

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 351**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/36** (2006.01)

**B01J 20/26** (2006.01)

**B01J 20/28** (2006.01)

**B01J 20/32** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2015 PCT/US2015/026340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2015 E 15782250 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3134146**

54 Título: **Método para eliminar bacterias de la sangre utilizando un elevado caudal**

30 Prioridad:

**24.04.2014 US 201461984013 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.04.2025**

73 Titular/es:

**EXTERA MEDICAL CORPORATION (100.00%)  
757 Arnold Drive, Suite B  
Martinez, CA 94553, US**

72 Inventor/es:

**MCCREA, KEITH y  
WARD, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**CAÑADAS ARCAS, Dolores**

ES 2 625 351 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

Método para eliminar bacterias de la sangre utilizando un elevado caudal

### 5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La infección del torrente sanguíneo, o bacteriemia, es un reto importante en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). La bacteriemia puede conducir rápidamente a un shock séptico, meningitis, endocarditis, osteomielitis y otras complicaciones metastásicas. *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* son las bacterias más comunes responsables de la bacteriemia y las infecciones nosocomiales. La gravedad del pronóstico de los pacientes con bacteriemia está correlacionada tanto con la carga bacteriana como con la duración de la bacteriemia. Por ejemplo, un estudio cuantitativo de RT-PCR en pacientes con bacteriemia por *E. coli* y *S. aureus* mostró que, cuando el número de ADN aumentaba a más de 1.238 copias/ml, la mortalidad aumentaba del 14,3% al 42,9% y el shock séptico, del 31,4% al 85,7%. También se descubrió que una concentración sanguínea elevada de *N. meningitidis* está correlacionada con una hospitalización prolongada, la pérdida de extremidades o tejidos, la necesidad de diálisis y la mortalidad del paciente. Otro estudio demostró que la gravedad de la neumonía neumocócica se correlacionaba con la carga bacteriana en sangre: la mortalidad de los pacientes con más de 1.000 copias de ADN de *S. pneumoniae*/ml de sangre fue del 25,9% frente al 6,1% de los pacientes que presentaban menos de 1.000 copias/ml. En otro estudio, se demostró que un hemocultivo positivo de seguimiento entre 48 y 96 horas después del diagnóstico inicial era el factor predictivo más potente de una bacteriemia por *S. aureus* complicada. La dificultad de un tratamiento eficaz de la bacteriemia se ve agravada por el frecuente retraso en la administración de una terapia antibiótica adecuada. Por cada hora de retraso en el tratamiento, el riesgo de mortalidad aumenta más de un 7%.

La estrategia convencional para combatir las infecciones bacterianas consiste en administrar fármacos activos que maten específicamente a las bacterias, minimizando al mismo tiempo los daños en el tejido del huésped. Se trata de un reto importante, ya que algunos de los antibióticos más eficaces disponibles en la actualidad son bastante tóxicos. Por ejemplo, la vancomicina es nefrotóxica y pronto podría estar contraindicada para los pacientes sometidos a oxigenación extracorpórea. Aunque se desarrollen con éxito nuevos antibióticos para hacer frente a la farmacorresistencia actual, seguirán apareciendo nuevas superbacterias. Está claro que se necesitan nuevas estrategias para combatir las infecciones, además del descubrimiento de fármacos.

Los patógenos farmacorresistentes son una amenaza creciente para el sistema sanitario. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, de sus siglas en inglés) han advertido recientemente de la aparición de enterobacterias resistentes a los carbapenems (CRE, de sus siglas en inglés; «superbacterias»). La tasa de mortalidad de la bacteriemia por CRE puede alcanzar el 50%. La resistencia de las CRE, incluso a los antibióticos más potentes disponibles, deja a los médicos con pocas opciones de tratamiento. La incidencia de las infecciones por CRE adquiridas en los hospitales ha aumentado un 400% en los últimos 10 años. En la actualidad, las bacteriemias por CRE son en su mayoría infecciones nosocomiales, pero existe la preocupación de que pueda aumentar la aparición de CRE adquirida en la comunidad. En la actualidad, la única estrategia para reducir las infecciones por CRE es la educación y la prevención.

Se necesita una tecnología segura y de amplio espectro que pueda reducir rápidamente la carga bacteriana y acortar la duración de la bacteriemia. La presente invención satisface esta y otras necesidades al dar a conocer un medio de adsorción por afinidad, extracorpóreo, de gran superficie, que puede eliminar de forma rápida y segura los patógenos de la sangre completa o del suero completo.

Las patentes US 2014/012097 A1 y US 2011/184377 A1 dan a conocer, por ejemplo, la eliminación de bacterias de la sangre utilizando un adsorbente de heparina.

### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente divulgación da a conocer métodos que pueden reducir rápidamente la carga bacteriana y acortar la duración de la bacteriemia, incluso sin identificar primero el tipo de bacteria presente en la sangre. El método inventivo se define en las reivindicaciones.

En el presente documento se da a conocer un método *ex vivo* para eliminar bacterias de una muestra tomada de un sujeto sospechoso de estar infectado con bacterias. El método comprende, consiste esencialmente en o consiste en: poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un medio de adsorción para permitir la formación de un complejo adherente, en el que el complejo adherente comprende bacterias y el medio de adsorción; y separar la muestra del complejo adherente para obtener la muestra con una cantidad reducida de bacterias. Normalmente, el medio de adsorción está contenido en una columna, recipiente o cartucho.

En algunas variantes, la muestra se selecciona del grupo formado por sangre, suero y plasma completos. En otras variantes, la muestra es sangre completa.

En algunas variantes, el medio de adsorción es un sustrato sólido de gran superficie, que tiene una superficie hidrófila que está libre de un adsorbente de polisacárido. En algunos casos, el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas rígidas de polímero. En algunas variantes, la perla rígida de polímero es un miembro seleccionado del grupo formado por poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y poliisobutileno. En otras variantes, el sustrato sólido comprende una o una pluralidad de fibras huecas o hilos.

En algunas variantes, la superficie hidrófila es una superficie catiónica. En otras variantes, la superficie hidrófila es una superficie con carga neutra.

En algunas variantes, las bacterias de la muestra se reducen entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 99,9%. En otras variantes, las bacterias de la muestra se reducen entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 40%.

En algunas variantes, la bacteria es una bacteria gramnegativa. En otras variantes, la bacteria es una bacteria grampositiva. En otras variantes, la bacteria se selecciona del grupo formado por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems y *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). En otras variantes, la bacteria se selecciona del grupo formado por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Escherichia coli*.

En algunas variantes, la superficie catiónica del medio de adsorción forma un complejo adherente con bacterias seleccionadas del grupo formado por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems y *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). En otras variantes, la superficie con carga neutra forma un complejo adherente con bacterias seleccionadas del grupo formado por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Escherichia coli*.

Las reivindicaciones definen un método *ex vivo* para eliminar bacterias de una muestra tomada de un sujeto sospechoso de estar infectado con bacterias, en el que se sabe que las bacterias tienen una afinidad no detectable por el heparán sulfato. El método comprende: poner en contacto una muestra de sangre completa en un circuito extracorpóreo, con un caudal lineal de aproximadamente 400 cm/min a aproximadamente 1000 cm/min, con un medio de adsorción para permitir la formación de un complejo adherente, en el que el medio de adsorción es un sustrato sólido de gran superficie que tiene, como mínimo, un adsorbente de polisacárido en su superficie, que es heparina, en el que el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas rígidas de polímero, en el que la perla rígida de polímero es un miembro seleccionado del grupo formado por poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y poliisobutileno, en el que el tamaño de los canales o el espacio intersticial entre las perlas individuales permite el paso de las células sanguíneas, en el que las bacterias se seleccionan entre *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems o *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido, en el que las perlas están recubiertas con 0,27 mg a 10 mg de heparina por gramo de perla, y separar la muestra del complejo adherente para producir la muestra con una cantidad reducida de bacterias, en el que el complejo adherente comprende bacterias y el medio de adsorción. Normalmente, el medio de adsorción está contenido en una columna, recipiente o cartucho. En algunos casos, la muestra sale de la columna, el recipiente o el cartucho, y el complejo adherente queda atrás.

La muestra es sangre completa.

El sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas rígidas de polímero. La perla rígida de polímero es un miembro seleccionado del grupo formado por poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y poliisobutileno.

El polisacárido adsorbente es la heparina.

Las perlas están recubiertas con aproximadamente 0,27 mg a aproximadamente 10 mg de heparina por gramo de perla. En otras realizaciones, la perla está recubierta con  $2 \pm 0,5$  mg de heparina por gramo de perla.

En algunas realizaciones, las bacterias de la muestra se reducen entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 99,9%. En otras realizaciones, las bacterias de la muestra se reducen entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 40%.

La bacteria se selecciona del grupo formado por *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems y *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido.

En algunos casos, en el presente documento se da a conocer un método *ex vivo* para eliminar bacterias de una muestra tomada de un sujeto sometido a diálisis u oxigenación extracorpórea. El método comprende, consiste esencialmente en, o consiste en: poner en contacto una muestra tomada de un sujeto con un cartucho de adsorción que comprende medios de adsorción, en el que el cartucho de adsorción está en serie con un cartucho de diálisis u oxigenador para permitir la formación de un complejo adherente, y separar la muestra del complejo adherente para obtener la muestra con una cantidad reducida de bacterias. El complejo adherente comprende bacterias y medio de adsorción. Normalmente, el medio de adsorción está contenido en una columna, recipiente o cartucho. En algunos casos, la muestra sale de la columna, el recipiente o el cartucho, y el complejo adherente queda atrás.

En algunas variantes, la muestra tiene un volumen total de sangre inferior a 200 ml.

En algunas variantes, el cartucho de adsorción tiene una altura de columna de entre 1 cm y 50 cm. En algunas variantes, el cartucho de adsorción tiene un diámetro de columna de entre 1 cm y 50 cm.

En algunas variantes, el cartucho de adsorción es proximal al sujeto en comparación con el cartucho de diálisis. En otras variantes, el cartucho de adsorción es distal al sujeto en comparación con el cartucho de diálisis.

Estos y otros aspectos, objetos y ventajas se volverán más evidentes al contemplar también las figuras y la descripción detallada a continuación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-B muestran una comparación de los medios de adsorción y la sangre humana. La figura 1A muestra los medios de adsorción y

la figura 1B muestra una imagen de un frotis de sangre humana.

La figura 2 muestra una comparación del tamaño de las bacterias, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Chlamydia*, y virus, por ejemplo, poxvirus, virus del herpes, virus de la gripe y picornavirus (polio).

