



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112016024569-5 B1



(22) Data do Depósito: 17/04/2015

(45) Data de Concessão: 03/01/2023

(54) Título: MÉTODO EX VIVO PARA REMOVER BACTÉRIAS DE UMA AMOSTRA RETIRADA DE UM INDIVÍDUO QUE É SUSPEITO DE ESTAR INFECTADO COM A MESMA

(51) Int.Cl.: A61M 1/36.

(30) Prioridade Unionista: 24/04/2014 US 61/984,013.

(73) Titular(es): EXTHERA MEDICAL CORPORATION.

(72) Inventor(es): KEITH MCCREA; ROBERT WARD.

(86) Pedido PCT: PCT US2015026340 de 17/04/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/164198 de 29/10/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/10/2016

(57) Resumo: MÉTODO EX VIVO PARA REMOVER BACTÉRIAS DE UMA AMOSTRA RETIRADA DE UM INDIVÍDUO QUE É SUSPEITO DE ESTAR INFECTADO COM A MESMA. A presente invenção refere-se a métodos para a remoção de uma quantidade significativa de bactérias (por exemplo, bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, incluindo as bactérias com baixa ou nenhuma afinidade com o sulfato de heparano) do sangue integral, soro ou plasma, utilizando um meio de adsorção. O método pode ser usado em tratamentos extracorpóreos envolvendo altas taxas de fluxo volumétrico e altas taxas de fluxo linear.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO EX VIVO PARA REMOVER BACTÉRIAS DE UMA AMOSTRA RETIRADA DE UM INDIVÍDUO QUE É SUSPEITO DE ESTAR INFECTADO COM A MESMA".**

[001] O presente pedido reivindica prioridade apresentam a Pedido de Patente Provisório US No. 61/984.013, depositado em 24 de abril de 2014, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

[002] A infecção da corrente sanguínea, ou bacteremia, é um grande desafio na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). A bacteremia pode levar rapidamente a choque séptico, meningite, endocardite, osteomielite e outras complicações metastáticas. *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* são as bactérias mais comuns responsáveis por bacteremia e infecções nosocomiais. A gravidade dos resultados para os pacientes com bacteremia está correlacionada tanto com a carga bacteriana quanto com a duração da bacteremia. Por exemplo, um estudo quantitativo RT-PCR de pacientes com bacteremia por *E. coli* e *S. aureus* mostrou que quando o número de rDNA aumentou para mais de 1.238 cópias/mL, a mortalidade aumentou de 14,3% para 42,9% e o choque séptico aumentou de 31,4% para 85,7%. Constatou-se também que uma alta concentração no sangue de *N. meningitides* está correlacionada com a hospitalização prolongada, a integridade física ou perda de tecido, a necessidade de diálise e a mortalidade de pacientes. Outro estudo mostrou que a gravidade da pneumonia pneumocócica está correlacionada com a carga bacteriana no sangue: a mortalidade de pacientes com mais de 1.000 cópias do DNA de *S. pneumoniae*/mL de sangue foi 25,9% contra 6,1% para os pacientes que exibem menos do que 1000 cópias/mL. Em outro estudo, uma hemocultura positiva de acompanhamento entre 48 e 96 horas após o diagnóstico inicial revelou-se o mais forte preditor de

bacteremia por *S. aureus* complicada. Para agravar a dificuldade de tratamento de bacteremia eficaz está a administração frequentemente adiada de terapia antibiótica adequada. Para cada hora de atraso no tratamento, o risco de mortalidade aumenta mais de 7%.

[003] A estratégia convencional para combater as infecções bacterianas é administrar fármacos ativos que especificamente matam as bactérias, minimizando os danos ao tecido hospedeiro. Este é um grande desafio à medida que alguns dos antibióticos mais eficazes atualmente disponíveis são bastante tóxicos. Por exemplo, a vancomicina é nefrotóxica, e em breve poderá ser contraindicada para pacientes submetidos à oxigenação extracorpórea. Mesmo que novos antibióticos sejam desenvolvidos com sucesso para abordar a atual resistência a fármacos, novas superbactérias continuarão a surgir. Claramente, novas estratégias para combater a infecção são necessárias, em adição à descoberta de fármacos.

[004] Os patógenos resistentes a fármacos são uma ameaça crescente para o sistema de saúde. O CDC foi recentemente alertado do surgimento de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenem (CRE; “superbactérias”). A taxa de mortalidade para bacteremia por CRE pode ser de no máximo 50%. Resistência de CREs até mesmo aos antibióticos mais fortes disponíveis deixa os médicos com poucas opções de tratamento. A incidência de infecções por CRE adquiridas em hospitais aumentou 400% ao longo dos últimos 10 anos. Atualmente, as bacteremias por CRE são principalmente infecções nosocomiais, mas existe a preocupação de que a incidência de CRE adquirida em comunidade possa aumentar. Hoje, a única estratégia de reduzir as infecções por CRE é através da educação e prevenção.

[005] Há a necessidade de uma tecnologia segura de amplo espectro que possa rapidamente reduzir a carga bacteriana, e diminuir a duração da bacteremia. A presente invenção satisfaz esta e outras

necessidades fornecendo um meio de adsorção de afinidade extracorpórea com alta área de superfície que pode rapidamente e com segurança remover patógenos do sangue total ou soro total.

[006] A presente invenção fornece métodos que podem rapidamente reduzir a carga bacteriana, e diminuir a duração da bacteremia mesmo sem primeiro identificar o tipo de bactérias presentes no sangue.

[007] Em alguns aspectos, é aqui fornecido um método ex vivo para remover bactérias de uma amostra retirada de um indivíduo que é suspeito de estar infectado com a bactéria. O método compreende, consiste essencialmente de, ou consiste em: contatar uma amostra retirada do indivíduo com um meio de adsorção para permitir a formação de um complexo aderente, onde o complexo aderente compreende bactérias e o meio de adsorção; e separar a amostra do complexo aderente para produzir a amostra com uma quantidade reduzida de bactérias. Tipicamente, o meio de adsorção está contido dentro de uma coluna, um recipiente ou cartucho.

[008] Em algumas modalidades, a amostra é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro e plasma. Em outras modalidades, a amostra é sangue total.

[009] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área de superfície tendo uma superfície hidrofílica que é isenta de um adsorvente polissacarídeo. Em alguns casos, o substrato sólido compreende uma pluralidade de grânulos de polímero rígidos. Em algumas modalidades, o grânulo de polímero rígido é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em poliuretano, polimetil metacrilato, polietileno ou copolímeros de etileno e outros monômeros, polietileno imina, polipropileno, e poli-isobutileno. Em outras modalidades, o substrato sólido compreende um ou uma pluralidade de fibras ou fios ociosos.

[010] Em algumas modalidades, a superfície hidrofílica é uma superfície catiônica. Em outras modalidades, a superfície hidrofílica é uma superfície de carga neutra.

[011] Em algumas modalidades, as bactérias presentes na amostra são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 99,9%. Em outras modalidades, as bactérias presentes na amostra são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 40%.

[012] Em algumas modalidades, a bactéria é uma bactéria gram-negativa. Em outras modalidades, a bactéria é uma bactéria gram-positiva. Em outras modalidades, a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Em ainda outras modalidades, a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), e *Escherichia coli*.

[013] Em algumas modalidades, a superfície catiônica do meio de adsorção forma um complexo aderente com bactérias selecionadas a partir do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Em outras modalidades, a superfície com carga neutra forma um complexo aderente com bactérias selecionadas a partir do grupo que consiste em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), e *Escherichia coli*.

[014] Em alguns aspectos, é fornecido aqui um método *ex vivo*

para remover bactérias de uma amostra retirada de um indivíduo que é suspeito de estar infectado com bactérias, onde as bactérias são conhecidas por terem uma afinidade baixa ou nenhuma afinidade para o heparan sulfato. O método compreende, consiste essencialmente de, ou consiste em: contatar uma amostra retirada de um indivíduo com um meio de adsorção para permitir a formação de um complexo aderente, onde o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área de superfície tendo ao menos um adsorvente polissacarídeo em sua superfície e separar a amostra do complexo aderente para produzir a amostra com uma quantidade reduzida de bactérias. O complexo aderente compreende bactérias e o meio de adsorção. Tipicamente, o meio de adsorção está contido dentro de uma coluna, um recipiente ou cartucho. Em certos aspectos, a amostra sai da coluna, do recipiente ou do cartucho, e o complexo aderente permanece atrás.

[015] Em algumas modalidades, a amostra é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro e plasma. Em outras modalidades, a amostra é sangue total.

[016] Em algumas modalidades, o substrato sólido compreende uma pluralidade de grânulos de polímero rígidos. Em alguns casos, o grânulo de polímero rígido é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em poliuretano, polimetil metacrilato, polietileno ou copolímeros de etileno e outros monômeros, polietileno imina, polipropileno, e poli-isobutileno. Em outras modalidades, o substrato sólido compreende uma ou uma pluralidade de fibras ocas.

[017] Em algumas modalidades, ao menos o adsorvente polissacarídeo é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em heparina, heparan sulfato, ácido hialurônico, ácido siálico, carboidratos com sequências de manose, e quitosana. Em outras modalidades, ao menos o polissacarídeo é heparina ou heparan sulfato. Em alguns casos, ao menos o adsorvente é heparina.

[018] Em algumas modalidades, os grânulos são revestidos com aproximadamente 0,27 mg a aproximadamente 10 mg de heparina por grama de grânulo. Em outras modalidades, o grânulo é revestido com $2 \pm 0,5$ mg de heparina por grama de grânulo.

[019] Em algumas modalidades, as bactérias presentes na amostra são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 99,9%. Em outras modalidades, as bactérias presentes na amostra são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 40%.

[020] Em algumas modalidades, as bactérias são bactérias gram-negativas. Em outras modalidades, as bactérias são as bactérias gram-positivas. Em ainda outras modalidades, as bactérias são selecionadas a partir do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido.

[021] Em alguns aspectos, é fornecido aqui um método *ex vivo* para remover as bactérias de uma amostra retirada de um indivíduo submetido à diálise ou oxigenação extracorpórea. O método compreende, consiste essencialmente de, ou consiste em: contatar uma amostra retirada de um indivíduo com um cartucho de adsorção que compreende meio de adsorção, onde o cartucho de adsorção está em série com um cartucho de diálise ou oxigenador para permitir a formação de um complexo aderente e separar a amostra do complexo aderente para produzir a amostra com uma quantidade reduzida de bactérias. O complexo aderente compreende bactérias e meios de adsorção. Tipicamente, o meio de adsorção está contido dentro de uma coluna, um recipiente ou cartucho. Em certos aspectos, a amostra sai da coluna, do recipiente ou do cartucho, e o complexo aderente permanece atrás.

[022] Em algumas modalidades, a amostra tem um volume de sangue total de menos do que 200 mL.

[023] Em algumas modalidades, o cartucho de adsorção tem uma altura da coluna entre 1 cm e 50 cm. Em algumas modalidades, o cartucho de adsorção tem um diâmetro da coluna entre 1 cm e 50 cm.

