



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 386**

51 Int. Cl.:
A61M 1/32 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06008934 .9**
96 Fecha de presentación : **04.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1704880**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Separación mejorada.**

30 Prioridad: **25.04.2002 SE 2002101257**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2009

73 Titular/es: **Alteco Medical AB.**
Lilla Grabrödersgatan 3C
222 22 Lund, SE

72 Inventor/es: **Johnson, Bo y**
Ljunggren, Lennart

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 328 386 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

Separación mejorada.

5 Área de la invención

La presente invención se relaciona con un método y un dispositivo para eliminar selectivamente un componente de una solución acuosa, tal como agua, sangre entera o un fluido corporal. Más específicamente, la invención se relaciona con un método, donde la solución acuosa se deja pasar a través de una matriz de separación integral rígida sin ser excluida de la misma.

Técnica anterior

Los procesos inflamatorios, tales como una sepsis son la principal causa de morbilidad y mortalidad en humanos. Se estima que, cada año, de 400.000 a 500.000 episodios de sepsis se traducen en 100.000 a 175.000 muertes humanas en los Estados Unidos solamente. En Alemania, las ratas de sepsis son de hasta el 19% de los pacientes estacionados en las unidades de cuidados intensivos. La sepsis también se ha convertido en la causa principal de muerte en unidades de cuidados intensivos entre pacientes con enfermedades no traumáticas. A pesar de los grandes avances en las últimas décadas en el tratamiento de infecciones serias, la incidencia y mortalidad debida a la sepsis continua en aumento.

Hay tres tipos principales de sepsis caracterizados por el tipo de organismo infeccioso. La más común es la sepsis Gram-negativa. La mayoría de estas infecciones son causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los patógenos Gram-positivos tales como los estafilococos y estreptococos, son la segunda mayor causa de sepsis. El tercer grupo principal incluye los hongos. Las infecciones fúngicas constituyen un porcentaje relativamente pequeño de los casos de sepsis, pero se traducen en una alta rata de mortalidad.

Un mecanismo bien establecido en la sepsis está relacionado con los componente tóxicos de las bacterias Gram-negativas, esto es, la estructura de la pared celular de lipopolisacáridos (LPS, endotoxinas), la cual está compuesta de un grupo de ácidos grasos, un grupo fosfato y una cadena de carbohidratos.

Varias de las respuestas del huésped a las endotoxinas han sido identificadas, tales como la liberación de citoquinas, que son producidas localmente. En el caso de una estimulación extensa, sin embargo, hay un vertimiento sobre la sangre periférica y se obtienen efectos nocivos potenciales, tales como la disfunción inducida de los órganos.

Los mediadores claves del choque séptico son el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), la interleucina 1 (I1-1) y la interleucina 17 (I1-17), que son liberadas por monocitos y macrófagos. Actúan de manera sinérgica causando una cascada de cambios fisiológicos que llevan al colapso de la circulación y al fallo múltiple de órganos. En efecto, altas concentraciones de TNF- α , pueden simular los síntomas y surgir de la sepsis.

Normalmente, las endotoxinas se mantienen dentro del lumen del intestino. Por ejemplo, durante un bypass cardiopulmonar la presencia de la isquemia esplanquica o la disopsia causa la interrupción de la barrera mucosa y la translocalización (esto es el transporte de endotoxinas desde el intestino al sistema circulatorio) de endotoxinas del lumen del intestino a la circulación portadora.

Se han usado antibióticos de tipos variables ampliamente para prevenir y tratar las infecciones. Sin embargo, para muchos antibióticos comúnmente utilizados se desarrolla una resistencia al antibiótico entre diversas especies de bacterias. Esto es particularmente cierto para la flora microbiana residente en hospitales, donde los organismos están bajo una presión constante selectiva para desarrollar resistencia. Además, en el hospital la alta densidad de pacientes potencialmente infectados y el grado de contacto personal a personal y personal a paciente facilita que se esparzan los organismos resistentes a los antibióticos. Los antibióticos usados son los más económicos, los más seguros y los más fáciles de administrar y pueden no tener un espectro suficientemente amplio para suprimir ciertas infecciones. Los antibióticos pueden ser tóxicos en grados diversos causando alergias, interacciones con otros fármacos, y causando daños directos a los órganos principales (por ejemplo, hígado, riñones). Muchos antibióticos también cambian la flora intestinal normal, lo que produce diarrea y mala absorción nutricional.

Ciertos antibióticos se sabe que neutralizan la acción de las endotoxinas, tal como la polimixina B. Este antibiótico se enlaza a la parte lípida A de la endotoxina y neutraliza su actividad. La polimixina no se usa de manera rutinaria debido a su toxicidad. Solamente se da a pacientes bajo constante supervisión y monitorización de la función renal.

Además, con el fin de superar algunas de las limitaciones inherentes a la inmunización activa contra los componentes bacterianos, se han usado diversas técnicas para producir anticuerpos que enlazan las endotoxinas. Un gran número de anticuerpos han sido preparados por inmunización de humanos con bacterias. Con el fin de desarrollar preparaciones más consistentes de anticuerpos terapéuticos, se han desarrollado numerosos anticuerpos monoclonales reactivos al LPS. Desafortunadamente, los estudios clínicos no han resultado beneficiosos. Sin embargo, debe anotarse que estas pruebas son llevadas a cabo en humanos después de la aparición de los síntomas de sepsis. Se cree en general que un tratamiento con anticuerpos anti-endotoxina, administrado después de la sepsis, puede producir pocos beneficios porque estos anticuerpos no pueden invertir la cascada inflamatoria iniciada por la endotoxina.

En JP 06022633, se muestra un adsorbente para anticuerpos antilípidicos, el cual comprende un compuesto con un grupo funcional aniónico y movilizables sobre un material poroso insoluble en agua. El material poroso puede ser agarosa, celulosa, dextrano, poliacrilamida, vidrio, sílica gel, o un polímero duro hecho a partir de un copolímero estireno-divinilbenceno, y el material poroso es empacado en un lecho de partículas separadas en un dispositivo de separación.

En intentos para eliminar componentes de la sangre, se han preparado diferentes materiales adsorbentes. Un adsorbente para remoción de endotoxinas comprende un ligando inmovilizado sobre un medio de soporte en fase sólida el cual se muestra en WO 01/23413. Un medio de soporte preferido está en la forma de perlas. Cuando se empaca en un dispositivo de separación, el medio de soporte en fase sólida es suficientemente poroso para permitir el paso de células de sangre entre las perlas.

En WO 00/62836, el material adsorbente tiene un tamaño y una estructura adaptada para eliminar la β -2 microbulina de la sangre. El material adsorbente de este documento puede ser un polímero sintético macroporoso con una superficie de perlas y de poros modificada para evitar la adsorción de proteínas y plaquetas. Sin embargo, las perlas esféricas individuales del polímero fueron destruidas mecánicamente con una carga de aproximadamente 500 g, la cual se obtiene por ejemplo en una columna empacada con las perlas. Tal carga resulta en una caída de presión considerable sobre la columna.

Con el fin de reducir la caída de presión, se preparó un adsorbente en EP 464872, el cual comprende partículas de gel duro poroso insoluble en agua que tienen un límite de exclusión de 10^6 - 10^9 Dalton. El lecho de gel es usado para la remoción selectiva de lipoproteínas de la sangre o plasma en un tratamiento por circulación extracorpórea.

De la misma forma, en WO 01/23413 el material de soporte poroso para la eliminación de endotoxinas son unas perlas, las cuales pueden ser colocadas dentro de un contenedor, teniendo las perlas un tamaño suficiente para proveer el espacio requerido entre las mismas cuando se empacan en una columna o en un lecho de filtración. El material de soporte poroso también puede ser fibras huecas de microfiltración o membranas de lámina plana con el fin de minimizar las caídas de presión.

En EP 424698 se muestra un adsorbente para eliminar biomacromoléculas, el cual consiste de un portador de partículas esféricas porosas que tiene un tamaño de partícula de 50-150 micrones y un límite de exclusión de por lo menos 10^5 Dalton. La polimixina B es acoplada a las partículas, las cuales son subsecuentemente colocadas dentro de un cartucho para ser usadas en un sistema para la eliminación extracorpórea de la endotoxina a partir de la sangre entera.

En estos sistemas tradicionales para la remoción extracorpórea de componentes tóxicos de la sangre, un contenedor o cartucho es llenado primero con un líquido y las perlas porosas adsorbentes son introducidas posteriormente. En US 6, 408, 894 se muestra un método, el cual proporciona una distribución más uniforme y un empaque más denso de las perlas. El método involucra suministrar con fuerza una mezcla de líquido y perlas en un contenedor de manera tal que el líquido es exprimido de la mezcla y expulsado del contenedor.

Así, una alimentación de células sanguíneas facilita la eliminación de compuestos presentes en el plasma como se describió más arriba, por ejemplo, en WO 00/62836 o WO 01/23413. Sin embargo, tal técnica involucra dos etapas de separación lo cual podría contribuir a un riesgo incrementado de activación celular adversa debida a la bioincompatibilidad.

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es eliminar o mitigar por lo menos parcialmente una o varias de las desventajas anteriormente mencionadas.