La figura 3 ilustra una sección transversal del medio de adsorción que contiene perlas con un diámetro (d) y una célula con un diámetro (a).

La figura 4 ilustra el tamaño mínimo de perla en función del flujo lineal y de la altura de la columna del cartucho de adsorción para un medio rígido sometido a convección forzada.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de un medio de adsorción eficaz para eliminar una cantidad significativa de bacterias (por ejemplo, bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas, incluidas bacterias sin afinidad conocida o con baja afinidad por el heparán sulfato) de la sangre (por ejemplo, sangre completa y suero sanguíneo). Además, los medios de adsorción se pueden utilizar en tratamientos extracorpóreos que impliquen altos caudales volumétricos y altos caudales lineales. Normalmente, el medio de adsorción está contenido en una columna, recipiente o cartucho. En algunos casos, la muestra sale de la columna, el recipiente o el cartucho, y un complejo adherente queda atrás.

La divulgación da a conocer un método para la eliminación de bacterias de la sangre, tal como sangre de mamíferos, poniendo en contacto la sangre con un sustrato sólido. Los inventores han descubierto que la arquitectura de la superficie del sustrato sólido es eficaz para eliminar patógenos tales como bacterias patógenas o virus.

El sustrato de la presente invención posee unas dimensiones intersticiales lo suficientemente grandes como para permitir un alto caudal de sangre sobre el sustrato sin una gran caída de presión. Por ejemplo, a medida que se extrae sangre de un paciente mamífero, esta se hace pasar sobre el sustrato a un caudal en el que la entrega de adsorbatos a la superficie del lecho adsorbente está caracterizada principalmente por convección forzada. Los sustratos adecuados para el transporte por convección generalmente se basan en «canales» macroscópicos o intersticios visibles entre material sólido, esencialmente no poroso, tal como partículas, perlas, fibras, hilos, espumas reticuladas u opcionalmente membranas densas enrolladas en espiral.

Esto contrasta con los medios adsorbentes altamente porosos (por ejemplo, sílice porosa, Sephadex®, poliestireno reticulado y otros medios de exclusión por tamaño) y muchos otros medios microporosos que utilizan el proceso mucho más lento de la difusión molecular. Los sustratos de adsorción que dependen del transporte por difusión suelen estar compuestos por materiales porosos con poros microscópicos y una gran superficie interior.

#### I. Definiciones

El término «terapia extracorpórea» incluye un procedimiento médico que se lleva a cabo fuera del cuerpo, es decir, *ex vivo*. En algunos casos, las terapias extracorpóreas incluyen métodos en los que un fluido corporal tal como la sangre se extrae del individuo y productos deseados tales como, pero no limitados a, oxígeno, anticoagulantes sanguíneos, anestésicos y similares se añaden al fluido corporal antes de devolverlo al individuo. En otros casos, una terapia extracorpórea incluye la eliminación de productos no deseados como toxinas producidas de forma natural, venenos o virus del cuerpo o de los fluidos corporales. Los ejemplos no limitativos de terapias extracorpóreas incluyen la aféresis, autotransfusión, hemodiálisis, hemofiltración, plasmáfesis, circulación extracorpórea (CEC), soporte vital extracorpóreo (SVEC), oxigenación por membrana extracorpórea (OMEC) y *bypass* cardiopulmonar.

El término «caudal elevado» o «condición de flujo elevado» incluye un caudal o velocidad de la sangre superior al límite de difusión.

El término «medio de adsorción» incluye un material a cuya superficie se puede adherir una célula, organismo, virus, patógeno, polipéptido, polinucleótido, molécula química, molécula biológica, y que puede ser extraído de una muestra tal como la sangre.

El término «complejo adherente» incluye un complejo de, como mínimo, dos moléculas, en el que la primera molécula está unida (por ejemplo, enlazada, acoplada o ligada) a una superficie tal como un sustrato y la segunda molécula está unida a la primera molécula. Por ejemplo, un patógeno o virus se puede adherir a la heparina para formar un complejo adherente. Normalmente, en los métodos de la presente invención, el complejo adherente queda atrás y la muestra se limpia del patógeno o virus.

El término «gran superficie» incluye la propiedad de tener una gran relación específica superficie/volumen.

El término «adsorbente» incluye un sustrato sólido con un compuesto químico, una molécula biológica o un material que está unido (por ejemplo, enlazado, acoplado o ligado) al mismo. En ciertos casos, el adsorbente es el propio sustrato sólido. En una realización, un adsorbente es una resina polimérica con un polisacárido tal como la heparina unido a ella. El sustrato puede ser una perla, fibra o hilo de polímero.

El término «perla rígida de polímero» hace referencia a una perla, gránulo, pellet, esfera, partícula, microcápsula, esfera, microesfera, nanoesfera, microperla, nanoperla, micropartícula, nanopartícula y similares fabricados a partir de una resina polimérica. Una perla de polímero es útil como sustrato.

El término «fibra» o «hilo» es útil como sustrato sólido. La fibra o el hilo pueden estar hechos de un polímero sintético o de un polímero natural o de una mezcla de ambos. En ciertos casos, una fibra hueca o hilo originalmente poroso se vuelve denso o no poroso antes, durante o después de unir heparina u otros adsorbentes a las superficies exteriores y/o interiores del mismo.

El término «hidrato de carbono» hace referencia a una molécula que contiene átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, y que suele tener la fórmula empírica  $C_x(H_2O)_y$ , donde  $x$  e  $y$  son números diferentes. Los ejemplos de hidratos de carbono incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

El término «polisacárido» hace referencia a una molécula de unidades de monosacáridos unidas entre sí por enlaces glucosídicos, y que tiene una fórmula empírica de  $C_x(H_2O)_y$ , donde  $x$  está entre 200 y aproximadamente 3000.

El término «superficie hidrófila» incluye una superficie con un ángulo de contacto con el agua inferior a 90° cuando la superficie es plana.

El término «baja afinidad por el heparán sulfato» en el contexto de una bacteria hace referencia a la baja afinidad de unión de la bacteria por el heparán sulfato. En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina utilizando ensayos estándar, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para heparán sulfato. En otras realizaciones, la afinidad de unión se determina basándose en un análisis predictivo, tal como un análisis de proteínas putativas de unión al heparán sulfato, expresadas por el patógeno, por ejemplo, bacterias. El término «sin afinidad por el heparán sulfato» hace referencia a una bacteria que no tiene afinidad de unión o tiene una afinidad inferior a la detectable por el heparán sulfato, o que no tiene unión conocida al heparán sulfato. En algunos casos, no tener afinidad por el heparán sulfato incluye no tener afinidad de unión predicha por el heparán sulfato.

## II. Descripción detallada

### A. Unión de patógenos bacterianos mediante transporte por convección

La unión de patógenos bacterianos al sustrato de adsorción esencialmente no poroso de la presente invención durante el transporte por convección es especialmente eficaz en las condiciones de flujo relativamente alto que se emplean habitualmente en el funcionamiento seguro de los circuitos sanguíneos extracorpóreos, por ejemplo,

cuando se mide por la velocidad de flujo lineal,  $\geq 8$  cm/min, preferentemente unos  $\geq 30$  cm/min y más preferentemente, unos 30-1.000 cm/min.

5 Los medios de adsorción eliminan los patógenos de la sangre completa en circuitos extracorpóreos con un caudal lineal de aproximadamente 400 cm/min a aproximadamente 1000 cm/min, de aproximadamente 500 cm/min a aproximadamente 1000 cm/min, de aproximadamente 600 cm/min a aproximadamente 1000 cm/min, de aproximadamente 100 cm/min a aproximadamente 500 cm/min o de aproximadamente 300 cm/min a aproximadamente 800 cm/min.

10 Como se da a conocer en el presente documento, los medios de adsorción eliminan patógenos de la sangre completa en circuitos extracorpóreos con un caudal volumétrico, de aproximadamente 50 mL/minuto a aproximadamente 5 L/minuto, por ejemplo, 50 mL/min, 100 mL/min, 150 mL/min, 200 mL/min, 250 mL/min, 300 mL/min, 350 mL/min, 400 mL/min, 500 mL/min, 550 mL/min, 600 mL/min, 650 mL/min, 700 mL/min, 750 mL/min, 800 mL/min, 850 mL/min, 900 mL/min, 950 mL/min, 1,0 L/min, 1,5 L/min, 2,0 L/min, 2,5 L/min, 3,0 L/min, 3,5 L/min, 4,0 L/min, 4,5 L/min y 5 L/min. En algunas variantes, el caudal es preferentemente  $>150$  mL/minuto.

15 Los medios adsorbentes altamente porosos, por el contrario, requieren caudales mucho más bajos, de menos de 1 mL/minuto a aproximadamente menos de 50 mL/minuto. Además, el tiempo de residencia sobre el sustrato de adsorción (por ejemplo, la cantidad de tiempo que el adsorbato (por ejemplo, las bacterias) está en contacto con el medio adsorbente) tiene que ser mucho mayor para un medio que requiera un transporte por difusión de los adsorbatos al sitio de adsorción dentro del medio en comparación con un medio que utilice la convección forzada de los adsorbatos a los sitios de unión, que no son compatibles con los sistemas sanguíneos extracorpóreos estándar.

20 Habitualmente, se reconoce que el «tiempo de residencia» en la columna de adsorción necesita ser más largo para un medio que requiere el transporte por difusión de adsorbatos al sitio de adsorción dentro del medio, cuando se compara con el menor tiempo de residencia necesario para transportar un adsorbato al sitio de unión (en un medio esencialmente no poroso) por convección forzada. Sin embargo, existen límites prácticos a las dimensiones de un cartucho, columna, filtro, etc. adsorbente, seguro y eficaz, especialmente en lo que respecta al volumen máximo de sangre que puede contener y a la velocidad de flujo de la sangre o el suero por el medio de adsorción. Por esta razón, el caudal medio a través del dispositivo de adsorción se considera una variable de diseño.