[024] Em algumas modalidades, o cartucho de adsorção está próximo do indivíduo em comparação com o cartucho de diálise. Em outras modalidades, o cartucho de adsorção é distal ao indivíduo em comparação com o cartucho de diálise.

[025] Estes e outros aspectos, objetivos e vantagens serão mais evidentes quando lidos com as figuras e a descrição detalhada que segue.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[026] As Figuras 1A-B mostram uma comparação do meio de adsorção e do sangue humano. A Figura 1A mostra o meio de adsorção e a Figura 1B mostra uma imagem de um esfregaço de sangue humano.

[027] A Figura 2 mostra uma comparação do tamanho das bactérias, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Chlamydia*, e os vírus, por exemplo, vírus da varíola, vírus do herpes, vírus da influenza, e picornavírus (Polio).

[028] A Figura 3 ilustra uma seção transversal do meio de adsorção contendo grânulos com um diâmetro (d) e uma célula com um diâmetro (a).

[029] A Figura 4 ilustra o tamanho mínimo de grânulo como uma função de fluxo linear e altura da coluna de cartucho de adsorção para um meio rígido submetido à convecção forçada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[030] A presente invenção é baseada, em parte, na descoberta de um meio de adsorção que é eficaz para a remoção de uma quantidade significativa de bactérias (por exemplo, bactérias gram-negativas e

bactérias gram-positivas, incluindo as bactérias sem nenhuma afinidade conhecida ou baixa afinidade com o heparan sulfato) a partir do sangue (por exemplo, sangue total e soro sanguíneo). Em adição, o meio de adsorção pode ser utilizado em tratamentos extracorpóreos envolvendo altas taxas de fluxo volumétrico e altas taxas de fluxo linear. Tipicamente, o meio de adsorção está contido dentro de uma coluna, um recipiente ou cartucho. Em certos aspectos, a amostra sai da coluna, do recipiente ou do cartucho, e um complexo aderente permanece atrás.

[031] Um primeiro aspecto da presente invenção fornece um método para remover as bactérias do sangue, tal como o sangue de mamíferos, através de contato do sangue com um substrato sólido. Os inventores descobriram que a arquitetura da superfície do substrato sólido é eficaz para remover patógenos tais como patógenos bacterianos ou vírus.

[032] O substrato da presente invenção possui dimensões intersticiais suficientemente grandes para permitir uma alta taxa de fluxo de sangue sobre o substrato sem uma grande queda de pressão. Por exemplo, à medida que o sangue é retirado de um paciente mamífero, ele passa sobre o substrato a uma taxa de fluxo pela qual a entrega de adsorbatos para a superfície do leito adsorvente é caracterizada principalmente por convecção forçada. Os substratos adequados para o transporte de convecção geralmente contam com “canais” macroscópicas ou interstícios visíveis entre o material não poroso essencial sólido, tal como partículas, grânulos, fibras, fios, espumas reticuladas, ou membranas densas opcionalmente enroladas em espiral.

[033] Isto está em contraste com meios adsorventes altamente porosos (por exemplo, sílica porosa, Sephadex®, poliestireno reticulado e outros meios de exclusão por tamanho), e muitos outros meios microporosos que usam o processo muito mais lento de difusão

molecular. Os substratos de adsorção que dependem do transporte de difusão são geralmente compostos por materiais porosos com poros microscópicos e uma área de superfície interna extremamente alta.

I. Definições

[034] O termo “terapia extracorpórea” inclui um procedimento médico que é conduzido fora do corpo, ou seja, ex vivo. Em alguns casos, as terapias extracorpóreas incluem métodos em que um fluido corporal tal como o sangue é retirado do indivíduo e produtos desejados tais como, mas não limitados a oxigênio, anticoagulantes do sangue, anestésicos, e similares são adicionados ao fluido corporal antes de ser retornado para o indivíduo. Em outros casos, uma terapia extracorpórea inclui remover produtos indesejados como toxinas que ocorrem naturalmente, venenos ou vírus do corpo ou fluidos corporais. Exemplos não limitantes de terapias extracorpóreas incluem aférese, autotransfusão, hemodiálise, hemofiltração, plasmaférese, circulação extracorpórea (ECC), suporte de vida extracorpórea (ECLS), oxigenação de membrana extracorpórea (ECMO), e desvio cardiopulmonar.

[035] O termo “alta taxa de fluxo” ou “alta condição de fluxo” inclui uma taxa de fluxo ou velocidade do sangue que está acima do limite de difusão.

[036] O termo “meio de adsorção” inclui um material ao qual uma célula, organismo, vírus, patógeno, polipeptídeo, polinucleotídeo, molécula química, molécula biológica pode aderir à superfície do mesmo e ser removida de uma amostra tal como sangue.

[037] O termo “complexo aderente” inclui um complexo de ao menos duas moléculas onde a primeira molécula está acoplada (por exemplo, ligada, acoplada ou presa) a uma superfície tal como um substrato, e a segunda molécula está ligada à primeira molécula. Por exemplo, um patógeno ou vírus pode aderir à heparina para formar um

complexo aderente. Tipicamente, nos métodos da presente invenção, o complexo aderente permanece atrás e a amostra é purificada do patógeno ou vírus.

[038] O termo “alta área de superfície” inclui a propriedade de ter uma grande relação de área de superfície específica para volume.

[039] O termo “adsorvente” inclui um substrato sólido com um composto químico, uma molécula biológica, ou um material que está anexado (por exemplo, ligado, acoplado ou preso) ao mesmo. Em certos casos, o adsorvente é o próprio substrato sólido. Em uma modalidade, um adsorvente é uma resina polimérica com um polissacarídeo, tal como heparina, ligada à mesma. O substrato pode ser um grânulo, fibras ou fios de polímero.

[040] O termo “grânulo de polímero rígido” refere-se a um grânulo, pélete, esfera, partícula, microcápsula, microesfera, nanoesfera, micropartícula, nanopartícula, e similares, que é feito de uma resina polimérica. Um grânulo de polímero é útil como um substrato.

[041] O termo “fibra” ou “fio” é útil como um substrato sólido. A fibra ou fio pode ser feito de um polímero sintético ou um polímero natural ou uma mistura desses. Em certos casos, uma fibra ou fio originalmente poroso é tornado denso ou não poroso, antes, durante ou após a ligação à heparina ou outros adsorventes às superfícies externas e/ou internas do mesmo.

[042] O termo “carboidrato” refere-se a uma molécula contendo átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, e, geralmente com a fórmula empírica $C_x(H_2O)_y$, onde x e y são números diferentes. Exemplos de carboidratos incluem monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

[043] O termo “polissacarídeo” refere-se a uma molécula de unidades de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas, e tendo uma fórmula empírica de $C_x(H_2O)_y$, onde x é entre 200 a

aproximadamente 3000.

[044] O termo “superfície hidrofílica” inclui uma superfície com um ângulo de contato com a água inferior a 90° , quando a superfície é plana.

[045] O termo “baixa afinidade com o heparan sulfato” no contexto de uma bactéria, refere-se à baixa afinidade de ligação das bactérias com o heparan sulfato. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é determinada utilizando ensaios convencionais, tais como um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para o heparan sulfato. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é determinada com base em uma análise preditiva, tal como uma análise de proteínas de ligação ao heparan sulfato expressa pelo patógeno, por exemplo, bactérias. O termo “sem afinidade com o heparan sulfato” refere-se a uma bactéria que não tem afinidade de ligação com o heparan sulfato ou mais baixa do que a afinidade detectável com o heparan sulfato, ou ligação não conhecida ao heparan sulfato. Em alguns casos, não ter nenhuma afinidade com o heparan sulfato inclui ter nenhuma afinidade de ligação predita com o heparan sulfato.

A. Ligação dos patógenos bacterianos por Transporte de Convecção

[046] A ligação de patógenos bacterianos ao substrato de adsorção essencialmente não poroso da presente invenção durante o transporte de convecção é particularmente eficaz nas condições de fluxo relativamente de alto normalmente empregadas na operação segura dos circuitos extracorpóreos de sangue, por exemplo, quando medido pela velocidade de fluxo linear, ≥ 8 cm/min, de preferência aproximadamente ≥ 30 cm/min, e mais preferencialmente aproximadamente 30 a 1.000 cm/min.

[047] Em algumas modalidades, o meio de adsorção remove patógenos do sangue total em circuitos extracorpóreos com uma taxa

de fluxo linear de aproximadamente 8 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, por exemplo, aproximadamente 8 cm/min a aproximadamente 30 cm/min, aproximadamente 25 cm/min a aproximadamente 100 cm/min, aproximadamente 50 cm/min a aproximadamente 200 cm/min, aproximadamente 100 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, a aproximadamente 200 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, a aproximadamente 400 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, a aproximadamente 500 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, a aproximadamente 600 cm/min a aproximadamente 1.000 cm/min, aproximadamente 100 cm/min a aproximadamente 500 cm/min ou aproximadamente 300 cm/min para aproximadamente 800 cm/min. Em certos casos, a taxa de fluxo é de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 100 cm/min ou aproximadamente 25 a 40 cm/min.

[048] Em outras modalidades, o meio de adsorção remove patógenos do sangue total em circuitos extracorpóreos com uma taxa de fluxo volumétrico de aproximadamente 50 mL/minuto a aproximadamente 5 L/minuto, por exemplo, 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 e 5 L/min. Em algumas modalidades, a taxa de fluxo é de preferência > 150 mL/minuto.

[049] O meio adsorvente altamente poroso, em contraste, exige taxas de fluxo muito menores de menos de 1 mL/minuto e aproximadamente menos de 50 mL/minuto. Além disso, o tempo de permanência no substrato de adsorção (por exemplo, a quantidade de tempo que o adsorbato (por exemplo, bactérias) está em contato com o meio adsorvente) precisa de ser muito maior para um meio exigindo

transporte difusivo dos adsorbatos para o sítio adsorvente dentro do meio, em comparação com um meio utilizando a convecção forçada dos adsorbatos para os sítios de ligação, que não são compatíveis com sistemas de sangue extracorpóreos padrão.

[050] Tipicamente, é reconhecido que o “tempo de permanência” na coluna de adsorção precisa ser mais longo para um meio que exige o transporte difusivo do adsorbatos para o sítio adsorvente dentro do meio, quando comparado com o tempo de permanência inferior necessária para conduzir um adsorbato para o sítio de ligação (em um meio essencialmente não poroso) por convecção forçada. No entanto, existem limites práticos para as dimensões de um cartucho adsorvente, coluna, filtro, etc. seguro e eficaz, especialmente com relação ao volume de retenção máximo de sangue que ele pode conter, e a velocidade do fluxo de sangue ou de soro passado o meio de adsorção. Por esta razão, a taxa de fluxo média através do dispositivo de adsorção é considerada como uma variável de projeto.

