



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619820-1 A2**

(22) Data de Depósito: 13/12/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)



(51) *Int.Cl.:*
A61M 1/34
A61K 31/70

(54) Título: MÉTODO DE REMOÇÃO
EXTRACORPÓREA DE UM MICRÓBIO PATOGENICO,
UMA CÉLULA INFLAMATÓRIA OU UMA PROTEÍNA
INFLAMATÓRIA DO SANGUE

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2005 SE 05 02750-3

(73) Titular(es): Exthera AB

(72) Inventor(es): Olle Larm, Thomas Bergström

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT SE2006001421 de
13/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/069983de
21/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE REMOÇÃO EXTRACORPÓREA DE UM MICRÓBIO PATOGENICO, UMA CÉLULA INFLAMATÓRIA OU UMA PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DO SANGUE. A presente invenção refere-se a um método de remoção extra- corpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos/uso de um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato possuindo afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, para remoção extracorpórea do referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos/uso de um carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, em que o referido carboidrato é imobilizado em substrato sólido ao ser preparado um dispositivo para tratamento de uma condição causada ou agravada pelo referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória / e um método de tratamento de um indivíduo mamífero, sofrendo de uma condição causada ou agravada por micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória.



PI0619820-1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO DE REMOÇÃO EXTRACORPÓREA DE UM MICRÓBIO PATOGENICO, UMA CÉLULA INFLAMATÓRIA OU UMA PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DO SANGUE".

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método de remoção extracorpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos; uso de um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, para remoção extracorpórea do referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória do sangue de mamíferos; uso de um carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, em que o referido carboidrato é imobilizado em substrato sólido ao ser preparado um dispositivo para tratamento de uma condição causada ou agravada pelo referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, e um método de tratamento de um indivíduo mamífero, sofrendo de uma condição causada ou agravada por micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória.

20 Antecedentes da Invenção

Biologia

Durante uma longa evolução, muitos microorganismos patogênicos aprenderam a fazer uso de glicoconjugados presentes na superfície de células eucarióticas, ou seja, glicolipídeos, glicoproteínas e proteoglicanos, como moléculas receptoras para fixação celular de forma a facilitar processos de colonização e invasão em tecidos. Em resumo, proteínas específicas, denominadas adesinas, da superfície de bactérias, vírus, fungos e parasitas, interagem com cadeias de carboidratos de glicoconjugados, possibilitando que micróbios colonizem superfícies de mucosas e lesões de tecidos.

30 O papel do ácido siálico na ligação de patógenos a células hospedeiras tem sido relatado por muitos anos. Somente recentemente, foi demonstrado que proteoglicanos, por meio de suas cadeias de carboidratos

(glicosaminoglicanos), ligam-se a muitos patógenos diferentes. Pela remoção dos grupamentos terminais de carboidratos destes vários glicoconjugados, pela sialidase e outras exoglicosidases ou com enzimas que degradam o glicosaminoglicano (GAG), presentes nas células em monocamadas, foi
5 comprovado que essas estruturas são moléculas receptoras de várias sialoadesinas e de proteínas que se ligam a heparano sulfato (HeBPs).

Esses mecanismos estão resumidos em um artigo de revisão por Siiri Hirno, Meeme Utt e Torkel Wadström, *Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Volume 12, incluindo Procedimentos da 17ª Reunião Inter-
10 nacional sobre Lecitina em Würzburg, 1997, editado por Edilbert van Driessche, Sonia Beeckmans e Thorkild C. BØg-Hansen, publicado por TEXTOP, Lemchesvej 11, DK-2900 Hellerup, Dinamarca ISBN número 87-984583-0-2.

Durante infecções microbianas, mediadores inflamatórios são liberados e ativados. Estas assim chamadas "citocinas pró-inflamatórias"
15 incluem fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e TNF- β), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas fazem parte da resposta inflamatória a sepsia. A falência múltipla de órgãos, induzida por sepsia, é atualmente a principal causa de óbitos em unidades de tratamento intensivo.

Com relação a infecções microbianas e cirurgia cardiovascular,
20 por exemplo, desvio cardiopulmonar, respostas inflamatórias são produzidas com uma diversidade de conseqüências biológicas que variam de disfunção orgânica subclínica a falência grave de múltiplos órgãos. Acredita-se que as citocinas sejam importantes mediadores nesta resposta.

As citocinas mencionadas acima têm a capacidade de se liga-
25 rem seletivamente a uma gama de glicosaminoglicanos, ou GAGs, incluindo sulfato de heparano em tecidos e sobre a superfície de células endoteliais e de leucócitos.

Receptores

Sulfato de heparano é um glicosaminoglicano que está presente
30 sobre a superfície de quase todas as células de mamíferos. Ele é formado por resíduos que se alternam de D-glucosamina e ácido urônico (L-idurônico e D-glucurônico). Os sulfatos de heparano são polissacarídeos heterogê-

neos altamente carregados (sulfatados), representando a porção carboidrato de muitos glicoconjugados (sindecano, perlecano, glipicano) sobre a superfície celular.

5 Muitos micróbios utilizam sulfatos de heparano, sobre a superfície celular de mamíferos como receptores. Esse mecanismo é geral e válido para praticamente todas as bactérias, vírus e parasitas. Alguns microorganismos utilizam mais de um receptor glicoconjugado. Exemplos de outros receptores, utilizados junto com heparano sulfato, são sulfatos específicos de condroitina e glicoproteínas contendo ácido siálico.

10 Micróbios que se ligam a heparano sulfato/sulfato de condroitina são exemplificados por vírus como vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), agente causador do herpes orolabial; vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2), agente causador de herpes genital; citomegalovírus (CMV), o principal agente de complicações em pacientes imunodeprimidos; vírus da dengue, que
15 causa febres recorrentes e vírus da imunodeficiência humana (HIV); e por bactérias como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*; e parasitas como *Plasmodium falciparum* (que causa malária) e *Trypanosoma cruzi* (que causa tripanossomíase).

20 E mais, citocinas, como TNF- β , também utilizam heparano sulfato em superfícies celulares para ligação e ativação.

Heparina atuando como receptor

A heparina é um polissacarídeo isolado de tecido de mamíferos. Desde a sua descoberta em 1916 pelo cientista americano McLean, a heparina tem sido reconhecida por suas propriedades anticoagulantes do sangue
25 e tem sido utilizada, por mais de 50 anos, clinicamente como anticoagulante sangüíneo e agente antitrombótico.