25 Los sustratos que dependen del transporte por convección forzada suelen ser más adecuados para caudales elevados, mientras que los sustratos que dependen del transporte por difusión, mucho más lento, son mucho menos eficaces cuando se requieren caudales elevados y tiempos de residencia más cortos. Por esta razón, en un dispositivo de purificación extracorpórea de la sangre, se prefiere que un adsorbato difunda rápidamente a través de los poros dentro del medio adsorbente. Cuando se bombea sangre a través de circuitos fabricados con materiales artificiales, es una práctica general emplear caudales sanguíneos relativamente altos para evitar el estancamiento y reducir el riesgo de coagulación. Por otro lado, se pueden evitar los caudales extremadamente altos, ya que pueden exponer a las células sanguíneas a altas tasas de cizallamiento y a daños por impacto que pueden romper o dañar de otro modo las células sanguíneas. Por tanto, la presente invención da a conocer un método y un dispositivo para eliminar patógenos bacterianos de la sangre utilizando las características preferentes del transporte por convección y su cinética deseable, más rápida. Esto se consigue haciendo pasar/fluir la sangre sobre un sustrato esencialmente no microporoso (por ejemplo, un sustrato sólido), que es capaz de unir al patógeno o las bacterias deseadas para eliminarlas de la sangre.

30 Los medios de adsorción dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar en la circulación sanguínea extracorpórea tradicional con caudales  $>50$  mL/min, y preferentemente entre aproximadamente 150 mL/minuto y 5L/minuto. Si se mide por la velocidad de flujo lineal, el caudal puede ser de 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800 cm/min o más. Los caudales tan elevados crean tiempos de residencia cortos dentro de la columna de adsorción y el transporte por convección domina sobre el transporte por difusión browniano. Esto es particularmente importante para unir partículas más grandes tales como virus, bacterias y parásitos, así como otras proteínas y patógenos que se difunden lentamente.

35 Los principales sitios de adsorción disponibles para eliminar los patógenos bacterianos se encuentran en las superficies de los intersticios del lecho del medio, el recipiente o el cartucho a través del cual fluye la sangre o se suministra por convección forzada. Para tratar la sangre, los canales intersticiales deben ser lo suficientemente grandes como para permitir el transporte de los glóbulos rojos, que tienen un diámetro medio de 6 micras. Para que un cartucho de adsorción empaquetado se pueda colocar en un circuito extracorpóreo con un elevada caudal sanguíneo, los canales intersticiales pueden ser varias veces mayores que el diámetro de los glóbulos rojos. Esto puede prevenir o eliminar sustancialmente las altas tasas de cizallamiento que conducen a la hemólisis, minimizando simultáneamente la caída de presión en la sangre que fluye a través del lecho o cartucho empaquetado. Además, el medio es preferentemente rígido para minimizar la deformación que puede obstruir el cartucho filtrante por compactación. Basándose en estas preferencias, un medio rígido optimizado equilibra el tamaño del canal intersticial y la superficie total, por ejemplo, para la eliminación eficaz de patógenos en circuitos sanguíneos extracorpóreos de alto flujo.

En la presente invención, se puede utilizar sangre completa de mamíferos. No se pretende limitar la cantidad de sangre que se puede utilizar en los métodos reivindicados. En caso necesario, se pueden realizar una o varias pasadas por el lecho de adsorción. La sangre puede ser humana o animal.

En algunas realizaciones, las bacterias de la muestra, sangre completa, se reducen en aproximadamente un 20% a aproximadamente un 90%, por ejemplo, en aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99,9%. En otras realizaciones, las bacterias de la muestra se reducen entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 40%, por ejemplo, aproximadamente un 20%, 25%, 30%, 35% o 40% o una reducción de bacterias de aproximadamente un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99,9%.

El medio de adsorción descrito en el presente documento, que tiene un absorbente de polisacárido en su superficie, se utiliza para eliminar de la muestra bacterias seleccionadas entre *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems y/o *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido.

## B. Medios de adsorción

En la presente invención se pueden utilizar como sustrato diversos materiales de distintas formas y composiciones. Todos los sustratos adsorbentes adecuados proporcionan una superficie elevada, favoreciendo al mismo tiempo el transporte de los adsorbatos a los sitios adsorbentes que los unen (principalmente) por transporte por convección forzada. Entre los sustratos útiles para crear los medios de adsorción se incluyen las perlas rígidas no porosas. En algunas realizaciones, un sustrato adecuado para su uso en la presente invención es aquel que es inicialmente microporoso, pero que se vuelve esencialmente no poroso cuando la superficie se trata antes, durante o después de la creación de los sitios de adsorción.

Un sustrato útil tiene forma de perlas o partículas sólidas. Las perlas pueden estar hechas de materiales que sean lo suficientemente rígidos como para resistir la deformación o la compactación bajo los caudales presentes. En algunas realizaciones, una rigidez suficiente del sustrato se define como la ausencia de un aumento significativo de la caída de presión a través del lecho de adsorción durante aproximadamente una hora de flujo de agua o solución salina a los caudales clínicos habituales. Por ejemplo, una rigidez de sustrato adecuada se define como un aumento <10-50% en la caída de presión con respecto a la caída de presión inicial (por ejemplo, medida en el primer minuto de flujo) cuando se mide con un caudal similar, por ejemplo, de solución salina.

Las perlas del sustrato adsorbente pueden estar hechas de poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y poliisobutileno. Algunos ejemplos de sustratos útiles incluyen el polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE, de sus siglas en inglés) no poroso. Otras perlas adecuadas son el poliestireno, el polietileno de alta y baja densidad, y el poliuretano.

Las perlas del sustrato se pueden preparar con una rugosidad o topografía superficial para aumentar la superficie de adsorción. Por ejemplo, es posible aumentar la superficie incrementando la relación superficie/volumen. Como se muestra en la figura 1A, una superficie irregular y ondulada produce más sitios de unión para las bacterias y los patógenos. Normalmente, una forma, estructura o geometría libre produce más superficie y resulta ventajosa. La figura 1A muestra perlas de UHMWPE tal y como se reciben de un reactor.

Los métodos para fabricar perlas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las perlas de polietileno adecuadas y otras perlas de poliolefina se producen directamente durante el proceso de síntesis. En algunos casos, las perlas se procesan hasta alcanzar el tamaño y la forma requeridos. Otros polímeros pueden necesitar molienda o secado por pulverización y clasificación, u otro tipo de procedimiento para crear perlas con la distribución de tamaños y la forma deseadas.

El medio de adsorción de la presente invención proporciona una superficie para fijar un adsorbente de polisacárido que puede unir un patógeno bacteriano. El medio de adsorción incluye un sustrato sólido con una superficie elevada, que tiene, como mínimo, un adsorbente de polisacárido, que es la heparina, en su superficie.

El sustrato sólido consiste en una pluralidad de perlas rígidas de polímero tal como se define en las reivindicaciones. Preferentemente, las perlas rígidas de polímero son perlas de polietileno.

El tamaño del sustrato sólido se puede seleccionar según el volumen de la muestra de prueba utilizada en el ensayo u otros parámetros. En algunas realizaciones, cada perla de la pluralidad de perlas rígidas de polímero tiene un diámetro exterior medio de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 1 mm, por ejemplo, 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 45 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 200 µm, 300 µm, 400 µm, 500 µm, 600 µm, 700 µm, 800 µm, 900 µm o 1 mm. En otras realizaciones, cada perla de la pluralidad de perlas rígidas de polímero tiene un diámetro medio de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 200 µm, por ejemplo, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 45 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 105 µm, 110 µm.

µm, 115 µm, 120 µm, 125 µm, 130 µm, 135 µm, 140 µm, 145 µm, 150 µm, 155 µm, 160 µm, 165 µm, 170 µm, 175 µm, 180 µm, 185 µm, 190 µm, 195 µm o 200 µm.

En algunas realizaciones, las perlas útiles tienen un tamaño que oscila entre aproximadamente 100 micras (µm) y 500 µm, o más, de diámetro, por ejemplo, 100 µm, 150 µm, 200 µm, 250 µm, 300 µm, 350 µm, 400 µm, 450 µm, 500 µm o más, de diámetro. El tamaño medio de las perlas puede oscilar entre aproximadamente 150 µm y aproximadamente 450 µm de diámetro, por ejemplo, 150 µm, 200 µm, 250 µm, 300 µm, 350 µm, 400 µm o 450 µm de diámetro. Por ejemplo, las perlas de polietileno de Polymer Technology Group (Berkeley, CA) con un diámetro medio de 300 µm son adecuadas para la presente invención.

Los medios de adsorción pueden estar en un recipiente tal como una columna, cartucho, tubo, tubo de centrifuga, lecho y similares, o cualquier recipiente en el que las células de la sangre que no se capturen en los medios de adsorción unidos a polisacáridos puedan eliminarse sin perturbar el patógeno bacteriano unido a los medios.

El sustrato se suele proporcionar empaquetado dentro de un alojamiento o recipiente, tal como una columna, que está diseñado para mantener el sustrato dentro del recipiente y permitir que la sangre fluya sobre la superficie del sustrato o lecho. El sustrato se puede disponer dentro del recipiente de forma que maximice la unión de los adsorbatos a las caras absorbentes del sustrato. El alojamiento o recipiente puede tener una estructura superficial macroporosa que ofrece una gran superficie a la sangre.

Una columna u otra forma de alojamiento se puede rellenar con tela heparinizada tejida o no tejida, o los sitios de adsorción de heparina, heparán sulfato u otros no heparínicos opcionales se pueden unir, por ejemplo, mediante enlaces covalentes, iónicos u otros enlaces químicos o físicos, después de que el alojamiento se haya llenado con el medio de sustrato. Controlando el denier de la fibra y la densidad de la tela durante la tejedura o el tricotado o durante la creación de una tela no tejida, se puede controlar el tamaño de los poros intersticiales. Las telas no tejidas útiles se pueden presentar en forma de fieltros, telas meltblown o hiladas electrostáticamente, con una orientación aleatoria, que se mantienen unidas por el entrelazamiento de las fibras y/o la adhesión o cohesión de las fibras que se cruzan. Las telas tejidas útiles tienen una estructura más definida y no aleatoria.

Un cartucho enrollado en espiral contiene una fina película o membrana que se enrolla firmemente con materiales espaciadores opcionales para evitar el contacto de las superficies adyacentes. La membrana puede estar hecha de polímeros tales como poliuretano, polietileno, polipropileno, polisulfona, policarbonato, PET, PBT y similares.

Como se ha indicado anteriormente, para su uso en el método de la invención, el tamaño de los canales o el espacio intersticial entre las perlas individuales para la filtración extracorpórea de la sangre se optimiza para evitar una caída de presión elevada entre la entrada y la salida del cartucho, para permitir el paso seguro de las células sanguíneas entre las perlas individuales en un entorno de flujo elevado, y para proporcionar una superficie intersticial adecuada para la unión del adsorbente de polisacárido a las citocinas o patógenos de la sangre. Por ejemplo, en un lecho compacto de perlas de 300 micras, aproximadamente esféricas, un tamaño de poro intersticial adecuado es de aproximadamente 68 micras de diámetro.

