

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 374**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2007** **PCT/GB2007/004126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2008** **WO08050148**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2007** **E 07824370 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 2061533**

54 Título: **Aparato para usar en una terapia de la enfermedad hepática**

30 Prioridad:

27.10.2006 GB 0621452

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

16.07.2021

73 Titular/es:

YAQRIT LIMITED (100.0%)
The Elms Courtyard, Bromesberrow
Ledbury HR8 1RZ, GB

72 Inventor/es:

DAVIES, NATHAN y
JALAN, RAJIV

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 843 374 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato para usar en una terapia de la enfermedad hepática

5 Campo de la invención

La invención se refiere al tratamiento *in vitro* de la sangre de un individuo que padece una enfermedad hepática. Se refiere a un aparato y a albúmina para usar en el tratamiento de la enfermedad hepática.

10 Antecedentes de la invención

Solo en Estados Unidos se estima que 60.000 personas mueren cada año por insuficiencia hepática, mientras que el grupo de donantes se mantiene constante en aproximadamente 4000 con 16-18.000 en lista de espera. La probabilidad de recibir el hígado de un donante para los sujetos que se encuentran en la lista es solo de 1 entre 8, sin embargo, no existe un tratamiento eficaz disponible para prolongar la vida de este grupo de pacientes.

La insuficiencia hepática produce disfunción multiorgánica y las tasas de mortalidad son del orden del 80 %. En los pacientes con cirrosis, el principal desencadenante del deterioro agudo de la función hepática es la infección. La forma específica de infección que se observa con mayor frecuencia en estos pacientes es la peritonitis bacteriana espontánea. Este deterioro agudo de la función de los órganos diana continúa a pesar del tratamiento de la infección subyacente y comúnmente se observan tasas de mortalidad de hasta el 40 %. Sin embargo, los mecanismos que conducen a este deterioro agudo de la función hepática tras la infección no están claros.

El documento US 2004/060866 se refiere a un método y a un sistema para usar un hemofiltro para tratar la IMRD, insuficiencia hepática, intoxicación exógena y otras afecciones asociadas con toxinas en la sangre de un paciente. Sen Sambit *et al.*, "Emerging indications for albumin dialysis", *American Journal of Gastroenterology*, vol. 100, n.º 2, febrero de 2005, páginas 468-475, describe un aparato para el aclaramiento sanguíneo de pacientes con enfermedad hepática que comprende medios para retirar endotoxinas mediante diálisis. El documento WO2004/080575 A1 desvela que la sangre del paciente puede tratarse transfiriendo toxinas unidas a la albúmina del paciente a albúmina recombinante.

Sumario de la invención

La invención se refiere al tratamiento de la enfermedad hepática, y aborda dos factores cruciales que pueden influir en la morbilidad y la mortalidad, en concreto, defectos en la estructura de la albúmina, la función y los niveles en pacientes con enfermedad hepática, y niveles elevados de endotoxina en la sangre de tales pacientes.

Por consiguiente, la invención proporciona un aparato para usar en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad hepática, que comprende:

- (a) medio para retirar selectivamente albúmina de la sangre de un individuo; y
- (b) medio para retirar selectivamente endotoxina de la sangre de un individuo; y
- (c) medio para suministrar albúmina que no procede del individuo a la sangre del individuo;

en donde dicho medio (a) comprende un medio para la diálisis de albúmina que comprende una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa, y en donde (a) y (b) son componentes separados del aparato.

La invención también proporciona:

- Albúmina que no procede de la sangre de un individuo que se va a tratar para usar en un método de tratamiento de la enfermedad hepática, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) retirar albúmina de la sangre del individuo;
- (b) reducir el nivel de endotoxina en la sangre del individuo; y
- (c) introducir dicha albúmina que no procede del individuo que se va a tratar en la sangre del individuo;

en donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante diálisis utilizando medios que comprenden una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa, y en donde las etapas (a) y (b) del método comprenden diferentes medios para retirar la albúmina y reducir el nivel de endotoxina.

- Un método *in vitro* de tratamiento extracorpóreo de la sangre mediante la retirada selectiva de albúmina y endotoxina de la sangre, en donde la sangre es de un individuo que tiene una enfermedad hepática, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la albúmina y retirar, de ese modo, la albúmina de la sangre;

- (b) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la endotoxina y retirar, de ese modo, la endotoxina de la sangre; y
 (c) añadir a la sangre albúmina que no procede del mismo individuo que la sangre; y en donde las etapas (a) y (b) del método comprenden diferentes medios para retirar la albúmina y reducir la endotoxina.

