



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 797**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03713168 .7**

86 Fecha de presentación : **04.04.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1497025**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

54 Título: **Separación mejorada.**

30 Prioridad: **25.04.2002 SE 0201257**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

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

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

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

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Separación mejorada.

5 La presente invención se refiere a mejoras en la remoción de componentes de sangre entera o de un fluido corporal. Más específicamente, la invención se refiere a un método en el cual se permite pasar sangre o fluido corporal a través de una matriz rígida de separación integral sin excluirse de la misma.

10 Los procesos inflamatorios tales como la sepsis son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en humanos. Se estima que anualmente de 400.000 a 500.000 episodios de sepsis dan lugar a 100.000 hasta 175.000 muertes humanas sólo en los Estados Unidos. En Alemania se han notado tasas de sepsis de hasta 19% de pacientes ubicados en las unidades de cuidado intensivo. La sepsis también se ha vuelto la causa que conlleva a la muerte en las unidades de cuidado intensivo entre pacientes con enfermedades no traumáticas. A pesar de los avances importantes de las últimas décadas en el tratamiento de infecciones graves, la incidencia y mortalidad debido a la sepsis continúa aumentando.

15 Existen tres tipos principales de sepsis caracterizados por el tipo de organismo infectante. La sepsis Gram-negativa es la más común. La mayoría de estas infecciones es causada por *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae* y *pseudomonas aeruginosa*. Los patógenos Gram-positivos, tales como los estafilococos y los estreptococos, son la segunda causa principal de sepsis. El tercer grupo en importancia incluye los hongos. Las infecciones por hongos constituyen un porcentaje relativamente pequeño de casos de sepsis, pero éstos dan lugar a una tasa alta de mortalidad.

20 Un mecanismo bien establecido en sepsis se relaciona con los componentes tóxicos de bacterias gram-negativas, es decir la estructura de pared celular lipopolisacárida (LPS, endotoxina), que se compone de un grupo ácido graso, un grupo fosfato y una cadena de carbohidratos.

25 Se han identificado varias de las respuestas de huésped a las endotoxinas, tales como la liberación de citoquinas que se producen localmente. En caso de una estimulación extensiva, sin embargo, existe un vertimiento sobre la sangre periférica y se obtienen efectos potenciales dañinos, tales como disfunción inducida de órganos.

30 Los mediadores clave de choque séptico son el Factor de Necrosis Tumoraes (TNF- α), interleuquina 1 (II-1) e interleuquina 17 (II-17), que se liberan mediante monocitos y macrófagos. Estos actúan de manera sinérgica causando una cascada de cambios fisiológicos que conducen a un colapso de circulación y fallo multiorgánico. En realidad, las altas concentraciones de TNF- α pueden imitar los síntomas y resultados de la sepsis.

35 Normalmente, las endotoxinas se mantienen dentro del lumen del intestino. Por ejemplo, durante la desviación (bypass) cardio-pulmonar la presencia de isquemia esplácnica o disoxia da lugar a disrupción o rompimiento de la barrera mucosa y la translocación (es decir, el transporte de endotoxinas del intestino al sistema circulatorio) de endotoxinas del lumen de la víscera al portal de circulación.

40 Los antibióticos de tipos variantes son ampliamente usados para prevenir y tratar infecciones. Sin embargo, para muchos antibióticos usados comúnmente se desarrolla una resistencia a antibióticos entre diversas especies de bacterias. Esto es particularmente cierto para la flora microbiana residente en hospitales, donde los organismos están bajo presión constante selectiva para desarrollar resistencia.

45 Por otra parte, en el hospital la alta densidad de pacientes potencialmente infectados y el contacto extenso de personal con personal y de personal con paciente facilita la difusión de organismos resistentes a antibióticos. Los antibióticos usados son los más económicos, los más seguros y los más fáciles de administrar y pueden no tener un espectro lo suficientemente amplio para suprimir ciertas infecciones.

50 Los antibióticos pueden tener una toxicidad de niveles variados causando alergias, interacciones con otras drogas y causando daños directos a los órganos principales (por ejemplo, hígado, riñón). Muchos antibióticos cambian también la flora intestinal normal que causan diarrea y una mala absorción nutricional.

55 Se conocen ciertos antibióticos para neutralizar la acción de endotoxinas, tales como la polimixina B. Este antibiótico se enlaza con la parte A lipídica de la endotoxina y neutraliza su actividad. La polimixina no se usa rutinariamente debido a su toxicidad. Solo se da a pacientes bajo supervisión constante y monitoreando su función renal.

60 Por otra parte, para superar algunas de las limitaciones inherentes a la inmunización activa contra componentes bacteriales, se han usado diversas técnicas para producir anticuerpos que enlazan la endotoxina. Se ha preparado un número grande de anticuerpos mediante inmunización de humanos con bacterias. Para desarrollar preparaciones más consistentes de anticuerpos terapéuticos, se han desarrollado numerosos anticuerpos monoclonales reactivos a LPS. Desafortunadamente, los estudios clínicos no han dado lugar a beneficios. Sin embargo, se debe notar que estos intentos se llevaron a cabo en humanos después del principio de los síntomas de sepsis. Se cree ampliamente que un tratamiento de anticuerpo anti-endotoxina, administrado después de la sepsis puede dar poco beneficio debido a que 65 estos anticuerpos no pueden reversar la cascada inflamatoria iniciada por la endotoxina.

En JP 06022633 se muestra un adsorbente para anticuerpos antilipídicos que comprende un compuesto con un grupo funcional aniónico inmovilizado en un material poroso insoluble en agua. El material poroso puede ser aga-

rosa, celulosa, dextran, poliacrilamida, vidrio, gel de sílice o un polímero duro hecho de un copolímero de estireno-divinilbenceno, y el material poroso se empaca como un lecho de partículas separadas en un dispositivo de separación.

Han sido preparados diferentes materiales absorbentes con la intención de retirar componentes de la sangre. En WO 01/23413 se muestra un adsorbente para retirar endotoxina el cual comprende un ligando inmovilizado sobre un medio soporte de fase sólida. Un medio de soporte preferido se encuentra en forma de perlas. Cuando está empacado en un dispositivo de separación, el medio soporte de fase sólida es lo suficientemente poroso como para permitir el paso de células de sangre entre las perlas.

En WO 00/62836 el material adsorbente tiene un tamaño y una estructura adaptados para retirar β -2 microglobulina de la sangre. El material adsorbente de este documento puede ser un polímero sintético macroporoso con una superficie de perlas y de poros modificada de tal manera que prevenga adsorción de proteína y plaquetas. Sin embargo, las perlas esféricas individuales del polímero se destruyeron mecánicamente a una carga de alrededor de 500 g, lo cual se obtiene en, por ejemplo, una columna empacada con las perlas. Una carga así da lugar a una baja de presión en la columna.

Para reducir la baja de presión se ha preparado un absorbente en EP 464872, el cual comprende partículas de gel duro poroso insoluble en agua que tienen un límite de exclusión de 10^6 - 10^9 Dalton, El lecho de gel se usa para remoción selectiva de lipoproteínas de sangre o plasma en tratamiento de circulación extracorpóreo.

De manera similar, en WO 01/23413 el material poroso de soporte para retirar la endotoxina son perlas con las que se puede llenar un contenedor y que tienen un tamaño suficiente para suministrar el espacio requerido entre las perlas empacadas en una columna o lecho de filtro. El material poroso de soporte pueden también ser fibras huecas de microfiltración o membranas planas laminadas para minimizar caídas de presión.

En EP 424698 se muestra un adsorbente para eliminar biomacro-moléculas, el cual consiste en un vehículo de partículas porosas esféricas que tienen un tamaño de partícula de 50-150 micrones y un límite de exclusión de por lo menos 105 Dalton. La polimixina B se acopla a las partículas con las que se llena un cartucho a usarse en un sistema para remoción extracorpórea de endotoxina de la sangre entera.

En estos sistemas tradicionales para retiro extracorpóreo de componentes tóxicos de la sangre, se llena primero un contenedor o cartucho con un líquido y las perlas porosas adsorbentes se introducen después. En US 6,408,894 se muestra un método que proporciona una distribución más uniforme y un empaque más denso de las perlas. El método involucra suministrar forzosamente una mezcla de líquidos y perlas en un contenedor de tal manera que el líquido haya sido exprimido de la mezcla y fuera del contenedor.

Así, una eliminación de células de sangre facilita el retiro de componentes presentes en plasma tal como se describe arriba, por ejemplo en WO 00/62836 ó WO 01/23413. Sin embargo, una técnica así involucra dos pasos de separación que podrían contribuir a un riesgo aumentado de activación celular adversa debido a bioincompatibilidad.

El propósito de la presente invención es suministrar un método nuevo para enlazar de manera selectiva y separar por lo menos un componente de la sangre entera o de los fluidos corporales, mediante el cual se eliminan los problemas arriba mencionados en conexión con procesos inflamatorios.

Otro propósito es suministrar un método así, mediante el cual el enlazamiento selectivo y la separación se pueden realizar sobre la sangre entera sin la necesidad de separar la sangre en plasma y células sanguíneas.

Otro propósito de la invención es suministrar un método que no sea dependiente del tamaño, es decir, los componentes de la sangre no se separan por medio de exclusión.

Un objetivo más de la invención es suministrar un método, mediante el cual se pueden obtener altas tasas de flujo en un dispositivo de separación sin caídas significativas de presión en el tiempo.

Otro propósito más es suministrar un método tal que no se someta la sangre a fuerzas de corte en un dispositivo de separación incluso a tasas altas de flujo mientras se mantienen una línea baja de presión para evitar daño a los vasos sanguíneos.