De acuerdo con un primer aspecto, se provee un método para eliminar selectivamente por lo menos un componente de una solución acuosa, que comprende: pasar dicha solución acuosa a través de una matriz de separación integral rígida sin ser excluida por dicha matriz, teniendo dicha matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que varía desde 5 micrones hasta 500 micrones y una superficie activa que varía desde 0.5 cm^2 hasta 10 m^2 ; enlazar por lo menos un componente de la solución acuosa mediante una unidad estructural de ácido biliar inmovilizada sobre dicha matriz; donde dicha matriz es obtenida por un proceso seleccionado del grupo que comprende: procesos de sinterización, moldeo y espumado. La unidad estructural de ácido biliar puede ser una unidad estructural de ácido desoxicólico.

De acuerdo con una realización, el método comprende adicionalmente: recubrir o modificar la superficie de dicha estructura porosa de dicha matriz con el fin de disponer dicha unidad estructural de ácido biliar sobre dicha estructura porosa.

La matriz puede ser hecha de un material seleccionado del grupo que comprende: metal, óxido inorgánico, carbono, vidrio, cerámica, polímero sintético, y un polímero natural y combinaciones de los mismos. La matriz puede ser hecha de un metal ferromagnético. Un polímero sintético o natural puede ser recubierto sobre dicho material. El polímero sintético puede ser seleccionado del grupo que comprende: una poliolefina, un polímero vinílico, un polímero que contiene flúor, un poliacrilato, una poliamida, una poliimida, una poliimina, un poliestireno y sus copolímeros, un

caucho de silicona, un poliéster, un policarbonato, un poliuretano, un polisulfonato, un poliglicol, un poliéter, y un polialquil óxido, y un copolímero y un híbrido de los mismos. El polímero natural puede ser seleccionado del grupo que comprende: un polisacárido, un policarbohidrato, un ácido poliamino, un ácido poliláctico, o un ácido poliglicólico, y un copolímero y un híbrido de los mismos.

La modificación de la superficie puede ser seleccionada del grupo que comprende: electrodeposición, electroevaporación, deposición química por plasma, deposición de un flujo de plasma iónico, polimerización de plasma, deposición de polímero en superficie mejorada por plasma, y deposición por vapor químico.

Un ligando adicional puede ser inmovilizado sobre dicha matriz, y dicho ligando puede ser seleccionado del grupo que comprende: una proteína, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un carbohidrato, un polisacárido, una hormona, un antioxidante, una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, un vitamina soluble en grasas, un colorante reactivo, alantoína, ácido úrico, o polimixina y combinaciones de los mismos.

Por lo menos un agente de entrecruzamiento puede ser acoplado de manera covalente entre dicha matriz y dicho ligando. El agente de entrecruzamiento puede ser seleccionado del grupo que comprende: un agente de entrecruzamiento homobifuncional, heterobifuncional y trifuncional. El agente de entrecruzamiento puede ser acoplado de manera covalente como un espaciador entre dicha matriz y dicho ligando. El espaciador puede ser seleccionado del grupo que comprende: un silano, un diisocianato, un glicolato, un polietilenglicol, un reactivo de succinimido, una dihidrazina, ácido adípico, una diamina, un aminoácido, un oligoaminoácido, un poliaminoácido, un péptido y una proteína.

En otro aspecto, se provee un dispositivo para el enlace y separación selectiva de por lo menos un componente de una solución acuosa, que comprende una carcasa, una entrada, una salida y por lo menos una matriz de separación, siendo dicha matriz rígida e integral para el paso de dicha solución acuosa a través de la misma, teniendo dicha matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que varía desde 5 micrones hasta 500 micrones y una superficie activa que varía desde 0.5 cm² hasta 10 m², y una unidad estructural de ácido biliar que es inmovilizada sobre dicha matriz y es capaz de enlazar dicho por lo menos un componente, donde dicha separación de matriz tiene una estructura porosa obtenida mediante un proceso seleccionado del grupo: proceso de sinterización, de moldeo y de espumado. La estructura de ácido biliar puede ser una estructura de ácido desoxicólico.

En una realización, la matriz de separación comprende varios discos dispuestos uno después de otro en la dirección del flujo de manera que se dispone que la solución acuosa pase por un disco y luego fluya hacia afuera sobre toda la superficie del siguiente disco.

Breve descripción de los dibujos

Objetivos, características y ventajas adicionales serán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones de la invención con referencia a los dibujos, en los cuales:

La Fig. 1 es una vista transversal esquemática de un cartucho que comprende las matrices de separación;

Las Figs. 2a, b, c y d son vistas transversales esquemáticas de cartuchos que comprenden las matrices de separación en diferentes configuraciones;

Las Figs. 3a, b, c y d son vistas transversales esquemáticas de cartuchos que comprenden matrices de separación en configuraciones diferentes adicionales;

La Fig. 4 es un diagrama de flujo esquemático de un sistema de prueba que comprende un cartucho con un cierto número de placas de matriz;

La Fig. 5 es un diagrama de las cantidades de TNF- α en sangre entera antes y después de un cartucho;

La Fig. 6 es un diagrama de la reducción de la cantidad de endotoxina con el tiempo.

Descripción detallada de las realizaciones

Se describirán más abajo varias realizaciones de la invención con el fin de permitir que una persona experimentada lleve a cabo la invención. La información específica dada más abajo no pretende limitar la invención, pero otras características y combinaciones son posibles dentro del alcance de la invención según se define por las reivindicaciones de patente anexas.

La matriz integral rígida debería tener una superficie disponible desde 0.5 cm² hasta 10 m², y la densidad de la estructura de matriz no es limitante.

En relación con esto el término “rígida” significa que la matriz no es flexible, no se dobla o flexiona, pero es capaz de soportar una presión de por lo menos 0.5 bar. El término “integral” significa que la matriz con alta área superficial tiene una entidad completa.

La estructura porosa de la matriz está hecha de metal, óxido inorgánico, carbono, vidrio, cerámica, polímero sintético y/o polímero natural o mezclas de los mismos. Las estructuras de metal sólidas porosas con tamaños de poros bien definidos y altas áreas superficiales pueden ser manufacturadas utilizando procesos de sinterización estrictamente controlados que producen poros de tamaño uniforme.

Se han producido diferentes polímeros en forma de materiales porosos moldeados o extrudidos con una estructura porosa que tiene el tamaño de poro deseado así como una alta área superficial para la matriz. También han sido producidos en forma de espuma. Por ejemplo, poliuretanos preparados a partir de isocianatos y diversos otros compuestos orgánicos tiene átomos de hidrógeno activos, los cuales han sido usados para producir productos de poliadición. Este hidrógeno activo puede venir de compuestos bifuncionales o polifuncionales tales como polialcoholes, políaminas. Las reacciones con agua dan lugar a aminas primarias, las cuales han sido utilizadas para la inmovilización covalente de ligandos específicos.

Se ha usado una amplia variedad de metales y aleaciones, tales como acero inoxidable, níquel, titanio, monel, inconel, aleación hastel y otros materiales metálicos especiales. Óxidos inorgánicos de alta área superficial, especialmente alúmina y zirconia, han sido también utilizados con las mismas técnicas para producir materiales cerámicos con estructuras de poros definidas. De la misma forma, cerámicas tales como vidrio sinterizado también pueden ser compradas, con tamaños de poro adecuados.

También se han usado otros materiales rígidos naturales, tales como sílica amorfa, por ejemplo, zeolitas y roca de lava.

Materiales naturales e híbridos de los mismos, los cuales pueden ser usados como materiales de matriz, son polisacáridos, tales como celulosa, y otros materiales de carbohidratos poliméricos. Otros materiales poliméricos naturales adecuados son poliaminoácidos, también aquellos que involucran aminoácidos sintéticos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y sus copolímeros con ácido láctico.

En este aspecto el término híbrido abarca derivados de tales materiales naturales, por ejemplo diacetato de celulosa, que es un polisacárido derivado.

Polímeros sintéticos adecuados para la matriz son poliolefinas tales como polietileno, polipropileno, polibutileno, polimetilpenteno y copolímeros de etilen vinil acetato; polímeros vinílicos, tales como alcohol polivinílico, acetales polivinílicos, y polivinilpirrolidona; polímeros que contienen flúor tales como politetrafluoroetileno, copolímero de etileno propileno fluorado, policlorofluoroetileno, polivinilfluoruro y fluoruro de polivinilideno; poliacrilatos, tales como polimetil-metacrilato, cianoacrilato, poliacrilonitrilo y polimetacrilatos; poliamidas, tales como poliácridamida; poliimidas, tales como polietileniminas; poliestireno y sus copolímeros, tales como poliestireno y polímeros de acrinonitrilo-butadieno-estireno; cauchos de silicona; poliésteres/éteres; policarbonatos; poliuretanos; polisulfonatos; poliglicoles; polialquildesóxidos tales como polietilenóxido, polipropilenóxido; y copolímeros o híbridos de los mismos.

En una realización, por lo menos un grupo funcional ha sido introducido sobre una estructura porosa de la matriz de separación integral rígida. Los grupos funcionales pueden ser de diferentes clases, esto es del tipo aniónico, catiónico o no iónico. Los grupos funcionales de la estructura porosa han sido usados para enlazar de forma covalente sustancias tales como péptidos/proteínas y ácidos biliares (por ejemplo ácido desoxicólico), anticuerpos y fragmentos de los mismos así como biomoléculas y sustancias que tienen la capacidad de enlazar selectivamente endotoxinas y/o mediadores proinflamatorios.