5

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Se ha descubierto que los niveles crecientes de albúmina modificada por isquemia (AMI) están asociados con la gravedad de la enfermedad hepática. Los valores se expresan como unidades de absorbancia de la AMI por g/l de albúmina plasmática, (media + o - ETM). * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

10

Figura 2: (A) Estallido oxidativo en reposo (%) en controles, pacientes con cirrosis sola y pacientes con cirrosis + HA, (B) diferencia entre el estallido oxidativo en reposo y el estallido oxidativo tras la estimulación *ex vivo* con *E. coli* en controles, pacientes con cirrosis sola y pacientes con cirrosis + HA, (C) media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF) como medida del número de bacterias (*E. coli* marcadas con FITC) engullidas por un neutrófilo en los controles, pacientes con cirrosis sola y pacientes con cirrosis + HA. Las diferencias estadísticas significativas se indican mediante superíndices. 1 = significativa frente al control. 2 = significativa frente a la cirrosis. **Figura 3:**

15

(A) Área bajo la curva operativa del receptor para determinar la utilidad predictiva de la medición del estallido oxidativo para determinar la supervivencia. Un corte del estallido en reposo $< 55\%$ tenía una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 64 % para predecir la muerte. (B) Curva de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de rangos logarítmicos para pacientes estratificados por estallido oxidativo en reposo alto ($\geq 55\%$) o bajo ($< 55\%$).

20

| | | | | |
|-----------------|----|----|----|----|
| día | 20 | 40 | 60 | 80 |
| acontecimientos | 4 | 5 | 10 | 12 |
| en riesgo | 50 | 44 | 36 | 33 |

Figura 4: (A) Área bajo la curva operativa del receptor para determinar la utilidad predictiva de la medición de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF) para determinar la supervivencia. Un corte de la MGIF $< 295\%$ tenía una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 76 % para predecir la muerte. Área = 0,80; Errores típicos = 0,08; significancia = 0,02; corte = 42; sensibilidad = 0,86; especificidad = 0,70, (B) Curva de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de rangos logarítmicos para pacientes estratificados por la MGIF baja (< 42) o alta (≥ 42).

25

| | | | | |
|-----------------|----|----|----|----|
| día | 20 | 40 | 60 | 80 |
| acontecimientos | 4 | 4 | 5 | 5 |
| en riesgo | 29 | 29 | 26 | 24 |

Figura 5: Estallido oxidativo en reposo en sangre entera de pacientes y en neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes. El plasma de pacientes con estallido alto también indujo un estallido alto en neutrófilos normales, mientras que el plasma de pacientes con estallido en reposo bajo no lo hizo, SE Sangre Entera, NN neutrófilos normales, PP Plasma de Pacientes, A estallido en reposo Alto ($\geq 55\%$), B estallido en reposo Bajo ($< 55\%$). * $p = 0,002$ frente a normales. ** $p = 0,0005$ frente a normales.

Figura 6: Reversibilidad del estallido oxidativo en reposo mediante la incubación de neutrófilos de pacientes con plasma normal. NP Neutrófilos de Pacientes, PP Plasma de Pacientes, PN Plasma Normal.

Figura 7: Aumento dependiente de la dosis en el estallido en reposo mediante la incubación con endotoxina, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Figura 8: la incubación con endotoxina no cambia la fagocitosis en neutrófilos normales, pero disminuye aún más la fagocitosis en pacientes con neutrófilos.

Figura 9: El estallido oxidativo en reposo es reversible pasando el plasma por una columna de retirada de endotoxina o incubando con anticuerpos CD14. Las columnas o los anticuerpos CD14 no influyen en el estallido en reposo cuando se usa plasma de pacientes con un estallido bajo o plasma de control. NN+PP A frente a NN+PP A CD14 $p < 0,001$. NN+PP A frente a NN+PP Columna HB $p < 0,001$.

Figura 10: La disminución de la fagocitosis es reversible pasando el plasma por una columna de retirada de endotoxina o incubando con anticuerpos CD14. Las columnas o los anticuerpos CD14 no influyen en el estallido en reposo cuando se usa plasma de pacientes con un estallido bajo o plasma de control. NN+PP A frente a NN+PP A CD14 $p = 0,04$ NN+PP A frente a NN+PP Columna HB $p = 0,03$.

Figura 11: Ilustración de sistemas de remplazo de albúmina.

Figura 12: Niveles de endotoxina medidos en muestras de plasma tomadas al final del experimento del Ejemplo 3 (T = 3 horas). Se encontró un nivel de endotoxina significativamente más alto ($p < 0,001$) en los animales tratados con solución salina en comparación con todos los demás grupos. Según el fabricante, el límite de detección de este ensayo es de 0,5 UE/ml, como se indica en la figura.

Figura 13: Niveles medidos en muestras de sangre tomadas al finalizar el experimento en el Ejemplo 3:

A: Niveles de albúmina. Se encontró que la albúmina se redujo significativamente a las 4 semanas después de la cirugía de BDL (*Bile Duct Ligation*, ligadura del conducto biliar) (** $p < 0,01$ frente a animales sin tratamiento previo), pero aumentó notablemente tras la terapia con albúmina (# $p < 0,05$ frente a solución salina, prueba de Mann-Whitney).

B: Niveles de ALT en plasma. Aunque hubo una aparente reducción de la ALT en plasma en todos los grupos de tratamiento en comparación con los animales que recibieron solución salina, estas diferencias no resultaron ser significativas.