Estos objetivos se logran mediante la presente invención que tiene los rasgos característicos de la reivindicación 1. Otras ventajas de la invención se volverán aparentes de la reivindicación 24 y de las sub-reivindicaciones.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para enlazar y separar selectivamente por lo menos un componente de sangre entera o un fluido corporal. Se deja pasar la sangre o fluido corporal por una matriz rígida íntegra de separación sin ser excluida de allí, teniendo la matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que abarque desde 5 micrones hasta 500 micrones y una superficie activa que abarca desde 0.5 cm^2 hasta 10 m^2 , enlazando por lo menos un componente de fluido corporal mediante por lo menos un grupo funcional dispuesto en dicha matriz, por lo cual dicha matriz se obtiene mediante un proceso seleccionado de un grupo que comprende: proceso de sinterizar, moldear y espumar.

En una realización preferida de la invención la matriz además comprende por lo menos un grupo funcional que ha sido introducido por medio de revestimiento y/o modificación de superficie de la estructura porosa. Esto da lugar a que la superficie activa obtenida, sola o en combinación con regiones no funcionalizadas de la misma, es capaz de enlazar selectivamente por lo menos un componente de sangre entera o fluido corporal. Los componentes a ser retirados pueden ser naturales así como no naturales, es decir un ligando específico, tal como un anticuerpo que se pega al componente.

Por otra parte, los grupos funcionales, obtenidos por medio de conversión selectiva directa o indirecta de la superficie de la estructura porosa, han sido usados además para inmovilización de ligandos. Sin embargo, los grupos funcionales de la estructura porosa se pueden utilizar tal como se usan en el método inventivo.

El tamaño de poro así como la superficie de la estructura porosa semejante a un esqueleto han sido adaptados para usarse en la matriz de separación del método inventivo en conexión con la purificación de sangre entera. Sin embargo, el método de acuerdo con la invención también se puede usar para retirar componentes de otros fluidos corporales así como también de soluciones acuosas. Es un aspecto importante de la invención que no se excluya de la matriz ningún componente ni ningún solvente durante un procedimiento de separación.

De acuerdo con la invención, la matriz integral rígida debe tener una superficie disponible de 0.5 cm² hasta 10 m², y la densidad de la estructura de la matriz no es limitante para llevar a cabo el método inventivo.

En este contexto, el término “rígido” significa que la matriz no es flexible, no se flexiona o cede, pero es capaz de resistir una presión de por lo menos 0,5 bar. El término “integral” significa que la matriz con gran superficie de área es una entidad entera.

La estructura porosa de la matriz en el método de la invención está hecha de metal, óxido inorgánico, carbono, vidrio, cerámica, polímero sintético y/o polímero natural, o mezclas de los mismos. Las estructuras porosas sólidas de metal con tamaños de poro bien y grandes áreas de superficie bien definidos se pueden fabricar usando procesos de sinterización controlados estrictamente produciendo poros de tamaño uniforme.

Se han producido diferentes polímeros como un material poroso moldeado o extrudido con una estructura porosa que tiene el tamaño de poro deseado así como también un área grande de superficie para la matriz. Ellos también se han producido en calidad de espuma. Por ejemplo, los poliuretanos preparados a partir de isocianatos y otros compuestos orgánicos diversos tienen átomos activos de hidrógeno que han sido usados para producir productos de poliadición. Este hidrógeno activo puede provenir de compuestos bifuncionales o polifuncionales, tales como polialcoholes, poliaminas. Las reacciones con agua ocasionan aminas primarias que se han usado para inmovilización covalente de ligandos específicos.

Se ha usado una amplia variedad de metales y aleaciones, tales como acero inoxidable, níquel, titanio, monel, inconel, hastelloy y otros materiales especiales de metal. Los óxidos inorgánicos de gran área de superficie, especialmente alúmina y circonio, también se han utilizado con las mismas técnicas para producir materiales cerámicos con estructuras de poro definido. Similarmente, se pueden adquirir tales cerámicas así como vidrio sinterizado, que tienen tamaños de poro adecuado.

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

Materiales naturales e híbridos de los mismos, que se pueden usar como un material de matriz en el método de la invención son los polisacáridos, tales como la celulosa y otros materiales poliméricos de carbohidratos. Otros materiales poliméricos naturales apropiados son los poliaminoácidos, también aquellos que involucran aminoácidos sintéticos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y sus copolímeros con ácido láctico.

En este contexto el término híbrido abarca derivados de materiales naturales como por ejemplo diacetato de celulosa que es un derivado preferido polisacárido.

Los polímeros sintéticos adecuados para la matriz a ser utilizada en la presente invención son poliolefinas, tales como el polietileno, polipropileno, el polibutileno, el polimetilpenteno y copolímeros de acetato de etileno vinilo; polímeros vinílicos, tales como alcohol polivinílico, acetales polivinílico y polivinilpirrolidona; polímeros que contienen flúor, tal como politetrafluoretileno, copolímero fluorado de etileno-propileno, policlorofluoroetileno, polivinilfluoruro y fluoruro de polivinilideno; poliácridatos, tales como polimetilmetacrilato, cianoacrilato, polyacrilonitrilo, y polimetacrilatos; poliamidas, tales como poliacrilamida; polímidas, tales como polietileniminas; polistyreno y sus copolímeros, tales como poliestireno y polímeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno; gomas de silicona; poliésteres/éteres; policarbonatos; poliuretanos; polisulfonatos; poliglicoles; polialquideóxidos tales como polietilenóxido, polipropilénóxido; y copolímeros o híbridos de los mismos.

En la realización preferida, por lo menos un grupo funcional se ha introducido en una estructura porosa de la matriz rígida de separación. Los grupos funcionales pueden ser de diferente tipo, es decir, de tipo aniónico, catiónico o no iónico. Los grupos funcionales de la estructura porosa se han usado para enlazar covalentemente sustancias como péptidos/proteínas y ácidos biliares (por ejemplo, ácido deoxicólico), anticuerpos y fragmentos de los mismos

así como también otras moléculas y sustancias que tienen la habilidad de enlazar selectivamente endotoxinas y/o mediadores pro-inflamatorios.

Una modificación superficial, es decir, una funcionalización de superficie de una manera directa, se llevó a cabo mediante electrodeposición, electro-evaporación, deposición química de plasma, deposición de un flujo de plasma iónico o deposición de vapor químico (por ejemplo polimerización de plasma, deposición de polímero con superficie aumentada por plasma). Los métodos de modificación de superficie son conocidos *per se* y se encuentran en "Modificación de superficie por plasma y polimerización por plasma" por N. Inagaki, 1996, Technomic Publishing, Lancaster, Estados Unidos de América. Por medio de estos métodos han sido tratados diferentes estructuras tridimensionales de matriz alcanzándose una modificación muy homogénea de la superficie activa.

Polimerización de monómeros bifuncionales de dobles enlaces acrílico o alílicos con grupos polares como OH, NH₂, CN y COOH han sido usados para producir polímeros de plasma con alta densidad de los grupos funcionales. Por ejemplo, se ha llevado a cabo una funcionalización de superficie de las superficies inorgánicas y orgánicas en un medio de plasma de compuestos alílicos, tales como la alilamina.

Se han hecho también posibles las superficies poliméricas en medios de plasma de NH₃, O₂ ó CO₂, las cuales ocasionan cualquiera de los grupos funcionales =NH, -NH₂, =CN, -OH, o -COOH. Otros ejemplos de gases usados son bien conocidos en el arte.

Un procesamiento plasma-químico se ha combinado también con la síntesis química clásica, aumentándose significativamente la selectividad de modificaciones de superficie para polímeros. Un enfoque ha sido aplicar una funcionalización específica de superficie por gas de plasma inmediatamente seguida por una unificación química de los grupos funcionales de plasma coexistentes.

Otra forma de introducir los grupos funcionales es por medio de una funcionalización directa, es decir, revistiendo la superficie con un material polimérico. En este contexto el polímero sintético o natural se ha revestido sobre un metal de gran superficie, óxido inorgánico, carbón, vidrio, cerámica, así como también otro polímero sintético adecuado y/o polímero natural o mezclas de los mismos.

Muchos de los polímeros mencionados arriba, especialmente aquellos sin grupos funcionales, tales como el polietileno, polipropileno, politetrafluoretileno, etc. necesitan más tratamiento para alterar sus propiedades de superficie. Así, un tratamiento de plasma o corona, como se menciona arriba, de la superficie polimérica generará un grupo funcional muy único, como el grupo hidroxilo, el carbonilo, el carboxilo, el amino y el imino, etc, los cuales están pegados covalentemente a la superficie.

El revestimiento también se ha llevado a cabo por medio de adhesión o adsorción de una sustancia polimérica que tiene grupos funcionales. Ejemplos de tales sustancias son la polilisina, poliarginina y la polietilenimina.

Por ejemplo, usando una técnica de plasma, se obtuvieron sustancias similares a polietilenimina sobre la superficie porosa. Cuando se usa una matriz de separación en el método de acuerdo con la invención para enlazar selectivamente y separar por lo menos un componente de sangre entera o de un fluid corporal, tanto las regiones hidrofílicas como las hidrofóbicas de los componentes proteínicos de la sangre pueden interactuar con la superficie procesada para retirar los componentes deseados. Después de la funcionalización cuando la superficie de la matriz para enlace y separación selectivos comprende una poliolefina, por ejemplo un polietileno o polipropileno, las cargas positivas de los grupos amino se usan de manera similar para interacciones electrostáticas y las regiones hidrofóbicas se usan para interacciones hidrofóbicas. Este enfoque se usa en el método de la invención para el enlace selectivo de regiones diferentes de lipopolisacáridos, por ejemplo.

Se pueden funcionalizar polímeros y metales que tienen hidroxilos reactivos, por ejemplo, por medio de la silanización.

Por consiguiente, diversos grupos funcionales diferentes se han acoplado covalentemente a una estructura de matriz porosa de gran superficie. Después de una funcionalización directa o indirecta, la estructura porosa puede tener tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas, las cuales pueden interactuar con los diferentes componentes de la sangre. Así, las propiedades características de una sustancia de interés se utilizan al preparar la superficie a ser usada en el método de acuerdo con la invención.