Enquanto que heparano sulfatos são componentes abundantes de todas as formas de vida animal com tecidos organizados, a heparina possui distribuição bastante especial em tecidos de mamíferos. A heparina, ao
30 contrário dos heparano sulfatos, está presente somente nos grânulos basofílicos de mastócitos. No entanto, atualmente, além de seu lugar estabelecido

na prevenção e terapia de distúrbios tromboembólicos, a heparina demonstrou ter um amplo espectro de atividades diferentes, independentes de anticoagulação.

Um grande número de proteínas no sangue liga-se, com alta afinidade, a heparina e/ou heparano sulfato. Exemplos destas incluem anti-trombina (AT), fibronectina, vitronectina, fatores de crescimento (por exemplo, os fatores de crescimento de fibroblastos, os fatores de crescimento semelhantes à insulina etc.). A albumina sérica humana (HSA) liga-se também, porém com menor afinidade. Por outro lado, a HSA está presente em grandes quantidades no sangue.

A fim de serem utilizadas estas propriedades da heparina para impedir infecções, foi cogitada a introdução de fragmentos de heparina e/ou fragmentos contendo ácido siálico no sistema vascular. Por meio desta, acreditava-se que estes fragmentos se ligariam às lectinas nos micróbios, bloqueando-as e, dessa forma, impedindo que elas se ligassem aos receptores na superfície celular de mamíferos. Esse conceito foi testado por muitos cientistas, porém com êxito limitado na maioria dos casos, em decorrência de complicações hemorrágicas quando quantidades grandes de heparina são introduzidas no sistema vascular.

A patente US 6.197.568 descreve métodos de isolamento e detecção de flavivírus e de outros vírus de febre hemorrágica, como vírus da dengue, fundamentados na interação de flavivírus e de outros vírus de febre hemorrágica, dependente de poliânions sulfatados.

Dispositivos extracorpóreos são utilizados em uma variedade de situações clínicas, incluindo diálise renal, desvio cardiopulmonar e plasmáfereze. "Terapias extracorpóreas" significam procedimentos nos quais produtos desejados, como oxigênio, anticoagulantes do sangue, anestésicos etc., podem ser acrescentados a líquidos corporais. Por outro lado, produtos não desejados, como toxinas etc., podem ser retirados de líquidos corporais para fora do corpo. Exemplos destas incluem hemodiálise e hemofiltração, as quais representam técnicas pelas quais o sangue é limpo pela retirada de produtos descartáveis.

Sumário da Invenção

Um objetivo da presente invenção é prover um método de tratamento de um mamífero que sofre de doenças ou condições, causadas ou agravadas por diferentes micróbios patogênicos, células inflamatórias ou proteínas inflamatórias pela remoção dos referidos micróbios patogênicos, células inflamatórias ou proteínas inflamatórias do sangue do referido mamífero.

Outro objetivo da presente invenção é prover um método de remoção extracorpórea de micróbios patogênicos, células inflamatórias ou proteínas inflamatórias de sangue de mamíferos.

Os objetivos supramencionados, bem como outros objetivos da invenção, os quais devem ser evidentes para um versado na técnica após ter examinado a descrição abaixo, são atingidos pelas diferentes características da presente invenção, conforme descritas neste pedido.

Uma primeira característica da presente invenção provê um método de remoção extracorpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos, compreendendo as etapas de:

- a) fornecimento de amostra de sangue de mamífero;
- b) pôr em contato a referida amostra com um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, sob condições que possibilitem a ligação de quaisquer micróbios patogênicos, células inflamatórias e proteínas inflamatórias, presentes na referida amostra de sangue, ao carboidrato,
- c) separação da amostra do substrato sólido, de forma que o referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória fique, pelo menos, parcialmente retido sobre o substrato sólido, e
- d) recuperação da referida amostra contendo uma quantidade reduzida do referido micróbio patogênico, célula inflamatória

ria ou proteína inflamatória.

O conceito anterior da técnica de introdução de fragmentos de heparina e/ou fragmentos contendo ácido siálico no sistema vascular dos pacientes exibiu êxito limitado, na maioria dos casos em decorrência de complicações hemorrágicas quando quantidades grandes de heparina são introduzidas no sistema vascular. O método de acordo com a invenção con-

5 torna esses problemas pela imobilização dos carboidratos em superfície sólida, conforme descrito inter alia no exemplo 6 Preparatório.

O uso de carboidratos imobilizados, conforme definido pelo método de acordo com a invenção, oferece também uma outra vantagem inesperada. Os inventores constataram que o carboidrato precisa estar imobilizado em uma superfície sólida para que tenha a capacidade necessária de ligar-se a uma quantidade significativa dos compostos a serem removidos. Essa propriedade inesperada é descrita nos exemplo 1 Comparativo e Ex-

10 xemplo 1 para HSV-1, que revela que, em solução, menos de 3% dos vírus ligam-se a heparina em excesso (exemplo 1 Comparativo), enquanto que mais de 94% dos vírus ligam-se a heparina imobilizada (Exemplo 1).

O método da presente invenção permite tratamento seguro e eficiente de pacientes que sofrem de sepsia ou choque séptico, pela remo-

20 ção de patógenos, causadores da condição, da circulação sangüínea do paciente. O método da presente invenção possibilita a remoção de muitos micróbios patogênicos, células inflamatórias e proteínas inflamatórias diferentes. Exemplos de micróbios patogênicos comumente associados a sepsia, os quais podem ser removidos empregando o método da invenção, incluem

25 estafilococos, como *Staphylococcus aureus*, *streptococci* e *E. coli*.

Como a heparina e heparano sulfatos ligam-se a um grande número de componentes, conforme exemplificados na seção de antecedentes, foi previsto que uma superfície contendo heparina seria coberta por muitas dessas proteínas, quando colocada em contato com sangue, impedindo,

30 dessa forma, que micróbios se fixassem. Os presentes inventores constataram surpreendentemente que é possível obter-se purificação altamente eficiente de soro e sangue total de mamíferos, incluindo seres humanos, em-

pregando um método e dispositivo de acordo com a presente invenção. Neste pedido, é descrito que uma coluna de tamanho moderado conseguiu remover quase que completamente quantidades consideráveis de vírus de soro sangüíneo e sangue total. Consultar, por exemplo, Exemplos 2, 3 e 4.

5 Em uma concretização, o referido micróbio patogênico é selecionado do grupo consistindo em bactérias, vírus e parasitas.