C: Concentración de urea en plasma. Se encontró que los animales que recibieron la combinación de albúmina y polimixina B tenían niveles de urea significativamente más bajos en comparación con el grupo al que se administró albúmina sola (* $p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney).

Figura 14. Presión arterial media (PAM) medida en el transcurso de tiempo del estudio del Ejemplo 3. Aunque la diferencia no resultó significativa, parece que el grupo que recibió la terapia combinada de albúmina/polimixina había mejorado la PAM en comparación con los animales que recibieron solo albúmina, siendo ambos superiores al grupo tratado con solución salina que demostró un deterioro notable después de 90 minutos.

Figura 15. Actividad de los neutrófilos en muestras de sangre arterial tomadas durante el período experimental. El eje Y muestra el % de neutrófilos que estallan en respuesta a las bacterias. Puede observarse que el porcentaje de neutrófilos que crean un estallido oxidativo en respuesta a bacterias patógenas aumenta progresivamente tanto en los grupos tratados con albúmina como con albúmina/polimixina en el transcurso del estudio. Se observa una ligera mejora en los animales tratados con solución salina a las 3 horas, pero esta fue menor que en los otros grupos y no se encontró que fuera significativa.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "comprende" o las variaciones tales como "comprendido/a" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, elemento integrante o etapa, o grupo de elementos, de elementos integrantes o de etapas, indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, elemento integrante o etapa, o grupo de elementos, elementos integrantes o etapas.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento ni ninguna forma de sugerencia de que el estado de la técnica forma parte del conocimiento general en Australia ni en otros lugares.

En la actualidad, la selección de tratamientos disponibles para pacientes con enfermedad hepática, en particular, aquellos pacientes con insuficiencia hepática, es limitada. Para muchos pacientes, la única opción es el trasplante, sin embargo, no existe un tratamiento eficaz disponible para prolongar la vida de este grupo de pacientes. Así pues, existe la necesidad de encontrar regímenes de tratamiento que puedan usarse para mejorar el estado de los individuos que padecen una enfermedad hepática.

La albúmina es la principal proteína plasmática que se produce en el hígado. La albúmina realiza una variedad de funciones, incluido el transporte de ácidos grasos, la quelación de metales, la unión a fármacos y la actividad antioxidante. En la enfermedad hepática, su concentración disminuye debido a una reducción de la síntesis o como resultado de tasas de degradación más altas. Los presentes inventores han demostrado además que, en los pacientes que tienen enfermedad hepática, una proporción de la albúmina en la circulación sanguínea es estructuralmente anormal. Los inventores también han descubierto que la cantidad de albúmina modificada por isquemia (AMI) aumenta en los pacientes con enfermedad hepática en comparación con los sujetos de control sanos. La capacidad funcional de una proporción de la albúmina del paciente con insuficiencia hepática se destruye de forma permanente.

En un aspecto, por lo tanto, la invención se refiere a un aparato para retirar la albúmina de la sangre de un individuo que tiene una enfermedad hepática.

La retirada de la albúmina en este contexto se refiere a la retirada de la albúmina estructuralmente normal, y también a la retirada de cualquier forma de albúmina estructural o funcionalmente modificada presente en la sangre del individuo. Es decir, preferentemente, los medios para retirar la albúmina utilizados de acuerdo con la presente invención serán capaces de retirar no solo la albúmina de origen natural, normal, sino también la albúmina que puede tener una estructura anormal o la albúmina que ha sido modificada. La retirada de cualquier albúmina dañada o anormal también puede ser terapéuticamente útil, porque la albúmina dañada tiene poca funcionalidad y puede estar asociada con reacciones secundarias dañinas. Por ejemplo, los medios para retirar la albúmina también pueden retirar la albúmina que tenga una flexibilidad molecular reducida, afinidad de unión de ácidos grasos reducida, calidad del transporte reducida, eficiencia del transporte reducida y/o capacidad de desintoxicación reducida en comparación con la albúmina sin modificar, normal. Los medios para retirar la albúmina también pueden retirar determinadas formas modificadas de albúmina, tales como la albúmina modificada por isquemia (AMI). Tales modificaciones estructurales y funcionales pueden detectarse utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1. En particular, se puede evaluar la funcionalidad de la albúmina utilizando un marcador de espín y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. La presencia de AMI puede detectarse examinando la capacidad de la

albúmina para unirse a átomos metálicos.

La retirada de la albúmina también puede desintoxicar la sangre al retirar cualquier toxina unida a la albúmina asociada. Es decir, los medios para retirar la albúmina también pueden, por consiguiente, retirar las toxinas de la sangre que están unidas a la albúmina.