Una modificación de superficie, esto es, una funcionalización de la superficie de una manera indirecta, fue lograda por medio de electrodeposición, electroevaporación, deposición química por plasma, deposición a partir de un flujo de iones de plasma, o deposición por vapor químico (por ejemplo, polimerización de plasma, deposición de polímero de superficie mejorada con plasma). Los métodos de modificación de superficie son conocidos *per se* y se encuentran en "Plasma surface modification and plasma polymerization" by N. Inagaki, 1996, Technomic Publishing, Lancaster, USA. Diferentes estructuras de matrices tridimensionales han sido tratadas por medio de estos métodos, alcanzándose una modificación muy homogénea de la superficie activa.

La polimerización de monómeros bifuncionales de dobles enlaces acrílicos o alílicos con grupos polares tales como OH, NH₂, CN y COOH ha sido usada para producir polímeros de plasma con alta densidad de los grupos funcionales. Por ejemplo, la funcionalización de superficie de las superficies inorgánicas y orgánicas ha sido llevado a cabo en un ambiente de plasma de compuestos alilo, tales como alilamina.

También ha sido posible preparar superficies poliméricas orgánicas en NH₃, O₂, o CO₂ como ambientes de plasma, lo que da lugar a cualquiera de los grupos funcionales =NH, -NH₂, =CN, -OH, o -COOH. Otros ejemplo de gases usados son bien conocidos en la técnica.

Un proceso plasmaquímico también ha sido combinado con síntesis química clásica, siendo la selectividad de las modificaciones de la superficie para los polímeros mejorada significativamente. Una modalidad ha sido aplicar una

funcionalización de superficie con gas de plasma específico, inmediatamente seguida por una unificación química de los grupos funcionales coexistentes en el plasma.

5 Otra forma para introducir los grupos funcionales es por medio de una funcionalización directa, esto es, recubriendo la superficie con un material polimérico. En relación con esto el polímero sintético o natural ha sido recubierto sobre la alta superficie del metal, óxido inorgánico, carbono, vidrio, cerámica así como otros polímeros sintéticos adecuados, y/o un polímero natural, o mezclas de los mismos.

10 Muchos de los polímeros antes mencionados, especialmente aquellos con grupos funcionales, tales como polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno etc., necesitan un tratamiento adicional con el fin de alterar sus propiedades de superficie. Así, un tratamiento con plasma o corona, como se mencionó anteriormente, de la superficie del polímero generará un grupo funcional muy único, tal como hidroxilo, carbonilo, carboxilo, amino e imino, etc., los cuales se unen de manera covalente a la superficie.

15 El recubrimiento también ha sido logrado por medio de adhesión o adsorción de una sustancia polimérica que tiene grupos funcionales. Ejemplos de tales sustancias son polilisina, poliarginina y polietilenamina.

20 Usando por ejemplo una técnica de plasma, se obtuvieron sustancias similares a la polietilenimina sobre la superficie porosa. Cuando se usa la matriz de separación enlazando y separando selectivamente por lo menos un componente de la sangre entera o de un fluido corporal, las regiones hidrófilas así como las hidrofóbicas de los componentes proteínicos de la sangre pueden actuar con la superficie procesada con el fin de eliminar los componentes deseados. Después de la funcionalización, cuando la superficie de matriz para enlace y separación selectiva comprende una poliolefina, por ejemplo un polietileno o polipropileno, las cargas positivas de los grupos amino son usadas de la misma forma para las interacciones electrostáticas y las regiones hidrofobas son usadas para interacciones hidrofobas. Esta
25 modalidad se utiliza para el enlazamiento selectivo de diferentes regiones de por ejemplo lipopolisacáridos.

Los polímeros y metales, que tienen por ejemplo hidroxilos reactivos, también pueden ser funcionalizados por medio de la silanización.

30 De acuerdo con lo anterior, se han acoplado de manera covalente diferentes grupos funcionales diversos a la estructura de matriz porosa de alta superficie. Después de una funcionalización directa y/o indirecta, la estructura porosa puede tener regiones tanto hidrófilas como hidrofobas, las cuales pueden actuar con componentes sanguíneos diferentes. Así, las propiedades características de una sustancia de interés se utilizan cuando se prepara la superficie que se va a usar.

35 Preferiblemente, los grupos funcionales de la superficie activa son sulfhidrilos, carboxilatos, aminas, aldehídos, cetonas, hidroxilos, halógenos, hidrazidas, e hidrógeno activo.

40 En otra realización, se ha acoplado un ligando a por lo menos un grupo funcional de la estructura porosa de alta superficie de una forma covalente. En relación con esto, un ligando es una sustancia con alta afinidad por el componente que se va a eliminar de la sangre entera o fluido corporal. Así, el ligando es utilizado para incrementar las propiedades de adsorción y la eficacia del enlace.

45 El ligando puede ser una proteína, preferiblemente una proteína recombinante, un péptido, un anticuerpo o un fragmento de los mismos, un carbohidrato, por ejemplo un polisacárido, una hormona, un antioxidante, una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, una vitamina soluble en grasa, por ejemplo vitamina E, un ácido biliar, un colorante reactivo, alantoina, ácido úrico o polimixina, o combinaciones de los mismos.

50 Un ácido biliar adecuado es el ácido desoxicólico, que es una sustancia hidrofoba endógena. Tal ácido biliar puede acoplarse bien directamente a los funcionales, a través de un espaciador, o acoplarse a través de una molécula grande, y se usa entonces para remover las endotoxinas de la sangre, los fluidos corporales y soluciones acuosas.

55 En relación con esto un espaciador es una molécula, grande o pequeña, que conecta el ligando con la superficie de la estructura porosa.

Por ejemplo, si la estructura porosa de la matriz de separación comprende una poliolefina que tiene un grupo amino añadido, este grupo puede tener una albumina acoplada al mismo y a su vez una unidad estructural de ácido biliar acoplada a esta molécula grande.

60 Así, se proporciona un nuevo uso de una unidad estructural de ácido biliar inmovilizada sobre un soporte para eliminar un componente de una solución acuosa que comprende los mismos. Preferiblemente, la unidad de ácido es una unidad de ácido desoxicólico.

65 De acuerdo con lo anterior, un soporte sólido adecuado para la inmovilización de la unidad estructural del ácido biliar es una matriz de separación integral rígida que tiene una estructura porosa con un tamaño de poro que varía desde 5 micrones a 500 micrones, preferiblemente de 70 micrones a 170 micrones, y con una superficie activa que varía de 0.5 cm² hasta 10 m².

ES 2 328 386 T3

El ligando de la matriz puede ser albumina o una albumina producida por medio de tecnología recombinante, la cual puede ser usada en vez de la albumina de suero, polimixina B (esto es grupos cargados sobre una estructura hidrófoba), o ácido desoxicólico.

5 Así, un ligando puede actuar también como un espaciador. Por ejemplo, también ha sido posible enlazar primero covalentemente una proteína recombinante humana u otra molécula grande (por ejemplo ácido hialurónico) a la estructura porosa, la cual permite un subsecuente enlazamiento del ligando específico para el componente que se va a eliminar.

10 Si es necesario, se acopla un agente de entrecruzamiento entre el por lo menos un grupo funcional y el ligando en una vía covalente. En relación con esto, un elemento de conexión es un elemento que de forma covalente enlaza el ligando a la estructura porosa de soporte siendo el elemento un espaciador que cuando se une el ligando a una distancia desde la estructura porosa misma. Tales espaciadores moleculares son conocidos en la técnica. Han sido introducidos con el fin de incrementar la afinidad del componente que se va a enlazar y la superficie de la estructura matriz porosa
15 también se incrementa por la introducción de estos espaciadores moleculares.

Un entrecruzador/espaciador puede comprender un entrecruzador de longitud cero solo o en combinación con un entrecruzador de intervención, estando el complejo final obtenido junto en virtud de sustancias químicas y estructuras de adición a la sustancia de entrecruzamiento. Estos entrecruzamientos que intervienen pueden ser del tipo homobifuncional (por ejemplo, dialdehídos), heterobifuncionales (por ejemplo aminoácidos) o del tipo de entrecruzamiento trifuncional.

Un propósito del espaciador es incrementar la biodisponibilidad del ligando específico usado.

25 El espaciador puede ser por ejemplo un silano, un diisocianato, un glicolato, un polietilenglicol, un reactivo de succinidimilo, una dihidrazina, un ácido adípico, una diamina, un aminoácido o un polioligoaminoácido, un poliaminoácido, un péptido o una proteína. Preferiblemente la proteína es una proteína de recombinación humana.

Los grupos funcionales del entrecruzador están diseñados para reaccionar con los grupos amino (Lys, Arg) con sulfidrilo (Cys) o con carboxilos (Asp, Glu) para citar unos pocos ejemplos.

En relación con la química de los grupos reactivos, se hace referencia al Bioconjugate Techniques, Greg T Hermanson, Academic Press, USA, 1996.

35 Así, la superficie de matriz porosa activa es capaz de eliminar endotoxinas de muestra, solas o en combinación con regiones no funcionalizadas de la superficie disponible de la estructura porosa. La superficie activa también puede ser usada como una herramienta para la inmovilización covalente de productos químicos tales como biomoléculas similares a aminoácidos, polipéptidos y anticuerpos con el fin de mejorar selectivamente la eliminación de tales componentes específicos.