[051] Os substratos que dependem de transporte de convecção forçada são geralmente mais adequados para as altas taxas de fluxo, enquanto os substratos que dependem do transporte de difusão muito mais lento são muito menos eficazes quando são necessárias altas taxas de fluxo e tempos de permanência mais curtos. Por esta razão, em um dispositivo extracorpóreo de purificação de sangue, é preferencial que um adsorbato difunda-se rapidamente através dos poros dentro do meio adsorvente. Quando o sangue é bombeado através dos circuitos fabricados a partir de materiais sintéticos, é uma prática geral empregar taxas de fluxo de sangue relativamente altas de modo a impedir a estagnação e reduzir o risco de formação de coágulos. Por outro lado, as taxas de fluxo extremamente altas podem ser evitadas porque podem expor as células do sangue a altas taxas de cisalhamento e os danos do impacto que pode romper ou de outra forma

danificar as células do sangue. A presente invenção, portanto, fornece um método e dispositivo para remover patógenos bacterianos do sangue usando as características preferenciais do transporte de convecção e sua cinética mais rápida desejável. Isto é conseguido através de passar/fluir o sangue sobre um substrato essencialmente não microporoso (por exemplo, um substrato sólido), que é capaz de se ligar à citocina desejada, patógeno ou bactérias para removê-los do sangue.

[052] O meio de adsorção fornecido aqui pode ser utilizado na circulação extracorpórea de sangue tradicional, com taxas de fluxo > 50 mL/min, e de preferência entre aproximadamente 150 mL/minuto a 5L/minuto. Se medido pela velocidade de fluxo linear, > 8 cm/min, de preferência aproximadamente > 24 cm/min e mais preferencialmente de aproximadamente 24 a 329 cm/min, ou mais. Por exemplo, a taxa de fluxo pode ser de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800 cm/min ou mais. Essas altas taxas de fluxo criam tempos de permanência curtos dentro da coluna de adsorção e o transporte de convecção domina sobre o transporte de difusão Browniano. Isto é particularmente importante para ligar partículas maiores, tais como vírus, bactérias e parasitas e outras proteínas e patógenos que se difundem lentamente.

[053] Os principais sítios de adsorção disponíveis para remover patógenos bacterianos se encontram nas superfícies dentro dos interstícios do leito de meio, recipiente ou cartucho através do qual o sangue flui ou é entregue por convecção forçada. Para tratar o sangue, os canais intersticiais precisam ser suficientemente grandes para permitir o transporte de glóbulos vermelhos, que têm um diâmetro médio de 6 microns. Para permitir que um cartucho de adsorção empacotado seja colocado em um circuito extracorpóreo com alta taxa de fluxo de sangue, os canais intersticiais podem ser várias vezes maiores do que

o diâmetro dos glóbulos vermelhos. Isto pode evitar ou substancialmente eliminar as altas taxas de cisalhamento que levam à hemólise, minimizando simultaneamente a queda de pressão no sangue que flui através do leito ou cartucho empacotado. Além disso, meio é preferencialmente rígido para minimizar a deformação que pode entupir o cartucho do filtro de compactação. Com base nestas preferências, um meio rígido otimizado equilibra o tamanho do canal intersticial e a área de superfície total, por exemplo, para a remoção eficiente de patógenos e/ou citocinas em circuitos extracorpóreos de sangue de alto fluxo.

[054] Os métodos reivindicados são destinados a serem aplicados principalmente nas terapias extracorpóreas ou procedimentos, e também dispositivos implantáveis.

[055] O sangue total e o soro sanguíneo de mamíferos podem ser utilizados na presente invenção. A quantidade de sangue ou de soro que pode ser utilizada nos métodos reivindicados não se destina a ser limitada. Ela pode variar de menos de 1 mL a acima de 1 L, até e incluindo o volume de sangue total de um paciente ou indivíduo, quando a recirculação contínua de volta para o paciente é empregada. Uma ou mais passagens através do leito de adsorção podem ser usadas se necessário. O sangue pode ser sangue humano ou de animal.

[056] Em algumas modalidades, as bactérias ou patógenos presentes na amostra, por exemplo, sangue total ou soro do sangue, são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, por exemplo, aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 99,9%. Em outras modalidades, as bactérias na amostra são reduzidas em aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, por exemplo, aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, ou 40% ou aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99,9% de redução das bactérias ou patógenos.

[057] Em algumas modalidades, as bactérias na amostra são

bactérias gram-negativas, tal como quaisquer bactérias que não retêm corante violeta cristal. Exemplos não limitantes de uma bactéria gram-negativa são *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Moraxella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Legionella*, outras *Enterobacteriaceae*, e cepas resistentes aos fármacos da mesma. Em outras modalidades, as bactérias na amostra são bactérias gram-positivas, tais como as bactérias que retêm corante violeta cristal. Exemplos não limitantes de uma bactéria gram-positiva são *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptomyces*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *enterococos*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, e cepas resistentes aos fármacos da mesma.

[058] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos aqui são usados para remover as bactérias gram-negativas de uma amostra de sangue total ou de soro sanguíneo. Em outras modalidades, os métodos são usados para remover as bactérias gram-positivas da amostra. Em ainda outras modalidades, o meio de adsorção descrito aqui tendo um adsorvente polissacarídeo em sua superfície é utilizado para remover bactérias tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e/ou *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido a partir da amostra.

[059] Em algumas modalidades, o meio de absorção tendo uma superfície hidrofílica com carga neutra é usado para remover

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), e/ou *Escherichia coli* de uma amostra de sangue total ou de soro sanguíneo. Em outras modalidades, o meio de adsorção tendo uma superfície catiônica (superfície hidrofílica) é utilizado para remover *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) da amostra.

B. Meio de Adsorção

[060] Vários materiais, em forma e composição, podem ser utilizados como um substrato na presente invenção. Todos os substratos adsorventes adequados fornecem uma alta área de superfície, enquanto promovendo o transporte de adsorbatos para os sítios adsorventes que se ligam a eles (principalmente) por transporte de convecção forçada. Os substratos úteis para criar o meio de adsorção incluem grânulos rígidos não porosos, partículas, ou espumas reticuladas, um leito monolítico rígido (por exemplo, formado a partir de grânulos ou de partículas sinterizadas), uma coluna empacotada com tecido ou não tecido, uma coluna empacotada com um fio ou fibras monofilamento não microporosa sólidas ou ocas, um cartucho enrolado em espiral formado a partir de membrana densa ou película plana, ou uma combinação de meios tais como um cartucho de grânulo/tecido misto. Em algumas modalidades, um substrato adequado para uso na presente invenção é um que é inicialmente microporoso, mas torna-se essencialmente não poroso quando a superfície é tratada antes, durante ou após a criação de sítios de adsorção.

[061] Um substrato útil está na forma de grânulos ou partículas sólidas. Os grânulos podem ser feitos de materiais que são suficientemente rígidos para resistir à deformação ou à compactação de

acordo com as taxas de fluxo encontradas. Em algumas modalidades, a suficiente rigidez de substrato é a ausência de um aumento significativo na queda de pressão através do leito de adsorção durante aproximadamente uma hora de fluxo de água ou solução salina em típicas taxas de fluxo clínicas. Por exemplo, uma rigidez de substrato adequada é um aumento $< 10\text{-}50\%$ na queda de pressão em relação à queda de pressão inicial (por exemplo, medida dentro do primeiro minuto de fluxo), quando medida em uma taxa de fluxo similar, por exemplo, de solução salina.

[062] Os grânulos de substrato adsorvente podem ser feitos a partir de um número de diferentes materiais biocompatíveis, tais como polímeros naturais ou sintéticos ou materiais não poliméricos incluindo vidros, cerâmicas e metais, que são essencialmente isentos de impurezas lixiviáveis. Alguns polímeros exemplificados incluem poliuretano, polimetil metacrilato, polietileno ou copolímeros de etileno e outros monômeros, polietileno imina, polipropileno, e poli-isobutileno. Exemplos de substratos úteis incluem Polietileno de Peso Molecular Ultra Alto não poroso (UHMWPE). Outros grânulos adequados são poliestireno, polietileno de baixa densidade e de alta densidade, sílica, poliuretano e quitosana.

[063] O substrato, tal como grânulos, fibras, fios e similares podem ser preparados com uma rugosidade de superfície ou topografia para aumentar a área da superfície de adsorção. Por exemplo, é possível aumentar a área de superfície, aumentando a relação de área de superfície para volume. Como é mostrado na Figura 1A, uma superfície irregular produz mais sítios de ligação para as bactérias e patógenos. Tipicamente, uma forma, formato ou geometria livre produz mais área de superfície e é vantajoso. A Figura 1A mostra grânulos UHMWPE como recebido fora de um reator.

[064] Os métodos para preparar os grânulos são conhecidos na

técnica. Por exemplo, os grânulos de polietileno adequados e outros grânulos de poliolefina são produzidos diretamente durante o processo de síntese. Em alguns casos, os grânulos são processados para o tamanho e a forma desejada. Outros polímeros podem precisar ser moídos ou secos por pulverização e classificados, ou, de outro modo, processados para criar grânulos de distribuição de tamanho e de forma desejada.

[065] Em alguns aspectos, o meio de adsorção da presente invenção fornece uma superfície para anexar um adsorvente polissacarídeo que pode ligar-se um patógeno bacteriano. Em algumas modalidades, o meio de adsorção inclui um substrato sólido com uma alta área de superfície tendo ao menos um adsorvente polissacarídeo em sua superfície.

[066] Em outros aspectos, um meio de adsorção da presente invenção fornece uma superfície hidrofílica sem um adsorvente polissacarídeo (“uma superfície nua”). Em algumas modalidades, o meio de adsorção inclui um substrato sólido com uma alta área de superfície e uma superfície hidrofílica catiônica. Em outras modalidades, o meio de adsorção inclui um substrato sólido com uma alta área de superfície e uma superfície neutra hidrofílica.

[067] O substrato sólido pode ser feito, por exemplo, mas não limitado a polietileno, poliestireno, polipropileno, polissulfona, poliacrilonitrilo, policarbonato, poliuretano, sílica, látex, vidro, celulose, agarose reticulada, quitina, quitosana, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicone, fluoropolímero, e outros polímeros sintéticos. O substrato sólido com uma alta área de superfície pode ser uma pluralidade de monocamadas adsorventes, filtros, membranas, fibras sólidas, fibras ocas, partículas ou grânulos. Opcionalmente, o substrato sólido pode estar presente em outras formas ou formatos fornecendo uma grande área de superfície.

[068] Em certos casos, o substrato sólido é uma pluralidade de grânulos de polímeros rígidos, tais como o polietileno, poliestireno, polipropileno, polissulfona, poliacrilonitrilo, policarbonato, poliuretano, sílica, látex, vidro, celulose, agarose reticulada, quitina, quitosana, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicone, fluoropolímero, e grânulos de polímero sintético. De preferência, os grânulos de polímero rígido são grânulos de polietileno.

[069] O tamanho do substrato sólido pode ser selecionado de acordo com o volume da amostra de teste usada no ensaio ou outros parâmetros. Em algumas modalidades, cada grânulo da pluralidade de grânulos de polímero rígido tem um diâmetro externo médio de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 1 mm, por exemplo, 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 , ou 1 mm. Em outras modalidades, cada grânulo da pluralidade de grânulos de polímero rígido tem um diâmetro médio de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 200 μm , por exemplo, 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 , 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 ou 200 μm .