En algunas realizaciones, las perlas rígidas del medio de adsorción tienen un diámetro medio como el que se indica en la tabla 5. Los sustratos sin perlas de los medios de adsorción, tales como hilos o fibras tejidos, tienen un tamaño de poro macroscópico como el que se indica en la tabla 6.

### C. Métodos para fabricar medios de adsorción

La superficie del sustrato sólido descrito en el presente documento está funcionalizada para permitir la unión covalente del adsorbente de polisacárido descrito en el presente documento.

Los polisacáridos tales como heparina o heparán sulfato u otros polisacáridos pueden unirse a la superficie del medio de adsorción mediante una unión covalente por el extremo (por ejemplo, una unión covalente a través del residuo terminal de la molécula de heparina). La unión covalente, en comparación con la unión no covalente, ofrece ventajosamente un mejor control de la orientación de las moléculas inmovilizadas y de su densidad superficial. En particular, la unión por el extremo de estos hidratos de carbono de cadena larga proporciona una función espaciadora que conduce a una mayor concentración de oligómeros de carbohidrato accesibles, disponibles para la unión de patógenos. De hecho, ciertos patógenos se unen a superficies recubiertas con heparina de longitud completa (por ejemplo, heparina con un peso molecular medio superior a 10 kDa) de forma mucho más eficaz que a superficies convencionales recubiertas con fragmentos de heparina, como se emplea generalmente en la técnica.

En algunas realizaciones, las moléculas de heparina de longitud completa inmovilizadas tienen un peso molecular medio superior a 10 kDa. En otras realizaciones, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio superior a 15 kDa. En otra realización, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio superior a 21 kDa. En otra realización, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio superior a 30 kDa. Preferentemente, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular



medio dentro del intervalo de 15-25 kDa. El peso molecular medio también puede ser superior, tal como en el intervalo de 25-35 kDa.

En algunas realizaciones, la concentración superficial del adsorbente de heparina sobre el sustrato sólido está en el intervalo de 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo, 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 11  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 13  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 14  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 17  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 18  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 19  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . En otras realizaciones, la concentración superficial del adsorbente de heparina en el sustrato sólido está en el intervalo de 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por ejemplo, 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 11  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 13  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 14  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

La cantidad de adsorbente de polisacárido por gramo de sustrato puede variar. En una realización particular, si se utilizan perlas, la cantidad de polisacárido, tal como la heparina, por gramo de perla está determinada por el número de capas utilizadas y también por el tamaño de las perlas. Cuanto mayor sea la perla, menor será la cantidad de polisacárido, tal como la heparina, por gramo de perla. Una cantidad preferente es de  $2,0 \pm 0,5$  mg de heparina/g de perla según el método MBTH (Larm et al., Biomater Med Devices Artif Organs, 1983, 11:161-173 y Riesenfeld y Rosen, Anal Biochem, 1990, 188:383-389).

La unión covalente de moléculas de heparina de longitud completa a una superficie se puede lograr mediante la reacción de un grupo aldehído de la molécula de heparina con un grupo amino primario presente en la superficie del medio de adsorción. Una propiedad inherente a todos los hidratos de carbono es que tienen un hemiacetal en su extremo reductor. Este acetal está en equilibrio con la forma aldehído y puede formar bases de Schiff con aminas primarias. A continuación, estas bases de Schiff se pueden reducir a aminas secundarias estables. En algunas realizaciones, la heparina de longitud completa se inmoviliza en superficie sobre el sustrato sólido mediante conjugación covalente. En otras realizaciones, la heparina de longitud completa se une mediante unión covalente a dicho medio de adsorción mediante un grupo amino secundario estable.

En ciertos casos, varios métodos de fabricación de adsorbentes y los adsorbentes en sí se dan a conocer en la patente US8.663.148 y en las patentes US2009/0136586, US2010/0249689, US2011/0184377 y US2012/0305482.

En algunas realizaciones, el medio de adsorción se hace hidrófilo antes de la unión del polisacárido, tal como la heparina, u otros compuestos. Los métodos para preparar la superficie hidrófila del sustrato incluyen el grabado ácido, tratamiento con plasma y exposición a oxidantes fuertes. Por ejemplo, una superficie polimérica como una perla de polietileno (PE) se puede grabar con un agente oxidante, tal como permanganato de potasio, peroxidisulfato de amonio y similares, para introducir propiedades hidrófilas junto con algunos grupos funcionales reactivos (por ejemplo, un grupo sulfonilo, grupo hidroxilo, grupo carboxilo, grupo carbonilo o dobles enlaces de carbono). La superficie se puede grabar con plasma o descarga de corona. Por ejemplo, las perlas de PE se pueden grabar con permanganato potásico en ácido sulfúrico para producir perlas con una superficie hidrófila que contenga grupos hidroxilo y dobles enlaces de carbono.

#### **D. Mezclas de medios de adsorción**

En ciertos casos, los métodos de la invención preparan el lecho de adsorción a partir de una mezcla de un medio heparinizado que es antitrombogénico y otro medio que es inherentemente trombogénico. Al ensamblar un cartucho de adsorción con superficies heparinizadas y, por ejemplo, superficies hidrófilas (superficies catiónicas o neutras), todos los patógenos bacterianos se pueden eliminar de forma segura de la sangre u otro fluido biológico. Por ejemplo, el medio heparinizado puede ser del 1% al 99% del lecho de adsorción y el sustrato inherentemente trombogénico puede ser del 99% al 1% del lecho de adsorción.

En algunas realizaciones de la presente invención, el medio de adsorción proporciona una superficie antitrombogénica que está en contacto íntimo con o en estrecha proximidad a una superficie trombogénica. Este medio de adsorción puede evitar una formación de trombos clínicamente significativa que, de otro modo, se produciría si se utilizara únicamente la superficie inherentemente trombogénica.

En el caso de los medios de adsorción en forma de perlas o partículas, una aplicación preferente de esta invención consiste en mezclar los distintos medios de adsorción antes de empaquetarlos en un cartucho u otro alojamiento. Esto proporciona un contacto íntimo entre las diversas químicas superficiales de las perlas adyacentes, permitiendo al mismo tiempo una fabricación eficiente de los cartuchos o filtros de adsorción. Un enfoque relacionado consiste en colocar los diferentes medios en capas en una disposición «tipo parfait» dentro del alojamiento, de tal modo que la sangre entre en contacto con los diferentes medios fluyendo en serie o en paralelo. Una disposición de los diferentes medios dentro de un cartucho consiste en colocar medios antitrombogénicos sin mezclar en la entrada y/o la salida del cartucho, con una región opcionalmente mezclada que contiene los medios más trombogénicos interpuesta entre las regiones de entrada y salida.

En el caso de los medios en forma de fibra, se puede preparar una estructura mixta tejida, de punto o no tejida mediante métodos bien conocidos en la industria textil, para formar tela a partir de la fibra mixta. Alternativamente, se puede preparar un hilo a partir de un hilo multifilamento más fino o un monofilamento hecho de dos o más fibras

con diferentes químicas superficiales, siempre que un tipo de fibra contenga una superficie que impida activamente la coagulación de la sangre al contacto. A continuación, el hilo de fibra mixta se puede utilizar para preparar la tela para el contacto con la sangre. Los medios de adsorción de fibra hueca o de fibra sólida se pueden mezclar y utilizar para fabricar cartuchos que se asemejen a dializadores u oxigenadores de fibra hueca. Para los medios de adsorción de tipo membrana o película del tipo que se utiliza en los cartuchos de adsorción enrollados en espiral, se pueden utilizar dos o más químicas superficiales muy próximas entre sí, de tal modo que la sangre debe entrar en contacto con ambas químicas superficiales (casi) simultáneamente. Esto se puede hacer con una disposición regular o aleatoria de los diversos grupos de unión dentro de la capa superficial de la película de membrana o formando una vía de flujo para la sangre entre dos películas de membrana estrechamente espaciadas, una de las cuales es antitrombogénica.

### E. Filtro sanguíneo extracorpóreo

En algunos casos, los métodos dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar en un dispositivo que comprenda medios de adsorción para la eliminación extracorpórea de patógenos de la sangre de mamíferos, por ejemplo, sangre humana. Por ejemplo, el dispositivo puede ser un dispositivo convencional para el tratamiento extracorpóreo de la sangre y el suero de pacientes, por ejemplo, un sujeto que sufra insuficiencia renal.

Se sabe que los patrones locales de flujo sanguíneo en la sangre que entra en contacto con los dispositivos médicos de circulación extracorpórea influyen en la formación de coágulos a través de la activación por cizallamiento y la agregación de plaquetas en las zonas estancadas. El dispositivo que contiene los medios de adsorción proporcionados en el presente documento puede, por ejemplo, tener una o más de las siguientes propiedades: a) un flujo sanguíneo en el rango de 150-5.000 ml/min o, si se mide por velocidad de flujo lineal, de  $\geq 8$  cm/min; b) baja resistencia al flujo; c) gran superficie del sustrato que tiene hidratos de carbono inmovilizados en él, por ejemplo, alrededor de 0,1-1 m<sup>2</sup>; d) un recubrimiento estable (por ejemplo, sin fugas clínicamente significativas de hidratos de carbono a la sangre en contacto con el mismo); e) propiedades hemodinámicas adecuadas en el dispositivo (por ejemplo, sin zonas de estancamiento) y f) biocompatibilidad óptima.

Los ejemplos no limitativos de un dispositivo para su uso según los métodos de la presente invención incluyen un dispositivo de oxigenación por membrana extracorpórea (OMEC), un dializador hemoflow pediátrico, que es un dispositivo de filtración extracorpórea de la sangre para eliminar moléculas de citocinas, u otro dispositivo extracorpóreo que pueda admitir caudales elevados.

Los métodos dados a conocer en el presente documento se pueden combinar con otras técnicas para filtrar o tratar la sangre de mamíferos. Por ejemplo, un cartucho basado en la cinética de convección se puede utilizar en serie con circuitos extracorpóreos convencionales tales como el bypass cardiopulmonar (BCP), hemodiálisis, oxigenación y ozonización extracorpóreas de la sangre (EBOO), y similares.

Los diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no pretenden ser limitativos. Por ejemplo, en los presentes ejemplos se utiliza heparina. No obstante, se pueden utilizar otros hidratos de carbono y adsorbentes de polisacárido además de los sustratos recubiertos de heparina que se ejemplifican a continuación.