40 Una matriz de separación puede ser producida con una estructura porosa de cierto tamaño de poro y/o cierto rango de tamaño de poro en dependencia de la aplicación pretendida.

Preferiblemente, la estructura porosa debería permitir el paso de células sanguíneas. De acuerdo con lo anterior, 45 varios tipos de células sanguíneas también pueden ser retiradas de la sangre por medio del método inventivo. Tales células enfermas o células con receptores de superficie, por ejemplo células fagocíticas activadas.

La estructura metálica puede ser magnética para aplicaciones especiales. Una matriz magnética puede por ejemplo ser obtenida recubriendo magnetitas sinterizada con un polímero, por ejemplo polietileno. Una eliminación eficiente de 50 células puede ser llevada a cabo entonces permitiendo que los anticuerpos, que tienen una etiqueta de hierro dextrano magnético se unan a células específicas en la sangre.

El tamaño de poro debería estar en el rango de 5 micrones a 500 micrones, preferiblemente de 70 micrones a 170 micrones, lo más preferiblemente de 80 micrones a 100 micrones, de manera que puedan mantenerse altas tasas de flujo sin daño celular o exclusión celular. Así, la separación alcanzada no se basa solamente en la distribución de 55 tamaño de los componentes. Virtualmente todos los componentes de la sangre entera o de un fluido corporal podrían ser eliminados.

Después de la eliminación de uno o más actuadores tóxicos primarios, esto es, una endotoxina, pueden eliminarse 60 actuadores tóxicos secundarios adicionales. Los actuadores secundarios pueden ser citoquinas (por ejemplo TNF- α), interleucinas (por ejemplo IL-1), oxígeno reactivo y radicales nitrógeno, etc.

Cuando se ejecuta el método, se protegen una o varias matrices de separación dentro de una carcasa, la cual puede tener diversas formas y variaciones y/o diferentes entradas y salidas dependiendo de la aplicación. Un dispositivo 65 tal puede ser usado entonces para la eliminación de endotoxinas y/o citoquinas y/o la neutralización de citoquinas. Esto se lleva a cabo haciendo pasar la sangre u otro fluido corporal a través del dispositivo, aplicado intra, para o extracorporalmente, sin que el líquido sea excluido de la matriz de separación integral regida dentro del mismo. La superficie activa de la estructura porosa, los grupos funcionales y/o los ligandos específicos sobre la misma pueden

enlazarse selectivamente y separar por lo menos un componente del líquido. El dispositivo puede ser usado también para la eliminación de endotoxinas a partir de soluciones acuosas.

Una característica importante del método en que todos los aspectos del choque séptico pueden ser provistos, por ejemplo, para actuadores tóxicos primarios y secundarios pueden ser eliminados.

Se hace referencia a la Fig. 1 en relación con la ejecución del método. Un dispositivo 1 comprende una carcasa 2, estando integrada la carcasa (o cartucho) del dispositivo en una circulación cerrada, en la cual la sangre entera o el fluido corporal se hace circular mediante una bomba. En la carcasa 2 por lo menos se dispone una matriz de separación 5a, 5b,....., cada una con el propósito de eliminar selectivamente un componente de la sangre entera o fluidos corporales. La carcasa 2 está provista con una entrada 3 y una salida 4, cuyos sitios no son de importancia en tanto se obtenga un flujo adecuado dentro de la matriz de separación y la carcasa. Preferiblemente, la bomba está dispuesta corriente arriba de la entrada 3.

De esta forma se obtiene un dispositivo que puede mantener ratas de flujo de 5 ml/h hasta 6.000 ml/min sin una caída de presión significativa. Cuando se aplica extracorporalmente, se obtiene una línea de presión de no más de 300 mm Hg de la bomba a la cánula aún a ratas de flujos muy altas.

La matriz de separación integral rígida puede ser producida de diferentes maneras. Puede por ejemplo ser diseñada como un disco, una barra, un cilindro, un anillo, una esfera, un tubo, un tubo hueco, una lámina plana u otras formas moldeadas.

Puesto que el flujo dentro de cada matriz de separación depende de su porosidad, el tiempo de contacto de los componentes en la sangre o un fluido corporal con la superficie activa puede ser controlado. Además, puede crearse un gradiente de flujo deseado dentro de un dispositivo de separación cambiando la porosidad y configuración de las matrices de separación individuales dentro del mismo.

En la Fig. 2 y Fig. 3 se muestran diferentes realizaciones esquemáticas de dispositivos, que pueden ser utilizadas cuando se ejecuta el método. Las flechas indican el flujo de la sangre o fluido corporal dentro de las matrices de separación individuales y las carcassas de las mismas, las flechas grandes indican una rata de flujo más alta que las flechas pequeñas. En estos ejemplos de diferentes configuraciones las matrices de separación pueden tener las mismas o diferentes porosidades con o sin los mismos o diversos tipos de grupos o ligando funcionales con el fin de eliminar uno o varios componentes de la sangre o un fluido corporal.

Las matrices de separación están integradas preferiblemente con las carcassas (teniendo cada una una entrada 3 y una salida 4) con el fin de asegurar que nada del líquido o de los componentes de la misma penetren a la matriz o matrices, esto es excluyéndose de las mismas. En las Figs. 2 (a) y (b) se dan ejemplos de una matriz de separación 5 dentro de una carcasa 2, siendo la matriz de diferentes configuraciones. Ejemplos de dos matrices de separación 5a, 5b dentro de una carcasa 2 se muestran en la Fig. 2 (c) y (d). En el dispositivo de la Fig. 2 (c) un recubrimiento impermeable 6, tal como una piel aplicada, sobre la periferia externa de la matriz de separación 5a asegura que todo el material suministrado al dispositivo pasará por esta matriz completa. El dispositivo de la Fig. 2 (d), por otro lado, algo del material suministrado tendrá un tiempo de residencia más corto en la matriz de separación 5a que en la matriz de separación 5b, y viceversa.

En la Fig. 3 cada dispositivo comprende varias matrices de separación 5a, 5g. En la Fig. 3(a) una pared de partición 7 asegura un flujo a través de todas las matrices. Las matrices de separación pueden ser posicionadas lateral o transversalmente con respecto a sus direcciones longitudinales, como en la Fig.3 (b) y (c), respectivamente. En la Fig. 3 (d) el dispositivo comprende matrices de separación de diferentes tamaños.

En conclusión, el método puede ser usado con un dispositivo aplicado intra, para o extracorporalmente o separado, el cual es por lo tanto capaz de reducir las endotoxinas y los mediadores proinflamatorios nocivos potenciales que circulan, especialmente $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-17, preferiblemente en sangre. También es posible eliminar selectivamente endotoxinas de otras soluciones acuosas. Los componentes se considera que se enlazan a la superficie activa de la matriz de separación integral rígida por medio de adhesión.

Ejemplos

El método será descrito adicionalmente e ilustrado con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales han sido seleccionados cuidadosamente con el fin de abarcar el método.

Modificaciones de superficie

Ejemplo 1

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 350 micrones y una superficie activa de 10 cm^2 , fue modificada por medio de una deposición de vapor químico mejorado por plasma utilizando O_2 (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

ES 2 328 386 T3

La formación de los grupos hidroxilos sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada con una prueba Dye, siendo confirmada la hidrofiliidad de la misma.

5 Ejemplo 2

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 100 micrones y una superficie activa de 20 cm², fue modificada por medio de deposición de vapor químico mejorada con plasma utilizando CO₂ (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

La formación de los grupos carboxilo y la cantidad de superficies de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinada por conversión en ácidos hidroxámicos. En relación con ésta todos los ácidos hidroxámicos dan un color rojo o violeta con cloruro férrico en solución ácida como se describe en Feigel *et al.*; Microchemie 15:18, 1934.

15 Ejemplo 3

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 170 micrones y una superficie activa de 0.04 m², fue modificada por medio de polimerización por plasma usando alilamina (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinada por medio de la prueba de ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS).

25 Ejemplo 4

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), con una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 0.26 m², fue modificada por medio de polimerización por plasma utilizando ácido acrílico (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System). La cantidad de grupos carboxilo de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 2.

35 Ejemplo 5

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 5 micrones y una superficie activa de 0.9 m², fue modificada por medio de polimerización por plasma utilizando NH₃ (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

45 Ejemplo 6

La superficie de una matriz de politetrafluoroetileno poroso, PTFE (W.L. Gore & Associates Inc., USA) con una porosidad de 10 micrones y una superficie activa de 100 cm², fue modificada por medio de deposición de vapor químico mejorada con plasma utilizando NH₃ (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

55 Ejemplo 7

La superficie de una matriz de poliestireno poroso (Down Chemical, USA) con una porosidad de 10 micrones y una superficie activa de 300cm² fue modificada por medio de deposición de vapor químico mejorada con plasma utilizando CO₂ (Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System).

La cantidad de grupos carboxilos sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 2.

65 Ejemplo 8

La superficie de una matriz de poliuretano poroso (Polymers Unlimited, Suecia), con una porosidad de 80 micrones y una superficie activa de 100 cm², fue modificada por medio de una solución al 2% de un alcoxi silano aldehídico artículo No. (PSX 1050 United Chemical Technologies, USA) en etanol al 95%. El pH de la solución fue ajustado a

ES 2 328 386 T3

pH 5.5 con ácido acético y la solución fue perfusionada a través de la matriz, la cual se dejó incubar durante una noche a temperatura ambiente y luego se lavó con solución salina fisiológica al 0.9%.