[070] Em algumas modalidades, os grânulos úteis têm um tamanho que varia de aproximadamente 100 microns (μm) a 500 μm , ou mais de diâmetro, por exemplo, 100 μm , 150 μm , 200 μm , 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , 450 μm , 500 μm , ou mais, de diâmetro. O tamanho médio dos grânulos pode ser de aproximadamente 150 μm a aproximadamente 450 μm de diâmetro, por exemplo, 150 μm , 200 μm ,

250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , ou 450 μm de diâmetro. Por exemplo, os grânulos de polietileno a partir de Polymer Technology Group (Berkeley, CA) tendo um diâmetro médio de 300 μm são adequados para a presente invenção.

[071] Em algumas modalidades, o substrato é uma membrana de barreira, por exemplo, uma película não porosa. Alternativamente, uma membrana microporosa pode ser tornada não porosa preenchendo os poros com material essencialmente não poroso, por exemplo, um polímero. A membrana na forma de uma folha ou de uma fibra oca ou sólida pode ser disposta dentro de um alojamento ou um recipiente.

[072] O meio de adsorção pode estar em um recipiente tal como uma coluna, cartucho, tubo, tubo de centrífuga, leito, e similares, ou qualquer recipiente em que as células do sangue que não são capturadas no meio de adsorção ligado a polissacarídeo pode ser removido sem perturbar o patógeno bacteriano aderido ao meio.

[073] O substrato é tipicamente fornecido empacotado dentro de um alojamento ou recipiente, tal como uma coluna, que é concebida para manter o substrato dentro do recipiente e permitir que o sangue ou o soro flua sobre a superfície do substrato ou leito. O substrato pode ser disposto dentro do recipiente para maximizar a ligação dos adsorbatos aos lados adsorventes do substrato. O alojamento ou recipiente pode ter uma estrutura de superfície macroporosa que fornece uma grande área de superfície para o sangue ou soro.

[074] Uma coluna ou outra forma de alojamento pode ser empacotada com um tecido heparinizado ou não tecido ou a heparina, heparan sulfato ou sítios de adsorção não heparina opcionais podem ser anexados, por exemplo, por ligações covalentes, iônicas ou outras ligações físicas ou químicas, depois do alojamento ser preenchido com o meio de substrato. Ao controlar o denier ou densidade da fibra do tecido durante a tecelagem ou entrelaçamento ou durante a criação de

uma tela não tecido, o tamanho do poro intersticial pode ser controlado. Os tecidos não tecidos úteis podem estar na forma de feltros, ou mantas eletrostaticamente fiadas ou fundido e soprado, tendo uma orientação aleatória mantida junta por entrelaçamento das fibras e/ou adesão ou coesão das fibras que se interceptam. Os tecidos úteis têm uma estrutura mais definida e não aleatória.

[075] Uma coluna ou alojamento pode ser empacotada com fibras ou fios feitos de fibras. O polietileno e outras fibras podem ser feitos em fibras monofilamento ocas ou sólidas ou fios multifilamentos, que pode ser empacotado em cartuchos do mesmo modo que as membranas de fibras ocas, são instaladas dentro de cartuchos de hemodiálise convencional ou oxigenadores de sangue. Na presente invenção, as fibras ocas originalmente porosas são feitas densas ou não porosas, antes, durante ou após ligar a heparina ou outros adsorventes às superfícies externas e/ou internas. Dyneema Purity® da Royal DSM é uma fibra sólida de alta resistência feita de UHMWPE. O polietileno de peso molecular ultra-alto (UHMWPE, UHMW) é um subconjunto do polietileno termoplástico. Dyneema pode ser heparinizada e empacotada em um cartucho para fornecer um suporte de alta área de superfície para a remoção de citocinas, bactérias e patógenos.

[076] Um cartucho enrolado em espiral contém uma película ou membrana fina que é enrolada firmemente em conjunto com materiais de espaçamento opcionais para evitar o contato das superfícies adjacentes. A membrana pode ser feita a partir de polímeros tais como poliuretano, polipropileno, polietileno, polissulfona, policarbonato, PET, PBT e similares.

[077] Como mencionado acima, em certos casos, para utilização nos métodos da invenção, o tamanho dos canais ou espaço intersticial entre os grânulos individuais para filtração extracorpórea de sangue são otimizados para evitar uma alta queda de pressão entre a entrada e a

saída do cartucho, para permitir a passagem segura das células do sangue entre os grânulos individuais em um ambiente de alto fluxo, e para fornecer área de superfície intersticial adequada para a ligação do adsorvente polissacarídeo às citocinas ou patógenos no sangue. Por exemplo, em um leito empacotado fechado de grânulos aproximadamente esféricos com 300 microns, um tamanho de poro intersticial adequado é de aproximadamente 68 microns de diâmetro.

[078] Em algumas modalidades, os grânulos rígidos do meio de adsorção têm um diâmetro médio como é apresentado na Tabela 5. Em algumas modalidades, os substratos não grânulo do meio de adsorção, tais como fios ou fibras tecidas, têm um tamanho de poro macroscópico quanto apresentado na Tabela 6.

C. Métodos para produzir um meio de adsorção

[079] A superfície do substrato sólido aqui descrito pode ser funcionalizada para permitir a ligação covalente do adsorvente polissacarídeo aqui descrito. Em algumas modalidades, a superfície do substrato sólido tem ao menos um grupo químico, tal como um grupo amina.

[080] Os polissacarídeos tais como a heparina ou o heparan sulfato ou outros polissacarídeos podem ser ligados à superfície do meio de adsorção por ligação covalente terminal (por exemplo, ligação covalente através do resíduo terminal da molécula de heparina). A ligação covalente em comparação com a ligação não covalente fornece vantajosamente um melhor controle da orientação das moléculas imobilizadas e a sua densidade de superfície. Em particular, a ligação terminal desses carboidratos de cadeia longa fornece uma função de espaçamento que conduz a uma concentração mais alta de oligômeros de carboidrato acessíveis disponíveis para a ligação aos patógenos. Na verdade, certos patógenos se ligam a superfícies revestidas com heparina de comprimento total (por exemplo, heparina com um peso

molecular médio maior do que 10 kDa) muito mais eficientemente do que a superfícies convencionais revestidas com fragmentos de heparina, como é geralmente empregado na técnica.

[081] Em algumas modalidades, as moléculas de heparina de comprimento total imobilizadas têm um peso molecular médio de mais de 10 kDa. Em outras modalidades, as moléculas de heparina imobilizada têm um peso molecular médio de mais de 15 kDa. Em outra modalidade, as moléculas de heparina imobilizada têm um peso molecular médio de mais de 21 kDa. Em ainda outra modalidade, as moléculas de heparina imobilizada têm um peso molecular médio de mais de 30 kDa. De preferência, as moléculas de heparina imobilizada têm um peso molecular médio dentro da faixa de 15 a 25 kDa. O peso molecular médio pode também ser mais alto, tal como na faixa de 25 a 35 kDa.

[082] Em algumas modalidades, a concentração na superfície do adsorvente heparina no substrato sólido está na faixa de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, por exemplo, 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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, e 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Em outras modalidades, a concentração na superfície do adsorvente heparano no substrato sólido está na faixa de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, por exemplo, 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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, e 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

[083] A quantidade de adsorvente polissacarídeo por grama de substrato pode variar. Em uma modalidade particular, se grânulos são utilizados, a quantidade de polissacarídeo, tal como heparina por grama de grânulos, é determinada pelo número de camadas utilizadas e também pelo tamanho dos grânulos. Quanto maior o grânulo, menos polissacarídeo, tal como heparina por grama de grânulo, é conseguido.

Uma quantidade preferencial é de $2,0 \pm 0,5$ mg de heparina/g de grânulo pelo método MBTH (Larm e outros, *Biomater Med Devices Artif Organs*, 1983, 11: 161 a 173 e Riesenfeld e Rosen, *Anal Biochem*, 1990, 188: 383 a 389).

[084] A ligação covalente de moléculas de heparina de comprimento total a uma superfície pode ser conseguida pela reação de um grupo aldeído da molécula de heparina com um grupo amino primário presente na superfície do meio de adsorção. Uma propriedade inerente de todos os carboidratos é que eles têm um hemiacetal na sua extremidade redutora. Este acetal está em equilíbrio com a forma de aldeído e pode formar bases de Schiff com as aminas primárias. Estas bases de Schiff podem então ser reduzidas para aminas secundárias estáveis. Em algumas modalidades, a heparina de comprimento total é imobilizada na superfície no substrato sólido por conjugação covalente. Em outras modalidades, a heparina de comprimento total é ligada de forma covalente ao dito meio de adsorção via um grupo amino secundário estável.

[085] Em certos casos, vários métodos de preparação de adsorventes e os próprios adsorventes são descritos na Patente US. No. 8.663.148 e Publicações de Pedido de Patente Nos. US2009/0136586, US2010/0249689, US2011/0184377, e US2012/0305482, cujas descrições são aqui incorporadas por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

[086] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é hidrofiliado antes da ligação do polissacarídeo, tal como a heparina, ou outros compostos. Os métodos para preparar a superfície hidrofílica do substrato incluem ataque ácido, tratamento de plasma, e exposição a oxidantes fortes. Por exemplo, uma superfície polimérica tal como um grânulo de polietileno (PE) pode ser gravada com um agente oxidante, tal como permanganato de potássio, peroxidissulfato de amônio e

similares, para introduzir propriedades hidrofílicas juntamente com alguns grupos funcionais reativos (por exemplo, um grupo sulfonila, um grupo hidroxila, um grupo carboxila, um grupo carbonila, ou ligações duplas de carbono). A superfície pode ser gravada com plasma ou corona. Por exemplo, grânulos de PE podem ser gravados com um permanganato de potássio em ácido sulfúrico para produzir grânulos com uma superfície hidrofílica contendo grupos hidroxila e ligações duplas de carbono.

D. Misturas de meios de adsorção

[087] Em certos casos, os métodos da invenção preparam o leito de adsorção a partir de uma mistura de meios heparinizados que é antitrombogênica e outro meio que é inerentemente trombogênico. Ao montar um cartucho de adsorção com ambas as superfícies heparinizadas e, por exemplo, superfícies hidrofílicas (superfícies catiônicas ou neutras), os patógenos bacterianos podem ser seguramente removidos do sangue ou de outro fluido biológico. Por exemplo, os meios heparinizados podem ser de 1% a 99% do leito de adsorção e o substrato inerentemente trombogênico pode ser de 99% a 1% do leito de adsorção.

[088] Em algumas modalidades da presente invenção, o meio de adsorção fornece uma superfície antitrombogênica que está em contato íntimo com, ou em estreita proximidade com uma superfície trombogênica. Esse meio de adsorção pode impedir a formação de trombos clinicamente significativa que, de outra forma, ocorreria se a superfície inerentemente trombogênica fosse utilizada sozinha.

[089] No caso do meio de adsorção na forma de grânulos ou partículas, uma aplicação preferencial da presente invenção é misturar os diferentes meios de adsorção em conjunto antes de empacotá-los em um cartucho ou outro alojamento. Isso fornece contato íntimo entre as várias substâncias químicas de superfície em grânulos adjacentes

enquanto permitindo a fabricação eficiente de cartuchos ou filtros de adsorção. Uma abordagem relacionada é dispor em camadas os diferentes meios em um arranjo “do tipo parfait” dentro do alojamento de tal forma que o sangue contate diferentes meios em fluxo em série ou paralelo. Um arranjo dos diferentes meios dentro de um cartucho é posicionar meios antitrombogênicos não misturados na entrada e/ou na saída do cartucho, com uma região opcionalmente misturada contendo os meios mais trombogênicos interpostos entre as regiões de entrada e de saída.