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

En otra realización preferida se ha acoplado un ligando a por lo menos un grupo funcional de la estructura porosa de gran superficie de una manera covalente. En este contexto, un ligando es una sustancia con alta afinidad por el componente que se va a retirar de la sangre entera o de un fluido corporal. Así, el ligando se usa para aumentar las propiedades de adsorción y la eficacia de enlazamiento.

El ligando puede ser una proteína, preferiblemente una proteína recombinante, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un carbohidrato, por ejemplo un polisacárido, una hormona, un antioxidante, una glicoproteína,

ES 2 266 797 T3

una lipoproteína, un lípido, una vitamina soluble en grasa, por ejemplo vitamina E, un ácido biliar, un colorante reactivo, alantoina, ácido úrico o polimixina o combinaciones de los mismos.

Un ácido biliar adecuado es ácido deoxicólico que es una sustancia hidrofóbica endógena. Un ácido biliar así puede acoplarse ya sea directamente con los grupos funcionales, por medio de un espaciador, o acoplarse por medio de una molécula grande y se usa luego para retirar endotoxinas de la sangre, fluidos corporales y soluciones acuosas como en el método de acuerdo con la invención.

En este contexto un espaciador es una molécula, grande o pequeña, la cual conecta al ligando con la superficie de la estructura porosa.

Por ejemplo, si en el método de la invención la estructura porosa de la matriz de separación comprende una poliolefina que tiene un grupo amino añadido, este grupo puede tener una albúmina acoplada al mismo y a su vez por lo menos una fracción de ácido biliar acoplada a esta molécula grande.

De esa manera, la invención también se refiere a un nuevo uso de una fracción de ácido biliar inmovilizada sobre un soporte para eliminar un componente de una solución acuosa que comprende la misma. Preferiblemente, la fracción de ácido biliar es una fracción de ácido deoxicólico.

Por consiguiente, un soporte sólido adecuado para la inmovilización de la fracción de ácido biliar es una matriz rígida integral de separación que tiene una estructura porosa con un tamaño de poro que abarca desde 5 micrones hasta 500 micrones, preferiblemente desde 70 micrones hasta 170 micrones y una superficie activa que abarca desde 0,5 cm² hasta 10 m².

También se prefiere que el ligando de la matriz en el método inventivo sea albúmina o una albúmina producida por medio de tecnología recombinante, que se puede usar en lugar de albúmina de suero, polimixina B (es decir, grupos cargados sobre una estructura hidrofóbica) o ácido deoxicólico.

Así, un ligando también puede actuar como un espaciador en el método de acuerdo con la invención. Por ejemplo, también ha sido posible primero pegar covalentemente una proteína humana recombinante u otra molécula grande (por ejemplo, ácido hialurónico) a la estructura porosa, que permite un enlazamiento consiguiente del ligando específico para el componente que va a ser retirado.

Si es necesario, se acopla un reticulador entre por lo menos un grupo funcional y el ligando de una manera covalente. En este contexto, un reticulador es un elemento que enlaza covalentemente el ligando con la estructura porosa de soporte, siendo el elemento un separador al ligar el ligando a una distancia de la misma estructura porosa. Tales separadores moleculares se conocen en el arte. Se han introducido para incrementar la afinidad por el componente a enlazarse y separarse de sangre entera o de fluidos corporales suministrando una mejor disponibilidad a los ligandos. La biocompatibilidad de la superficie de la estructura porosa de la matriz también se incrementa por la introducción de estos separadores moleculares.

Un reticulador/separador puede comprender un reticulador de longitud cero, solo o en combinación con un reticulador de intermedio, estando el complejo final obtenido enlazado en virtud de sustancias químicas que añaden estructuras a la sustancia reticulada. Estos reticuladores intermedios pueden ser del tipo homobifuncional (por ejemplo, dialdehidos), heterobifuncional (por ejemplo aminoácidos) o del tipo reticulador trifuncional.

El principal propósito del separador es incrementar la biodisponibilidad del ligando específico utilizado.

El separador puede ser por ejemplo un silano, un diisocianato, un glicolato, un polietilenglicol, un reactivo de succinimidilo, una dihidrazina, ácido adipídico, una diamina, un amino ácido, un poli u oligoaminoácido, un poliaminoácido, un péptido o una proteína. La proteína es preferiblemente una proteína humana recombinante.

Los grupos funcionales del reticulador se diseñan para reaccionar con grupos amino (Lys, Arg), con sulfhidrilos (Cys), o con carboxilos (Asp, Glu), para citar algunos ejemplos.

En conexión con la química de grupos reactivos, se hace referencia a las Técnicas Bioconjugadas (Bioconjugate Techniques), Greg T Hermanson, Academic Press, USA 1996.

Así, la superficie de la matriz activa porosa es capaz, en el método inventivo, de retirar endoxinas, por ejemplo, so las o en combinación en regiones no funcionarizadas de la superficie disponible de la estructura porosa. La superficie activa también se puede usar como una herramienta para inmovilización covalente de químicos, tales como biomoléculas como aminoácidos, polipéptidos y anticuerpos para elevar selectivamente la eliminación de tales componentes específicos.

Una matriz de separación destinada a retirar selectivamente por lo menos un componente de sangre entera o de fluidos corporales se puede producir con una estructura porosa de un cierto tamaño de poro y/o cierto rango de tamaño de poro en dependencia de la aplicación destinada. Preferiblemente, la estructura de poro debe permitir el paso de células sanguíneas. Por consiguiente, ciertos tipos de células sanguíneas también se pueden retirar de sangre entera

por medio del método de la invención. Tales células enfermas o células con receptores de superficie específicos, como por ejemplo células fagocitantes activadas.

La estructura de metal puede ser magnética para aplicaciones especiales. Una matriz magnética se puede obtener por ejemplo mediante revestimiento de magnetita sinterizada con un polímero, por ejemplo polietileno. Una remoción eficiente de células se puede llevar a cabo permitiendo que los anticuerpos, con una etiqueta de hierro magnético dextran, se peguen a células específicas en la sangre.

El tamaño de poro debe estar dentro del rango desde 5 micrones hasta 5000 micrones, preferiblemente desde 70 micrones hasta 170 micrones, más preferiblemente desde 80 micrones hasta 100 micrones para que se mantengan altas tasas de flujo sin daño celular o exclusión celular. Así, la separación realizada con el método de acuerdo con la invención no se basa en una distribución de tamaños de los componentes. Virtualmente todos los componentes de sangre entera o de un fluido corporal pueden ser eliminados por medio del método inventivo.

Después de retirar uno o más de los causantes tóxicos primarios, es decir una endotoxina, otros causantes tóxicos secundarios se pueden retirar. Los causantes secundarios pueden ser citoquinas (por ejemplo, $\text{TNF-}\alpha$), interleuquinas (por ejemplo, IL-1), oxígeno reactivo y radicales nitrógenados, etc.

Al llevar a cabo el método de acuerdo con la invención, una o más matrices de separación se protegen dentro de una carcasa, que puede tener diversas formas y diferentes y/o variables entradas y salidas dependiendo de la aplicación. Un dispositivo así puede entonces usarse para retirar endotoxina y/o citoquina y/o neutralizar citoquina. Esto se lleva a cabo haciendo pasar sangre u otros fluidos corporales a través del dispositivo, aplicado de manera intra-, para- o extra-corporalmente, sin excluir al líquido de la matriz rígida íntegra de separación, el cual está allí. La superficie activa de la estructura porosa, los grupos funcionales y/o los ligandos específicos sobre ella enlazan entonces selectivamente y separan por lo menos un componente del líquido. El dispositivo puede ventajosamente usarse también para retirar endotoxinas de soluciones acuosas.

Un rasgo importante del método inventivo es que se pueden cubrir todos los aspectos del choque séptico, es decir tanto los causantes tóxicos primarios como los secundarios se pueden retirar por medio del método inventivo.

Se hace referencia a la figura 1 en conexión con la realización del método de acuerdo con la invención. Un dispositivo 1 comprende una carcasa 2, estando la carcasa (o cartucho) del dispositivo integrado en una circulación cerrada, en la cual la sangre entera o los fluidos corporales se hacen circular por medio de una bomba. En la carcasa 2 está dispuesta por lo menos una matriz de separación 5a, 5b, ..., cada una destinada a retirar selectivamente un componente de sangre entera o de fluidos corporales. La carcasa 2 se provee de una entrada 3 y una salida 4, los sitios de las cuales no son de importancia mientras se obtenga un flujo adecuado dentro de una o más matrices de separación y la carcasa. La bomba se dispone preferiblemente corriente arriba de la entrada 3.

De esta manera se obtiene un dispositivo que puede mantener tasas de flujo desde 5 ml/h hasta 6 000 ml/min sin una caída significativa de presión. Al aplicarse extracorporalmente se obtiene una presión en la línea de no más de 300 mm de Hg desde la bomba hasta la cánula incluso a tasas de flujo muy altas.

La matriz rígida integral de separación se puede producir en diferentes formas a ser usadas en el método inventivo. Se puede diseñar por ejemplo como un disco, una barra, un cilindro, un anillo, una esfera, un tubo, un tubo hueco, una lámina plana u otras formas moldeadas.

Puesto que el flujo dentro de cada matriz de separación es dependiente de su porosidad, se puede controlar el tiempo de contacto de los componentes en sangre o en un fluido corporal con la superficie de contacto. Por otra parte, se puede crear un gradiente de flujo deseado dentro de un dispositivo de separación cambiando la porosidad y configuración de las matrices individuales de separación que allí se encuentran.

En las figuras 2 y 3 se muestran diferentes realizaciones esquemáticas de dispositivos, que se pueden usar al realizar el método de acuerdo con la invención. Las flechas indican el flujo de sangre o fluido corporal dentro de las matrices individuales de separación y las carcasas para ellas; las flechas grandes indican una tasa mayor de flujo que las flechas pequeñas. En estos ejemplos de configuraciones diferentes, las matrices de separación pueden tener las mismas porosidades o diferentes porosidades, con o sin el mismo tipo o diferente tipo de grupos funcionales o ligandos para retirar uno o varios componentes de sangre o de un fluido corporal.