La funcionalidad aldehído de la matriz obtenida fue evaluada utilizando una aceleración catalítica de la oxidación de la P-fenilendiamina mediante peróxido de hidrógeno siendo oxidada la P-fenilendiamina con el peróxido de hidrógeno en una solución ácida, la cual es conocida como base de Bandrowsky.

Ejemplo 9

La superficie de una matriz de silicona porosa (Nusil, Francia), con una porosidad de 200 micrones y una superficie activa de 0.5 m², fue modificada por medio de una solución al 2% de aminosilano (artículo No. 0750, United Chemical Technologies, USA) en etanol al 95%. La solución fue perfusionada a través de la matriz la cual fue incubada durante la noche a temperatura ambiente y se lavó finalmente con solución salina fisiológica al 0.9%.

La cantidad de aminos primarios sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

Recubrimiento por medio de enlace covalente

Ejemplo 10

Poli-lisina (200 mg) fue disuelta en 10 ml de solución de carbonato de sodio 50 mM y una matriz de policarbonato poroso con una porosidad de 100 micrones (MicroPore Plastics, USA), que fue sumergida entonces en la solución y mantenida a 4°C durante 24 horas con el fin de obtener un enlace covalente entre la poli-lisina y la matriz de policarbonato. La matriz porosa fue lavada finalmente con exceso de agua destilada.

La cantidad de aminos primarios sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

Ejemplo 11

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 4 fue perfusionada con una solución acuosa de meto-p-toluenosulfonato de 1-cicloexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida (WCCM) (Aldrich) a una rata de flujo de 5 ml/min en un circuito cerrado a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego fue enjuagada con agua y una solución de polietilenimina (Sigma) (10 mg/ml, pH 7.0) que fue añadida finalmente y la matriz fue incubada durante la noche.

La cantidad de aminos primarios sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

Ejemplo 12

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 fue conjugado utilizando 1.0% de glutaraldehído en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.5, y se perfusiono a una rata de flujo de 1 ml/min durante 6 horas a temperatura ambiente. La matriz fue lavada entonces con solución reguladora antes de la incubación con una solución de ácido hialurónico (2 mg/ml) durante 16 horas a temperatura ambiente. El exceso de ácido hialurónico fue finalmente enjuagado.

El contenido de ácido hialurónico de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue verificado y determinado con Alcian blue (Sigma).

Recubrimiento por medio de adhesión

Ejemplo 13

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), con una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 0.18 m², fue perfusionada a una rata de flujo de 1 ml/min en un circuito cerrado durante 16 horas a temperatura ambiente con 2 mg/ml de solución de ácido hialurónico (ByoHyos, Suecia 12-10⁶ Da) a un pH de 3.3, el cual fue ajustado con HCl 0.1 M.

El contenido de ácido hialurónico de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue verificado como en el ejemplo 12.

ES 2 328 386 T3

Ejemplo 14

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 7.0 m², fue colocada en un tubo de vidrio. El tubo, con la matriz porosa dentro del mismo, fue llenado con una solución de 0.13% de poli-lisina (Sigma) en 350 ml de agua, y el pH fue ajustado a pH 3.3 con HCl 0.1 M. Entonces la solución de poli-lisina fue recirculada a través del tubo con su matriz de filtro durante 16 horas a temperatura ambiente a una rata de flujo de < 5 ml/min. La matriz porosa fue enjuagada finalmente con osmosis reversa con agua.

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

Ejemplo 15

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania) con una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 3.4 m², fue colocada en un tubo de vidrio. El tubo con la matriz porosa dentro del mismo fue llenado con una solución de RecombuminTM (albumina de suero humano recombinante, de Hoechst-Pharma, USA) en 350 ml de agua para osmosis reversa y luego fue ajustada a pH 3.3 con HCl 0.1 M.

Luego la solución de RecombuminTM fue recirculada a través del tubo con su matriz de filtro durante 16 horas a temperatura ambiente utilizando una bomba a una rata de flujo de < 5 ml/min. La matriz porosa fue enjuagada finalmente con agua de osmosis reversa.

El contenido de proteína en la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinada utilizando azul brillante de Coomassie Brilliant Blue (BioRad, USA).

Ejemplo 16

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 fue perfusionada con una solución de polietilenimina (Sigma), 10 mg/ml, durante la noche a una rata de flujo de 5 ml/min en un circuito cerrado. Luego, la matriz porosa fue enjuagada con agua.

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue probada como se describió en el ejemplo 3.

Conjugación directa de ligandos

Ejemplo 17

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 fue conjugada con desoxicolato (DOC) utilizando una solución acuosa de WCCM. Se añadió una solución de 300 ml al 40% de dimetilformamida (DMF) (Sigma) en agua, la cual contenía una mmol de desoxicolato de sodio, al policarbonato poroso con agitación mientras se ajustaba el pH con HCl 0.3 M a pH 4.8. Se añadió entonces una solución de WCCM 6 mM en DMF: agua (1:1.8) durante un periodo de 10 minutos. La suspensión fue mantenida a pH 4.8 durante 3 horas mediante la adición de HCl 0.3 m.

El contenido de DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado utilizando un Bile Acid Kit (Sigma).

Ejemplo 18

(Ejemplo comparativo)

La matriz de polietileno poroso obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 fue conjugada utilizando glutaraldehído al 12% en solución reguladora de fosfato 0.15 M, pH 7.0 durante 24 horas a temperatura ambiente. La matriz fue lavada con solución reguladora de fosfato 0.15 M y luego se añadieron anticuerpos anti CD14 (DAKO Dinamarca) en una concentración de 1 mg/ml y se incubó a 8°C durante 24 horas. La reducción subsecuente con cianoborohidruro de sodio fue llevada a cabo con el fin de producir uniones aminas secundarias estables.

El contenido en anticuerpos de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución reguladora de anticuerpos antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 19

(Ejemplo comparativo)

5 La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 8 fue lavada con una solución reguladora de fosfato 0.15 M y luego se añadió un receptor recombinante IL-1 (Kineret, Amgen, USA) a una concentración de 1 mg/ml y se incubó a 8°C durante 24 horas. La reducción subsecuente con cianoborohidruro de sodio se llevo a cabo con el fin de producir enlaces aminos secundarios estables.

10 El contenido en receptor IL-1 de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución reguladora del receptor IL-1 antes y después de la incubación con la matriz porosa.

15 Ejemplo 20

(Ejemplo comparativo)

20 La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 fue conjugada utilizando glutaraldehído 1.0% y solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.5. La matriz fue incubada con esta solución durante 3 horas. Después de lavar con regulador de fosfato la matriz fue incubada en una solución de sulfato de polimixina B (Sigma), 1 mg/ml, durante la noche bajo recirculación. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

25 Ejemplo 21

(Ejemplo comparativo)

30 La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 2 fue conjugada con receptor TNF- α recombinante (Enbrel Wyeth, UK) a una concentración de 5 mg/ml en solución reguladora de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 0.1 M (Sigma), pH 4.8. Se añadieron 30 mg/ml de una solución acuosa de WCCM y la matriz fue incubada durante la noche a 8°C. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

35 El contenido en receptor TNF- α sobre la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución reguladora del receptor TNF- α antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 22

40 (Ejemplo comparativo)

45 La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 fue conjugada con un anticuerpo TNF- α antihumano (Sigma) utilizando glutaraldehído 1.0% en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.5. La matriz fue incubada con solución reguladora de anticuerpo TNF- α durante 3 horas. Después de lavar la matriz porosa con solución reguladora de fosfato, el anticuerpo TTNF- α antihumano (1 mg/ml) en solución reguladora de fosfato fue añadido e incubado a temperatura ambiente durante 6 horas bajo recirculación a una rata de flujo de 1 ml/min. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

50 El contenido de anticuerpo TNF- α de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución reguladora de anticuerpo TNF- α antes y después de la incubación con la matriz porosa.

55 Ejemplo 23

(Ejemplo comparativo)

60 La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 fue conjugada con proteína incrementadora de la permeabilidad bactericida humana (BPI) (Wieslab, Suecia) a una concentración de 2 mg/ml en solución reguladora MES 0.1 M, pH 4.8. Se añadió una solución acuosa de WCCM a esta matriz a una concentración de 15 mg/ml, y la matriz fue incubada durante la noche a 8°C. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

65 El contenido de BPI de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución reguladora de BPI antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 24

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 15 fue incubada en una solución de DOC en solución reguladora de MES 0.1 M, pH 4.8, a una concentración de 1 mg/ml. Luego se añadió una solución acuosa de WCCM, y la matriz fue incubada durante la noche a 8°C. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

El contenido de DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado como en el ejemplo 17.

Conjugación de ligandos con espaciador

Ejemplo 25

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 fue activada con glutaraldehído 1.2% en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0 durante 24 horas a temperatura ambiente. La matriz fue lavada con regulador y subsecuentemente incubada durante 24 horas en 1,6-diaminoexano (DAH) (Sigma), 50 mg/ml en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0. Después de lo anterior, se añadieron 10 mg/ml de cianoborohidruro de sodio a la solución (Sigma). La matriz porosa fue lavada con solución reguladora de fosfato 0.1 M y luego se incubó en una solución de DOC (1 mg/ml) en solución reguladora MES 0.1 M, pH 4.8.