 Em uma concretização, o referido micróbio patogênico é um vírus. Em uma concretização mais específica, o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1, herpes simples tipo 2, vírus
10 *Influenza A*, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência humana. Em outra concretização mais específica, o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1 ou herpes simples tipo 2.

 Em outra concretização, o referido micróbio patogênico é uma bactéria. Em uma concretização mais específica, a referida bactéria é selecionada do grupo consistindo em *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*,
15 *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*. Em uma concretização preferida, o referido micróbio patogênico é *Helicobacter pylori* ou *Staphylococcus aureus*.

20 Em ainda outra concretização, o referido micróbio patogênico é um parasita. Em uma concretização mais específica, o referido parasita é selecionado do grupo consistindo em *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*.

 Em ainda outra concretização, a referida célula inflamatória é selecionada do grupo consistindo em linfócitos inflamatórios e macrófagos inflamatórios.
25

 Em ainda mais outra concretização, a referida proteína inflamatória é um citocina pró-inflamatória. Em uma concretização mais específica, a referida citocina pró-inflamatória é selecionado do grupo consistindo em
30 fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6).

 Em uma concretização, o referido sangue de mamíferos é san-

gue humano.

Em uma concretização do método da invenção, o referido carboidrato é selecionado do grupo consistindo em heparina, heparano sulfato, sulfato de condroitina, carboidratos contendo ácido siálico e carboidratos contendo ácido neurâmico. Em uma concretização mais específica, o referido carboidrato é heparina.

Em ainda outra concretização, o referido substrato sólido compreende micropartículas ou fibras ocas. Em certas concretizações da invenção, o material do referido substrato sólido é selecionado do grupo consistindo em vidro, celulose, acetato de celulose, quitina, quitosano, dextrano em reticulado, agarose reticulada, polipropileno, polietileno, polissulfona, poliacrilonitrila, silicone, Teflon e poliuretanos.

Em ainda outra concretização, o referido carboidrato é unido ao referido substrato sólido por ligação covalente. Em uma concretização mais específica, o referido carboidrato está unido ao referido substrato sólido por ligação covalente em ponto terminal. A ligação covalente de um carboidrato a um substrato sólido fornece melhor controle de parâmetros, como densidade de superfície e orientação das moléculas imobilizadas, em comparação à fixação não covalente. Foi demonstrado pelos inventores que estes parâmetros são importantes a fim de ser provida a ligação mais adequada do patógeno às moléculas imobilizadas do carboidrato. A concentração da superfície do carboidrato sobre o substrato sólido deve variar de preferência entre 1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A fixação covalente em ponto terminal significa que o carboidrato está fixado covalentemente ao substrato sólido por intermédio do resíduo terminal da molécula do carboidrato. Uma segunda característica da presente invenção provê o uso de um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, para remoção extracorpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos.

Concretizações de uso de acordo com a segunda característica da invenção correspondem àquelas especificadas acima para o método de

acordo com a primeira característica da presente invenção, em relação ao micróbio patogênico, célula inflamatória, proteína inflamatória, sangue de mamífero, carboidrato, substrato sólido e imobilização.

5 Uma terceira característica da invenção provê uso de um carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, em que o referido carboidrato é imobilizado em substrato sólido ao ser preparado um dispositivo para tratamento de uma condição, causada ou agravada por micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória.

10 Concretizações de uso de acordo com a terceira característica da invenção correspondem àquelas especificadas acima para o método de acordo com a primeira característica da presente invenção, em relação ao micróbio patogênico, célula inflamatória, proteína inflamatória, sangue de mamífero, carboidrato, substrato sólido e imobilização.

15 Um dispositivo, conforme referido no uso e método de acordo com a invenção, pode compreender um dispositivo convencional para tratamento extracorpóreo do sangue e soro de pacientes, por exemplo, que sofrem de insuficiência renal.

20 Configurações de fluxo sangüíneo localizado em dispositivos médicos de circulação extracorpórea em que há contato com sangue, influenciam, sabidamente, a formação de coágulos por meio de ativação de cisalhamento e agregação de plaquetas em áreas estagnadas. Conseqüentemente, um dispositivo conforme utilizado na segunda, terceira e quarta características da invenção deve ser planejado de maneira a não criar esses problemas.

25 Um dispositivo conforme utilizado em algumas concretizações da invenção pode, por exemplo, possuir as seguintes propriedades:

- fluxo sangüíneo variando de 1 a 500 ml/min, de preferência de 5 a 250 ml/min.

30 - Resistência baixa ao fluxo.

- Área de superfície grande de substratos contendo carboidratos imobilizados no mesmo, por exemplo, próximo de 0,1 - 1 m².

- Revestimento estável (sem vazamento de carboidrato para o sangue em contato com o mesmo).

- Propriedades hemodinâmicas apropriadas no dispositivo (sem áreas de estagnação).

5 - Biocompatibilidade ótima.

Um exemplo não restritivo de um dispositivo desse tipo, que pode ser utilizado em um uso ou método de acordo com a presente invenção, é um dialisador pediátrico de fluxo sanguíneo como o dialisador/hemofiltro Prisma M10 da Gambro AB, Suécia. Outros modelos ou tipos de dispositivos para tratamento extracorpóreo de sangue ou soro podem ser utilizados tam-
10 bém.

Uma quarta característica da presente invenção provê um método de tratamento de um indivíduo mamífero que sofre de uma condição causada ou agravada por micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, compreendendo as etapas:
15

- a) extração de sangue do indivíduo,
- b) pôr em contato o referido sangue extraído com um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, sob condições que possibilitem a ligação de
20 quaisquer micróbios patogênicos, células inflamatórias e proteínas inflamatórias, ao carboidrato,
- c) reintrodução do sangue, contendo uma quantidade reduzida do referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou
25 proteína inflamatória, na circulação sanguínea do indivíduo.

Em uma concretização do método de tratamento de acordo com a presente invenção, a extração e reintrodução de sangue são executadas em uma seqüência contínuo, em que uma parte da circulação sanguínea do
30 indivíduo está incluída na seqüência.

Concretizações de um método de tratamento de acordo com a

quarta característica da invenção correspondem àquelas acima para o método de acordo com a primeira característica da presente invenção, em relação ao micróbio patogênico, célula inflamatória, proteína inflamatória, sangue de mamífero, carboidrato, substrato sólido e imobilização.

5 Conforme utilizado neste pedido, o termo "micróbio patogênico" significa um micróbio que causa doença em organismo vivo quando introduzido no referido organismo. Exemplos de "micróbios patogênicos" incluem bactérias, vírus e parasitas.