Las matrices de separación se integran preferiblemente con las carcasas (que tienen cada una una entrada 3 y una salida 4) para asegurar que no se impida entrar a líquido o componentes allí presentes a la matriz o matrices, es decir que sean excluidos de allí. En la figura 2 (a) y (b) se dan ejemplos de una matriz de separación 5 dentro de una carcasa 2, siendo la matriz de diferentes configuraciones. En la figura 2 (c) y (d) se muestran ejemplos de dos matrices de separación 5a y 5b dentro de una carcasa 2. En el dispositivo de la figura 2 (c) un revestimiento impermeable 6, tal como una piel aplicada, en la periferia externa de la matriz de separación 5a asegura que todo el material suministrado al dispositivo pasará por esta matriz entera. En el dispositivo de la figura 2 (d), por otra parte, algo del material suministrado tendrá un tiempo más corto de residencia en la matriz de separación 5a que en la matriz de separación 5b, y viceversa.

En la figura 3 cada dispositivo comprende varias matrices de separación 5a-5g. En la figura 3 (a) una pared de tabique 7 asegura un flujo a través de todas las matrices. Las matrices de separación se pueden posicionar lateralmente o transversalmente en relación con su dirección longitudinal, tal como en la s figuras 3 (b) y (c), respectivamente. En la figura 3 (d) el dispositivo comprende matrices de separación de diferentes tamaños.

En conclusión, el método inventivo se puede usar con un dispositivo aplicado intra- para- o extra-corporalmente o puesto solo, el cual de esa manera es capaz de reducir la circulación de endotoxinas y mediadores potencialmente dañinos por inflamatorios, especialmente TNF- α , IL-1 e IL-17, preferiblemente en sangre. También es posible retirar selectivamente endotoxinas de otras soluciones acuosas. Se considera que los componentes se enlazan con la superficie activa de la matriz rígida integral de separación por medio de la adhesión.

Ejemplos

Ahora la invención seguirá describiéndose e ilustrándose por referencia a los siguientes ejemplos, que han sido seleccionados cuidadosamente para abarcar la invención. Por consiguiente, estos ejemplos no deben ser interpretados de ninguna manera como limitantes de la invención.

Modificaciones de superficie

Ejemplo 1

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 350 micrones y una superficie activa de 10 cm², fue modificada por medio de deposición de vapor químico aumentada con plasma usando O₂ (Plasma Science, Estados Unidos de América, Tipo PS 0350 Plasma Surface Treatment System (Sistema de tratamiento de superficie con plasma)).

La formación de grupos hidroxilo sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó con la prueba de Dye, confirmandose su hidrofiliidad.

Ejemplo 2

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 100 micrones y una superficie activa de 20 cm², se modificó por medio de deposición de vapor químico aumentada con plasma usando O₂ (Plasma Science, Estados Unidos de América, Tipo PS 0350 Plasma Surface Treatment System (Sistema de tratamiento de superficie con plasma)).

La formación de grupos carboxílicos y la cantidad sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó mediante conversión hacia ácidos hidroxámicos. En este contexto todos los ácidos hidroxámicos dan un color rojo o violeta con cloruro férrico en solución ácida, tal como se describe en Feigel *et al.*; Microchemie 15:18, 1934.

Ejemplo 3

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 170 micrones y una superficie activa de 0,04 m², se modificó por medio de polimerización en plasma usando alilamino (Plasma Science, Estados Unidos de América, Tipo PS 0350 Sistema de tratamiento de superficie con plasma).

La cantidad de aminas primarias sobre la estructura porosa de la matriz obtenida se determinó por medio de ensayo con ácido sulfónico de trinitro benceno (TNBS).

Ejemplo 4

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 0,26 m², fue modificada por medio de polimerización con plasma usando ácido acrílico (Plasma Science, EE.UU, Tipo PS 0350 Sistema de tratamiento de superficie con plasma).

La cantidad de grupos hidroxilo sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 5

La superficie de una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 5 micrones y una superficie activa de 0,9 m², se modificó por medio de polimerización en plasma usando NH₃ (Plasma Science, USA, Tipo PS 0350 Sistema de tratamiento de superficie con plasma).

La cantidad de aminas primarias de la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 3.

ES 2 266 797 T3

Ejemplo 6

La superficie de una matriz de politetrafluoroetileno, PTFE (W.L. Gore & Associates Inc., USA), que tiene una porosidad de 10 micrones y una superficie activa de 100 cm², fue modificada por medio de deposición de vapor químico aumentada con plasma usando NH₃ (Plasma Science, USA, Tipo PS 0350 Sistema de tratamiento de superficie con plasma).

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

Ejemplo 7

La superficie de una matriz de poliestireno poroso (Dow Chemical, Estados Unidos), que tiene una porosidad de 10 micrones y una superficie activa de 300 cm² fue modificada por medio de deposición de vapor químico aumentada con plasma usando CO₂ (Plasma Science, USA, Tipo PS 0350 Sistema de tratamiento de superficie con plasma).

La cantidad de grupos carboxílicos sobre la estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 8

La superficie de una matriz de poliuretano poroso (Polymers Unlimited, Suecia), que tiene una porosidad de 80 micrones y una superficie activa de 100 cm², fue modificada por medio de una solución al 2% de un silano alcoxi aldehídico, (Art No. PSX 1050, United Chemical Technologies Inc., Estados Unidos) en 95% de etanol. El pH de la solución se ajustó a pH 5,5 con ácido acético y la solución se difunde a través de la matriz, la cual se incubó por una noche a temperatura ambiente y luego se lavó con suero fisiológico al 0,9%.

La funcionalidad de aldehído de la matriz obtenida se evaluó usando una aceleración catalítica de la oxidación de p-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno, siendo oxidada la p-fenilendiamina por el peróxido de hidrógeno en una solución ácida, conocida como la base de Bandrowski.

Ejemplo 9

La superficie de una matriz de un silicona porosa (Nusil, Francia), que tiene una porosidad de 200 micrones y una superficie activa de 0,5 m², se modificó por medio de una solución al 2% de una amino-silano (Art No. 0750, United Chemical Technologies Inc., Estados Unidos) en etanol al 95%. La solución se difundió a través de la matriz, la cual se incubó por una noche a temperatura ambiente y se lavó finalmente con suero fisiológico al 0,9%.

La cantidad de aminas primarias en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida fue ensayada como se describe en el ejemplo 3.

Revestimiento por medio de enlace covalente

Ejemplo 10

Se disolvió poli-lisina (200 mg) en 10 ml de una solución de carbonato de sodio de 50 mM y se sumergió en la solución una matriz de policarbonato poroso con una porosidad de 100 micrones (MicroPore Plastics, USA) y se mantuvo a 4°C por 24 horas para obtener un enlace covalente entre la poli-lisina y la matriz de policarbonato. Esta matriz porosa se lavó finalmente con agua destilada en exceso.

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 11

La matriz de polietileno poroso obtenida de acuerdo con el ejemplo 4 se difundió con una solución acuosa de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-p-toluenesulfonato (WCCM) (Aldrich) a una tasa de flujo de 5 ml/min en un circuito cerrado a temperatura ambiente por 6 h. Luego se enjuagó con agua y finalmente se adicionó una solución de polietilenimina (Sigma) (10 mg/ml, pH 7.0) y se incubó la matriz por una noche.

La cantidad de aminas primarias sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 12

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 se conjugó usando glutardialdehído al 1,0% en un buffer de fosfato 0,2M, pH 7,5 y difundido a una tasa de flujo de 1 ml/min por 6 horas a temperatura ambiente.

ES 2 266 797 T3

La matriz se lavó luego con buffer antes de la incubación con solución de ácido hialurónico (2 mg/ml) por 16 horas a temperatura ambiente. Se retiró finalmente el exceso de ácido hialurónico.

El contenido de ácido hialurónico sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se verificó y determinó con Alcian Blue (Sigma)

Revestimiento por medio de adhesión

Ejemplo 13

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 0,18 m², fue difundida a una tasa de flujo de 1 ml/min e un circuito cerrado por 16 horas a temperatura ambiente con solución de ácido hialurónico de 2 mg/ml (BioHyos, Sweden, 12 106 Da) a un pH 3,3, el cual se ajustó con HCl de 0,1 M.

El contenido de ácido hialurónico en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se verificó tal como en el ejemplo 12.

Ejemplo 14

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 7,0 m², fue colocada en un tubo de vidrio. El tubo, con la matriz porosa allí, se llenó con una solución de poli-lisina al 0,13% (Sigma) en 350 ml de agua y se ajustó el pH a pH 3,3 con HCl de 0,1 M. Entonces la solución de polilisina se recirculó a través de tubo con su matriz de filtro por 16 horas a temperatura ambiente a una tasa de flujo de <5 ml/min. La matriz porosa finalmente se enjuagó con agua de ósmosis inversa.

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

Ejemplo 15

Una matriz de polietileno poroso (Porex Technologies, Alemania), que tiene una porosidad de 70 micrones y una superficie activa de 3,4 m², fue colocada en un tubo de vidrio. El tubo con la matriz porosa allí se llenó con una solución de Recombumin™ (Albúmina de Suero Humano Recombinante, Hoechst-Pharma, USA) al 0.2% en 350 ml de agua de ósmosis inversa y después ajustada a pH 3,3 con HCl de 0,1 M.

Luego, la solución de Recombumin™ se recirculó a través del tubo con su matriz de filtro por 16 horas a temperatura ambiente usando una bomba a una tasa de flujo de < 5 ml/min. La matriz porosa se enjuagó finalmente con agua de ósmosis inversa.

El contenido de proteína de superficie sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó usando Coomassie Brilliant Blue (BioRad, USA).