Luego se añadió una solución acuosa de WCCM y la matriz fue incubada durante la noche a 8°C. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH 7.4

El contenido de DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado como en el ejemplo 17.

Ejemplo 26

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 fue activado durante 24 horas a temperatura ambiente con glutaraldehído al 1.2% en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0. La matriz fue lavada con solución reguladora y luego incubada durante 24 horas con dihidrazida adípica (Aldrich) a una concentración de 10 mg/ml en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.4. Luego se añadieron 10 mg/ml de cianoborohidruro de sodio (Sigma) a la solución.

La matriz porosa fue lavada con solución reguladora de fosfato 0.1 M y luego se incubó con una solución de DOC a una concentración de 1 mg/ml en solución reguladora MES 0,1 M, pH 4.8. Luego se añadió una solución acuosa de WCCM, y la matriz fue incubada durante la noche a 8°C. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

El contenido DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado como en el ejemplo 17.

Ejemplo 27

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 10 fue conjugada con DOC utilizando una solución acuosa de WCCM. Se añadió una solución en agua de 300 ml de DMF al 40% (Sigma), que contenía una mmol de desoxicolato de sodio a la matriz de policarbonato porosa con agitación. El pH de la suspensión fue ajustado a 4.8 con HCl 0.3 M. Se añadió una solución 6 mM de WCCM en DMF: agua (1:1.8) durante un periodo de 10 minutos y la suspensión se mantuvo a pH 4.8 durante 3 horas por la adición periódica de HCl de 0.3 M. Luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas.

El contenido de DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinada como en el ejemplo 17.

Ejemplo 28

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 14 fue activado durante 10 horas a temperatura ambiente con glutaraldehído al 1.2% en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0 y luego se enjuagó con cantidades excesivas de regulador. Se introdujo polietilenimina (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml en solución reguladora de bicarbonato 0.1 M, pH 8.0, en la matriz porosa, la matriz se incubó con la solución durante 16 horas.

La matriz fue lavada luego con solución reguladora y conjugada con DOC utilizando una solución acuosa de WCCM. Se añadió una solución de 300 ml de DMF al 40% en agua, que contenía una mmol de desoxicolato de sodio,

ES 2 328 386 T3

a la matriz porosa mientras se agitaba. El pH fue ajustado a 4.8 con HCl 0.3 M. Una solución 6 mM de WCCM en DMF: agua (1:1.8) fue añadida entonces durante un periodo de 10 minutos. La solución fue mantenida a pH 4.8 durante tres horas mediante la adición periódica de HCl 0.3 M. Luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas.

El contenido de DOC de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado como en el ejemplo 17.

Ejemplo 29

(Ejemplo comparativo)

La matriz de polietileno porosa de acuerdo con el ejemplo 3 fue activado durante 24 horas a temperatura ambiente con glutaraldehído al 1.2% en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0. La matriz fue lavada entonces con la reguladora e incubado durante 24 horas con 1,6-diaminohexano (DAH) (Sigma) a una concentración de 50 mg/ml en solución reguladora de fosfato 0.2 M, pH 7.0. La matriz porosa fue lavada entonces con solución reguladora de fosfato 0.1 M y se incubó durante 12 horas a 8°C como una suspensión en una solución del receptor TNF- α (Enbrel, Wyeth, UK) a una concentración de 10 mg/ml en solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4. Luego se añadió una solución de cianoborohidruro de sodio (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml, a la suspensión. La matriz fue lavada finalmente con solución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.4.

El contenido del receptor TNF- α de la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida fue determinado indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución en regulador del receptor TNF- α antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Enlace y separación selectivos de los componentes de la sangre

Las separaciones celulares fueron llevadas a cabo permitiendo que la sangre entera pasara a través de un filtro de una matriz conformada como un disco y con una superficie activa de 0.02 m².

La eliminación de las endotoxinas y citoquinas fue llevada a cabo con el sistema de prueba mostrado en la Fig.4. Un contenedor 8, lleno con hasta 2 l de sangre entera o plasma, fue conectado a una bomba 9, un monitor de presión 10, y un dispositivo de filtro 1 con hasta 40 placas de matriz, esto es, una superficie activa de hasta 7 m², con una porosidad entre 70 y 130 micrones.

Separación celular

Ejemplo 30

(Ejemplo comparativo)

Una matriz porosa magnética que comprendía una mezcla de polietileno y ferrita magnética (80% de FeO, 20% de BaO₂, (Porex Technologies, Alemania), que tenía una porosidad de 100 micrones, fue utilizada para separar leucocitos a partir de sangre entera utilizando periódicamente anticuerpos marcados anti CD45+ (MACS Antibody Microbeads; Miltenyi Biotec, Alemania). Después de la marcación magnética de los leucocitos con tales anticuerpos, la sangre se dejó pasar a través de la matriz porosa.

El recuento celular de leucocitos fue llevado a cabo utilizando un contador de células automático, el cual después de la separación mostró una reducción en el contenido de leucocitos en la sangre del 90%.

Ejemplo 31

(Ejemplo comparativo)

La superficie de una matriz de diacetato de celulosa poroso (Tenite, Eastman Chemicals, USA), con una porosidad de 200 micrones y una superficie activa de 0.2 m², fue utilizada para la separación de células sanguíneas fagocitantes humanas como neutrófilos y monocitos. La sangre humana entera fue recogida en tubos vacutainer EDTA (B&D, UK) y la sangre se dejó pasar a través de la matriz porosa.

La reducción en el número de neutrófilos y monocitos en la sangre recolectada fue del 50% y 35%, respectivamente, según se determinó microscópicamente mediante recuentos diferenciales celulares en una cámara Burkner utilizando el reactivo de Turks.

Remoción de citoquina

Ejemplo 32

5 (Ejemplo comparativo)

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 22, que había sido recubierta con grupos para reducción de endotoxina, fue utilizada como discos porosos en el sistema de prueba mostrado en la Fig. 4.

10 La eliminación de TNF- α a partir de sangre entera fue investigada después de inmovilizar anticuerpos policlonales contra TNF- α con glutaraldehído sobre los grupos amino sobre la estructura polimérica porosa. La producción de TNF- α fue inducida mediante la adición de LPS a la sangre y la sangre entera activada fue perfusionada sobre el filtro inmovilizado en el dispositivo.

15 La cantidad de TNF- α en la sangre entera (Fig.5) fue determinada pre (♦) y post (v) el dispositivo mediante una enzima de inmunoensayo (Enzymimmuno-assai, Milenia Biotec GmbH, Alemania), con el fin de estudiar el consumo de TNF- α por parte de los discos de filtro. Como se ve, podría obtenerse una considerable reducción de las concentraciones patológicas de TNF- α en sangre entera.

20

Remoción de endotoxina

Ejemplo 33

25 La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 25, esto es matriz de polietileno modificada con plasma con DOC sobre la misma, fue inmovilizada a través de un espaciador de diamino hexano, el cual primero había sido acoplado a la matriz mediante glutaraldehído y luego al desoxicolato utilizando carbodiimida. La matriz obtenida fue utilizada como discos porosos en el dispositivo de filtro del sistema mostrado en la Fig.4.

30 La eliminación de LPS del plasma fue ejecutada de una manera similar que en el ejemplo 32.

La cantidad de LPS en plasma fue determinada por medio de una prueba Limulus Amebocyte Lysate (Endochrome-K, Charles River Laboratories Inc, USA) en el volumen a diferentes intervalos de tiempo durante la recirculación a través del dispositivo de filtro.

35

En la Fig. 6 se muestra la reducción de la cantidad de endotoxina (pg/ml) frente al tiempo. Después de una recirculación de 2 horas la carga de endotoxina fue reducida de 75 pg/ml al inicio hasta 15 pg/ml, que es el límite de detección.

40

Ejemplo 34

Las matrices obtenidas de acuerdo con el ejemplo 3 (grupos amino no inmovilizados) y ejemplo 17 (DOC inmovilizado), respectivamente, fueron utilizadas como discos porosos y comparadas con referencia a su capacidad para eliminar LPS. Un estudio de recirculación similar al ejemplo 34 fue ejecutado con la diferencia de que el LPS fue disuelto en agua destilada.

45

La eliminación de LPS de la solución de agua fue determinada como se mostró en la Fig. 4 mientras se recirculaba a una rata de flujo de 0.22 ml/min a través de cada filtro en un dispositivo de 10 ml.

50

En la Tabla 1 más abajo se dan los valores para la eliminación de LPS por las dos matrices del ejemplo 3 y el ejemplo 17, respectivamente, como porcentaje de la concentración inicial de LPS después de una recirculación de 120 minutos.

55

TABLA 1

	Ejemplo 3	Ejemplo 17
60 Eliminación de LPS (%)	81	96

60

La diferencia en grado de eliminación entre el plasma (ejemplo 34) y agua (ejemplo 35) puede ser explicada por interacciones competitivas de las proteínas, LPS y el ligando.