10 Conforme utilizado neste pedido, o termo "célula inflamatória" significa uma célula envolvida em resposta inflamatória em mamíferos. Exemplos de "células inflamatórias" incluem linfócitos inflamatórios e macrófagos inflamatórios.

15 Conforme utilizado neste pedido, o termo "proteína inflamatória" significa uma proteína, como uma citocina, liberada, por exemplo, em conexão com infecção microbiana ou imunização.

 Conforme utilizado neste pedido, o termo "citocina" significa uma proteína liberada, por exemplo, em ligação com infecção microbiana ou imunização, selecionada do grupo consistindo em interleucinas, interferons, quemocinas e fatores de necrose tumoral.

20 Exemplos

Exemplo 1 Preparatório

Aminação de Sefadex G25

 Metaperiodato de sódio (NaIO_4 , 6,0 g) foi dissolvido em água (994 ml) e adicionado a Sefadex G 25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) 25 (50 g) em 1 litro de água. A mistura foi mantida no escuro sob agitação por 24 horas. Após filtração e lavagem com 5 x 1 litro de água e, finalmente, tampão fosfato a 0,1 M, o produto resultante foi suspenso em tampão fosfato, pH 7,0 (350 ml) e uma solução de polietilenimina (100 ml de Lupasol (BASF, Alemanha), 5% em água) foi acrescentada. O gel foi estabilizado por 30 adição de solução aquosa de NaBH_3CN , cianoborohidreto de sódio (0,5 g em 100 ml, tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0). O gel foi filtrado e lavado conforme descrito acima e, finalmente, lavado com tampão acetato (500 ml, 0,1 M,

pH 0,4), produzindo Sefadex G 25 aminado (85 g).

Exemplo 2 Preparatório

Fixação covalente em ponto terminal de heparina em gel de cromatografia

Sefadex G 25 aminado (85 g), obtido conforme descrito no exemplo 1 Preparatório, foi suspenso em tampão acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0), e 4,0 g de heparina degradada por ácido nitroso (heparina da Pharmacia, Suécia) foram acrescentados. A mistura da reação foi agitada por 24 horas e, em seguida, processada conforme acima, produzindo Sefadex G 25 heparinizado (80 g).

O gel contém 2% de heparina (p/p, análise de enxofre). As partículas de Sefadex G 25 possuem diâmetro médio de 50 - 150 μm . Um cálculo a grosso modo revela que 1 cm^3 contém 10^6 partículas, fornecendo um área de superfície de partículas de 0,03 m^2/cm^3 . Ademais, se a heparina for fixada somente à superfície das partículas, Sefadex G 25 heparinizado com 2% de heparina p/p possui em torno de 0,003 μg de heparina/ cm^2 .

Exemplo 3 Preparatório

Fixação covalente de heparina em lâ de vidro aminada

Um material em lâ de vidro é heparinizado empregando o procedimento geral descrito abaixo.

Lâ de vidro é cuidadosamente limpa com ácido (HCl), lavada com etanol absoluto e seca em estufa a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 4 horas.

As funções amino reativas são introduzidas na superfície da lâ de vidro por tratamento com solução aquosa composta por poliamina, polietilenimina (PEI) ou quitosano. Para algumas finalidades, as poliaminas podem ser estabilizadas na superfície reticulada com reagentes bifuncionais, como crotonaldeído ou glutaraldeído.

O revestimento é estabilizado ainda por intermédio de reticulação iônica com um polissacarídeo sulfatado (dextrano sulfato ou heparina). Se necessário, essas etapas são repetidas, sendo formada uma estrutura tipo "sanduíche". Lavagem cuidadosa (água, tampões adequados) deve ser conduzida entre cada etapa. Depois de uma última adição de PEI ou quitosano, a fixação do ponto terminal (EPA) à superfície aminada da heparina

original é efetuada por aminação redutora, utilizando a função aldeído no resíduo terminal redutor, presente na heparina original. O acoplamento é efetuado em solução aquosa por aminação redutora (cianoborohidrito, CN-BH^3), essencialmente conforme descrita no exemplo 2 Preparatório.

- 5 A análise de superfície, conforme descrita no exemplo 2 Preparatório, revela que aproximadamente 10 mg/cm^2 de heparina estão acoplados à superfície de vidro.

Exemplo 4 Preparatório

Fixação covalente de heparina sobre superfícies poliméricas aminadas

- 10 Uma superfície polimérica foi heparinizada, empregando o procedimento geral descrito abaixo.

- A superfície polimérica é gravada com um agente oxidante (permanganato de potássio, peroxidissulfato de amônio) a fim de serem introduzidas características hidrofílicas juntamente com alguns grupos funcionais reativos ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}=\text{C}-$). A superfície pode ser gravada também com plasma ou coroa.
- 15

- Funções amino reativas são introduzidas por tratamento com uma poliamina, polietilenimina (PEI) ou quitosano. Para algumas finalidades, as poliaminas podem ser estabilizadas na superfície reticulada com reagentes bifuncionais, como crotonaldeído ou glutaraldeído.
- 20

- O revestimento é estabilizado ainda por intermédio de reticulação iônica com um polissacarídeo sulfatado (dextrano sulfato ou heparina). Se necessário, essas etapas são repetidas, sendo formada uma estrutura tipo "sanduíche". Lavagem cuidadosa (água, tampões adequados) deve ser conduzida entre cada etapa. Depois de uma última adição de PEI ou quitosano, a fixação do ponto terminal (EPA) à superfície aminada da heparina original é efetuada por aminação redutora, utilizando a função aldeído no resíduo terminal redutor, presente na heparina original. Uma função aldeído mais reativa no resíduo terminal redutor pode ser atingida por degradação parcial do grupamento nitroso da heparina. Esta degradação encurta o tempo de reação, porém fará com que a heparina imobilizada tenha peso molecular mais baixo. O acoplamento é efetuado em solução aquosa por amina-
- 25
- 30

ção redutora (cianoborohidrito, CNBH_3^-), essencialmente conforme descrita no exemplo 2 Preparatório.

1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de heparina podem ser acoplados a todas as superfícies hidrofílicas como vidro, celulose, quitina, etc., e mais ou menos, a todos os polímeros hidrofóbicos como polivinil, cloreto, polietileno, policarbonato, poliestireno, PTFE etc.

Exemplo 5 Preparatório

Fixação covalente em ponto único ou em múltiplos pontos da heparina em superfícies poliméricas

Conduzida conforme foi descrita no exemplo 2 Preparatório com exceção de que as funções aldeído foram introduzidas na cadeia da heparina por oxidação com periodato de sódio em solução aquosa.

