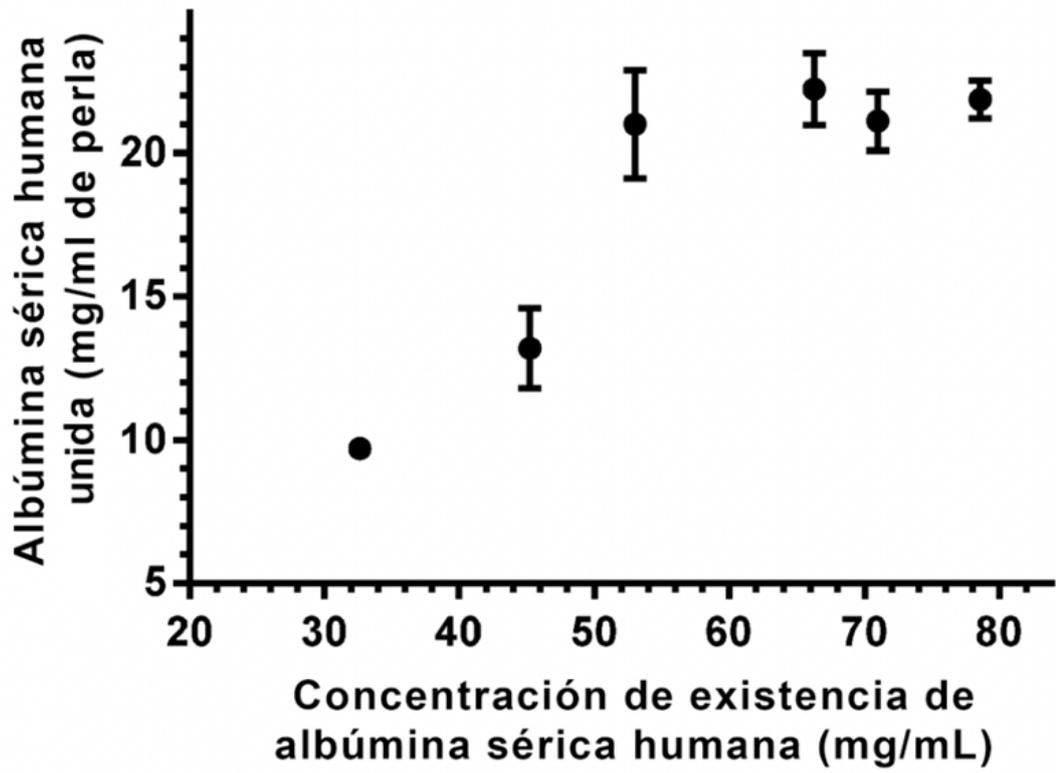


Figura 2

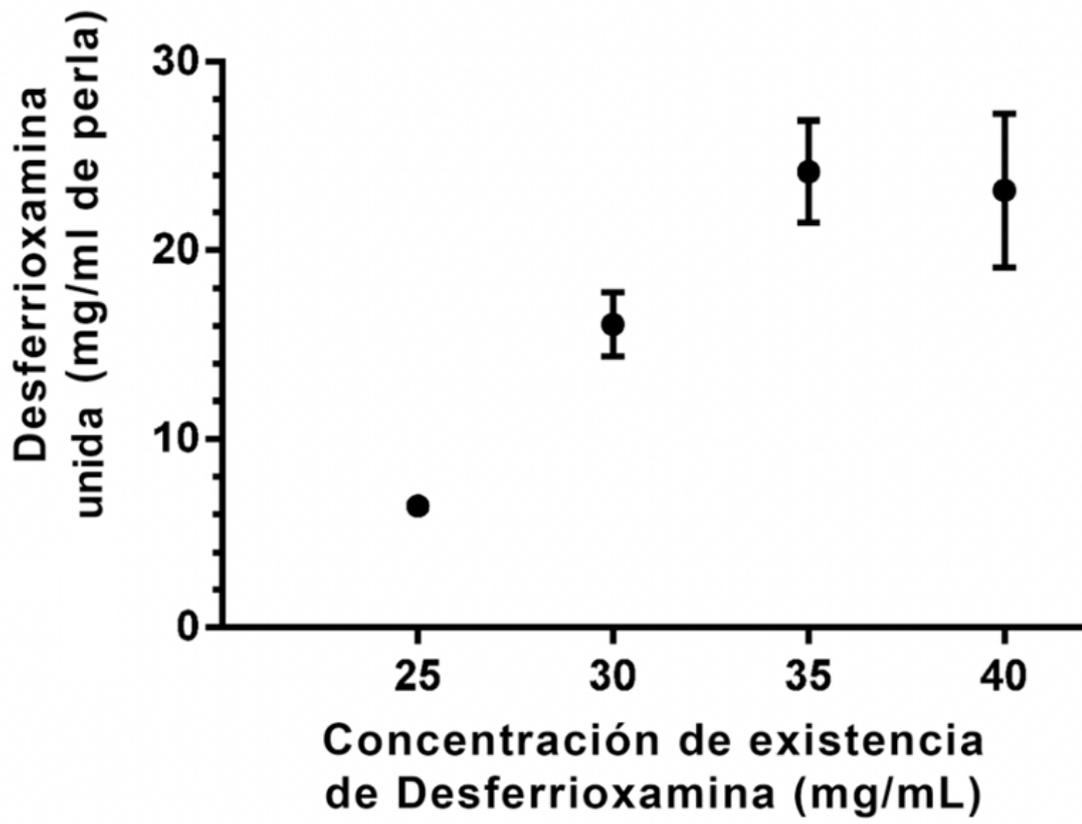


Figura 3

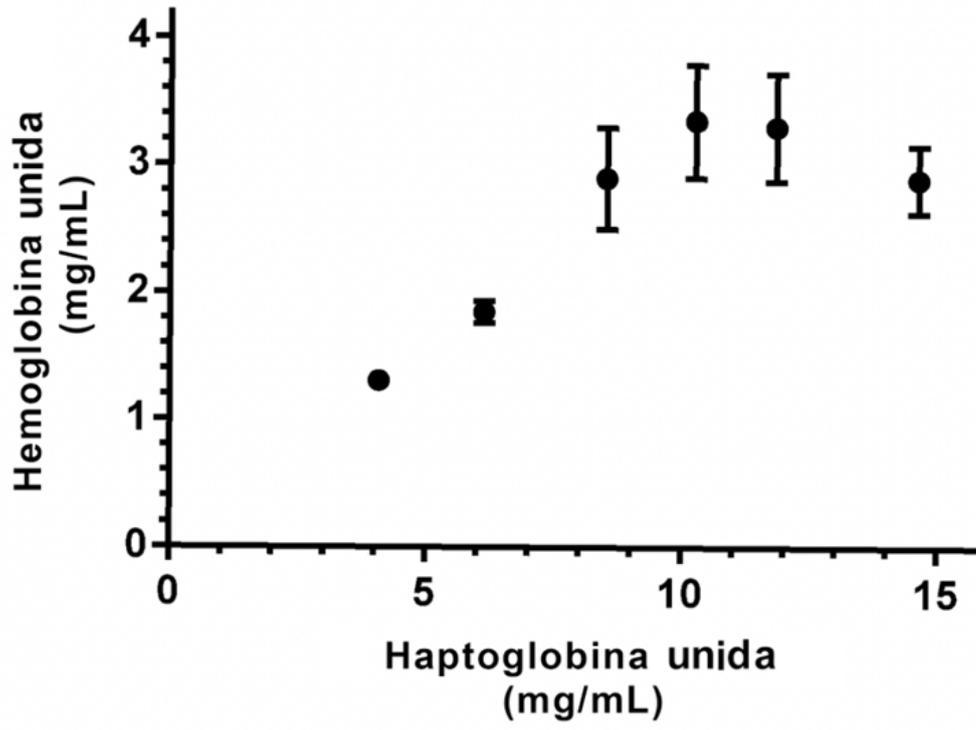