[090] No caso de meios na forma de fibras, um tecido misto, malha, ou uma estrutura não tecida podem ser preparados por métodos bem conhecidos na indústria têxtil para formar tecido a partir de fibra mista. Alternativamente, um fio pode ser preparado a partir de fios multifilamento ou monofilamento mais finos feitos de duas ou mais fibras com diferentes químicas de superfície, desde que um tipo de fibra contenha uma superfície que impede ativamente a coagulação do sangue em contato. O fio de fibra mista pode então ser utilizado para preparar tecido para contato com o sangue. Os meios de adsorção de fibra oca ou de fibra sólida podem ser misturados e utilizados para produzir cartuchos que se assemelham a dialisadores ou oxigenadores de fibras ocas. Para meios de adsorção do tipo membrana ou película que é usado em cartuchos de adsorção enrolados em espiral, dois ou mais produtos químicos de superfície podem ser usados em estreita proximidade um com o outro de tal modo que o sangue deve contatar ambas as químicas de superfície (quase) simultaneamente. Isto pode ser feito com um arranjo regular ou aleatório dos vários grupos de ligação dentro da camada de superfície da película de membrana, ou pela formação de um caminho de fluxo para o sangue entre duas películas de membrana estreitamente espaçadas, uma das quais é antitrombogênica.

E. Filtração extracorpórea de sangue

[091] Em certos aspectos, os métodos fornecidos aqui podem ser utilizados em um dispositivo que compreende meios de adsorção para a remoção extracorpórea de patógenos a partir do sangue de mamíferos, por exemplo, sangue humano. Por exemplo, o dispositivo pode ser um dispositivo convencional para o tratamento extracorpóreo de sangue e soro de pacientes, por exemplo, um indivíduo que sofre de insuficiência renal.

[092] Os padrões de fluxo sanguíneo local no sangue em contato com dispositivos médicos para circulação extracorpórea são conhecidos por influenciar a formação do coágulo através da ativação por cisalhamento e agregação de plaquetas em zonas estagnadas. O dispositivo contendo os meios de adsorção fornecidos aqui pode, por exemplo, ter uma ou mais das seguintes propriedades: a) um fluxo sanguíneo na faixa de 150 a 5.000 mL/min, ou se for medido pela velocidade de fluxo linear de ≥ 8 cm/min; b) baixa resistência ao fluxo; c) grande área de superfície de substrato tendo carboidratos imobilizados para o efeito, por exemplo, aproximadamente 0,1 a 1 m²; d) um revestimento estável (por exemplo, sem vazamento clinicamente significativo de carboidrato para o sangue em contato com o mesmo); e) propriedades hemodinâmicas adequadas no dispositivo (por exemplo, sem zonas estagnadas); e f) biocompatibilidade ótima.

[093] Exemplos não limitantes de um dispositivo para uso de acordo com os métodos da presente invenção incluem um dispositivo de oxigenação de membrana extracorpórea (ECMO), um dialisador de hemofluxo pediátrico que é um dispositivo extracorpóreo de filtração de sangue para a remoção de moléculas de citocina ou outro dispositivo extracorpóreo que pode acomodar altas taxas de fluxo.

[094] Os métodos da presente invenção podem ser empregados antes ou após outros tratamentos convencionais, tal como a

administração de antibióticos.

[095] Em algumas modalidades, os métodos são realizados em um ciclo contínuo de tal modo que, a amostra, por exemplo, sangue total, é extraída do corpo e processada de acordo com o método aqui fornecido, e, em seguida, a amostra resultante (por exemplo, amostra contendo uma quantidade reduzida de patógeno bacteriano) é reintroduzida no corpo, formando assim um ciclo que compreende parte da corrente sanguínea do paciente.

[096] Em outras modalidades, os métodos fornecidos aqui podem ser combinados com outras técnicas para filtrar ou tratar sangue de mamíferos. Por exemplo, um cartucho que é baseado em cinética de convecção pode, então, ser utilizado em série com circuitos extracorpóreos convencionais, tais como desvio cardiopulmonar (CPB), hemodiálise, oxigenação e ozonização extracorpórea do sangue (EBOO), e similares.

[097] Os vários aspectos da invenção são ainda descritos nos exemplos seguintes. Estes exemplos não se destinam a ser limitantes. Por exemplo, nos presentes exemplos, a heparina é usada. No entanto, outros carboidratos e adsorventes polissacarídeos podem ser utilizados sozinhos ou em adição aos substratos revestidos com heparina exemplificados abaixo.

III. EXEMPLOS

[098] Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, mas não limitar, a invenção reivindicada.

[099] Exemplo 1. Remoção de bactérias com afinidade baixa ou indetectável com o heparan sulfato

[0100] Este exemplo ilustra a utilização de grânulos revestidos com heparina para remover patógenos bacterianos com afinidade baixa ou indetectável com o heparan sulfato a partir do sangue total.

[0101] Tem sido relatado na literatura que em mais de 50 patógenos

alvo diferentes, os proteoglicanos de heparan sulfato foram encontrados em sindecanos como um sítio de ligação inicial durante a sua patogênese. Surpreendentemente, a heparina ligada à superfície pode funcionar como um substituto para os organismos de ligação ao heparan sulfato.

[0102] Os estudos mostraram que os meios de adsorção heparinizados podem remover a alta concentração de *S. aureus* e MRSA a partir de sangue total. Além disso, o estudo demonstrou que as bactérias que aderem à superfície heparinizada não foram mortas, e assim não liberam potenciais toxinas inflamatórias e seus subprodutos para o sangue. Assim, os meios ligados à heparina podem ser utilizados em um dispositivo extracorpóreo para remover de forma eficaz e segura as bactérias circulantes incluindo cepas resistentes a fármacos a partir do sangue infectado.

[0103] Este exemplo testa tanto patógenos de ligação ao heparan sulfato conhecidos quanto patógenos desconhecidos ou inesperados para se ligarem à heparina. Além disso, descobriu-se que os controles hidrofílicos, ou catiônicos ou com carga neutra, podem funcionar como uma superfície eficaz para se ligar a patógenos. As superfícies com carga neutra, em geral, não foram tão eficazes como as superfícies heparinizadas na remoção de patógenos, mas é possível que uma tecnologia de redução de patógenos possa ser desenvolvida usando superfícies hidrofílicas genéricas. As superfícies catiônicas hidrofílicas mostraram razoável capacidade de remover patógenos também.

[0104] Este exemplo ilustra que um meio de adsorção compreendendo uma heparina ligada à superfície pode ser usado para remover os patógenos de ligação ao heparan sulfato tais como, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *E. faecalis*, *E. faecalis* resistente à vancomicina, HSV-1 e HSV-2, e *Candida albicans*.

[0105] Este exemplo ilustra que um meio de adsorção

compreendendo uma heparina ligada à superfície pode ser usado para remover patógenos de ligação de heparan sulfato com baixa afinidade (por exemplo, zero) tais como, *E. coli*, *E. coli* resistente a carbapenem, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* resistente a carbapenem, *K. pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido, *E. faecium*, *A. baumannii*, e *S. pneumonia*, do sangue.

[0106] Em particular, um meio de adsorção compreendendo uma superfície hidrofílica neutra pode remover, por exemplo, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), e *E. coli*. Além disso, um meio de adsorção compreendendo uma superfície hidrofílica catiônica pode remover, por exemplo, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* resistente a carbapenem, *K. pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido, *E. faecium*, *A. baumannii*, e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).

[0107] A bacteremia por *S. aureus* ou *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) exibe uma afinidade natural com a heparina e o sulfato de heparina (HS). Uma tecnologia de adsorção de afinidade tem sido desenvolvida que conta com este mecanismo natural para remover bactérias do sangue. O ligando primário é heparina ligada ao terminal, um análogo do heparan sulfato. A heparina não só fornece o mecanismo de ação para remover bactérias do sangue total, mas também fornece uma superfície antitrombogênica que aumenta a segurança do circuito extracorpóreo.

[0108] O alvo de carboidratos e proteoglicanos para a ligação inicial é um mecanismo comum da maioria dos patógenos. Por exemplo, o vírus da gripe se ligará ao ácido siálico, um carboidrato encontrado em muitas glicoproteínas. Muitas bactérias gram-negativas têm adesinas de ligação à manose localizadas nas pontas das fímbrias. Outros carboidratos que têm demonstrado ser alvo das bactérias incluem L-fucose, galactose, e várias glucosaminas ou galactoaminas. O tema comum dos patógenos que se ligam a carboidratos é a natureza ubíqua

do glicocálice na superfície das células.

[0109] As bactérias que têm sido alvo, neste exemplo, incluem *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e as suas cepas resistentes a carbapenem, e também *P. aeruginosa*. Existem muitas adesinas diferentes relatadas para as bactérias gram-negativas. As mais estudadas são fímbrias do Tipo 1, Tipo 3, tipo P e tipo S e também proteína da membrana externa A (OmpA). As fímbrias Tipo 1 e OmpA têm sido implicadas na ligação a células endoteliais. As fímbrias Tipo 1 mediam a ligação à manose (sensíveis à manose) e são expressas na maioria das *Enterobacteriaceae*. Outras fímbrias têm adesinas para diferentes carboídratos e são consideradas como resistentes à manose. Tipicamente, vários tipos de fímbrias são expressos simultaneamente.

[0110] Em adição, tem sido mostrado que adesinas sensíveis à manose estão presentes na superfície de células bacterianas, mesmo quando as fímbrias não são expressas. As fímbrias Tipo 1 revelaram interagir com as células endoteliais humanas microvasculares do cérebro humano, sugerindo que as fímbrias podem ser expressas no sangue. As cepas resistentes a fármacos de *Klebsiella pneumoniae* expressar uma maior concentração de fímbrias Tipo 1 e Tipo 3.

[0111] Uma superfície heparinizada para conseguir a remoção de *S. aureus*, MRSA, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, vírus herpes simplex, exotoxinas específicas, e outros patógenos direcionados a HS foi investigada. Os estudos in vitro confirmaram a afinidade de muitos destes patógenos e toxinas com meios heparinizados.

[0112] O segundo meio de adsorção desenvolvido foi uma superfície funcionalizada com manose para alvejar as bactérias gram-negativas, tais como *E. coli*, *K. pneumoniae*, e *A. baumannii*. Os estudos in vitro confirmaram que o meio de manose pode ligar esses patógenos. Demonstrou-se que o MRSA não teve nenhuma afinidade com o meio de manose. No entanto, o meio heparinizado foi também muito eficaz

na remoção dessas bactérias gram-negativas que não se esperava ter uma alta afinidade com a heparina. Estes resultados foram inesperados e, portanto, não é possível prever com base na literatura somente que as bactérias podem ser removidas do sangue por uma superfície heparinizada.