Ejemplo 16

La matriz de polietileno poroso obtenida de acuerdo con el ejemplo 4 se hace pernear con una solución de polietilenimina (Sigma), 10 mg/ml, por una noche a una tasa de flujo de 5 ml/min en un circuito cerrado. Luego, la matriz porosa se enjuagó con agua.

La cantidad de aminas primarias en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se ensayó como se describe en el ejemplo 3.

Conjugación directa de ligandos

Ejemplo 17

La matriz de polietileno poroso obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 se conjugó con deoxicolato (DOC) usando una solución acuosa de WCCM. Se adicionó una solución de 300 ml de dimetilformamida (DMF) (Sigma) al 40% en agua, la cual contenía 1 mmol de deoxicolato de sodio, al policarbonato poroso revolviendo mientras se ajustaba el pH con HCl de 0,3 M a un pH 4,8. Una solución de WCCM de 6 mM en DMF:agua (1:1,8) se adicionó luego por un período de 10 minutos. La suspensión se mantuvo a un pH 4,8 por 3 horas mediante la adición de HCl de 0,3 M.

El contenido de DOC sobre la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó usando un Kit de ácido biliar (Sigma).

Ejemplo 18

La matriz de polietileno porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 se conjugó usando glutardialdehído al 12% en búfer de fosfato de 0,15 M, pH 7.0 por 24 horas a temperatura ambiente. La matriz se lavó entonces con búfer de fosfato de 0,15 M y luego se adicionaron anticuerpos anti CD14 (DAKO Dinamarca) a una concentración de 1 mg/ml e incubado a 8°C por 24 horas. La reducción siguiente con cianoborohidruro de sodio se realizó para producir enlaces estables de amina secundaria.

El contenido de anticuerpo en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó directamente por medio de espectroscopia UV de la solución de búfer anticuerpo antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 19

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 8 se lavó con búfer de fosfato de 0,15 M y luego se adicionó un receptor IL-1 recombinante (Kineret, Amgen, USA) a una concentración de 1 mg/ml y se incubó a 8°C por 24 horas. La reducción siguiente con cianoborohidruro de sodio se realizó para producir enlaces estables de amina secundaria.

El contenido de receptor IL-1 en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución de búfer receptor IL-1 antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 20

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 se conjugó usando glutardialdehído al 1,0% y búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,5. La matriz se incubó con esta solución por 3 horas. Después de lavar con búfer de fosfato la matriz se incubó en una solución de Polimyxina B sulfato (Sigma), 1 mg/ml, por una noche bajo circulación. La matriz se lavó finalmente con un búfer de fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 2 se conjugó con un receptor recombinante TNF- α (Enbrel, Wyeth, Reino Unido) a una concentración de 5 mg/ml en búfer de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) de 0.1 M, (Sigma), pH 4.8. Treinta mg/ml de una solución acuosa de WCCM se adicionaron y la matriz se incubó por una noche a 8°C. La matriz finalmente se lavó con búfer fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

El contenido de receptor TNF- α en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución de búfer de receptor TNF- α antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 22

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 se conjugó con un anticuerpo antihumano TNF- α (Sigma) usando un glutardialdehído al 1.0% en un búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,5. La matriz se incubó con la solución búfer de anticuerpo TNF- α por 3 horas. Después de lavar la matriz porosa con búfer de fosfato, se adiciona anticuerpo antihumano TNF- α (1 mg/ml) en búfer de fosfato y se incubó a temperatura ambiente por 6 horas bajo recirculación a una tasa de flujo de 1 ml/min. La matriz se lavó finalmente con búfer de fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

El contenido de anticuerpo TNF- α en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución de búfer de anticuerpo TNF- α antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 23

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 se conjugó con proteína humana bactericida de permeabilidad incrementada (BPI) (Wieslab, Sweden) a una concentración de 2 mg/ml en un búfer de MES de 0,1 M, pH 4,8. Se adicionó una solución acuosa de WCCM a esta matriz a una concentración de 15 mg/ml y se incubó la matriz por una noche a 8°C. La matriz se lavó finalmente con búfer de fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

El contenido de BPI en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó indirectamente por medio de espectroscopia UV de la solución búfer de BPI antes y después de la incubación con la matriz porosa.

Ejemplo 24

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 15 se incubó en una solución de DOC en búfer MES de 0,1 M, pH 4,8, a una concentración de 1 mg/ml. Luego se adicionó una solución acuosa de WCCM y la matriz se incubó por una noche a 8°C. La matriz se lavó finalmente con búfer de fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

ES 2 266 797 T3

El contenido DOC en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó tal como en el ejemplo 17.

Conjugación de ligandos con el separador

Ejemplo 25

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 se activó con glutardialdehído al 1,2% en búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,0 por 24 horas a temperatura ambiente. La matriz se lavó con búfer y posteriormente se incubó por 24 horas en 1,6-diaminohexano (DAH) (Sigma), 50 mg/ml, en búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,0. Después se adicionó cianoborohidruro de sodio (Sigma) de 10 mg/ml a la solución. La matriz porosa se lavó con búfer de fosfato de 0,1 M y luego se incubó en una solución de DOC (1 mg/ml) en búfer MES de 0,1 M, pH 4,8. Luego se adicionó una solución acuosa de WCCM y se incubó la matriz por una noche a 8°C. La matriz se lavó finalmente con búfer de fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

El contenido de DOC en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó tal como en el ejemplo 17.

Ejemplo 26

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 5 se activó por 24 horas a temperatura ambiente con glutaraldehído al 1,2% en búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,0. La matriz se lavó con búfer y se incubó por 24 horas con dihidrazida atípica (Aldrich) a una concentración de 10 mg/ml en búfer de fosfato de 0,2 M, pH 7,4. Luego se adicionaron 10 mg/ml de cianoborohidruro de sodio (Sigma) a la solución.

La matriz porosa se lavó con búfer de fosfato de 0,1 M y se incubó luego con una solución de DOC a una concentración de 1 mg/ml en búfer MES de 0,1 M, pH 4,8. Luego se adicionó una solución de WCCM y se incubó la matriz por una noche a 8°C. La matriz se lavó finalmente con búfer fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

El contenido de DOC en la superficie de la estructura porosa de la matriz obtenida se determinó tal como en el ejemplo 17.

Ejemplo 27

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 10 se conjugó con DOC usando una solución acuosa de WCCM. A la matriz porosa de policarbonato se adicionó revolviendo una solución de agua de 300 ml de DMF al 40% (Sigma) que contiene 1 mmol de deoxicolato de sodio. El pH de la solución se ajustó a 4,8 con HCl de 0,3 M. Una solución de 6 mM de WCCM en DMF:agua (1:1,8) se adicionó por un período de 10 minutos y se mantuvo la suspensión a un pH 4,8 por 3 horas mediante adición periódica de 0,3 M de HCl. Luego se mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas.

El contenido de DOC en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó tal como en el ejemplo 17.

Ejemplo 28

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 14 se activó por 10 horas a temperatura ambiente con glutardialdehído al 1,2% en búfer fosfato de 0,2 M, pH 7,0, y luego se enjuagó con cantidades excesivas de búfer. Se introdujo en la matriz porosa polietilenimina (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml en búfer de bicarbonato de 0,1 M, pH 8,0; y la matriz se incubó con la solución por 16 horas.

Luego se lavó la matriz con búfer y se conjugó con DOC usando una solución acuosa de WCCM. Se adicionó revolviendo una solución de 300 ml 40% de DMF en agua que contiene 1 mmol de deoxilato de sodio a la matriz porosa. El pH se ajustó a 4,8 con HCl de 0,3 M. Se adicionó luego una solución de 6 mM de WCCM en DMF:agua (1:1,8) por un período de 10 minutos. La suspensión se mantuvo en pH 4,8 por 3 horas mediante la adición periódica de HCl de 0,3 M. Luego se mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas.

El contenido de DOC en la superficie de estructura porosa de la matriz obtenida se determinó tal como en el ejemplo 17.

Ejemplo 29

La matriz polietilénica porosa obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 se activó por 24 horas a temperatura ambiente con glutardialdehído al 1,2% en búfer fosfato de 0,2 M, pH 7,0. La matriz se lavó luego con el búfer y se incubó por 24 horas con 1,6-diaminohexano (DAH) (Sigma) a una concentración de 50 mg/ml en búfer fosfato de 0,2 M, pH 7,0. La matriz porosa se lavó luego con búfer fosfato de 0,1 M y se incubó por 12 horas a 8°C como una suspensión en una solución del receptor de TNF- α (Enbrel, Wyeth, UK) a una concentración de 10 mg/ml en búfer fosfato de 0,1 M, pH 7,4. Luego a la suspensión se adicionó una solución de cianoborohidruro de sodio (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml. La matriz finalmente se lavó con búfer fosfato de 0,1 M, pH 7,4.

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

5 *Enlazamiento selectivo y separación de los componentes de la sangre*

Las separaciones de célula se llevaron a cabo permitiendo que la sangre entera pase por un filtro de una matriz con forma de disco que tiene una superficie activa de 0,02 m².

10 La remoción de las endotoxinas y citoquinas se realizó con el sistema de prueba mostrado en la figura 4. Se conectó un contenedor 8, lleno con hasta 2 L de sangre entera o plasma, con una bomba 9, un monitor de presión 10 y un dispositivo de filtro 1 con hasta 40 platos de matriz; es decir, suministrándose una superficie activa de hasta 7 m², la cual tiene una porosidad entre 70 y 130 micrones.

15 *Separación celular*

Ejemplo 30

20 Una matriz magnética porosa que comprende una mezcla de polietileno y ferrite magnética (80% FeO, 20% BaO₂, Porex Technologies, Alemania), que tenía una porosidad de 10^o micrones, se usó para separar leucocitos de sangre entera usando anticuerpos anti CD45+ específicamente etiquetados (MACS Microperlas Anticuerpos; Miltenyi Biotec, Alemania). Después de un etiquetado magnético de los leucocitos con tales anticuerpos, se permitió que la sangre pasara por la matriz porosa.