El medio para retirar la albúmina de la sangre retira la albúmina de forma selectiva. Es decir, la albúmina se retira con preferencia a otras sustancias de la sangre, tales como otras proteínas. Preferentemente, la cantidad de albúmina retirada de la sangre es significativamente mayor que la de otros componentes sanguíneos retirados. Por ejemplo, más del 99 % en peso del componente retirado en este aspecto puede ser albúmina. Más del 98 %, más del 95 %, más del 90 %, más del 80 %, más del 70 %, más del 60 % o más del 50 % del componente retirado en este aspecto puede ser albúmina. La retirada de albúmina en el presente documento incluye la retirada de las diferentes formas modificadas de albúmina descritas en el presente documento.

El medio para retirar la albúmina es un medio capaz de retirar selectivamente la albúmina de la sangre, y comprende medios para la diálisis de la albúmina que comprenden una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa o un soporte sólido que se une selectivamente a la albúmina.

En un aspecto, la albúmina se retira selectivamente utilizando un ligando que se une a la albúmina. El ligando puede ser cualquier molécula que se una a la albúmina. Por ejemplo, se sabe que hay una serie de colorantes reactivos se unen a la albúmina. El ligando puede ser un anticuerpo u otro ligando de afinidad que se una específicamente a la albúmina. Por lo general, un ligando que se une específicamente a la albúmina es un ligando capaz de retirar selectivamente la albúmina de la sangre como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, el ligando puede ser capaz de unirse a la albúmina con más fuerza que otros componentes de la sangre. Por ejemplo, el ligando puede ser un anticuerpo que se une específicamente a la albúmina humana. El ligando puede ser un anticuerpo que se une a un epítipo que es específico de la albúmina. El ligando puede ser una combinación de moléculas que se unen cada una a la albúmina, tal como una combinación de moléculas que se unen a diferentes partes de la molécula de albúmina. El ligando puede ser un anticuerpo policlonal o una mezcla de anticuerpos que se unen a múltiples epítopos de la proteína de albúmina. Tal enfoque de combinación puede ser útil en la retirada de las formas modificadas de albúmina, ya que diferentes anticuerpos pueden dirigirse a diferentes partes de la molécula de albúmina.

Se pueden generar anticuerpos contra epítopos específicos de la molécula de albúmina. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar específicamente contra aquellas regiones que se espera que sean estructuralmente similares de formas modificadas particulares y no modificadas de albúmina.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos que se unen a la albúmina. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios. Asimismo, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR (*Complementarity-Determining Region*, región determinante de la complementariedad) o anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos para usar en la presente invención se pueden producir mediante cualquier método adecuado. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo generando anticuerpos en un animal hospedador contra el polipéptido completo o un fragmento del mismo, por ejemplo, un epítipo antigénico del mismo, en el presente documento, después del "inmunógeno".

Un método para producir un anticuerpo policlonal comprende inmunizar a un animal hospedador adecuado, por ejemplo, un animal de experimentación, con el inmunógeno y aislando las inmunoglobulinas del suero del animal. Por tanto, el animal puede ser inoculado con el inmunógeno, extraerse posteriormente la sangre del animal y purificarse la fracción de IgG.

Un método para producir un anticuerpo monoclonal comprende immortalizar células que produzcan el anticuerpo deseado. Se pueden producir células de hibridoma fusionando células de bazo de un animal experimental inoculado con células tumorales (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256, 495-497).

Se puede seleccionar una célula immortalizada que produzca el anticuerpo deseado mediante un procedimiento convencional. Los hibridomas pueden crecer en cultivo o inyectarse por vía intraperitoneal para la formación de líquido ascítico o en el torrente sanguíneo de un hospedador alogénico o un hospedador inmunodeprimido. El anticuerpo humano puede prepararse mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguido de la transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr.

Para la producción de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, es conveniente que el animal de experimentación sea una cabra, un conejo, una rata o un ratón. Si se desea, el inmunógeno se puede administrar como un conjugado en el que se acople el inmunógeno, por ejemplo, a través de una cadena lateral de uno de los

residuos de aminoácidos, a un vehículo adecuado. La molécula de vehículo normalmente es un vehículo fisiológicamente aceptable. El anticuerpo obtenido puede aislarse y, si se desea, purificarse.

Un anticuerpo u otro ligando, "se une específicamente" a una proteína cuando se une con preferencia o con alta afinidad a la proteína para la que es específica, pero no se une ni se une sustancialmente o se une solo con baja afinidad a otras proteínas. Es decir, un anticuerpo se une específicamente a la albúmina si se une a la albúmina con más fuerza que a otros componentes sanguíneos, tales como otras proteínas de la sangre. Como se ha explicado anteriormente, la especificidad de la unión puede ser tal que se une a formas de albúmina alteradas estructural o funcionalmente, así como a albúmina no modificada. Preferentemente, se une a formas de albúmina alteradas estructural o funcionalmente con la misma o sustancialmente la misma afinidad de unión que la albúmina no modificada. Preferentemente, se une a las formas modificadas y no modificadas de albúmina con mayor afinidad que otros componentes sanguíneos, tales como otras proteínas de la sangre. Se conoce bien en la técnica una variedad de protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos para determinar la capacidad de unión específica de un anticuerpo (véase, por ejemplo, Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1226, 1993). Dichos inmunoenayos normalmente implican la formación de complejos entre la proteína específica y su anticuerpo, y la medición de la formación de complejos.