Exemplo 6 Preparatório

Fixação de heparina no lúmen interno de fibras ocas

Neste exemplo preparatório, foi utilizado um dialisador pediátrico de fluxo sangüíneo. As fibras do dialisador foram feitas em polissulfona com diâmetro interno de 200 microns e espessura de parede de 40 microns. A área total de superfície do sangue em contato com o material foi de 4000 cm^2 e o volume de preparação foi de 28 ml.

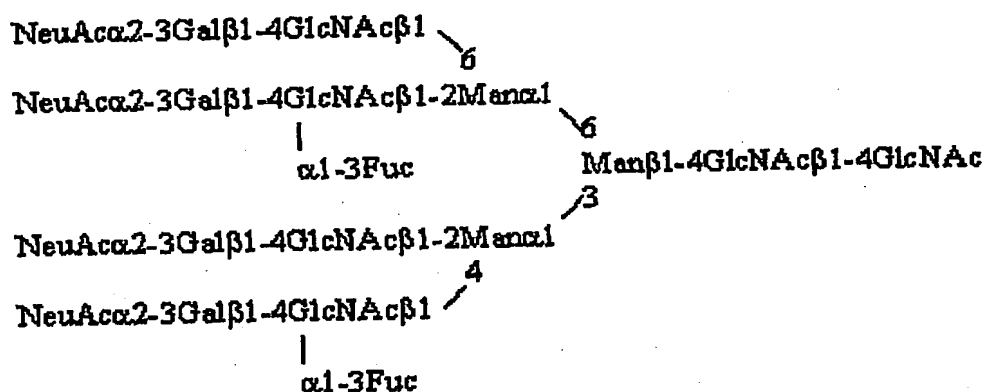
O processo de aminação foi conduzido conforme descrito de maneira geral no exemplo 4 Preparatório, com exceção da etapa de gravação que foi omitida. Polissulfona é hidrofílica e não requer gravação. A imobilização de heparina foi efetuada por bombeamento de uma solução contendo heparina degradada por ácido nitroso (heparina da Pharmacia), juntamente com NaBH_3CN , conforme descrito no exemplo 2 Preparatório. Como a medição da quantidade de heparina é um procedimento destrutivo, um dialisador de referência, heparinizado sob condições idênticas foi inutilizado e as suas fibras, sujeitas à análise de enxofre. Os resultados revelaram um teor de heparina de aproximadamente 5 μg de heparina/ cm^2 , valor que corresponde a um teor de 20 mg de heparina no dispositivo.

Exemplo 7 Preparatório

Fixação covalente de oligômeros com resíduos terminais de ácido siálico no

lúmen interno de fibras ocas

Neste exemplo preparatório, o grupo aldeído no resíduo terminal redutor foi utilizado para acoplamento. A aminação das fibras foi efetuada conforme descrito no exemplo 6 Preparatório e o acoplamento do oligossacarídeo da fórmula I, o qual contém resíduos terminais de ácido siálico, foram conduzidos por circulação do composto da fórmula I, dissolvido em tampão acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0), juntamente com NaBH_3CN (0,4 g), em temperatura ambiente por 24 h. Os resultados revelaram teor de ácido siálico de cerca de $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.



10

Exemplo 1 Comparativo

Fixação de HSV-1 à heparina em solução

Uma solução (10 μl), contendo 10^7 de unidades formadoras de placa de vírus (Vírus Herpes simples tipo 1, cepa KOS321), foi incubada com 20 μl de ^3H -heparano sulfato (HS) marcado, em volume total de 400 μl de NaCl tamponado, por 30 min a 37°C . Depois do mesmo, a solução foi centrifugada através de um filtro Microsep 1M, sendo retidos os vírus e HS ligado. 2,3% de HS estava ligado (479 CPM) ao vírus, enquanto que 97,7% do HS não estavam ligados e passaram através do filtro.

Exemplo 1

Remoção de partículas de vírus HSV-1 e HSV-2 de solução salina tamponada por ligação com heparina imobilizada em partículas de Sefadex

Partículas de Sefadex, revestidas com heparina, conforme no exemplo 2 Preparatório, foram embebidas em NaCl tamponado (PBS) e 0,8 ml

foram transferidos para cada uma das duas colunas pequenas descartáveis, formando uma camada em gel de aproximadamente 1 cm. Após 3 lavagens, 50 µl de vírus radiomarcados com ^3H -timidina foram suspensos em 150 µl de PBS. 10^9 unidades formadoras de placa de HSV-1, correspondentes a 10^{11} partículas virais, foram acrescentadas à coluna 1, e 10^8 unidades formadoras de placa de HSV-2, correspondentes a 10^{10} partículas virais, foram acrescentadas à coluna 2. Foi permitido que os vírus se adsorvessem às respectivas colunas. Depois do mesmo, 0,8 ml de PBS foram acrescentados a cada coluna e o líquido atravessado foi recolhido para estimativa de vírus não absorvidos.

Subseqüentemente, as duas colunas foram lavadas 4 vezes com 1 ml de PBS, e as lavagens foram recolhidas, sob a forma de frações, para quantificação dos vírus retirados pela lavagem. Estas e as frações seguintes foram transferidas para tubos de cintilação e quantificadas quanto à quantidade de vírus por determinação de cpm em um contador beta. Na etapa seguinte, as colunas foram submetidas à eluição, por três vezes, dos respectivos vírus ligados à heparina por 1 ml de NaCl a 2 M, sendo recolhidas as três frações de cada coluna. Depois desta etapa, a eluição foi conduzida, acrescentando-se, por duas vezes, 1 ml de SDS a 5% em PBS (PBS-SDS), e as duas frações, de cada coluna, foram recolhidas. Finalmente, as partículas revestidas com heparina, provenientes das duas colunas, foram suspensas, cada uma, em 1 ml de PBS-SDS, e alíquotas de 200 µl foram submetidas à quantificação das partículas restantes ligadas a vírus por determinação da radioatividade.