25 El conteo de células de leucocitos se llevó a cabo usando un Contador de Células automático, el cual después de la separación mostró una reducción del contenido de leucocito en la sangre de 90%.

Ejemplo 31

30 La superficie de una matriz de diacetato de celulosa poroso (Tenite, Eastman Chemicals, USA), que tiene una porosidad de 200 micrones y una superficie activa de 0,2 m² fue usada para separación de células fagocitantes de sangre humana tales como neutrofilos y monocitos. Se recolectó sangre humana entera en tubos vacutainer de EDTA (B&D, UK) y se permitió a la sangre pasar por la matriz porosa.

35 La reducción en el número de neutrofilos y monocitos en la sangre recogida fue de 50% y 35%, respectivamente, tal como se determinó por microscopía por conteo diferencial de células en una cámara Bürkner usando Reactivo Türks.

Remoción de Citoquina

40 Ejemplo 32

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 22, que había sido revestida con grupos de remoción de endotoxinas, se usó como discos porosos en el sistema de prueba mostrado en la figura 4.

45 La eliminación de TNF- α de la sangre entera se investigó después de inmovilizar anticuerpos policlonales contra TNF- α con glutardialdehído sobre los grupos aminos en la estructura polimérica porosa. Se indujo la producción de TNF- α mediante la adición de LPS a la sangre y la sangre entera activada se vertió difundiéndose por el filtro inmovilizado en el dispositivo.

50 Las cantidades de TNF- α en la sangre entera (figura 5) se determinaron pre (♦) y post (■) el dispositivo mediante un inmunoensayo de enzima (Enzymimmuno-ensayo, Milenia Biotec GmbH, Alemania) para estudiar la captación de TNF- α por parte de los discos de filtro.

55 Tal como se ve, se podría obtener una reducción considerable de las concentraciones patológicas de TNF- α en sangre entera.

Remoción de Endotoxina

60 Ejemplo 33

La matriz obtenida de acuerdo con el ejemplo 25, es decir una matriz polietilénica modificada con plasma, que tiene DOC en ella, fue inmovilizada por medio de un espaciador o separador de diaminohexano, que primero había sido acoplado a la matriz por el glutardialdehído y luego al deoxicolato usando carbodiimida. La matriz obtenida se usó como discos porosos en el dispositivo de filtro del sistema mostrado en la figura 4.

La eliminación de LPS de plasma se llevó a cabo de una manera similar a la del ejemplo 32.

ES 2 266 797 T3

La cantidad de LPS en plasma se determinó mediante un ensayo de Lisado de Limulus Amebocita (Endochrome-K, Charles River Laboratories Inc. USA) en masa en diferentes intervalos de tiempo durante la recirculación a través del dispositivo de filtro.

En la figura 6 se muestra la reducción de la cantidad de endotoxina (pg/ml) con el tiempo. Después de una recirculación de 3 h la carga de endotoxina se redujo desde 75 pg/ml, al inicio, hasta 15 pg/ml que es el límite de detección.

Ejemplo 34

Las matrices obtenidas de acuerdo con el ejemplo 3 (grupos aminos no inmovilizados) y el ejemplo 17 (DOC inmovilizado), respectivamente, se usaron como discos porosos y se compararon con referencia a su habilidad de eliminar LPS. Se llevó a cabo un estudio de recirculación similar al del ejemplo 33 con la diferencia de que se disolvió LPS en agua destilada.

La eliminación de LPS de la solución de agua se determinó tal como se muestra en la figura 4 mientras se recirculaba a una tasa de flujo de 0,22 ml/min a través de cada filtro en un dispositivo de 10 ml.

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

TABLA 1

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

La diferencia en el grado de eliminación entre el plasma (ejemplo 34) y agua (ejemplo 35) se puede explicar mediante interacciones competitivas de proteínas, LPS y el ligando.

Remoción combinada

Ejemplo 35

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

Las dos matrices de especificidad diferente se conectaron en serie en un sistema de prueba de bucle cerrado de dos dispositivos de filtro, tal como se muestra en la figura 4. La sangre entera en un contenedor se mantuvo a 37°C, se activó mediante la adición de LPS y se introdujo al sistema. El muestreo se llevó a cabo en diferentes intervalos de tiempo simultáneamente del contenedor y de las salidas del filtro para análisis de citoquinas.

Para ambas matrices los resultados mostraron un decrecimiento en las concentraciones de citoquina de 70% y 55% para TNF- α e IL-1 β , respectivamente.

La tabla 2 de abajo muestra un resumen de la aplicabilidad versátil y la eficacia considerable del método inventivo para un enlazamiento selectivo y separación de diferentes componentes de la sangre entera o de un fluido corporal. Para este propósito se han usado diferentes matrices porosas como soporte para la conexión de ligandos con o sin separador o espaciador. De esta manera, se han llevado a cabo métodos de inmovilización con glutardialdehído usando dos terminales -NH₂ y con 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida con un terminal -NH₂ y un terminal -OH o -COOH, respectivamente. También se ha usado silanización a través de aldehído o reactivos funcionales de acoplamiento de amino silano para enlazamiento específico de grupos amino, anticuerpos, enzimas, péptidos, proteínas; grupos de aldehído que reaccionan espontáneamente con aminas, péptidos y proteínas.

TABLA 2

Matriz Porosa	Método	Espaciador	Ligando	Componente	Eficacia %
Polietileno	-	HA	DOC	LPS	80.1
Polietileno	-	Poli-Lis	DOC	LPS	12.8
Polietileno	-NH ₂	DAH	DOC	LPS	29.6
Polietileno	-NH ₂	-	DOC	LPS	12.5
Polietileno	-NH ₂	DAH	Polimixina B	LPS	16.3
Polietileno	NH ₂	DAH	Arginina	LPS	14.3
Polietileno	-NH ₂	DAH	Recombunin	LPS	18.3
Polietileno	-NH ₂	-	Anti-TNF- α Ab	TNF- α	63.2
Polietileno	Alilamina	PEI	DOC	LPS	33.4
Polietileno	Alilamina	Poli-Lis	DOC	LPS	85.5
Polietileno	-COOH	-	TNF- α Receptor	TNF- α	59.2
Polietileno	-COOH	-	Interleuquina-1 Receptor	IL-1	64.0
Polietileno	-COOH	-	Trombomodulina	Trombina	70.8
Polietileno	-COOH	-	BPI	LPS	91.2
Polietileno	-OH	Sil.ald.	TNF- α Receptor	TNF- α	61.8
Polietileno	-OH	Sil.ald.	Interleuquina-1 Receptor	IL-1	62.0
Polietileno	-OH	Sil.ald.	Trombomodulina	Trombina	73.7
Polietileno	-OH	Sil.ald.	BPI	LPS	89.3
Polietileno	HA	DAH	DOC	LPS	9.
Polietileno	Poli-Lis	DAH	DOC	LPS	73.3
Polietileno	Recombunina	-	DOC	LPS	20.8
Polietileno	-NH ₂	GDA	Anti CD 11b Ab	Granulocitos y monocitos	50.2
Polietileno	-OH	Sil.ald.	Anti CD 11b Ab	Granulocitos y monocitos	56.1
Policarbonato	-	Poli-Lis	DOC	LPS	44.4
Policarbonato	-OH	Sil.Ald	TNF- α Receptor	TNF- α	75.9
Policarbonato	-COOH	-	Trombomodulina	Trombina	72.0
Poliuretano	-	DAH	DOC	LPS	0.2
Poliuretano	-	DAH	Recombunina	LPS	18.5
Poliuretano	-	Poli-Lis	DOC	LPS	4.8
Poliuretano	-	Sil.Ald	TNF- α Receptor	TNF- α	6.7

Matriz Porosa	Método	Espaciador	Ligando	Componente	Eficacia %
Poliuretano	-	Sil.Ald	BPI	LPS	88.0
Silicona	-	Sil.Ald	TNF- α Receptor	TNF- α	55.3
Silicona	-	Sil.Ald	Trombomodulina	Trombina	68.2
Zeolita	-	Sil.Ald	TNF- α Receptor	TNF- α	63.9
Zeolita	-	Sil.-NH ₂	DOC	LPS	48.3
Zeolita		Sil.Ald	Interleuquina-1 Receptor	IL-1	60.1
Celulosa	CNBr	DAH	DOC	LPS	28.5
Celulosa	CNBr	Poli-Lis	DOC	LPS	39.2
PTFE	Alilamina	DAH	TNF- α Receptor	TNF- α	73.0
PTFE	-COOH	-	Interleuquina-1 Receptor	IL-1	77.7
Abreviaciones: BPI = Proteína bactericida que incrementa permeabilidad; DAH = 1,6-diamino-hexano; DOC= deoxicolato; EDC= 1-etil-3(3-dimetilaminopropilo)carbodiimida; GDA = glutardialdehído; HA = ácido hialurónico; IL-1 = Interleuquina-1; PEI = polietilenimina; Recombumina = albúmina humana recombinante; Sil.ald. = Reactivo de acoplamiento de aldehído funcional silano; Sil.-NH ₂ = reactivo de acoplamiento de amino funcional silano; TNF- α = factor- α de necrosis tumoral.					