Cuando se usa un ligando para lograr la retirada de albúmina, el ligando puede proporcionarse unido a un soporte sólido. El ligando puede inmovilizarse sobre tal soporte sólido. Un soporte sólido adecuado puede tener la forma de una columna a través de la cual pueda pasar la sangre. Un soporte sólido adecuado puede ser, por ejemplo, un material poroso tal como una membrana, un lecho de partículas o un filtro que sea suficientemente poroso para permitir que las células sanguíneas pasen a través del mismo. Un soporte sólido adecuado puede ser alternativamente un sustrato sólido a través de la superficie de la cual se puede pasar sangre. Preferentemente, el soporte sólido tiene una gran área de superficie para maximizar el área de contacto entre la sangre del individuo y el ligando unido al soporte. El soporte sólido puede estar en forma de perlas, que se pueden usar para llenar un recipiente en el que se pueda introducir la sangre o a través del cual se puede pasar la sangre. Las perlas tendrán preferentemente un tamaño suficiente para permitir una porosidad suficiente cuando se empaqueten en una columna o un lecho filtrante. Se conocen en la técnica diferentes materiales de perlas.

Por consiguiente, los medios para retirar la albúmina de acuerdo con la presente invención pueden comprender tal soporte sólido sobre el cual se une o inmoviliza un ligando capaz de unirse a albúmina. Los medios para retirar la albúmina pueden comprender un recipiente a través del cual pasa la sangre. Por tanto, el recipiente puede comprender una entrada y una salida. La entrada y la salida están colocadas de modo que la sangre que pasa a través del recipiente entre en contacto con un soporte sólido como se describe en el presente documento. Preferentemente, el medio para retirar la albúmina está diseñado o seleccionado para maximizar el área de contacto entre la sangre y el soporte sólido. Se conoce en la técnica una variedad de tales diseños. Por ejemplo, los medios para retirar la albúmina pueden ser una columna o un lecho filtrante lleno de perlas, en donde un ligando para la albúmina está inmovilizado sobre las perlas.

En una realización de la presente invención, la retirada de la albúmina se realiza mediante diálisis. Tal enfoque también puede conducir a la retirada de otros componentes sanguíneos que se someten a diálisis junto con la albúmina. Por lo general, la albúmina debe ser el componente predominante retirado. Esta etapa de diálisis de la presente invención puede usar cualquier sistema de diálisis de albúmina que permita la retirada de albúmina de la sangre. Se conoce en la técnica una variedad de tales sistemas. Un sistema de diálisis es el sistema de recirculación de absorbancia molecular (MARS, *Molecular Absorbance Recirculating System*). Una alternativa es un sistema genérico de diálisis de albúmina de una sola etapa (SPAD, *Single Pass Albumin Dialysis*). Estos sistemas utilizan una membrana de poro de 50 kDa para someter a diálisis la albúmina en sangre. Este sistema está diseñado particularmente para retirar las toxinas unidas a la albúmina de la sangre de los pacientes.

Como alternativa a este sistema, se puede utilizar una membrana de poro mayor para que la albúmina de la sangre del paciente se intercambie activamente con albúmina nueva mediante diálisis. Esto permite la retirada de toxinas y formas anormales de albúmina en la misma etapa. Esto también permite la introducción en la sangre de albúmina nueva, no del individuo, como se analiza más adelante.

Los estudios en los que se modifica el sistema MARS para incluir una membrana de poro mayor indican que hay una mejora sustancial en la retirada de toxinas unidas a proteína en comparación con el dispositivo de poro convencional de 50 kDa. Por ejemplo, se puede usar una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa, superior a 60 kDa, superior a 70 kDa, superior a 80 kDa, superior a 90 kDa o superior a 100 kDa. La membrana puede tener un tamaño de poro inferior a 60 kDa, inferior a 75 kDa, inferior a 100 kDa o inferior a 150 kDa.

Se pueden retirar otros componentes sanguíneos junto con la albúmina, dependiendo del medio utilizado en particular para retirar la albúmina. En una realización, otros componentes que se retiran con la albúmina pueden devolverse a la sangre del individuo. Los componentes que se devolverán pueden purificarse de la mezcla de albúmina que se ha retirado de la sangre o pueden reemplazarse por componentes equivalentes nuevos que no procedan del individuo.