65

Eliminación combinada

Ejemplo 35

5 (Ejemplo comparativo)

Las matrices obtenidas de acuerdo con el ejemplo 19 y el ejemplo 29 fueron utilizadas para la remoción combinada de TNF- α e IL-1 respectivamente.

10 Las dos matrices de diferente especificidad fueron conectadas en serie en un sistema de prueba de circuito cerrado de dos dispositivos de filtro como se muestra en la Fig. 4. La sangre entera en un contenedor fue mantenida a 37°C, activada mediante la adición de LPS, e introducida en el sistema. El muestreo se llevó a cabo en diferentes intervalos de tiempo simultáneos desde el contenedor y desde la salida de los filtros para el análisis de las citoquinas.

15 Los resultados mostraron para ambas matrices un descenso en las concentraciones de citoquina de 70% y 55% para TNF- α e IL-1 β respectivamente.

La Tabla 2 más abajo muestra un resumen de la aplicabilidad versátil y de la eficacia considerable del método inventivo para el enlazamiento y separación selectivos de diferentes componentes a partir de sangre entera o un fluido corporal. Para este propósito, se han usado diferentes matrices porosas como soportes para el enlazamiento de ligandos, con o sin un espaciador. Así, se han ejecutado métodos de inmovilización con glutaraldehído utilizando 2-NH₂ terminales y con 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida con un -NH₂ terminal y un -OH o -COOH terminal, respectivamente. También puede utilizarse la silanización a través de aldehído o de reactivos de acoplamiento de silano amino funcionales para el enlace de grupos amino, anticuerpos, enzimas, péptidos, y proteínas, reaccionando espontáneamente los grupos aldehído con aminas, péptidos y proteínas.

30 (Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 386 T3

TABLA 2

Matriz porosa	Método	Espaciador	Ligando	Componente	Eficacia %
Polietileno	-	HA	DOC	LPS	80.1
Polietileno	-	Poly-Lys	DOC	LPS	12.8
Polietileno	-NH ₂	DAH	DOC	LPS	29.6
Polietileno	-NH ₂	-	DOC	LPS	12.5
Polietileno	-NH ₂	DAH	Polimixina B*	LPS	16.3
Polietileno	-NH ₂	DAH	Arginina*	LPS	14.3
Polietileno	-NH ₂	DAH	Recombunin*	LPS	18.3
Polietileno	-NH ₂	-	Anti-TNF- α Ab*	TNF- α	63.2
Polietileno	Alilamina	PEI	DOC	LPS	33.4
Polietileno	Alilamina	Poly-Lys	DOC	LPS	85.5
Polietileno	-COOH	-	Receptor TNF- α *	TNF- α	59.2
Polietileno	-COOH	-	Receptor de Interleucina-1*	IL-1	64.0
Polietileno	-COOH	-	Trombomodulina*	Trombina	70.8
Polietileno	-COOH	-	BPI*	LPS	91.2
Polietileno	-OH	Sil.ald.	Receptor TNF- α *	TNF- α	61.8
Polietileno	-OH	Sil.ald	Receptor de Interleucina-1*	IL-1	62.0
Polietileno	-OH	Sil.ald	Trombomodulina*	Trombina	73.7
Polietileno	-OH	Sil.ald	BPI*	LPS	89.3
Polietileno	HA	DAH	DOC	LPS	29.6
Polietileno	Poli	DAH	DOC	LPS	73.3
Polietileno	Recombunin	-	DOC	LPS	20.8
Polietileno	-NH ₂	GDA	Anti CD 11b Ab*	Granulocitos y monocitos	50.2
Polietileno	-OH	Sil.Ald	Anti CD 11b Ab*	Granulocitos y monocitos	56.1
Policarbonato	-	Poly-Lys	DOC	LPS	44.4
Policarbonato	-OH	Sil.Ald	Receptor TNF- α *	TNF- α	75.9
Policarbonato	-COOH	-	Trombomodulina	Trombina	72.0
Poliuretano	-	DAH	DOC	LPS	30.2
Poliuretano	-	DAH	Recombunin*	LPS	18.5
Poliuretano	-	Poly-Lys	DOC	LPS	14.8
Poliuretano	-	Sil.Ald	Receptor TNF- α *	TNF- α	56.7
Poliuretano	-	Sil.Ald	BPI*	LPS	88.0

ES 2 328 386 T3

Silicona	-	Sil.Ald	Receptor TNF- α *	TNF- α	55.3
Silicona	-	Sil.Ald	Trombomodulina	Trombina	68.2
Zeolita	-	Sil.Ald	Receptor TNF- α *	TNF- α	63.9
Zeolita	-	Sil.-NH ₂	DOC	LPS	48.3
Zeolita	-	Sil.Ald	Receptor de Interleucina-1 *	IL-1	60.1
Celulosa	CNBr	DAH	DOC	LPS	28.5
Celulosa	CNBr	Poly-Lys	DOC	LPS	39.2
PTFE	Alilamina	DAH	Receptor TNF- α *	TNF- α	73.0
PTFE	-COOH	-	Receptor de Interleucina-1 *	IL-1	77.7

*= Ejemplo comparativo

Abreviaturas: BPI = Proteína que incrementa la permeabilidad bactericida; DAH = 1,6-diamino-hexano; DOC = desoxicolato; EDC = 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; GDA = glutarardialdehído; HA = ácido hialurónico; IL-1= Interleucina-1; PEI = polietilenimina; Recombumin = albumina humana recombinante; Sil.ald. = Reactivo de acoplamiento de silano aldehído funcional; Sil.-NH₂ = Reactivo de acoplamiento de silano funcional amino; TNF- α = Factor α de necrosis tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar selectivamente por lo menos un componente de una solución acuosa, que comprende:
5 hacer pasar dicha solución acuosa a través de una matriz de separación integral rígida sin ser excluido por dicha matriz, teniendo dicha matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que varía desde 5 micrones a 500 micrones y una superficie activa que varía desde 0.5 cm² hasta 10 m²,
10 enlazando por lo menos un componente de la solución acuosa mediante una unida estructural de ácido biliar inmovilizada sobre dicha matriz,
15 mediante lo cual dicha matriz es obtenida por un proceso seleccionado del grupo que comprende: procesos de sinterización, moldeo y espumado.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicha unidad estructural de ácido biliar es una unidad de ácido desoxi-cólico.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende adicionalmente:
20 recubrir o modificar la superficie de dicha estructura porosa de dicha matriz con el fin de disponer la unidad estructural de ácido biliar en dicha estructura porosa.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz está hecha de un material seleccionado del grupo que comprende: metal, óxido inorgánico, carbono, vidrio, cerámica, polímero sintético y un polímero natural, y combinaciones de los mismos.
25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha matriz está hecha de un metal ferromagnético.
6. El método de la reivindicación 4, donde un polímero sintético o natural es recubierto sobre dicho material.
30 7. El método de la reivindicación 4 a 6, donde dicho polímero sintético es seleccionado del grupo que comprende: una poliolefina, un polímero vinílico, un polímero que contiene flúor, un poliacrilato, una poliamida, una poliimida, una poliimina, un poliestireno y sus copolímeros, un caucho de silicona, un poliéster, un policarbonato, un poliuretano, un polisulfonato, un poliglicol, un poliéter y un polialquidóxido y un copolímero y un híbrido de los mismos.
35 8. El método de la reivindicación 4 o 6, donde dicho polímero natural es seleccionado del grupo que comprende: un polisacárido, un policarbohidrato, un ácido poliamino, una ácido poliláctico, o un ácido poliglicólico y un copolímero y un híbrido de los mismos.
40 9. El método de la reivindicación 3, donde dicha modificación de superficie es seleccionada del grupo que comprende:
45 electrodeposición, electroevaporación, deposición química por plasma, deposición desde un flujo de plasma iónico, polimerización por plasma, deposición de polímero de superficie mejorada por plasma, y deposición de vapor químico.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde un ligando adicional es inmovilizado sobre dicha matriz, y dicho ligando es seleccionado del grupo que comprende: una proteína, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un carbohidrato, un polisacárido, una hormona, un antioxidante, una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, una vitamina soluble en grasa, un colorante reactivo, alantoína, ácido úrico, o polimixina, y combinaciones de los mismos.
50 11. El método de la reivindicación 10, donde por lo menos un agente de entrecruzamiento esta acoplado covalentemente entre dicha matriz y dicho ligando.
55 12. El método de la reivindicación 11, donde dicho agente de entrecruzamiento es seleccionado del grupo que comprende: un agente de entrecruzamiento u homobifuncional, heterobifuncional y trifuncional.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, donde dicho agente de entrecruzamiento está acoplado covalentemente como un espaciador entre dicha matriz y dicho ligando.
60 14. El método de la reivindicación 16, donde dicho espaciador es seleccionado del grupo que comprende: un silano, un diisocianato, un glicolato, un polietilenglicol, un reactivo de succinimidilo, una dihidrazina, ácido adípico, una diamina, un aminoácido, un ácido oligoamino, un ácido poliamino, un péptido y una proteína.
65 15. Un dispositivo para la unión y separación selectiva de por lo menos un componente de una solución acuosa de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende una carcasa (2), una entrada (3) y una salida (4) y por lo menos una matriz de separación (5a, 5b,.....), siendo dicha matriz rígida e integral para

ES 2 328 386 T3

5 pasar dicha solución acuosa a través de la misma, teniendo dicha matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que varía desde 5 micrones hasta 500 micrones y una superficie activa que varía desde 0.5 cm² hasta 10 m², y una unidad estructural de ácido biliar que se inmoviliza sobre dicha matriz y que es capaz de enlazar dicho por lo menos un componente, donde dicha matriz de separación tiene una estructura porosa obtenida por un proceso seleccionado del grupo: proceso de sinterización, moldeo y espumado.