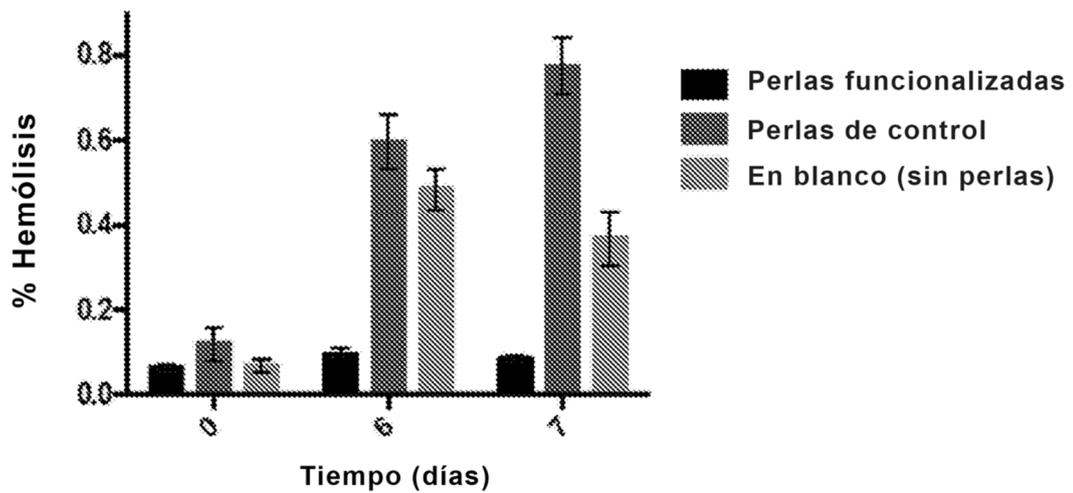


Figura 4

A

Porcentaje de hemólisis - Regulador Citrato-Fosfato



B

Porcentaje de hemólisis - AS-3