Se conocen en la técnica diferentes métodos para retirar la albúmina de la sangre. Por ejemplo, la patente de EE.UU.

n.º 4.093.612 desvela composiciones de colorantes reactivas que pueden emplearse para retirar la albúmina de un fluido. De acuerdo con la presente invención, tales composiciones se pueden usar para la retirada de albúmina de la sangre del individuo. Por lo tanto, este puede ser un sistema de captura selectivo de albúmina basado en compuestos que se unen específicamente a la albúmina. Estos pueden ser, por ejemplo, colorantes reactivos como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.093.612 tales como azul de cibacrón, o pueden ser otras moléculas capaces de unirse a la albúmina, tales como los anticuerpos específicos de la albúmina.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se retira la albúmina de la sangre de una persona con una enfermedad hepática. Esta albúmina se reemplaza por nueva albúmina que no procede del individuo. La nueva albúmina es preferentemente estructural y funcionalmente normal. Es decir, la nueva albúmina puede comprender ninguna, o sustancialmente ninguna, forma de albúmina estructural o funcionalmente modificada. Cuando la albúmina retirada de la sangre de un individuo comprende una o más formas modificadas de albúmina, la albúmina devuelta a la sangre de ese individuo comprende preferentemente menos albúmina modificada de la que se ha retirado. Por ejemplo, la albúmina devuelta a la sangre del individuo puede comprender menos del 50 %, menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % de la cantidad de albúmina modificada retirada de ese individuo. Preferentemente, la albúmina devuelta al individuo no incluirá albúmina modificada ni albúmina modificada de uno o más de los tipos que se retiraron del individuo, tal como nada de albúmina modificada por isquemia (AMI).

La albúmina nueva puede proceder de otro individuo, tal como de un individuo que no tenga enfermedad hepática, una persona que no tenga insuficiencia hepática o una persona que tenga una función hepática normal. La albúmina nueva normalmente tendrá una mayor proporción de albúmina estructural y funcionalmente normal que la albúmina extraída del individuo. La nueva albúmina puede ser albúmina de calidad farmacéutica.

Esta nueva albúmina se introduce en la sangre del individuo para garantizar que el individuo tenga un nivel adecuado de albúmina circulante. Esta puede ser un reemplazo directo de la albúmina retirada, por ejemplo, se puede devolver la misma o una cantidad equivalente de albúmina a la que se extrae a la sangre. En este sistema, la albúmina del individuo se intercambia eficazmente con albúmina nueva. Como alternativa, variando la cantidad de albúmina introducida en esta etapa, se puede aumentar o disminuir la concentración total de albúmina en sangre si es necesario. Por tanto, la cantidad de albúmina que se introduce en la sangre puede ser mayor o menor que la cantidad que se extrae. Por ejemplo, la enfermedad hepática puede provocar una disminución del nivel de albúmina circulante. Esto puede dar lugar a una baja capacidad funcional. De acuerdo con la presente invención, la cantidad de albúmina nueva introducida en la sangre del paciente puede ser mayor que la cantidad de albúmina extraída. Esto puede complementar el nivel de albúmina en la circulación del individuo. Por ejemplo, puede introducirse una cantidad de albúmina nueva que eleve el nivel general de albúmina en la sangre hasta un nivel igual, o similar, al que se observa en un individuo que no tiene enfermedad hepática.

La albúmina nueva puede introducirse en la sangre del individuo simultáneamente a la retirada de la albúmina del individuo. Por ejemplo, se puede lograr un intercambio de albúmina mediante diálisis. Como alternativa, las etapas de retirada de albúmina y de retorno de albúmina pueden llevarse a cabo secuencialmente o por separado. Por ejemplo, cuando la invención se lleve a cabo *ex vivo*, la sangre del individuo puede pasar a través de medios para retirar la albúmina y luego, posteriormente, se le puede añadir albúmina nueva. Esto se puede realizar mediante diferentes partes del mismo aparato. Como alternativa, la adición de albúmina nueva puede realizarse por separado. Por lo general, la adición de albúmina nueva se lleva a cabo después de la retirada de la albúmina de la sangre del paciente.

En estudios adicionales descritos en el presente documento, los inventores han demostrado que la endotoxina es un componente en la sangre de individuos con enfermedad hepática que puede estar asociada con el pronóstico de esos pacientes, por ejemplo, su susceptibilidad a infecciones o insuficiencia orgánica, su riesgo de mortalidad y su posible capacidad de respuesta a algunas terapias tales como la inmunosupresión.

Los inventores han descubierto que estos factores de pronóstico están relacionados con la activación de neutrófilos en la sangre de un individuo que tiene una enfermedad hepática, y que tal activación puede estar relacionada con la presencia de un factor transmisible en el plasma de esos individuos. Así pues, el plasma de un individuo que tiene un alto grado de activación de neutrófilos es capaz de aumentar el nivel de activación de neutrófilos normales.

Los inventores han descubierto además que se puede conseguir un efecto similar poniendo en contacto neutrófilos normales con endotoxina, y que la retirada de endotoxina de la sangre de pacientes que tienen un alto grado de activación de neutrófilos puede reducir los niveles de activación de los neutrófilos en esa sangre. Por lo tanto, se cree que la retirada de endotoxina es útil en el tratamiento de pacientes que tienen enfermedad hepática cuyos neutrófilos se encuentran en un estado activado. Al restablecer la función normal de los neutrófilos, se puede mejorar la capacidad de esos individuos para combatir infecciones.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a la retirada de endotoxina de la sangre de pacientes que tienen enfermedad hepática. La retirada de la albúmina aborda un problema de desintoxicación, relacionándose la retirada de endotoxina con un problema adicional de respuesta inmunitaria reducida. Al combinar estos dos enfoques en un solo aparato o método, se consigue un tratamiento particularmente eficaz de la enfermedad hepática.