REIVINDICACIONES

1. Un método para enlazar selectivamente y separar por lo menos un componente de un fluido corporal, el cual
5 comprende: hacer pasar un fluido corporal, tal como sangre entera, a través de una matriz rígida integral de separación sin estar excluido por dicha matriz, teniendo dicha matriz una estructura porosa con un tamaño de poro que abarca desde 5 micrones hasta 500 micrones así como también una superficie activa que abarca desde 0,5 cm² hasta 10 m², enlazando por lo menos un componente de fluido corporal por al menos un grupo funcional dispuesto en dicha matriz, por lo cual dicha matriz se obtiene mediante un proceso seleccionado del grupo que comprende los procesos
10 de sinterizar, moldear y espumar.
2. El método tal como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende: revestir o modificar la superficie de dicha estructura porosa de dicha matriz para colocar dicho, por lo menos uno, grupo funcional en dicha estructura porosa, mediante lo cual dicho, por lo menos uno, grupo funcional solo o en combinación con regiones no funcionalizadas de
15 dicha estructura porosa es capaz de enlazar dicho, al menos uno, componente.
3. El método tal como se reivindica en la reivindicación 1 en el cual dicha matriz está hecha de un material seleccionado del grupo que comprende: metal, óxido inorgánico, carbón, vidrio, cerámica, polímero sintético y un polímero natural y las combinaciones de los mismos.
20
4. El método tal como en la reivindicación 3, en el cual dicha matriz se hace de un metal ferromagnético.
5. El método tal como en las reivindicaciones 3 ó 4 en el cual dicho material se reviste de un polímero sintético o natural.
25
6. El método tal como en las reivindicaciones 3 ó 5, en el cual dicho polímero sintético se selecciona del grupo que comprende: una poliolefina, un polímero vinílico, un polímero que contiene flúor, un poliacrilato, una poliamida, una poliimida, una poliimina, un poliestireno y sus copolímeros, una goma de silicona, un poliéster, un policarbonato, un poliuretano, un polisulfonato, un poliglicol, un poliéter y un polialquidóxido y un copolímero y un híbrido de los
30 mismos.
7. El método tal como en las reivindicaciones 3 ó 5, en el cual dicho polímero natural se selecciona del grupo que comprende un polisacárido, un policarbohidrato, un ácido de poliamina, un ácido poliláctico o un ácido poliglicólico y un copolímero y un híbrido de los mismos.
35
8. El método, tal como en la reivindicación 2, en el cual dicha modificación de superficie se selecciona del grupo que comprende: electrodeposición, electroevaporación, deposición química por plasma, deposición desde un flujo de plasma iónico, polimerización de plasma, deposición de polímero de superficie aumentada con plasma y deposición de vapor químico.
40
9. El método tal como en la reivindicación 2, en el cual dicho, al menos uno, grupo funcional se selecciona del grupo que comprende: un sulfhidrilo, un carboxilato, una amina, un aldehído, una cetona, un hidroxilo, un halógeno, una hidracida o un hidrógeno activo.
- 45 10. El método tal como en la reivindicación 2, en el cual un ligando se acopla con dicho, cuando menos uno, grupo funcional de una manera covalente.
11. El método tal como en la reivindicación 10, en el cual dicho ligando se selecciona del grupo que comprende: una proteína, un péptido, un anticuerpo o un fragmento de los mismos, un carbohidrato, un polisacárido, una hormona, un
50 antioxidante, una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, una vitamina soluble en grasa, un ácido biliar, un colorante reactivo, alantoina, ácido úrico o polimixina o combinaciones de los mismos.
12. El método tal como en las reivindicaciones 10 u 11, en el cual se acopla covalentemente un reticulador entre dicho, al menos uno, grupo funcional y dicho ligando.
55
13. El método tal como en la reivindicación 12, en el cual dicho reticulador se selecciona del grupo que comprende un reticulador homobifuncional, uno heterobifuncional y uno trifuncional.
14. El método tal como en las reivindicaciones 12 ó 13, en el cual dicho reticulador se acopla covalentemente como
60 un separador entre dicho, al menos uno, grupo funcional y dicho ligando.
15. El método tal como en la reivindicación 14, en el cual dicho separador se selecciona del grupo que comprende: un silano, un diisocianato, un glicolato, un polietilenglicol, un reactivo de succinimidilo, una dihidrazina, ácido adipídico, una diamina, un aminoácido, un ácido oligoamino, un poliaminoácido, un péptido y una proteína.
65
16. El método, tal como en la reivindicación 1, en el cual dicha matriz de separación tiene la forma seleccionada del grupo que comprende: un disco, una barra, un cilindro, un anillo, una esfera, un tubo y un tubo hueco.

ES 2 266 797 T3

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual dicho tamaño de poro es desde 50 micrones hasta 500 micrones.

18. El método tal como en cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17, que se lleva a cabo en un dispositivo (1) que comprende una carcasa (2), una entrada (3), una salida (4), y dicha, por lo menos una, matriz de separación (5a, 5b, ...).

19. El método tal como en la reivindicación 18, en el cual dicho dispositivo tiene por lo menos dos matrices de separación (5a, 5b, ...), las cuales, cada una de ellas, remueven selectivamente y por separado por lo menos un componente de un fluido corporal.

20. El método tal como se reivindica en la reivindicación 19, en el cual dichas, por lo menos dos, matrices de separación (5a, 5b, ...) remueven por lo menos dos componentes de un fluido corporal.

21. El método tal como se reivindica en la reivindicación 20 en el cual una primera matriz de separación remueve un primer componente y una segunda matriz de separación remueve un segundo componente de un fluido corporal.

22. El método de las reivindicaciones 19, 20 ó 21, en el cual por lo menos una de dichas matrices de separación tiene un tamaño de poro desde 50 micrones hasta 500 micrones.

23. El método tal como en cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 22, en el cual la tasa de flujo a través de dicho dispositivo es desde 5 ml/h hasta 6 000 ml/min.

24. Un dispositivo para enlazar selectivamente y separar por lo menos un componente de un fluido corporal de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende una carcasa (2), una entrada (3), una salida (4) y por lo menos una matriz de separación (5a, 5b, ...), que es rígida e integral para dejar pasar dicha sangre o fluido corporal a través de sí, la cual tiene una estructura porosa con un tamaño de poro que abarca desde 5 micrones hasta 500 micrones así como también una superficie activa en un rango desde 0,5 cm² hasta 10 m², la cual es capaz de enlazar dicho, por lo menos uno, componente, donde dicha matriz de separación tiene una estructura porosa obtenida mediante un proceso seleccionado del grupo de: proceso de sinterizar, moldear y espumar.

25. El dispositivo tal como se reivindica en la reivindicación 24, en el cual dicha matriz tiene un tamaño de poro desde 50 micrones hasta 500 micrones.

26. El dispositivo tal como se reivindica en las reivindicaciones 24 ó 25, donde dicho dispositivo tiene por lo menos dos matrices de separación (5a, 5b, ...), cada una de ellas remueve selectivamente y por separado por lo menos un componente de sangre entera o de un fluido corporal.

27. El dispositivo tal como se reivindica en la reivindicación 26, en el cual dichas por lo menos dos matrices de separación (5a, 5b, ...) remueven por lo menos dos componentes de un fluido corporal.

28. El dispositivo tal como se reivindica en la reivindicación 27, en el cual una primera matriz de separación remueve un primer componente y una segunda matriz de separación remueve un segundo componente de un fluido corporal.

29. El dispositivo tal como se reivindica en las reivindicaciones 26, 27 ó 28, en el cual por lo menos una de dichas matrices tiene un tamaño de poro desde 50 micrones hasta 500 micrones.

30. El dispositivo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, en el cual dicha matriz de separación tiene la forma de un disco, una barra, un cilindro, un anillo, una esfera, un tubo o un tubo hueco.

31. El dispositivo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el cual dicha matriz de separación comprende varios discos dispuestos uno después de otro en la dirección de flujo para que el fluido corporal se disponga para pasar un disco y luego fluya por la superficie entera del siguiente disco.

32. El dispositivo tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31, en el cual se lleva a cabo una modificación de superficie por medio de un proceso seleccionado del grupo de electrodeposición, electroevaporación, deposición química por plasma, deposición de un flujo de plasma iónico, polimerización por plasma, deposición polimérica de superficie aumentada por plasma y deposición química de vapor.