Os resultados são apresentados na Tabela 1 abaixo. Conforme apresentado, somente 5,5% das partículas contendo HSV-1 e 11,7% das partículas contendo HSV-2 não se adsorveram na coluna. Ademais, como o DNA viral, e não as proteínas deste que se ligam a heparina, é marcado por radioatividade, estas partículas não adsorvidas poderiam representar vírus não infecciosos com envelopes rompidos (ou seja, as partes externas frágeis do vírus que se ligam a heparina). O resto dos vírus (94,5% para HSV-1 e 88,3% do HSV-2) liga-se às partículas revestidas com heparina na coluna. A

ligação aparenta ser forte, considerando o fato de que somente 0,5% do HSV-1 e 1,1% do HSV-2 foram removidos por 4 lavagens sucessivas. A capacidade limitada de NaCl a 2M, em três tentativas sucessivas, de eluir os vírus ressalta as características de alta afinidade da ligação de ambos os
5 vírus às partículas revestidas com heparina. Por outro lado, quantidades substanciais de HSV-1 e HSV-2 foram eluídas por PBS-SDS.

No total, 48% de HSV-1 e 68,8% de HSV-2 foram recuperados das colunas. Isso pode ser atribuído ao fato de que NaCl a 2 M diminuiu espontaneamente a radioatividade das amostras, em aproximadamente 30%
10 de acordo com nossas observações passadas, e de que SDS-PBS exerce também provavelmente esse efeito.

Considerados como um todo, os resultados comprovam o princípio de que partículas virais de HSV-1 e HSV-2 podem ser removidas de uma fase líquida por passagem através de coluna curta contendo partículas de
15 Sefadex revestidas com heparina, e de que vírus extraídos ligam-se com alta afinidade às colunas.

Tabela 1. Ligação de partículas virais de HSV radiomarcadas, suspensas em NaCl tamponado a partículas de heparina-Sefadex.

Ligação de HSV à coluna com heparina (% de vírus introduzidos = controle = 100%)		
	HSV-1	HSV-2
Vírus introduzidos (controle)	100,0	100,0
Vírus não adsorvidos	5,5	11,7
Lavados da coluna		
1ª lavagem	0,2	0,4
2ª lavagem	0,1	0,3
3ª lavagem	0,1	0,2
4ª lavagem	0,1	0,2
Total não adsorvido + lavado	6,0	12,8
Eluídos com NaCl a 2 M		
1ª eluição	7,8	14,7
2ª eluição	1,6	1,9
3ª eluição	0,1	1,3
Eluídos com SDS a 5%		
1ª eluição	10,6	11,9
2ª eluição	18,5	18,3
Total eluído com NaCl + SDS	38,6	48,1
Não eluídos de partículas	4,1	7,9
Total não eluído	4,1	7,9
Total recuperado (não adsorvido + lavado + eluído + não eluído)	48,7	68,8

Exemplo 2

Remoção de partículas virais de HSV-1 de soro humano por ligação a heparina imobilizada em partículas de Sefadex

- 5 O procedimento experimental, conforme descrito no Exemplo 1, foi utilizado com a diferença de que as partículas virais radiomarcadas do HSV-1, em quantidade de 10^9 PFU, equivalente a 10^{11} partículas virais, foram misturadas a 0,5 ml de soro humano e aplicadas, em seguida sobre partículas revestidas com heparina em uma coluna descartável. Depois do mesmo, o procedimento, incluindo eluição e lavagem, foi seguido conforme no Exemplo 1. Os resultados são apresentados na Tabela 2 abaixo.
- 10

Tabela 2. Ligação de partículas virais radiomarcadas do HSV-1 (10^{11}), suspensas em soro humano, a partículas de heparina-Sefadex (1 cm^3).

Ligação de HSV-1 à coluna com heparina (% de vírus introduzidos = controle = 100%)	
Vírus introduzidos (controle)	100,0
Vírus não absorvidos	2,4
Lavados da coluna	
1ª lavagem	0,9
2ª lavagem	0,2
3ª lavagem	0,1
4ª lavagem	0,2
Total não absorvido + lavado	3,8
Eluídos com NaCl a 2 M	
1ª eluição	2,1
2ª eluição	0,4
3ª eluição	0,2
Eluídos com SDS a 5%	
1ª eluição	3,5
Total eluído com NaCl + SDS	6,2
Total recuperado (não absorvido + lavado + eluído + não eluído)	10,0
Restante em partículas	90,0

Conforme apresentado, 97,6% das partículas de HSV-1, suspensas em soro humano, ligaram-se à coluna. Pela lavagem, por 4 vezes, somente 3,8% das partículas virais foram removidas. Empregando NaCl a 2 M, somente 2,7% dos vírus foram eluídos e, adicionalmente, 3,5% foram eluídos por SDS. A conclusão destes resultados é a de que vírus suspensos em soro, sendo esta a verdadeira situação em vida durante infecção grave disseminada, melhoraram o desempenho da coluna removedora de vírus, no que se refere à ligação de vírus radiomarcados, e de que somente 2,4% das partículas de HSV-1 não foram adsorvidos. Como provável explicação, as proteínas séricas auxiliaram a estabilização das partículas virais e, desse modo, melhoraram a remoção do HSV-1 pelas partículas heparinizadas de Sefadex.

15 Exemplo 3

Remoção de partículas virais de HSV-1 de soro humano por ligação a heparina imobilizada em dialisador de fluxo sanguíneo, feito de fibras ocas

O procedimento experimental, conforme descrito no Exemplo 1, foi utilizado com a diferença de que as partículas virais radiomarcadas do

HSV-1, em quantidade de 10^9 PFU, equivalente a 10^{11} partículas virais, foram misturadas a 0,5 ml de soro humano e aplicadas, em seguida sobre partículas revestidas com heparina no dialisador de fibras ocas revestidas com heparina do exemplo Preparatório 6. Depois do mesmo, o procedimento, incluindo eluição e lavagem, foi seguido conforme no Exemplo 1. Os resultados são apresentados na Tabela 3 abaixo.

Conforme apresentado, 92,3% das partículas de HSV-1, suspensas em soro humano, ligaram-se à coluna. Pela lavagem, por 4 vezes, somente 4,2% das partículas virais foram removidas. Empregando NaCl a 2 M, somente 4,0% dos vírus foram eluídos e, adicionalmente, 4,5% foram eluídos por SDS. A conclusão destes resultados é a de que a ligação de partículas virais, suspensas em soro humano, a fibras heparinizadas é comparável àquela ligação de vírus semelhantemente suspensos a partículas de Sefadex e de que somente 7,7% das partículas de HSV-1 não foram absorvidos.

Tabela 3. Ligação de partículas virais radiomarcadas do HSV-1, suspensas em soro humano, a fibras ocas heparinizadas.