A. Resultados

[0113] O primeiro relatório de remoção bem-sucedida de bactérias do sangue total foi publicado em 2011 (Mattsby-Baltzer e outros, J. Microbiol. Biotechnol., 2011, 21 (6), 659 a 664). Neste estudo, mostrou-se que uma alta concentração de *S. aureus* e MRSA foi removida do sangue total utilizando o meio heparinizado. Além disso, demonstrou-se, utilizando PCR, que as bactérias não foram mortas quando se ligaram à superfície heparinizada e, portanto, não liberou potenciais toxinas inflamatórias/subprodutos na corrente sanguínea. O uso dos meios heparinizados cria um dispositivo de espectro muito amplo que pode remover com segurança as bactérias circulantes do sangue, independentemente da resistência aos fármacos.

[0114] O meio de adsorção heparina não funciona adicionando-se quaisquer substâncias químicas detectáveis ao sangue tratado ou hemoderivados. Em vez disso, ele usa heparina ligada ao terminal covalentemente ligada (sem lixiviação) como um ligante em um processo de adsorção rápida não limitado por difusão.

[0115] Como discutido aqui, *S. aureus* e MRSA podem ser removidos do sangue total utilizando o meio heparinizado. Várias cepas de *S. aureus* e MRSA foram testadas neste estudo. Os resultados são mostrados na Tabela 1. *S. aureus* e várias cepas de MRSA foram removidos com um alto rendimento do sangue total. Dependendo da cepa, até 85% das bactérias MRSA foram removidas pelo meio heparinizado.

[0116] Tabela 1. Remoção de cepas de *S. aureus* e MRSA do

sangue total

Cepas testadas de <i>S. Aureus</i> e <i>MRSA</i>				
	SA1800T	MRSA485	MRSA251	MRSA860
% removida em uma passagem	62%	85%	59%	70%

[0117] Em um estudo em sangue in vitro, 85% de MRSA foram removidos por uma única passagem através do meio (Tabela 2).

[0118] Tabela 2. Remoção tanto de patógenos suscetíveis a fármacos quanto patógenos resistentes a fármacos

Bactéria	% de Redução	Capacidade (CFU/g)
Bactéria Gram-Positiva		
MRSA	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>(VRE)	91,25%	1,88E+06
<i>E. faecium</i>	56,38%	1,72E+06

[0119] A concentração inicial de bactérias foi de 5×10^6 CFU/mL. Em adição à ligação a MRSA, a análise PCR indicou que a superfície heparinizada não era bactericida. Esta é uma conclusão importante que indica que os componentes celulares de bactérias (mortas), que podem ser inflamatórios e tóxicos para o destinatário, não são liberados no sangue quando as bactérias se ligam ao meio.

[0120] Estudos adicionais foram realizados para testar a afinidade de vários patógenos com o meio heparinizado. Nestes estudos, seringas filtrantes de 2,5 mL foram preenchidas com meio heparinizado ou meio de controle para testar a remoção de várias bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias foram cultivadas utilizando métodos convencionais e diluídas em sangue de cavalo desfibrinado. O sangue foi então passado sobre o meio enxaguado com solução salina um total de 3 vezes, e depois colocado em placas para a contagem de CFU. A concentração alvo em CFU/mL foi típica para um ensaio antimicrobiano

e variou entre 10^5 e 10^6 CFU/mL.

[0121] Uma tabela resumo relatando a remoção de patógenos utilizando o meio heparinizado é mostrada na Tabela 2.

B. Resultados inesperados

[0122] Vários patógenos descritos na literatura ou com pouca, nenhuma afinidade, ou afinidade desconhecida com a heparina ou sulfato de heparina foram testados usando os mesmos protocolos utilizados para os patógenos de ligação à heparina. A Tabela 3 lista essas bactérias e os resultados. Surpreendentemente, muitas bactérias gram-negativas e suas cepas resistentes a fármacos foram removidas em alta concentração do sangue.

[0123] Tabela 3. Remoção inesperada de bactérias gram-negativas usando uma superfície heparinizada

Bactérias Gram-Negativas	% de Redução	Capacidade (CFU/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

Conclusão

[0124] Os resultados mostram que o meio heparinizado tem uma capacidade extremamente alta de remover um amplo espectro de bactérias do sangue. Inesperadamente, várias bactérias com nenhuma ou pouca afinidade conhecida com a heparina ou sulfato de heparina foram também removidas. Portanto, há pouca previsibilidade com relação à afinidade que muitos patógenos podem ou não ter em direção à química da superfície heparinizada. A adsorção de várias bactérias gram-positivas, incluindo patógenos de ligação à heparina relatados, sugere que estes patógenos se ligam especificamente à superfície heparinizada. Sem estar ligado a qualquer teoria em particular, acredita-se que as superfícies hidrofílicas, tais como as superfícies neutras ou catiônicas no meio de adsorção, podem ser utilizadas para remover as

bactérias sem afinidade conhecida (ou baixa afinidade) com a heparina ou heparan sulfato. Alternativamente, a ligação das bactérias gram-negativas listadas acima pode ser através da interação de sítios específicos ou através de ligação não específica. A topografia da superfície do meio de adsorção pode ser importante para esta ligação.

[0125] Exemplo 2. Meio de adsorção com uma superfície hidrofílica

[0126] Este exemplo mostra o meio de adsorção compreendendo uma superfície hidrofílica que pode ser usada para remover bactérias do sangue total ou do soro.

[0127] O meio de adsorção descrito aqui contém uma topografia de superfície que permite a sua ligação a patógenos, tais como aqueles com nenhuma ou baixa afinidade com a heparina (Figura 1A). Sem estar limitado por qualquer teoria em particular, acredita-se que uma superfície áspera e irregular pode contribuir para a afinidade das bactérias ao meio de adsorção.

[0128] A Figura 1B mostra uma imagem de um esfregaço de sangue humano para comparação. A Figura 2 mostra uma comparação do tamanho de bactérias, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Chlamydia*, e os vírus, por exemplo, vírus da varíola, vírus do herpes, vírus da influenza, e picornavírus (Polio).

[0129] Exemplo 3. Filtros de sangue para uso em terapias extracorpóreas com alta taxa de fluxo linear

[0130] Este exemplo fornece um modelo exemplificativo de um cartucho de filtro extracorpóreo que é usado para acomodar altas taxas de fluxo lineares.

[0131] Um filtro extracorpóreo de sangue pode ser projetado para operar com segurança em velocidades de fluxo específicas utilizadas com sistemas de bombas comuns. Se a queda de pressão através de um filtro de sangue é muito alta, pode ocorrer a hemólise. Tipicamente, sistemas de diálise operam com pressões abaixo de 34 kPa a fim de

evitar o risco de hemólise.

[0132] Para um cartucho preenchido com meio adsorvente empacotado, a queda de pressão através do cartucho depende da taxa de fluxo, do tamanho das partículas, do módulo de partículas, da altura do meio empacotado, e da viscosidade do sangue. Se um meio filtrante não é suficientemente rígido, então a compressão do meio pode ocorrer com o aumento do fluxo sanguíneo, resultando em uma porosidade reduzida que pode conduzir a pressões não seguras.

[0133] A primeira variável a determinar é o tamanho de partícula mínimo permitido para alturas de coluna específicas e taxas de fluxo lineares. As taxas de fluxo típicas de sistemas de diálise estão entre 100 e 400 mL/min, o que equivale a uma taxa de fluxo linear de aproximadamente 8 e 30 cm/min, dependendo do diâmetro do cartucho. As taxas de fluxo volumétrico típicas de desvio cardiopulmonar (CPB) e oxigenadores de membrana extracorpórea (ECMO) podem ser de até 5000 mL/min. Assim, dependendo da largura do cartucho, a taxa de fluxo linear poderia ser de no máximo 1000 cm/min. Se um cartucho é feito mais largo, a taxa de fluxo linear pode ser reduzida para reduzir a pressão.

[0134] A fim de determinar o tamanho de partícula mínimo com base na taxa de fluxo linear e tamanho da partícula, é necessário não exceder pressões que podem causar hemólise. A equação Blake-Kozeny descreve a queda de pressão através do meio empacotado de sólidos rígidos.

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

[0135] onde μ é a viscosidade do sangue; K_o é uma constante; d_p é o diâmetro da partícula; ϵ é a porosidade do leito intersticial ou volume de vazio; L é a altura do meio empacotado; e u é a taxa de fluxo linear.

[0136] A equação pode ser resolvida para d_p

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

[0137] Se 34 kPa é a pressão máxima permitida, então as seguintes variáveis são utilizadas para determinar o tamanho da partícula como uma função da taxa de fluxo e da altura da coluna.

[0138] $\mu = 4$ cp viscosidade do sangue

[0139] $K_o = 150$ constante

[0140] $\varepsilon = 0,36$ (pode variar de 0,3 a 0,5 dependendo da eficiência do empacotamento)

[0141] $\Delta P = 34$ kPa pressão máxima permitida

[0142] 255 mmHg

[0143] 4,9 PSI

$\frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^2} = 8,78$

$\frac{\mu * K_o}{\Delta P} = 1,76E-05$

[0146] O diâmetro mínimo do grânulo para uma dada velocidade linear e a altura da coluna são dados na Tabela 4.

Tabela 4. Baixas Taxas de Fluxo Volumétricas					
Diâmetro do grânulo (microns)					
u (cm/min)	L (altura da coluna em cm)				
	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

Tabela 4. Baixas Taxas de Fluxo Volumétricas

Diâmetro do grânulo (mícrons)

u (cm/min)	L (altura da coluna em cm)				
	3	5	10	20	30
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

[0147] No entanto, o tamanho das células do sangue pode também ser levado em consideração, à medida que o tamanho efetivo dos poros não pode ser muito pequeno para bloquear a passagem de células do sangue. Os macrófagos são as maiores células no sangue e têm aproximadamente 21 mícrons, por isso, é importante que estas células sejam permitidas passar através do meio filtrante (Figura 3).

[0148] O tamanho da garganta representado por “a” na Figura 3, isto é, a menor abertura entre os grânulos em um meio empacotado, é descrito mais completamente a seguir. O tamanho do pescoço pode ser calculado pela seguinte equação.

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

[0149] O tamanho mínimo do pescoço deve, então, ser de ao menos 21 mícrons. Portanto, o tamanho mínimo do grânulo é:

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

[0150] Onde $d_{pmin} = 136$ mícrons

[0151] Assim, o tamanho mínimo permitido é de 136 mícrons. A Tabela 5 representa as taxas de fluxo lineares úteis e as alturas de

coluna para grânulos iguais ou maiores do que 136 μm de diâmetro.

[0152] Tabela 5. Tamanho do grânulo em relação ao fluxo linear e à altura da coluna

Diâmetro do grânulo (microns)						Diâmetro do grânulo (microns)					
u (cm/min)	L (altura da coluna em cm)					u (cm/min)	L (altura da coluna em 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

[0153] A Figura 4 representa um gráfico da Tabela 5. O gráfico mostra o tamanho mínimo do grânulo no eixo y, a taxa de fluxo linear no eixo x e a altura da coluna no eixo z. A Figura 4 tem 6 diferentes tons de cinza à medida que o corte de tamanho do grânulo é de 136 microns. Portanto, os tons que representam os grânulos menores do que esse tamanho não são representados. (Por exemplo, 0-50 e 50-100).