### III. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

#### Ejemplo 1. Eliminación de bacterias con afinidad baja o no detectable por el heparán sulfato

Este ejemplo ilustra el uso de perlas recubiertas de heparina para eliminar patógenos bacterianos con baja afinidad o afinidad no detectable por el heparán sulfato de la sangre completa.

Se ha descrito en la bibliografía que más de 50 patógenos diferentes captan los proteoglicanos de heparán sulfato que se encuentran en los sindecanos como sitio de unión inicial durante su patogénesis. Sorprendentemente, la heparina unida a la superficie puede funcionar como sustituto de los organismos que se unen al heparán sulfato.

Nuestros estudios han demostrado que los medios de adsorción heparinizados pueden eliminar altas concentraciones de *S. aureus* y SARM de la sangre completa. Además, el estudio demostró que las bacterias unidas a la superficie heparinizada no morían y, por tanto, no liberaban potenciales toxinas inflamatorias y sus productos secundarios en la sangre. Por tanto, los medios unidos a heparina se pueden utilizar en un dispositivo extracorpóreo para eliminar de forma eficaz y segura las bacterias circulantes, incluidas las cepas farmacorresistentes, de la sangre infectada.

En este ejemplo se prueban tanto patógenos conocidos que se unen al heparán sulfato como patógenos de los cuales se desconoce o no se espera que se unan a la heparina. Además, se descubrió que los controles hidrófilos, ya sean catiónicos o con carga neutra, pueden funcionar como una superficie eficaz para unir patógenos. En

general, las superficies con carga neutra no fueron tan eficaces como las superficies heparinizadas en la eliminación de patógenos, pero es factible que se pueda desarrollar una tecnología de reducción de patógenos utilizando superficies hidrófilas genéricas. Las superficies catiónicas hidrófilas también mostraron una capacidad razonable para eliminar patógenos.

5 Este ejemplo ilustra que un medio de adsorción que comprende una heparina unida a la superficie se puede utilizar para eliminar patógenos que se espera que se unan al heparán sulfato, tales como, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), *E. faecalis*, *E. faecalis* resistente a la vancomicina, VHS-1 y VHS-2, y *Candida albicans*.

10 Este ejemplo ilustra que un medio de adsorción que comprende una heparina unida a la superficie se puede utilizar para eliminar patógenos de baja (por ejemplo, cero) afinidad de unión al heparán sulfato, tales como, *E. coli*, *E. coli* resistente a los carbapenems, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* resistente a los carbapenems, *K. pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido, *E. faecium*, *A. baumannii* y *S. pneumoniae*, de la sangre.

15 En particular, un medio de adsorción que comprende una superficie hidrófila neutra puede eliminar, por ejemplo, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *E. coli*. Asimismo, un medio de adsorción que comprende una superficie hidrófila catiónica puede eliminar, por ejemplo, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* resistente a los carbapenems, *K. pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido, *E. faecium*, *A. baumannii* y *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM).

20 La bacteriemia por *S. aureus* o *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) muestra una afinidad natural hacia la heparina y el heparán sulfato (HS). Se ha desarrollado una tecnología de adsorción por afinidad que se basa en este mecanismo natural para eliminar las bacterias de la sangre. El ligando primario es heparina unida por el extremo, un análogo del heparán sulfato. La heparina no sólo proporciona el mecanismo de acción para eliminar las bacterias de la sangre completa, sino que también proporciona una superficie antitrombogénica que aumenta la seguridad del circuito extracorpóreo.

La captación de hidratos de carbono y proteoglicanos para la unión inicial es un mecanismo común de la mayoría de los patógenos. Por ejemplo, los virus de la gripe se unen al ácido siálico, un hidrato de carbono que se encuentra en muchas glicoproteínas. Muchas bacterias gramnegativas tienen adhesinas de unión a la manosa situadas en las puntas de las fimbrias. Otros hidratos de carbono que han demostrado ser captados por las bacterias son la L-fucosa, la galactosa y diversas glucosaminas o galactoaminas. El patrón común de los patógenos que se unen a los hidratos de carbono es la naturaleza ubicua del glicocáliz en las superficies celulares.

30 Las bacterias objetivo en este ejemplo incluyen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y sus cepas resistentes a los carbapenems, así como también *P. aeruginosa*. Existen muchas adhesinas diferentes descritas para las bacterias gramnegativas. Las más estudiadas son las fimbrias de tipo 1, tipo 3, tipo P y tipo S y también la proteína de membrana externa A (OmpA). Las fimbrias de tipo 1 y la OmpA han estado implicadas en la unión a las células endoteliales. Las fimbrias de tipo 1 median la unión a la manosa (sensibles a la manosa) y se expresan en la mayoría de las enterobacterias. Otras fimbrias tienen adhesinas para diferentes hidratos de carbono y se consideran resistentes a la manosa. Normalmente, varios tipos de fimbrias se expresan simultáneamente.

Además, se ha demostrado que las adhesinas sensibles a la manosa están presentes en la superficie celular bacteriana, incluso cuando no se expresan las fimbrias. Se ha demostrado que las fimbrias de tipo 1 interactúan con las células endoteliales microvasculares del cerebro humano, lo que sugiere que las fimbrias se pueden expresar en la sangre. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* farmacorresistentes expresan una mayor concentración de fimbrias de tipo 1 y de tipo 3.

Se investigó una superficie heparinizada para la eliminación dirigida de *S. aureus*, SARM, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, virus del herpes simple, exotoxinas específicas y otros patógenos que captan el HS. Los estudios *in vitro* han confirmado la afinidad de muchos de estos patógenos y toxinas por los medios heparinizados.

El segundo medio de adsorción desarrollado fue una superficie funcionalizada con manosa para captar bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. Los estudios *in vitro* confirmaron que los medios con manosa pueden unir a estos patógenos. Se demostró que el SARM no tenía afinidad por el medio de manosa. Sin embargo, el medio heparinizado también fue muy eficaz para eliminar estas bacterias gramnegativas, que no se esperaba que tuvieran una gran afinidad por la heparina. Estos resultados fueron inesperados, por lo que no es posible predecir basándose únicamente en la bibliografía qué bacterias pueden ser eliminadas de la sangre por una superficie heparinizada.

## Resultados

### A. Resultados

El primer informe sobre la eliminación con éxito de bacterias de la sangre completa se publicó en 2011 (Mattsbj-Baltzer et al., J. Microbiol. Biotechnol., 2011, 21(6), 659-664). En este estudio, se demostró que se eliminaban altas

concentraciones de *S. aureus* y SARM de la sangre completa utilizando los medios heparinizados. Además, se demostró mediante PCR que las bacterias no morían al unirse a la superficie heparinizada y, por tanto, no liberaban potenciales toxinas inflamatorias/productos secundarios en el torrente sanguíneo. El uso de los medios heparinizados proporciona un dispositivo de muy amplio espectro que puede eliminar con seguridad las bacterias circulantes de la sangre, independientemente de la farmacorresistencia.

El medio de adsorción de heparina no funciona mediante adición de ninguna sustancia química detectable a la sangre tratada o a los productos sanguíneos. En su lugar, utiliza la heparina unida covalentemente (sin lixiviación) y unida por el extremo como ligando en un proceso de adsorción rápida no limitado por la difusión.

Como se expone en el presente documento, *S. aureus* y SARM se pueden eliminar de la sangre completa utilizando los medios heparinizados. En este estudio se sometieron a prueba varias cepas de *S. aureus* y SARM. Los resultados se muestran en la tabla 1. *S. aureus* y varias cepas de SARM se eliminaron en grandes cantidades de la sangre completa. Dependiendo de la cepa, hasta el 85% de las bacterias de SARM fueron eliminadas por los medios heparinizados.

Tabla 1. Eliminación de cepas de *S. Aureus* y SARM de la sangre completa

Cepas de <i>S. Aureus</i> y SARM sometidas a prueba				
	SA1800T	SARM485	SARM251	SARM860
% eliminado en una sola pasada	62%	85%	59%	70%

En un estudio *in vitro* en sangre, el 85% del SARM se eliminó mediante una sola pasada por el medio (tabla 2).

Tabla 2. Eliminación de patógenos tanto sensibles a los fármacos como farmacorresistentes

Bacterias	% de reducción	Capacidad (UFC/g)
<b>Bacterias grampositivas</b>		
SARM	91,57%	3,69E+05
<i>S. pneumoniae</i>	53,06%	1,73E+05
<i>E. faecalis</i>	99,04%	2,12E+06
<i>E. faecalis</i> (ERV)	91,25%	1,88E+06
<i>E. faecium</i>	56,38%	1,72E+06

La concentración inicial de bacterias fue de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Además de unir el SARM, el análisis PCR indicó que la superficie heparinizada no era bactericida. Se trata de un hallazgo importante que indica que los componentes celulares de las bacterias (muertas), que pueden ser inflamatorios y tóxicos para el receptor, no se liberan a la sangre cuando las bacterias se unen al medio.

Se realizaron estudios adicionales para comprobar la afinidad de varios patógenos por los medios heparinizados. En estos estudios, se llenaron jeringas filtrantes de 2,5 ml con medios heparinizados o medios de control para comprobar la eliminación de diversas bacterias gramnegativas y grampositivas. Las bacterias se cultivaron utilizando métodos estándar y se diluyeron en sangre de caballo desfibrinada. A continuación, se pasó la sangre sobre el medio enjuagado con solución salina un total de 3 veces y se cultivó en placas para el recuento de UFC. La concentración objetivo de UFC/ml era la habitual para las pruebas antimicrobianas y oscilaba entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml.

En la tabla 2 se muestra una tabla resumen que informa de la eliminación de patógenos utilizando los medios heparinizados.

## B. Resultados inesperados

Varios patógenos descritos en la bibliografía con poca, ninguna o afinidad desconocida por la heparina o el heparán sulfato fueron sometidos a pruebas utilizando los mismos protocolos empleados para los patógenos que se unen a la heparina. La tabla 3 lista estas bacterias y los resultados. Sorprendentemente, muchas bacterias gramnegativas y sus cepas farmacorresistentes se eliminaron en alta concentración de la sangre.