Ligação de HSV-1 à coluna com heparina (% de vírus introduzidos = controle = 100%)	
Vírus introduzidos (controle)	100,0
Vírus não absorvidos	7,7
Lavados da coluna	
1ª lavagem	3,1
2ª lavagem	0,8
3ª lavagem	0,1
4ª lavagem	0,2
Total não adsorvido + lavado	4,2
Eluídos com NaCl a 2 M	
1ª eluição	3,3
2ª eluição	0,5
3ª eluição	0,2
Eluídos com SDS a 5%	
1ª eluição	4,5
Total eluído com NaCl + SDS	8,5
Total recuperado (não absorvido + lavado + eluído + não eluído)	12,7
Restante em partículas	87,3

Exemplo 4

Remoção de partículas virais de HSV-1 e HSV-2 de sangue total humano por ligação a heparina imobilizada em partículas de Sefadex

O procedimento experimental, conforme descrito no Exemplo 1, foi utilizado com a diferença de que as partículas virais radiomarcadas do HSV-1 e HSV-2, em quantidade equivalente a 10^{11} partículas virais por ml, foram misturadas a 1 ml de sangue humano e aplicadas, em seguida a 1 ml de partículas revestidas com heparina em uma coluna descartável. Depois do mesmo, o procedimento, incluindo eluição e lavagem, foi seguido conforme no Exemplo 1.

Os resultados são apresentados na Tabela 4 abaixo. Conforme apresentado, 99,1% das partículas de HSV-1 e 99,8% das partículas de HSV-2, suspensas em sangue humano, ligaram-se à coluna.

Tabela 4. Ligação de partículas virais de HSV radiomarcadas, suspensas em sangue humano, a partículas de heparina-Sefadex (1 cm^3).

Ligação de HSV em sangue total à coluna com heparina (% de vírus introduzidos = controle = 100%)		
	HSV-1 %	HSV-2 %
Vírus introduzidos (controle)	100,0	100,0
Vírus não adsorvidos	0,9	0,2

Exemplo 5

Remoção de vírus *Influenza A* de soro humano por ligação a oligossacarídeos imobilizados contendo ácido siálico

Estoque de vírus *Influenza A H1N1* foram replicados em células MDCK, cultivadas a 35°C sob condições padrões por 3 dias, após os quais, as células foram homogeneizadas e tituladas para avaliar o número de unidades formadoras de focos (FFU)/ml. Partículas virais foram suspensas em soro humano até uma concentração final de 10^6 FFU/ml. Foram aplicados 10 ml de suspensão sobre um dialisador de fibras ocas revestidas com ácido siálico, preparado empregando o método descrito no exemplo 7 Preparatório. Após a titulação, a infectividade do soro contendo o vírus *Influenza A*, após passagem através do dialisador e comparação desse valor com títulos

de uma alíquota do mesmo soro contendo o vírus que não passou pelo dispositivo, foi concluído que 87% das FFU do vírus *Influenza A* permaneceram ligados às fibras.

Exemplo 6

5 Remoção de *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* por ligação a heparina imobilizada

Quatro pipetas estéreis foram acondicionadas com lã de vidro (0,5 ml), heparinizada conforme descrito no exemplo 3 Preparatório. As "colunas" assim formadas foram lavadas com 3 ml de tampão fosfato salino (PBS) estéril de pH 7,2. Foram testadas duas cepas diferentes de *H. pylori* e duas cepas diferentes de *S. aureus*. Cada uma das quatro amostras de bactérias diferentes, suspensas em tampão PBS, foi aplicada a uma "coluna" separada. As quantidades de bactérias nas amostras foram medidas antes de serem aplicadas à coluna e depois de eluição da coluna, por densidade óptica (OD) em 560 nm e por contagens de unidades viáveis (CFU/ml). Conforme evidenciado pela tabela abaixo, aproximadamente 90% das bactérias *H. pylori* e aproximadamente 50% das *S. aureus* foram imobilizados na coluna.

Tabela 6. Ligação de *H. pylori* e *S. aureus* a lã de vidro heparinizada

Bactéria	OD ₅₆₀		CFU/ml		Ligação %
	Inicial	Final	Inicial	Final	
<i>H. pylori</i> ATCC 43504	8,33	0,81	2×10^8	$1,5 \times 10^7$	~90
<i>H. pylori</i> ATCC 43504	8,33	1,86	2×10^8	1×10^7	~90
<i>S. aureus</i> CCUG 12600	9,30	5,5	$7,7 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	~50
<i>S. aureus</i> CCUG 12600	9,30	6,9	$7,7 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	~50

REIVINDICAÇÕES

1. Método de remoção extracorpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamífero, compreendendo as etapas:

- 5 a) fornecimento de uma amostra de sangue do mamífero,
- b) pôr em contato a referida amostra com um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, sob condições que possibilitem a ligação de quaisquer micróbios patogênicos, células inflamatórias e proteínas inflamatórias, presentes na referida amostra de sangue, ao carboidrato,
- 10 c) separação da amostra do substrato sólido, de forma que o referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória fique, pelo menos, parcialmente retido sobre o substrato sólido, e
- 15 d) recuperação da referida amostra contendo uma quantidade reduzida do referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória.

20 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido micróbio patogênico é selecionado do grupo, consistindo em bactérias, vírus e parasitas.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, em que o referido micróbio patogênico é um vírus.

25 4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1, herpes simples tipo 2, vírus *Influenza A*, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência humana.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1 e vírus herpes simples tipo 2.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2,

em que o referido micróbio patogênico é uma bactéria.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida bactéria é selecionada do grupo consistindo em *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida bactéria é *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, em que o referido micróbio patogênico é um parasita.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o referido parasita é selecionado do grupo consistindo em *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida célula inflamatória é selecionada do grupo consistindo em linfócitos inflamatórios e macrófagos inflamatórios.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida proteína é uma citocina pró-inflamatória.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a referida citocina pró-inflamatória é selecionada do grupo consistindo em fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6).

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido sangue de mamífero é sangue humano.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido carboidrato é selecionado do grupo consistindo em heparina, heparano sulfato, sulfato de condroitina, carboidratos compreendendo ácido siálico e carboidratos compreendendo ácido neurâmico.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o referido carboidrato é heparina.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido substrato sólido compreende micropartícu-

las.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido substrato sólido compreende uma ou mais fibras ocas.

5 19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o material do referido substrato sólido é selecionado do grupo consistindo em vidro, celulose, acetato de celulose, quitina, quitosano, dextrano reticulação, agarose reticulada, polipropileno, polietileno, polissulfona, poliacrilonitrila, silicone, Teflon e poliuretanos.