[0154] Os dados foram utilizados para determinar o tamanho de abertura de poro mínimo de material não grânulo, tais como fios ou fibras. A tabela a seguir (Tabela 6) fornece o tamanho mínimo correspondente da abertura de poro em relação à altura da coluna e à taxa de fluxo linear.

[0155] Tabela 6. Tamanhos de poros macroscópicos para materiais não grânulo

Tamanho de poro macroscópico						Tamanho de poro macroscópico					
L (altura da coluna em cm)						L (altura da coluna em 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

[0156] Se um meio de adsorção é compressível, o tamanho de poro macroscópico diminuirá como uma função da taxa de fluxo, devido à tensão de cisalhamento da corrente sanguínea. Um meio compressível pode ser “pré-comprimido” para alcançar o tamanho mínimo de poro calculado na Tabela 6 para uma taxa de fluxo desejada. Para um meio compressível ligeiramente empacotado, o tamanho de poro macroscópico não deve diminuir abaixo dos valores na Tabela 6 sob condições de fluxo, caso contrário, a pressão do sistema aumentará, o que poderia conduzir à hemólise e macrófagos também seriam filtrados.

[0157] Em adição à determinação do tamanho de partículas e/ou do tamanho de poro macroscópico, o diâmetro (por exemplo, diâmetro, interno) do cartucho de filtro extracorpóreo pode ser determinado. A

Tabela 7 fornece diâmetros de cartucho úteis necessários para atingir a taxa de fluxo linear necessária em uma taxa de fluxo volumétrico específico.

Tabela 7. Diâmetros de Cartuchos

Diâmetro do cartucho (cm)							Diâmetro do cartucho (cm)						
Taxa de fluxo volumétrico desejado (mL/min)							Taxa de fluxo volumétrico desejado (mL/min)						
u (cm/min)	50	100	150	300	500	1000	u (cm/min)	500	1000	2000	3000	4000	5000
1	14,1	20,0	24,5	34,6	44,7	63,2	1	44,7	63,2	89,4	109,5	126,5	141,4
3	8,2	11,5	14,1	20,0	25,8	36,5	76	5,1	7,3	10,3	12,6	14,5	16,2
5	6,3	8,9	11,0	15,5	20,0	28,3	151	3,6	5,1	7,3	8,9	10,3	11,5
7	5,3	7,6	9,3	13,1	16,9	23,9	226	3,0	4,2	5,9	7,3	8,4	9,4
9	4,7	6,7	8,2	11,5	14,9	21,1	301	2,6	3,6	5,2	6,3	7,3	8,2
11	4,3	6,0	7,4	10,4	13,5	19,1	376	2,3	3,3	4,6	5,6	6,5	7,3
13	3,9	5,5	6,8	9,6	12,4	17,5	451	2,1	3,0	4,2	5,2	6,0	6,7
15	3,7	5,2	6,3	8,9	11,5	16,3	526	1,9	2,8	3,9	4,8	5,5	6,2
17	3,4	4,9	5,9	8,4	10,8	15,3	601	1,8	2,6	3,6	4,5	5,2	5,8
19	3,2	4,6	5,6	7,9	10,3	14,5	676	1,7	2,4	3,4	4,2	4,9	5,4
21	3,1	4,4	5,3	7,6	9,8	13,8	751	1,6	2,3	3,3	4,0	4,6	5,2
23	2,9	4,2	5,1	7,2	9,3	13,2	826	1,6	2,2	3,1	3,8	4,4	4,9
25	2,8	4,0	4,9	6,9	8,9	12,6	901	1,5	2,1	3,0	3,6	4,2	4,7
27	2,7	3,8	4,7	6,7	8,6	12,2	976	1,4	2,0	2,9	3,5	4,0	4,5
29	2,6	3,7	4,5	6,4	8,3	11,7	1051	1,4	2,0	2,8	3,4	3,9	4,4
31	2,5	3,6	4,4	6,2	8,0	11,4	1126	1,3	1,9	2,7	3,3	3,8	4,2

[0158] Outro fator a considerar é o volume total de sangue usado com um dispositivo extracorpóreo. Por exemplo, o volume total removido do corpo durante um tratamento de circulação extracorpórea é tipicamente não mais do que 8 a 10% de sangue do paciente. Para um adulto médio, isto equivale a 500 mL de sangue. Um típico volume de sangue de cartucho ou tubo de diálise pode variar de 250 a 300 mL. Se um cartucho de diálise é utilizado em série com um cartucho de adsorção, então o volume de sangue do cartucho de adsorção deveria ser não mais do que 200 mL. As dimensões práticas para um cartucho de adsorção da presente invenção são fornecidas na Tabela 8.

[0159] Tabela 8. Volume de sangue de cartucho empacotado (mL) - 0,36 de razão de volume de vazio

Tabela 8. Volume de sangue de cartucho empacotado (mL) – 0,36 de razão de volume de vazio

Diâmetro	Altura da coluna (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

[0160] Este exemplo fornece modalidades exemplificadas do meio de adsorção e do cartucho de adsorção descritos acima. O meio de adsorção pode ser utilizado em terapias extracorpóreas com taxa de fluxo volumétrica de até 5000 mL/min e taxas de fluxo linear até 1000 cm/min.

[0161] Exemplo 4. Filtros de sangue para a remoção de vírus da hepatite C e vírus da hepatite B

[0162] Este exemplo fornece um cartucho de filtro extracorpóreo que é usado para remover vírus da hepatite C e vírus da hepatite B. Neste exemplo, o meio de adsorção é misto. O meio misto compreende uma relação de 70:30 de grânulos de polietileno heparinizado: proteína A fixada em um gel de celulose.

[0163] Os grânulos de PE heparinizado têm ligação terminal covalente de heparina degradada por ácido nitroso em grânulos de PE aminado. Os grânulos de PE heparinizado contêm 2,6 mg de heparina/g de grânulos.

[0164] A ligação terminal covalente de heparina degradada por ácido nitroso em grânulos de PE aminado é preparada utilizando tampão de acetato a 0,1 M de pH 4,0 (100 mL) e heparina degradada por ácido nitroso (1,6 g). Após agitação durante 15 min, NaBH₃CN (100 mg) dissolvido em tampão de acetato a 0,1 M pH 4,0 (10 mL) é adicionado. A mistura reacional é agitada durante 24 h em temperatura ambiente e NaBH₃CN adicional (100 mg) dissolvido em de tampão de

acetato a 0,1 M pH 4,0 (10 mL) é adicionado, e a agitação é continuada durante mais 24 h em temperatura ambiente para produzir a ligação terminal covalente de heparina.

[0165] Em 0,5 mL de tampão borato a 0,05 M (pH 10,0) são dissolvidos 4 mg de proteína A (Sigma), e 0,01 N de NaOH/água é adicionado de modo a trazer o pH para 10 e produzir um volume total de 1,0 mL (solução de proteína A). Esta solução de proteína (quantidade total) é adicionada a 1 mL de um gel de celulose ativado com epóxi e a mistura é agitada a 37°C durante 16 horas e lavada com uma quantidade suficiente de PBS (tampão de fosfato 10 a mM suplementado com cloreto de sódio a 150 mM) para fornecer GCL 2000m-Proteína A.

[0166] O meio de adsorção misto é usado para remover vírus da hepatite C e vírus da hepatite B do sangue.

[0167] Entende-se que os exemplos e modalidades aqui descritos são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações serão sugeridas pelos versados na técnica e são incluídas dentro do espírito e âmbito deste pedido e escopo das reivindicações em anexo. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui citados são aqui incorporados por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método *ex vivo* para remover bactérias de uma amostra retirada de um indivíduo que é suspeito de estar infectado com bactérias, em que as bactérias são conhecidas por terem afinidade não detectável para o heparan sulfato, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) contatar uma amostra selecionada a partir de sangue total, soro ou plasma retirada do indivíduo a uma taxa de fluxo linear de cerca de 400 cm/min a cerca de 1.000 cm/min com um meio de adsorção para permitir a formação de um complexo aderente, em que o meio de adsorção é um substrato sólido tendo ao menos um adsorvente polissacarídeo na superfície do mesmo; em que o substrato sólido compreende um grânulo de polímero rígido em que o tamanho mínimo do pescoço é de 21 microns; ou

(ii) contatar uma amostra retirada do indivíduo a uma taxa de fluxo linear de cerca de 400 cm/min a cerca de 1.000 cm/min com um meio de adsorção para permitir a formação de um complexo aderente, em que o complexo aderente compreende bactérias e o meio de adsorção, em que o substrato sólido compreende uma fibra sólida ou fio de tecido feito de fibra sólida; e

(iii) separar a amostra do complexo aderente para produzir a amostra com uma quantidade reduzida de bactérias.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra é sangue total.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato sólido compreende uma pluralidade de grânulos de polímero rígidos.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo aderente compreende bactérias e o meio de adsorção.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o grânulo de polímero rígido é um membro selecionado do grupo que consiste em poliuretano, polimetil metacrilato, polietileno ou copolímeros de etileno e outros monômeros, polietileno imina, polipropileno, e poli-isobutileno.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato sólido compreende uma ou uma pluralidade de fibras ocas.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um adsorvente polissacarídeo é um membro selecionado do grupo que consiste em heparina, heparan sulfato, ácido hialurônico, ácido siálico, carboidratos com sequências de manose, e quitosana.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as bactérias presentes na amostra são reduzidas em 20% a 99,9%.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as bactérias presentes na amostra são reduzidas em 20% a 40%.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as bactérias presentes na amostra falham em um ensaio de ligação à heparina *in vitro*.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* resistente a carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem, e *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamase de espectro estendido.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra tem uma taxa de fluxo volumétrico de 50

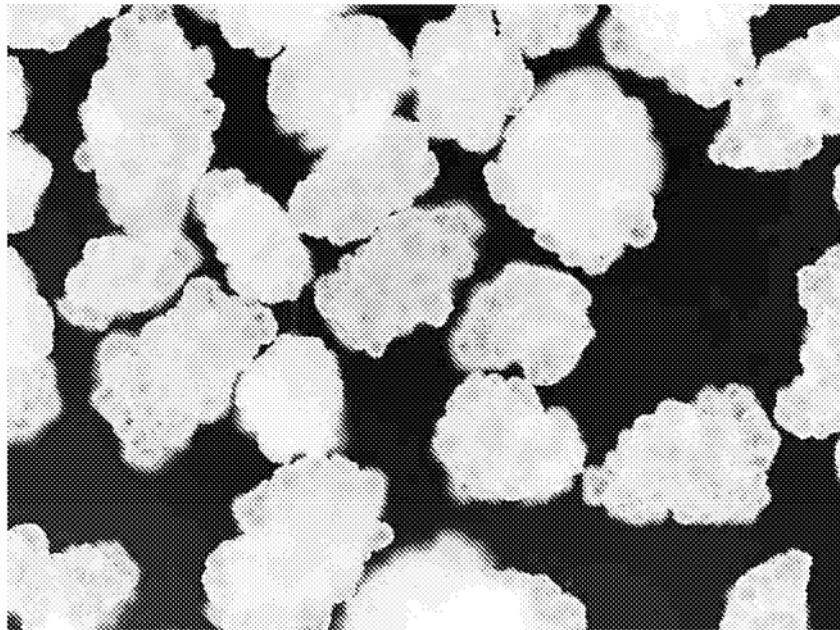
mL/min a 5 L/min.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato sólido compreende uma superfície irregular ou rugosa desigual.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o grânulo de polímero rígido tem um diâmetro de 300 μm a mais de 1 mm.