El medio para retirar la endotoxina de la sangre retira la endotoxina de forma selectiva. Es decir, la endotoxina se retira con preferencia a otras sustancias de la sangre. Preferentemente, la cantidad de endotoxina retirada de la sangre es significativamente mayor que la de otros componentes sanguíneos retirados. Por ejemplo, más del 99 % en peso del componente retirado en este aspecto puede ser endotoxina. Más del 98 %, más del 95 %, más del 90 %, más del 80 %, más del 70 %, más del 60 % o más del 50 % del componente retirado en este aspecto puede ser endotoxina.

El medio para retirar endotoxina puede ser cualquier medio capaz de retirar selectivamente endotoxina de la sangre.

En un aspecto, la endotoxina se puede retirar selectivamente utilizando un ligando que se una a la endotoxina. El ligando puede ser cualquier molécula que se una a la endotoxina. Por ejemplo, anticuerpos anti-endotoxina, proteínas de unión a LPS, Polimixina B, polietilenimina, un ligando de arginina y diversos péptidos son conocidos por unirse a la endotoxina. El ligando puede ser un anticuerpo u otro ligando de afinidad que se una específicamente a la endotoxina. Por ejemplo, el ligando puede ser un anticuerpo que se una específicamente a la endotoxina. Por lo general, un ligando que se une específicamente a la endotoxina es un ligando capaz de retirar selectivamente la endotoxina de la sangre como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, el ligando es capaz de unirse a la endotoxina con más fuerza que otros componentes de la sangre. El ligando puede ser un anticuerpo que se une a un epítipo que es específico de la endotoxina. El ligando puede ser una combinación de moléculas que se unen cada una a la endotoxina, tal como una combinación de moléculas que se unen a diferentes partes de la molécula de endotoxina o diferentes endotoxinas. El ligando puede ser un anticuerpo policlonal o una mezcla de anticuerpos que se unen a múltiples epítopos en la molécula de endotoxina o diferentes endotoxinas.

Se pueden generar anticuerpos contra epítopos específicos de la molécula de endotoxina. Los tipos de anticuerpos adecuados pueden ser cualquier tipo de anticuerpo, como se ha descrito anteriormente en relación con la albúmina, tal como un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos que se unen a endotoxina pueden prepararse mediante cualquier medio, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente en relación con los anticuerpos que se unen a la albúmina. El anticuerpo obtenido puede aislarse y, si se desea, purificarse.

Un anticuerpo u otro ligando, "se une específicamente" a una proteína cuando se une con preferencia o con alta afinidad a la proteína para la que es específica, pero no se une ni se une sustancialmente o se une solo con baja afinidad a otras proteínas. Es decir, se une a la endotoxina con más fuerza que a otros componentes sanguíneos, tales como otras proteínas de la sangre. La especificidad de la unión puede ser tal que se una a diferentes formas de endotoxina. Preferentemente, se une a una variedad de formas de endotoxina con mayor afinidad que otros componentes sanguíneos.

Cuando se usa un ligando para lograr la retirada de endotoxina, el ligando puede proporcionarse unido a un soporte sólido. El ligando puede inmovilizarse sobre tal soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados son los analizados anteriormente en relación con los ligandos de unión a albúmina.

Por consiguiente, los medios para retirar la endotoxina de acuerdo con la presente invención pueden comprender o consistir en tal soporte sólido sobre el cual se une o inmoviliza un ligando capaz de unirse a endotoxina. Los medios para retirar endotoxina pueden comprender o consistir en un recipiente a través del cual pasa la sangre. Por tanto, el recipiente puede comprender una entrada y una salida. La entrada y la salida están colocadas de modo que la sangre que pasa a través del recipiente entre en contacto con un soporte sólido como se describe en el presente documento. Preferentemente, el medio está diseñado o seleccionado para maximizar el área de contacto entre la sangre y el soporte sólido. Se conoce en la técnica una variedad de tales diseños. Por ejemplo, el medio puede ser una columna o un lecho filtrante lleno de perlas, en donde un ligando para la albúmina está inmovilizado sobre las perlas.

En otro aspecto, en lugar de retirar físicamente la endotoxina de la sangre, se puede administrar un agente al individuo para reducir los niveles de endotoxina. Por ejemplo, la endotoxina de la sangre puede neutralizarse funcionalmente en lugar de retirarse. Se conocen en la técnica diferentes métodos para neutralizar endotoxina. Esto puede comprender administrar un agente al individuo, agente que es capaz de retirar o neutralizar selectivamente la actividad de la endotoxina. Esto puede depender del sistema inmunitario del hospedador para ayudar a retirar la endotoxina. Por ejemplo, un agente adecuado puede unirse a la endotoxina y permitir que el sistema inmunitario del individuo aclare los complejos de endotoxina-agente de la sangre. Se conocen diferentes agentes para disminuir los niveles de endotoxina circulante, por ejemplo, anticuerpos anti-endotoxina, albúmina y proteínas de unión a LPS, anticuerpos CD-14 neutralizantes de LPS.