Fig 1

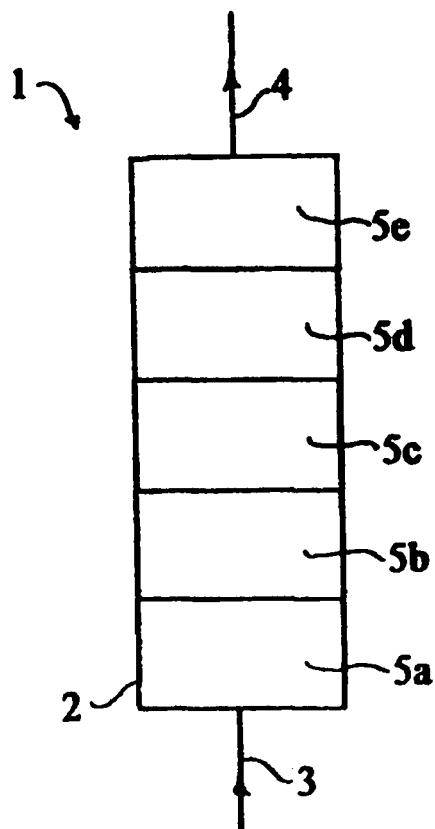


Fig 4

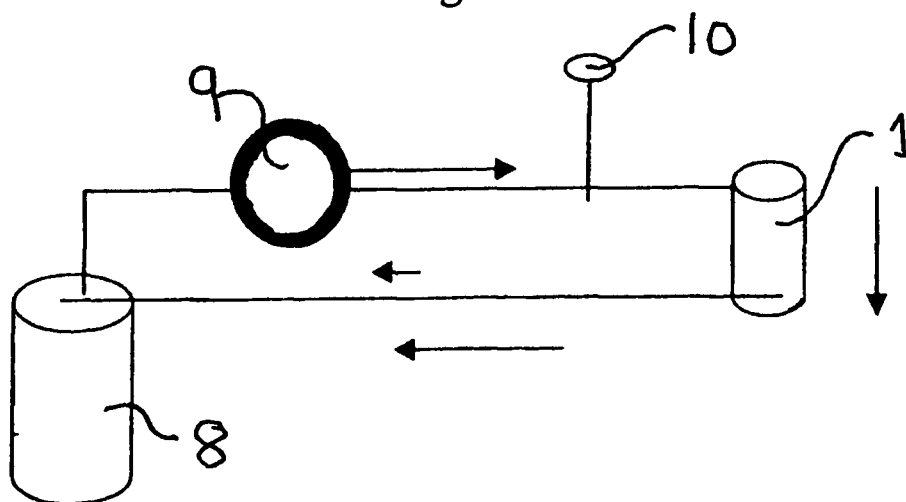
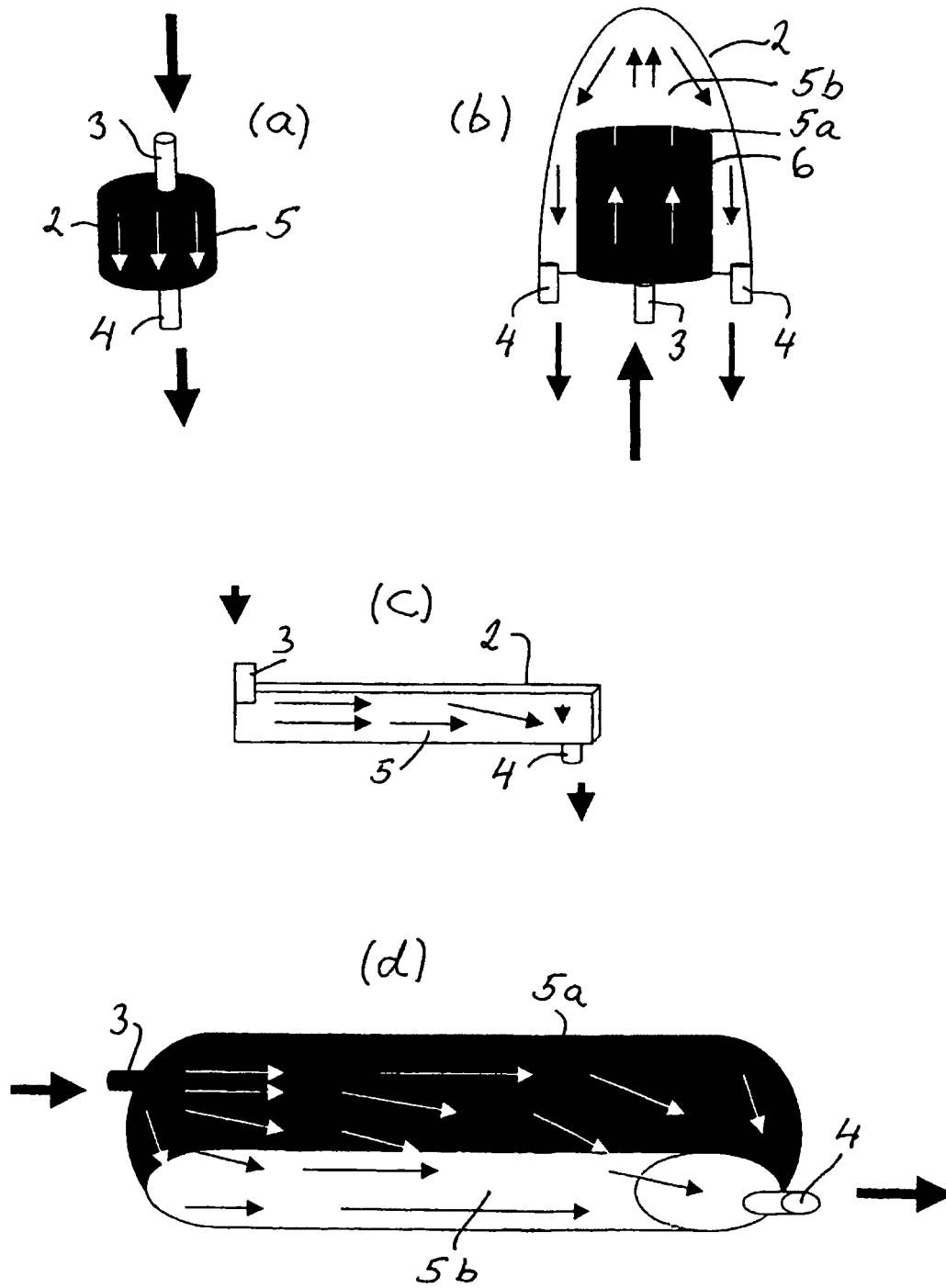


FIG 2



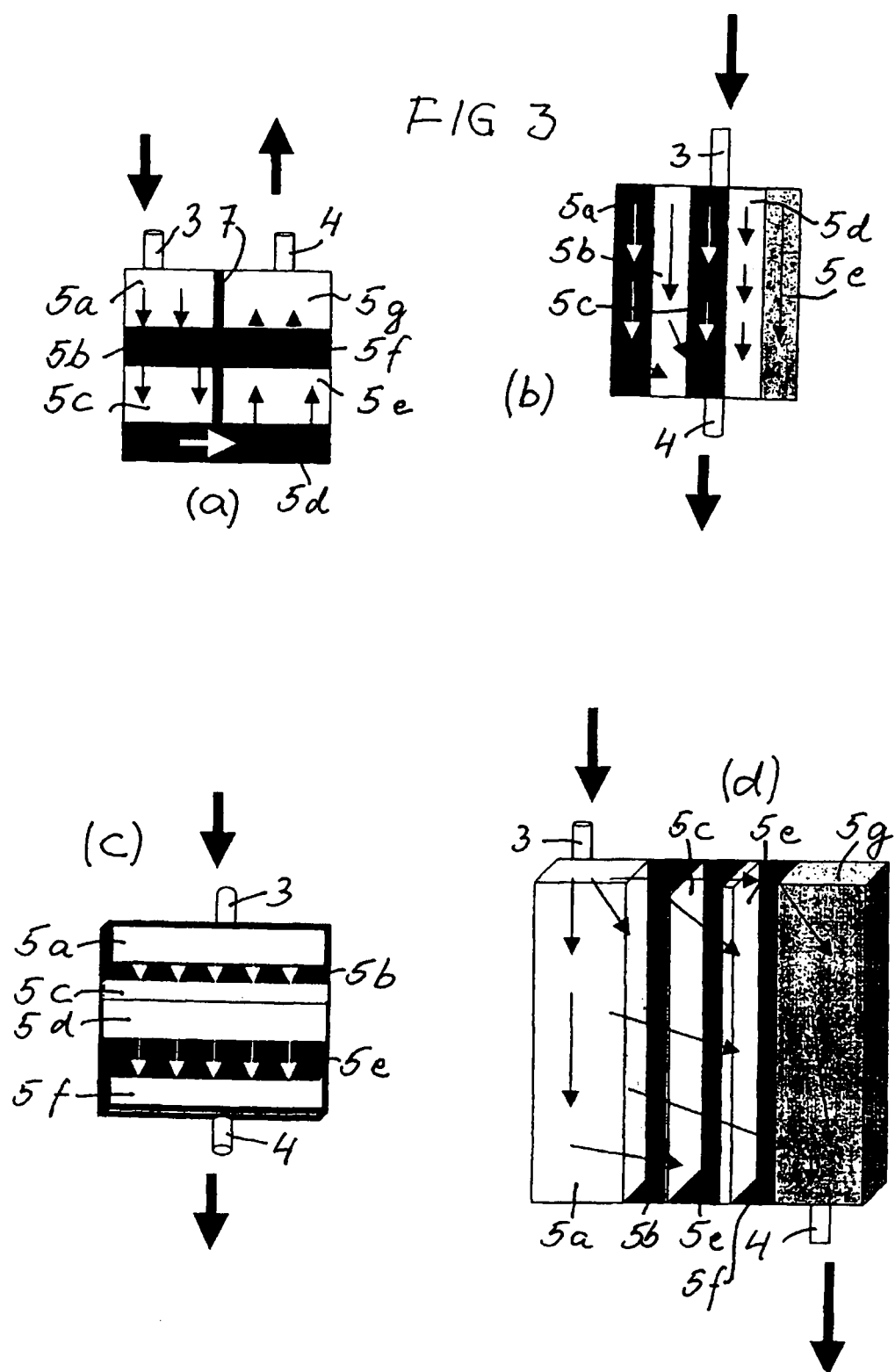


Fig 5

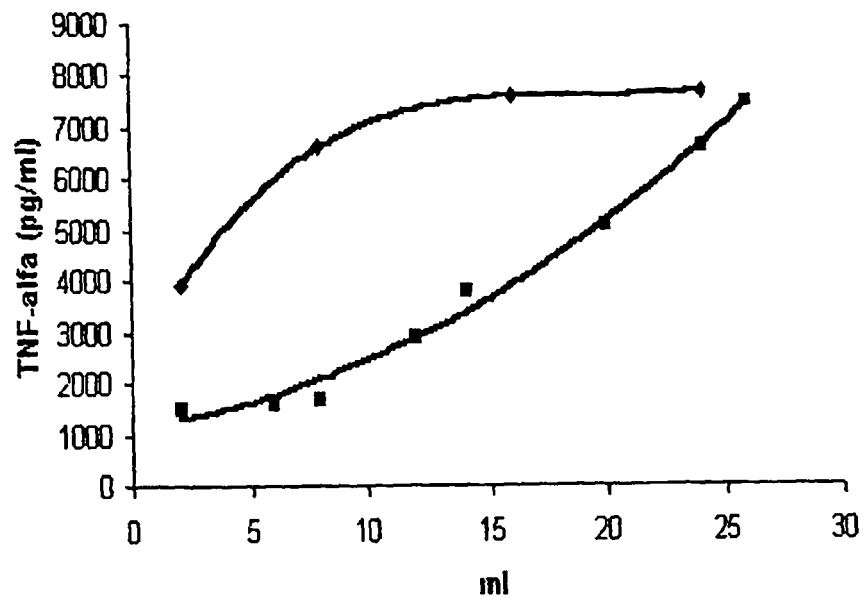


Fig 6

pg LPS/ml