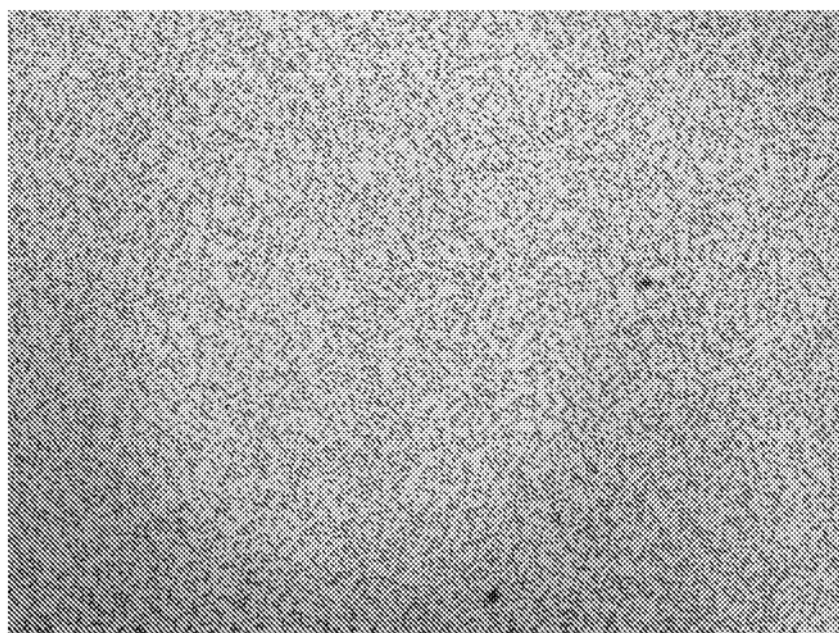
1/4

FIG. 1A



100x de aumento

FIG. 1B



100x de aumento

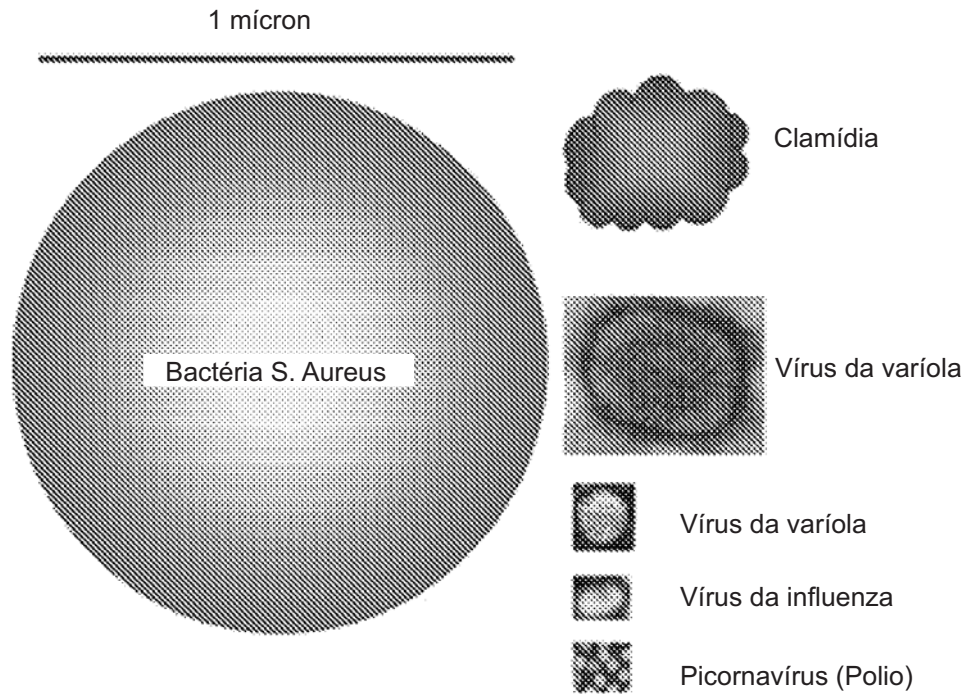
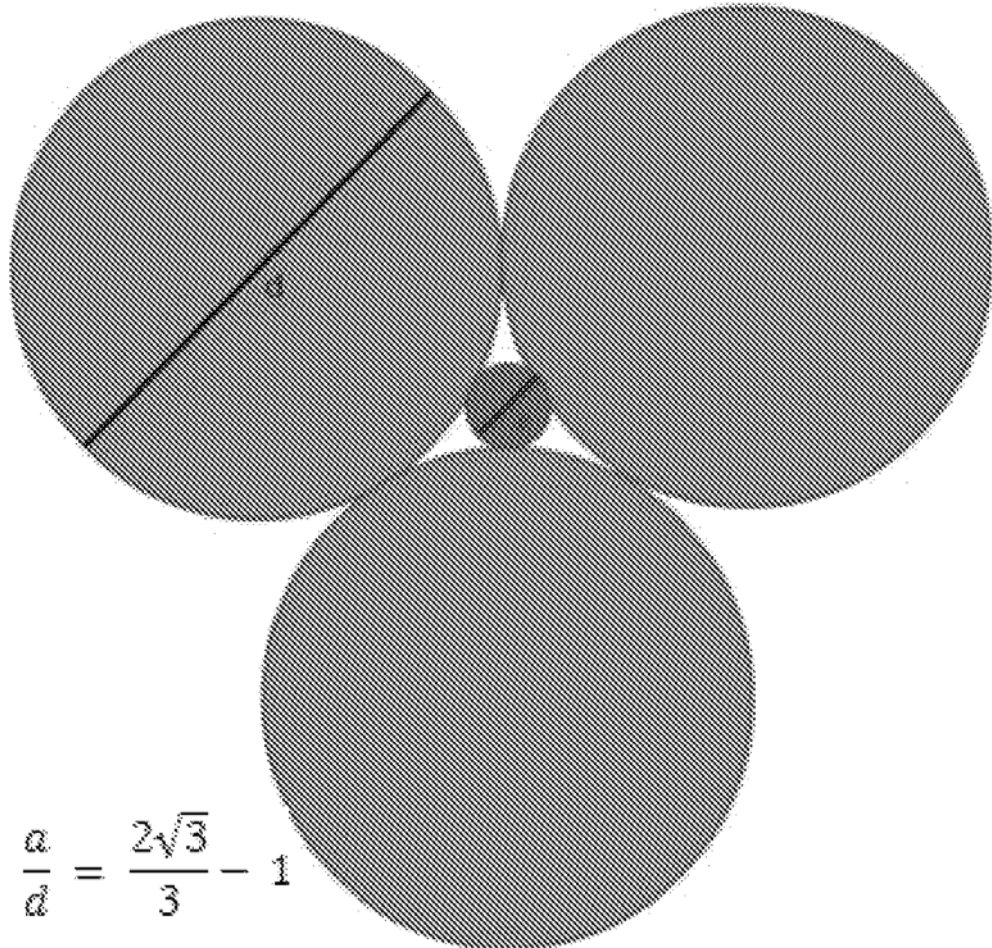


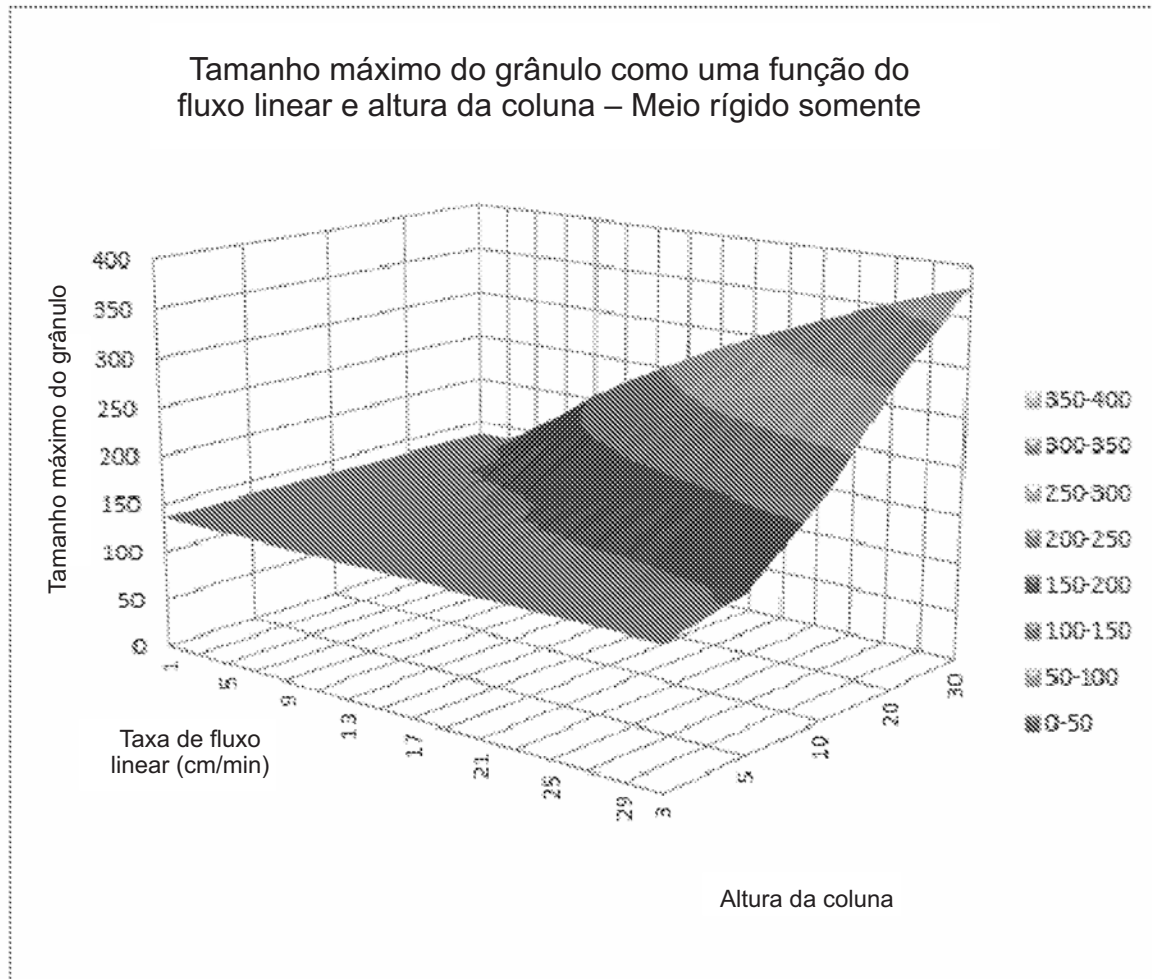
FIG. 2

3/4



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

FIG. 3

**FIG. 4**