Tabla 3. Eliminación inesperada de bacterias gramnegativas utilizando una superficie heparinizada

Bacterias Gram Negativas	% de reducción	Capacidad (UFC/g)
<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	99,94%	4,66E+05
<i>K. pneumoniae</i>	36,57%	4,90E+05
<i>E. coli</i> (CRE)	99,93%	8,56E+05
<i>E. coli</i>	99,75%	2,04E+06
<i>A. baumannii</i>	79,13%	4,83E+05

### Conclusión

Los resultados muestran que los medios heparinizados tienen una capacidad extremadamente alta para eliminar un amplio espectro de bacterias de la sangre. Inesperadamente, también se eliminaron varias bacterias sin afinidad conocida o con poca afinidad por la heparina o el heparán sulfato. Por lo tanto, hay poca previsibilidad en cuanto a la afinidad que muchos patógenos pueden tener o no hacia la química superficial heparinizada. La adsorción de varias bacterias grampositivas, entre las que se encuentran patógenos descritos que se unen a la heparina, sugiere que estos patógenos se unen específicamente a la superficie heparinizada. Sin estar vinculados a ninguna teoría en particular, se cree que las superficies hidrófilas, tales como las superficies neutras o catiónicas de los medios de adsorción, se pueden utilizar para eliminar las bacterias sin afinidad conocida (o baja afinidad) por la heparina o el heparán sulfato. Alternativamente, la unión de las bacterias gramnegativas enumeradas anteriormente se puede producir mediante la interacción de sitios específicos o a través de una unión no específica. La topografía de la superficie del medio de adsorción puede ser importante para esta unión.

### Ejemplo 2. Medio de adsorción con superficie hidrófila (no reivindicado)

Este ejemplo muestra el medio de adsorción que comprende una superficie hidrófila, que se puede utilizar para eliminar bacterias de la sangre completa o del suero.

Los medios de adsorción descritos en el presente documento contienen una topografía superficial que permite su unión a patógenos, tales como los que no tienen afinidad o tienen baja afinidad por la heparina (figura 1A). Sin ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que una superficie rugosa, irregular u ondulada puede contribuir a la afinidad de las bacterias por el medio de adsorción.

La figura 1B muestra una imagen de un frotis de sangre humana para su comparación. La figura 2 muestra una comparación del tamaño de bacterias, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Chlamydia*, y virus, por ejemplo, poxvirus, virus del herpes, virus de la gripe y picornavirus (polio).

### Ejemplo 3. Filtros de sangre para su uso en terapias extracorpóreas de caudal lineal elevado

Este ejemplo proporciona un diseño a modo de ejemplo de un cartucho filtrante extracorpóreo que se utiliza para admitir caudales lineales elevados.

Un filtro sanguíneo extracorpóreo se puede diseñar para que funcione de forma segura a caudales específicos utilizados con sistemas de bombeo comunes. Si la caída de presión a través de un filtro de sangre es demasiado elevada, se puede producir hemólisis. Normalmente, los sistemas de diálisis funcionan con presiones inferiores a 34 kPa para evitar el riesgo de hemólisis.

En un cartucho lleno de medios adsorbentes empaquetados, la caída de presión a través del cartucho depende del caudal, el tamaño de las partículas, el módulo de las partículas, la altura de los medios empaquetados y la viscosidad de la sangre. Si un medio filtrante no es lo suficientemente rígido, se puede producir la compresión del medio con el aumento del flujo sanguíneo, lo que da lugar a una porosidad reducida que puede provocar presiones inseguras.

La primera variable a determinar es el tamaño mínimo de partícula admisible para alturas de columna y caudales lineales específicos. Los caudales habituales de los sistemas de diálisis se sitúan entre 100 y 400 ml/min, lo que equivale a un caudal lineal de aproximadamente 8 y 30 cm/min en función del diámetro del cartucho. Los caudales volumétricos habituales del bypass cardiopulmonar (BCP) y los oxigenadores por membrana extracorpóreos (OMEC) pueden ser de hasta 5000 ml/min. Por tanto, dependiendo de la anchura del cartucho, el caudal lineal podría llegar a 1000 cm/min. Si un cartucho se hace más ancho, el caudal lineal se puede disminuir para reducir la presión.

Para determinar el tamaño mínimo de las partículas basándose en el caudal lineal y el tamaño de las partículas, es necesario no sobrepasar presiones que puedan causar hemólisis. La ecuación de Blake-Kozeny describe la caída de presión a través de medios empaquetados de sólidos rígidos.

$$\Delta P = \mu * \left( \frac{K_o}{d_p^2} \right) \frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^3} L * u$$

donde  $\mu$  es la viscosidad de la sangre;  $K_o$  es una constante;  $d_p$  es el diámetro de la partícula;  $\epsilon$  es la porosidad del lecho intersticial o volumen vacío;  $L$  es la altura del medio empaquetado; y  $u$  es el caudal lineal.

5

La ecuación se puede resolver para  $d_p$

$$d_p = \sqrt{\frac{\mu * K_o}{\Delta P} * \frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^3} L * u}$$

10 Si 34 kPa es la presión máxima admisible, se utilizan las siguientes variables para determinar el tamaño de las partículas en función del caudal y de la altura de la columna.

15

$\mu =$	4	cp	viscosidad de la sangre
$K_o =$	150		constante (puede oscilar entre 0,3 y 0,5 en función de la eficacia de la empaquetadura)
$\epsilon =$	0,36		
$\Delta P =$	34	kPa	Presión máxima admisible
	255	mmHg	
	4,9	PSI	

$$\frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^3} = 8.78$$

$$\frac{\mu * K_o}{\Delta P} = 1.76E-05$$

20

Los diámetros mínimos de las perlas para una velocidad lineal y una altura de columna dadas se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Caudales volumétricos bajos

diámetro de las perlas (micras)					
L (altura de la columna en cm)					
u (cm/min)	3	5	10	20	30
1	22	28	39	56	68
3	37	48	68	96	118
5	48	62	88	124	152
7	57	74	104	147	180
9	65	83	118	167	205
11	72	92	131	185	226
13	78	100	142	201	246
15	83	108	152	216	264
17	89	115	162	230	281
19	94	121	172	243	297
21	99	128	180	255	312
23	103	133	189	267	327
25	108	139	197	278	341
27	112	145	205	289	354
29	116	150	212	300	367
31	120	155	219	310	380

5

Sin embargo, también se puede tener en cuenta el tamaño de las células sanguíneas, ya que el tamaño efectivo de los poros no puede ser demasiado pequeño como para bloquear el paso de las células sanguíneas. Los macrófagos son las células más grandes de la sangre y miden aproximadamente 21 micras, por lo que es importante que estas células puedan atravesar el medio filtrante (figura 3).

10

El tamaño de garganta representado con «a» en la figura 3, es decir, la abertura más pequeña entre las perlas de un medio empaquetado, se describe con más detalle a continuación. El tamaño del cuello se puede calcular mediante la siguiente ecuación.

15

$$a = d_p \cdot \frac{2\sqrt{3}}{3} - 1$$

El tamaño mínimo del cuello debe ser entonces de, como mínimo, 21 micras. Por lo tanto, el tamaño mínimo de perla es:

20

$$d_{pmin} = \frac{a}{\frac{2\sqrt{3}}{3} - 1}$$

donde  $d_{pmin} = 136$  micras

25

Por tanto, el tamaño mínimo permitido es de 136 micras. La tabla 5 representa los caudales lineales útiles y las alturas de columna para perlas de diámetro igual o superior a 136 µm.

Tabla 5. Tamaño de las perlas en relación con el flujo lineal y la altura de la columna

diámetro de las perlas (micras)						diámetro de las perlas (micras)					
u (cm/min)	L (altura de la columna en cm)					u (cm/min)	L (altura de la columna en cm)				
	3	5	10	20	30		3	5	10	20	30
1	136	136	136	136	136	1	136	136	136	136	136
3	136	136	136	136	136	76	188	243	343	485	594
5	136	136	136	136	152	151	265	342	484	684	838
7	136	136	136	147	180	226	324	418	592	837	1025
9	136	136	136	167	205	301	374	483	683	966	1183
11	136	136	136	185	226	376	418	540	763	1079	1322
13	136	136	142	201	246	451	458	591	836	1182	1448
15	136	136	152	216	264	526	494	638	903	1277	1564
17	136	136	162	230	281	601	529	682	965	1365	1671
19	136	136	172	243	297	676	561	724	1023	1447	1773
21	136	136	180	255	312	751	591	763	1079	1525	1868
23	136	136	189	267	327	826	620	800	1131	1600	1959
25	136	139	197	278	341	901	647	835	1181	1671	2046
27	136	145	205	289	354	976	674	870	1230	1739	2130
29	136	150	212	300	367	1051	699	902	1276	1805	2210
31	136	155	219	310	380	1126	723	934	1321	1868	2288

- 5 La figura 4 representa un gráfico de la tabla 5. El gráfico muestra el tamaño mínimo de las perlas en el eje y, el caudal lineal en el eje x y la altura de la columna en el eje z. La figura 4 tiene 6 tonos distintos de gris, ya que el límite de tamaño de las perlas es de 136 micras. Por lo tanto, los tonos que representan las perlas por debajo de ese tamaño no están representados. (por ejemplo, 0-50 y 50-100).
- 10 Los datos se utilizaron para determinar el tamaño mínimo de la abertura de los poros de materiales no perlados, tales como hilos o fibras tejidos. La siguiente tabla (tabla 6) da a conocer el tamaño mínimo correspondiente de la abertura de los poros en relación con la altura de la columna y el caudal lineal.



Tabla 6. Tamaños macroscópicos de poros para material no perlado

Tamaño de poro macroscópico						Tamaño de poro macroscópico							
		L ( altura de la columna en cm )							L ( altura de la columna en cm )				
u (cm/min)		3	5	10	20	30	u (cm/min)		3	5	10	20	30
1		21	21	21	21	21	1		21	21	21	21	21
3		21	21	21	21	21	76		29	38	53	75	92
5		21	21	21	21	24	151		41	53	75	106	130
7		21	21	21	23	28	226		50	65	92	129	159
9		21	21	21	26	32	301		58	75	106	149	183
11		21	21	21	29	35	376		65	83	118	167	205
13		21	21	22	31	38	451		71	91	129	183	224
15		21	21	24	33	41	526		76	99	140	197	242
17		21	21	25	36	43	601		82	106	149	211	259
19		21	21	27	38	46	676		87	112	158	224	274
21		21	21	28	39	48	751		91	118	167	236	289
23		21	21	29	41	51	826		96	124	175	247	303
25		21	22	30	43	53	901		100	129	183	258	317
27		21	22	32	45	55	976		104	135	190	269	329
29		21	23	33	46	57	1051		108	140	197	279	342
31		21	24	34	48	59	1126		112	144	204	289	354

- 5 Si un medio de adsorción es compresible, el tamaño macroscópico de los poros disminuirá en función del caudal debido a la tensión de cizallamiento de la sangre que fluye. Un medio compresible se puede «comprimir previamente» para alcanzar el tamaño mínimo de poro calculado en la tabla 6 para un caudal deseado. Para un medio compresible poco compacto, el tamaño macroscópico de los poros no debe disminuir por debajo de los valores de la tabla 6 en condiciones de flujo, ya que de lo contrario aumentaría la presión del sistema, que podría provocar hemólisis y, además, se filtrarían los macrófagos.
- 10

Además de determinar el tamaño de las partículas y/o el tamaño macroscópico de los poros, se puede determinar el diámetro (por ejemplo, el diámetro interior) del cartucho filtrante extracorpóreo. La tabla 7 da a conocer los diámetros útiles de los cartuchos, necesarios para conseguir el caudal lineal necesario para un caudal volumétrico específico.