16. El dispositivo de la reivindicación 15, donde dicha unidad estructural de ácido biliar es una unidad estructural de ácido desoxicólico.

10 17. El dispositivo de la reivindicación 15 o 16, donde dicha matriz de separación comprende varios discos dispuestos uno después de otro en la dirección de flujo de manera que la solución acuosa se dispone para que pase de un disco y luego fluya hacia afuera sobre la superficie completa del siguiente disco.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig 1

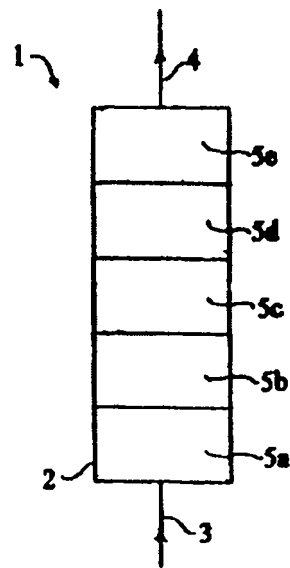


Fig 4

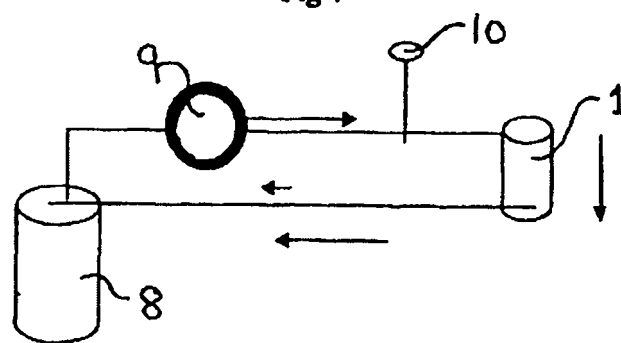
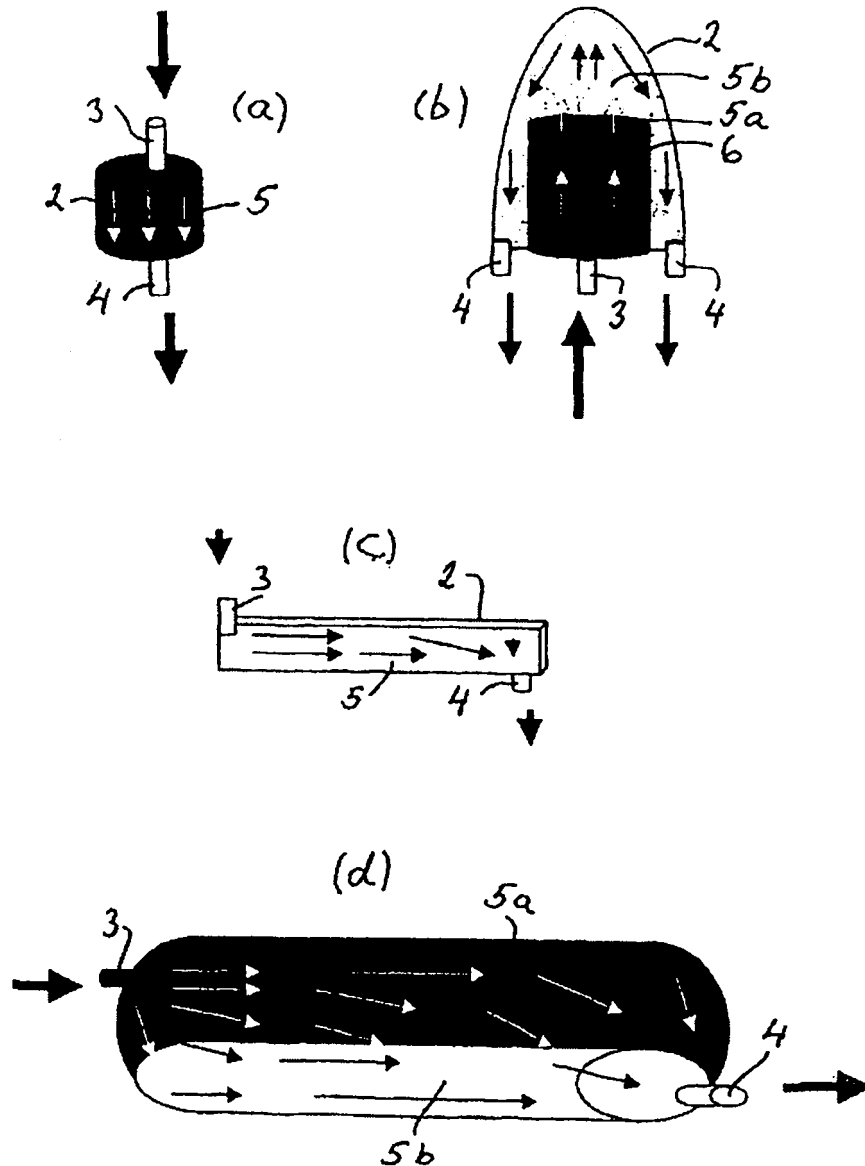


FIG 2



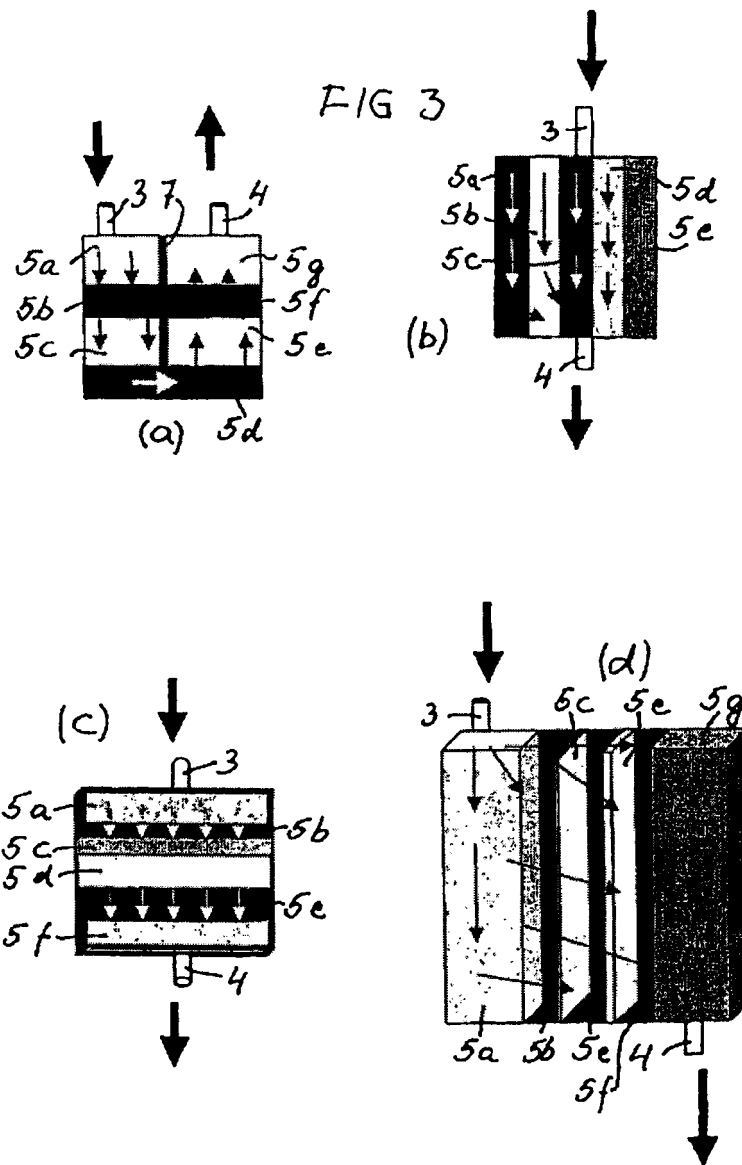


Fig 5

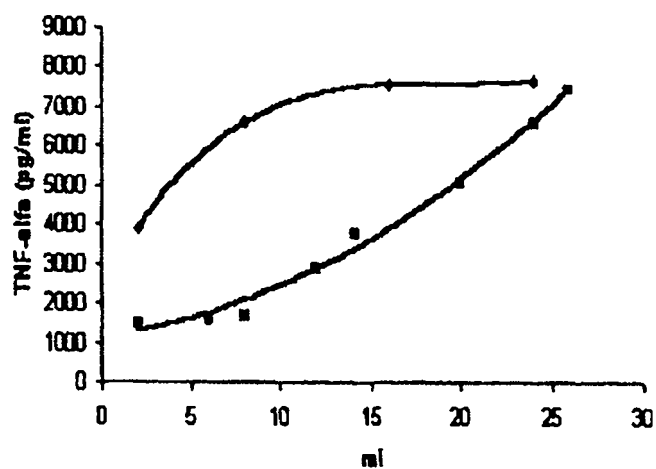


Fig 6

pg LPS/ml