10 20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido carboidrato está unido ao referido substrato sólido por ligação covalente.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido carboidrato está unido ao referido substrato sólido por fixação covalente em ponto terminal.

15 22. Uso de um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado sobre substrato sólido, o referido carboidrato possuindo afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, para remoção extracorpórea de um micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória do sangue de mamífero.

20 23. Uso de um carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, em que o referido carboidrato é imobilizado em substrato sólido ao ser preparado um dispositivo para tratamento de uma condição causada ou agravada por um micróbio patogênico, célula inflamatória, ou proteína inflamatória.

24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-23, em que o referido micróbio patogênico é selecionado do grupo consistindo em bactérias, vírus e parasitas.

25 25. Uso de acordo com a reivindicação 24, em que o referido micróbio patogênico é um vírus.

26. Uso de acordo com a reivindicação 25, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1, herpes

simples tipo 2, vírus *Influenza A*, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência humana.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1 e vírus herpes simples tipo 2.

28. Uso de acordo com a reivindicação 24, em que o referido micróbio patogênico é uma bactéria.

29. Uso de acordo com a reivindicação 28, em que a referida bactéria é selecionada do grupo consistindo em *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*.

30. Uso de acordo com a reivindicação 29, em que a referida bactéria é *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*.

31. Uso de acordo com a reivindicação 24, em que o referido micróbio patogênico é um parasita.

32. Uso de acordo com a reivindicação 31, em que o referido parasita é selecionado do grupo consistindo em *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*.

33. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-32, em que a referida célula inflamatória é selecionada do grupo consistindo em linfócitos inflamatórios e macrófagos inflamatórios.

34. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-32, em que a referida proteína inflamatória é uma citocina pró-inflamatória.

35. Uso de acordo com a reivindicação 34, em que a referida citocina pró-inflamatória é selecionada do grupo consistindo em fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6).

36. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-35, em que o referido sangue de mamífero é sangue humano.

37. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-36, em que o referido carboidrato é selecionado do grupo consistindo em heparina, heparano sulfato, sulfato de condroitina, carboidratos compreendendo

ácido siálico e carboidratos compreendendo ácido neurâmico.

38. Uso de acordo com a reivindicação 37, em que o referido carboidrato é heparina.

5 39. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-38, em que o referido substrato sólido compreende micropartículas.

40. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-39, em que o referido substrato sólido compreende uma ou mais fibras ocas.

10 41. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-40, em que o referido substrato sólido é selecionado do grupo consistindo em vidro, celulose, acetato de celulose, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarose reticulada, polipropileno, polietileno, polissulfona, poliacrilonitrila, silicone, Teflon e poliuretanos.

15 42. Método de tratamento de um indivíduo mamífero que sofre de uma condição causada ou agravada por micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, compreendendo as etapas:

- 20 a) extração de sangue do indivíduo,
- b) pôr em contato o sangue extraído com um dispositivo compreendendo um carboidrato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, sob condições que possibilitem a ligação de quaisquer micróbios patogênicos, células inflamatórias e proteínas inflamatórias, ao carboidrato, e
- 25 c) reintrodução do sangue, contendo uma quantidade reduzida do referido micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória, na circulação sangüínea do indivíduo.

30 43. Método de acordo com a reivindicação 42, em que a extração e reintrodução de sangue são efetuadas em uma seqüência contínua, em que a seqüência compreende uma parte da circulação sangüínea do indivíduo.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-

43, em que o referido micróbio patogênico é selecionado do grupo consistindo em bactérias, vírus e parasitas.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, em que o referido micróbio patogênico é um vírus.

5 46. Método de acordo com a reivindicação 45, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em herpes simples tipo 1, herpes simples tipo 2, vírus *Influenza A*, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência humana.

10 47. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo em vírus herpes simples tipo 1 e vírus herpes simples tipo 2.

48. Método de acordo com a reivindicação 44, em que o referido micróbio patogênico é uma bactéria.

15 49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que a referida bactéria é selecionada do grupo consistindo em *Helicobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que a referida bactéria é *Helicobacter pylori* ou *Staphylococcus aureus*.

20 51. Método de acordo com a reivindicação 44, em que o referido micróbio patogênico é um parasita.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o referido parasita é selecionado do grupo consistindo em *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*.

25 53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-45, em que a referida célula inflamatória é selecionada do grupo consistindo em linfócitos inflamatórios e macrófagos inflamatórios.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-53, em que a referida proteína é uma citocina pró-inflamatória.

30 55. Método de acordo com a reivindicação 54, em que a referida citocina pró-inflamatória é selecionada do grupo consistindo em fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleu-

cina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6).

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-55, em que o referido carboidrato é selecionado do grupo consistindo em heparina, heparano sulfato, sulfato de condroitina, e carboidratos compreendendo ácido siálico e carboidratos compreendendo ácido neurâmico.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o referido carboidrato é heparina.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-57, em que o referido substrato sólido compreende micropartículas.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-58, em que o referido substrato sólido compreende uma ou mais fibras ocas.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-59, em que o referido substrato sólido é selecionado do grupo consistindo em vidro, celulose, acetato de celulose, quitina, quitosano, dextrano reticulado, agarose reticulada, polipropileno, polietileno, polissulfona, poliacrilonitrila, silicone, Teflon e poliuretanos.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO DE REMOÇÃO EXTRACORPÓREA DE UM MICRÓBIO PATOGENICO, UMA CÉLULA INFLAMATÓRIA OU UMA PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DO SANGUE".

5 A presente invenção refere-se a um método de remoção extra-
corpórea de micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória
de sangue de mamíferos/uso de um dispositivo compreendendo um carboi-
drato imobilizado em substrato sólido, o referido carboidrato possuindo afini-
dade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamatória ou proteína infla-
10 matória, para remoção extracorpórea do referido micróbio patogênico, célula
inflamatória ou proteína inflamatória de sangue de mamíferos/uso de um
carboidrato com afinidade de ligação a micróbio patogênico, célula inflamató-
ria ou proteína inflamatória, em que o referido carboidrato é imobilizado em
substrato sólido ao ser preparado um dispositivo para tratamento de uma
15 condição causada ou agravada pelo referido micróbio patogênico, célula in-
flamatória ou proteína inflamatória / e um método de tratamento de um indi-
víduo mamífero, sofrendo de uma condição causada ou agravada por micró-
bio patogênico, célula inflamatória ou proteína inflamatória.