15

Tabla 7. Diámetros de los cartuchos

Diámetro del cartucho (cm)		Caudal volumétrico deseado (ml/min)					
u (cm/min)		50	100	150	300	500	1000
	14						
1	1	20.0	24.5	34.6	44.7	63.2	
3	8.2	11.5	14.1	20.0	25.8	36.5	
5	6.3	8.9	11.0	15.5	20.0	28.3	
7	5.3	7.6	9.3	13.1	16.9	23.9	
9	4.7	6.7	8.2	11.5	14.9	21.1	
11	4.3	6.0	7.4	10.4	13.5	19.1	
13	3.9	5.5	6.8	9.6	12.4	17.5	
15	3.7	5.2	6.3	8.9	11.5	16.3	
17	3.4	4.9	5.9	8.4	10.8	15.3	
19	3.2	4.6	5.6	7.9	10.3	14.5	
21	3.1	4.4	5.3	7.6	9.8	13.8	
23	2.9	4.2	5.1	7.2	9.3	13.2	
25	2.8	4.0	4.9	6.9	8.9	12.6	
27	2.7	3.8	4.7	6.7	8.6	12.2	
29	2.6	3.7	4.5	6.4	8.3	11.7	
31	2.5	3.6	4.4	6.2	8.0	11.4	

Diámetro del cartucho (cm)		Caudal volumétrico deseado (ml/min)					
u (cm/min)		500	1000	2000	3000	4000	5000
1	44.7	63.2	89.4	109.5	126.5	141.4	
76	5.1	7.3	10.3	12.6	14.5	16.2	
151	3.6	5.3	7.3	8.9	10.3	11.5	
226	3.0	4.2	5.9	7.3	8.4	9.4	
301	2.6	3.6	5.2	6.3	7.3	8.2	
376	2.3	3.3	4.6	5.6	6.5	7.3	
451	2.1	3.0	4.2	5.2	6.0	6.7	
526	1.9	2.8	3.9	4.8	5.5	6.2	
601	1.8	2.6	3.6	4.5	5.2	5.8	
676	1.7	2.4	3.4	4.2	4.9	5.4	
751	1.6	2.3	3.3	4.0	4.6	5.2	
826	1.5	2.2	3.1	3.8	4.4	4.9	
901	1.5	2.1	3.0	3.6	4.2	4.7	
976	1.4	2.0	2.9	3.5	4.0	4.5	
1051	1.4	2.0	2.8	3.4	3.9	4.4	
1126	1.3	1.9	2.7	3.3	3.8	4.2	

- 5 Otro factor a tener en cuenta es el volumen total de sangre utilizado con un dispositivo extracorpóreo. Por ejemplo, el volumen total extraído del cuerpo durante un tratamiento de circulación extracorpórea no suele ser superior al 8-10% de la sangre del paciente. Para un adulto medio, esto equivale a 500 ml de sangre. Un volumen de sangre habitual del cartucho y el tubo de diálisis puede oscilar entre 250-300 ml. Si se utiliza un cartucho de diálisis en serie con un cartucho de adsorción, entonces el volumen de sangre del cartucho de adsorción no debe ser superior a 200 ml. Las dimensiones prácticas para un cartucho de adsorción de la presente invención se dan a conocer en la tabla 8.

Tabla 8. Volumen de sangre de un cartucho empaquetado (ml) - relación de volumen vacío 0,36

Diámetro	Altura de la columna (cm)				
	3	5	10	20	30
1	0.84834	1.4139	2.8278	5.6556	8.4834
5	21.2085	35.3475	70.695	141.39	212.085
10	84.834	141.39	282.78	565.56	848.34
15	190.8765	318.1275	636.255	1272.51	1908.765
20	339.336	565.56	1131.12	2262.24	3393.36

Este ejemplo da a conocer realizaciones a modo de ejemplo de los medios de adsorción y el cartucho de adsorción descritos anteriormente. Los medios de adsorción se pueden utilizar en terapias extracorpóreas con un caudal volumétrico de hasta 5000 ml/min y caudales lineales de hasta 1000 cm/min.

#### Ejemplo 4. Filtros de sangre para eliminar el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B (no reivindicados)

Este ejemplo da a conocer un cartucho filtrante extracorpóreo que se utiliza para eliminar el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B. En este ejemplo, el medio de adsorción es mixto. El medio mixto comprende una proporción de 70:30 de perlas de polietileno heparinizadas: proteína A fijada a un gel de celulosa.

Las perlas de PE heparinizadas tienen heparina degradada con ácido nitroso en unión covalente por el extremo a perlas de PE aminadas. Las perlas de PE heparinizadas contienen 2,6 mg de heparina/g de perla.

- 5 La unión covalente por el extremo de heparina degradada con ácido nitroso a perlas de PE aminadas se prepara utilizando solución tampón de acetato 0,1 M pH 4,0 (100 ml) y heparina degradada con ácido nitroso (1,6 g). Tras agitar durante 15 min, se añade NaBH<sub>3</sub>CN (100 mg) disuelto en solución tampón de acetato 0,1 M pH 4,0 (10 ml). La mezcla de reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente y se añade NaBH<sub>3</sub>CN adicional (100 mg) disuelto en solución tampón de acetato 0,1 M pH 4,0 (10 ml) adicional, continuando la agitación durante otras 24
- 10 h a temperatura ambiente para producir la unión covalente por el extremo de la heparina. En 0,5 mL de solución tampón de borato 0,05 M (pH 10,0) se disuelven 4 mg de proteína A (Sigma) y se añade NaOH 0,01N/agua para llevar el pH a 10 y hacer un volumen total de 1,0 mL (solución de proteína A). Esta solución de proteína (cantidad total) se añade a 1 mL de un gel de celulosa activado con epoxi y la mezcla se agita a 37° C durante 16 horas y se
- 15 lava con una cantidad suficiente de PBS (solución tampón de fosfato 10 mM suplementado con cloruro sódico 150mM) para obtener GCL 2000m- Proteína A.

El medio de adsorción mixto se utiliza para eliminar el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B de la sangre.

- 20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos.

## REIVINDICACIONES

1. Método *ex vivo* para eliminar bacterias de una muestra tomada de un sujeto sospechoso de estar infectado con bacterias, en el que se sabe que las bacterias tienen una afinidad no detectable por el heparán sulfato, comprendiendo el método:

(i) poner en contacto una muestra de sangre completa en un circuito extracorpóreo a un caudal lineal de aproximadamente 400 cm/min a aproximadamente 1000 cm/min con un medio de adsorción para permitir la formación de un complejo adherente, en el que el medio de adsorción es un sustrato sólido de gran superficie que tiene, como mínimo, un adsorbente de polisacárido en su superficie, que es heparina, en el que el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas rígidas de polisacárido, en el que la perla rígida de polímero es un miembro seleccionado del grupo formado por poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y poliisobutileno, en el que el tamaño de los canales o el espacio intersticial entre las perlas individuales permite el paso de las células sanguíneas, en el que las bacterias se seleccionan entre *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems o *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido; en el que las perlas están recubiertas con 0,27 mg a 10 mg de heparina por gramo de perla; y  
(ii) separar la muestra del complejo adherente para obtener la muestra con una cantidad reducida de bacterias;

en el que el complejo adherente comprende bacterias y el medio de adsorción.

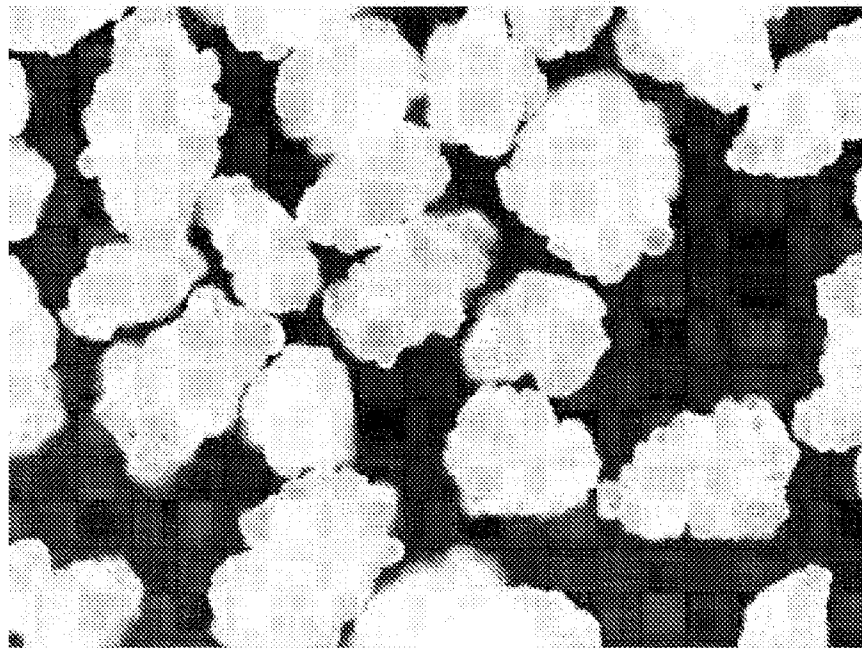
2. Método, según la reivindicación 1, en el que la perla rígida de polímero es polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros.

3. Método, según la reivindicación 1, en el que la perla está recubierta con  $2 \pm 0,5$  mg de heparina por gramo de perla.

4. Método, según la reivindicación 1, en el que la bacteria se selecciona del grupo formado por *Escherichia coli* resistente a los carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems y *Klebsiella pneumoniae* de betalactamasa de espectro extendido.

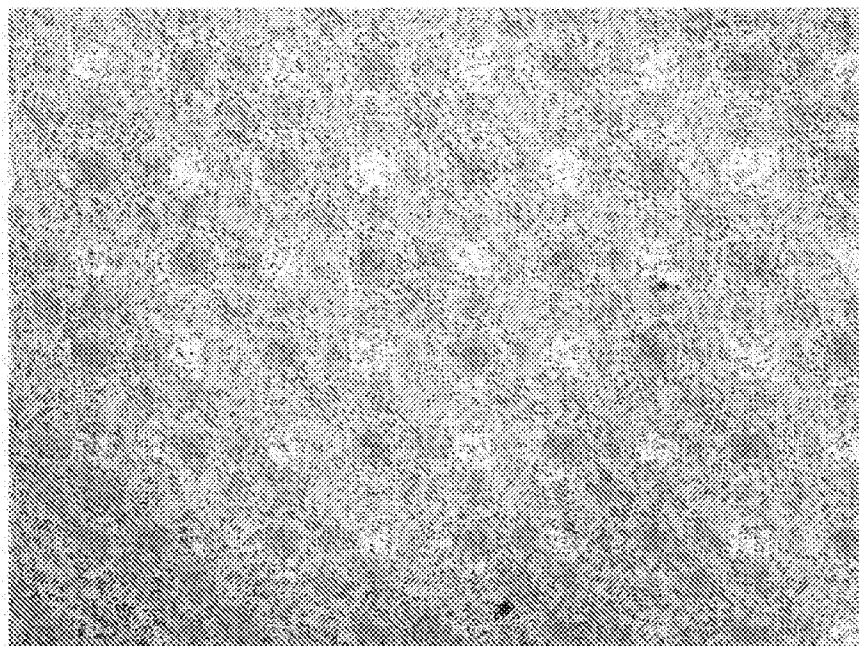
5. Método, según la reivindicación 1, en el que el sustrato sólido comprende una superficie rugosa u ondulada irregular.

**FIG. 1A**

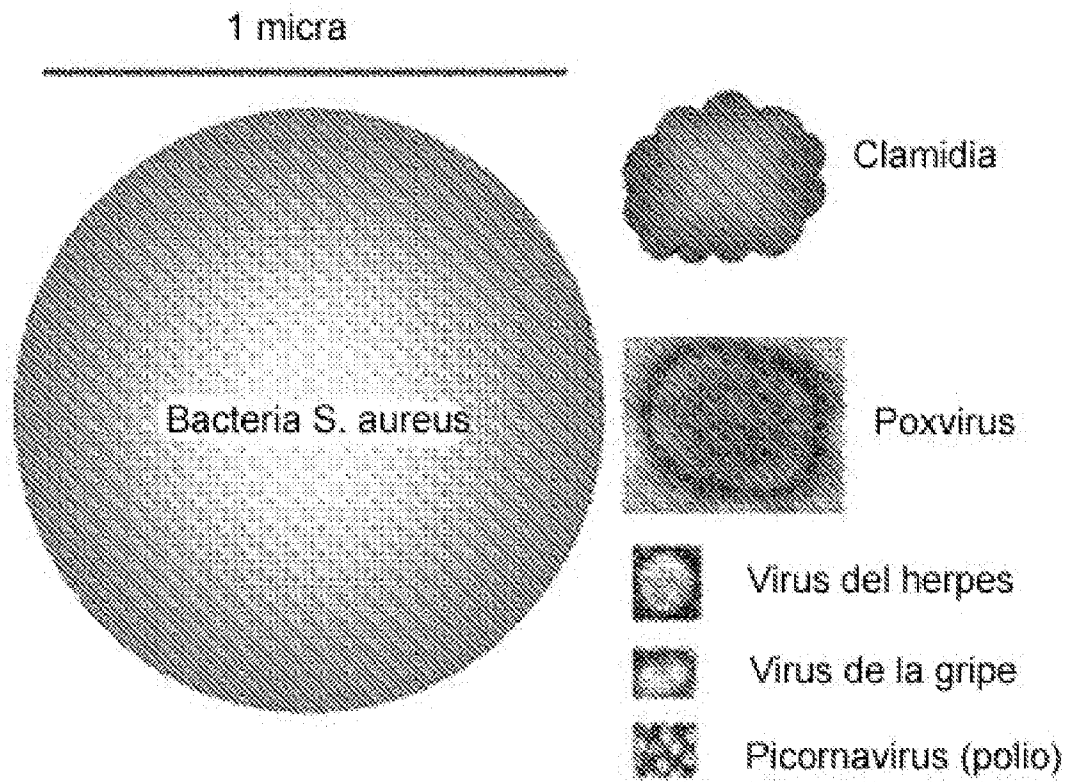


100x aumento

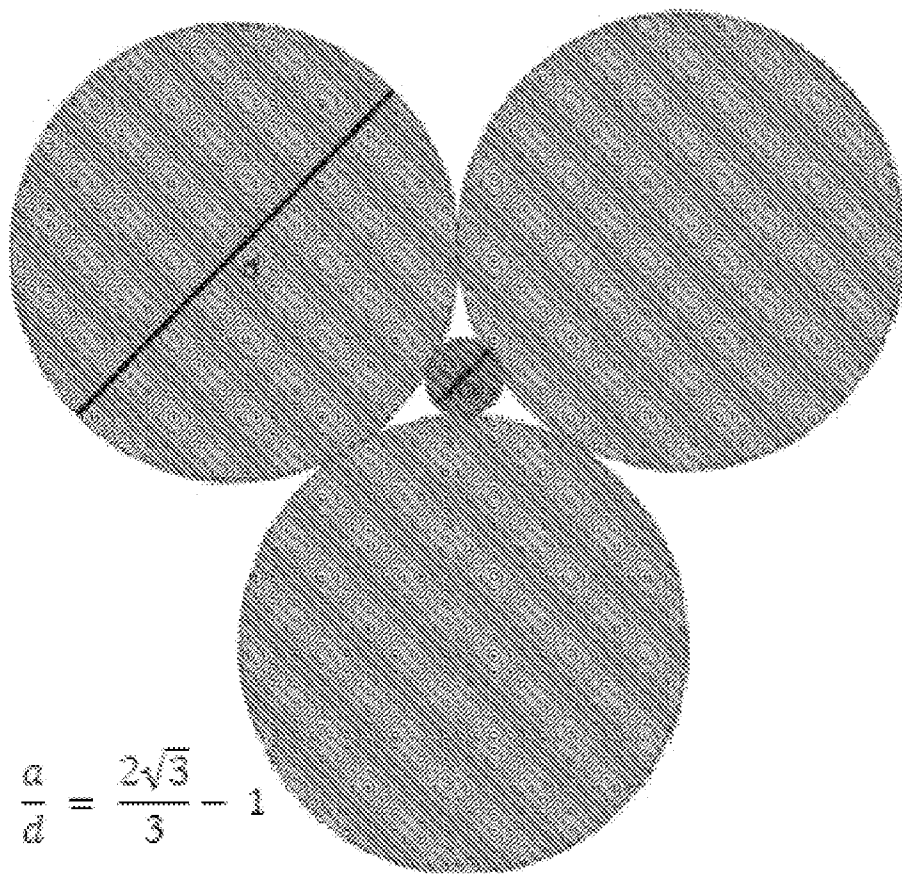
**FIG. 1B**



100x aumento



**FIG. 2**



**FIG. 3**

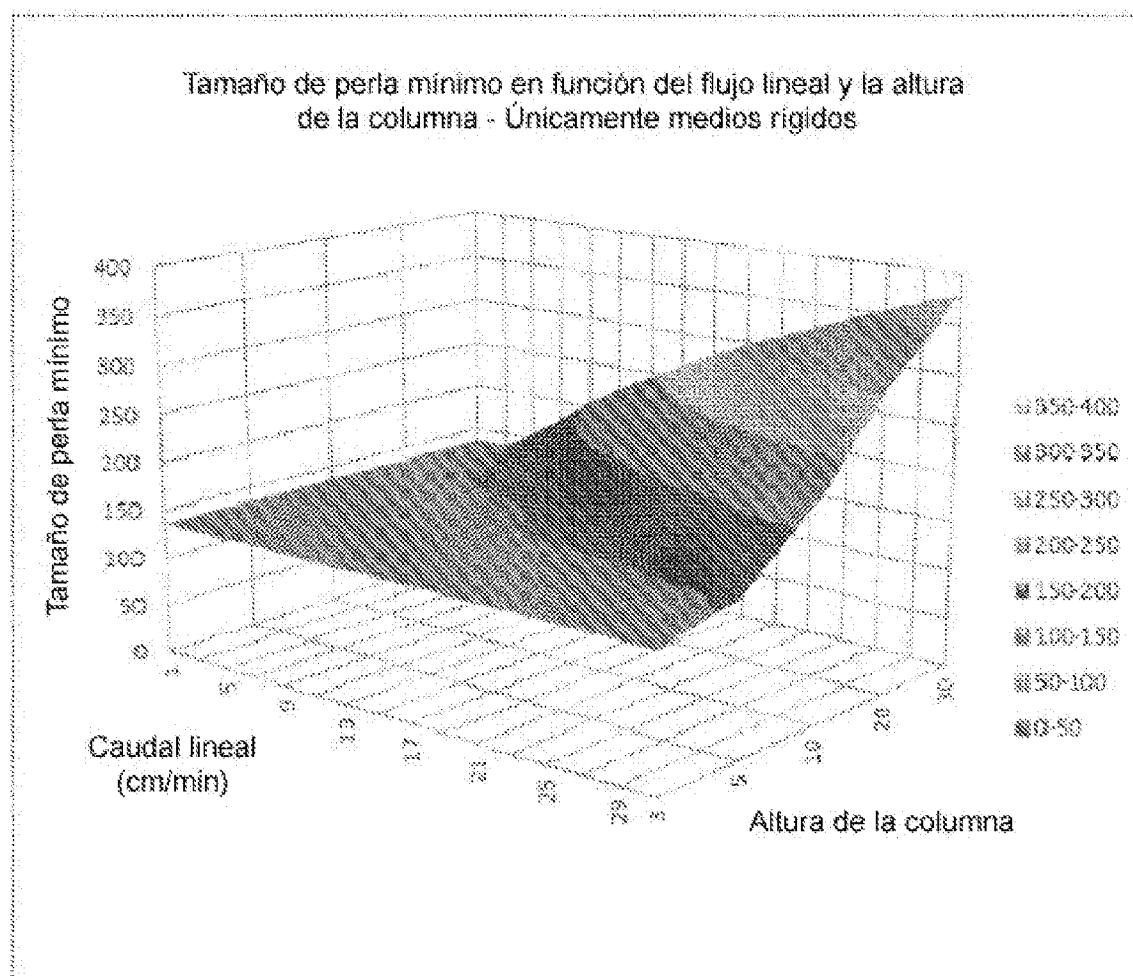


FIG. 4