Se pueden retirar otros componentes sanguíneos junto con la endotoxina, dependiendo del medio utilizado en particular para retirar la endotoxina. Por ejemplo, algunos métodos para retirar endotoxina también pueden retirar otras toxinas de la sangre. Esto puede resultar beneficioso para el paciente. Algunos métodos para retirar endotoxina también pueden retirar otros componentes sanguíneos que se deseen mantener en la sangre. En este caso, los componentes sanguíneos que se retiran con la endotoxina pueden volver a la sangre del individuo. Los componentes que se devuelvan pueden purificarse de la mezcla de endotoxina retirada o pueden reemplazarse por componentes equivalentes nuevos que no procedan del individuo.

- En la técnica, se han descrito diferentes enfoques para retirar endotoxina de una muestra. Por ejemplo, el documento EP-A-0 129 786 describe el uso de polimixina B inmovilizada covalentemente sobre fibras de poliestireno para la retirada de endotoxinas de la sangre. Falkenhagen *et al.*, (*Artificial Organs* (1996) 20: 420) describieron la retirada de endotoxina del plasma utilizando perlas recubiertas de polietilenimina. El documento WO 01/23413 describe oligopéptidos que tienen un alto grado de dispersión que se utilizan para retirar selectivamente endotoxina de la sangre o del plasma. El documento US 5.476.715 describe materiales para la retirada de endotoxina de una muestra, que comprenden un vehículo poroso elaborado a partir de polímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico con un tamaño de partícula y un espaciamiento particulares. Staubach *et al.*, ("*Transfusion and Apheresis Science*" (2003) 29: 93-98) describe un dispositivo para la adsorción de endotoxina que se basa en albúmina inmovilizada. Por tanto, existe una serie de métodos disponibles que podrían utilizarse para retirar endotoxina de una muestra. Se puede utilizar o adaptar para usar cualquiera de estos métodos de acuerdo con la presente invención. El lector experto podrá seleccionar un método y las condiciones adecuados para su uso.
- El aparato o el método de la invención será preferentemente eficaz para lograr una reducción significativa de los niveles de endotoxina circulantes en sangre. Por ejemplo, el aparato o el método puede conducir a una reducción de al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o más en el nivel de endotoxina en la sangre del individuo.
- Los dos aspectos de la presente invención también están relacionados. La albúmina es capaz de unirse a la endotoxina en la sangre. Así pues, la retirada de la albúmina también puede conducir a la retirada de alguna endotoxina unida a la albúmina. Asimismo, al aumentar el nivel de albúmina normal en el individuo, de nuevo, la albúmina de la sangre puede unirse a la endotoxina circulante y los niveles de endotoxina libre en la sangre pueden disminuir. Sin embargo, la cantidad de reducción de endotoxina lograda de esta manera es relativamente baja, por tanto, la presente invención utiliza medios separados para (a) retirar la albúmina y (b) reducir los niveles de endotoxina. Este efecto de retirada y/o reemplazo de albúmina puede complementar otros medios para reducir la endotoxina y puede ayudar a "absorber" la endotoxina que queda en la sangre del individuo.
- Basándose en estos hallazgos, los inventores han desarrollado un nuevo método y aparato para usar en el tratamiento de individuos que tienen una enfermedad hepática. Estos comprenden una combinación de componentes que actúan para retirar tanto la albúmina como la endotoxina de la sangre de un individuo que tiene una enfermedad hepática.
- Particularmente, los inventores han desarrollado un aparato para usar en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad hepática, comprendiendo el aparato medio para retirar selectivamente la albúmina de la sangre del individuo y medio para retirar selectivamente la endotoxina de la sangre del individuo. Estos son dos medios separados, cada uno dirigido a lograr uno de estos efectos. El aparato también comprende medios para suministrar albúmina nueva, que no procede del individuo, a la sangre del individuo.
- El uso de tal aparato produce, por tanto, la retirada de albúmina de la sangre del individuo, una reducción del nivel de endotoxina en la sangre del individuo y, opcionalmente, la introducción de nueva albúmina en la sangre del individuo. Esto es terapéuticamente útil de una variedad de formas. La retirada de la albúmina endógena de la sangre de un individuo puede producir la retirada de toxinas no deseadas unidas a la albúmina y también puede producir la retirada de formas modificadas anormales de albúmina de la sangre. Tales formas modificadas suelen tener una capacidad funcional reducida. La introducción de albúmina nueva se puede utilizar para reemplazar la albúmina que se ha retirado por albúmina nueva. Preferentemente, la albúmina nueva no comprende toxinas unidas a las moléculas de albúmina y, preferentemente, la albúmina nueva está en forma no modificada. La adición de albúmina nueva a la sangre también se puede utilizar para complementar los niveles de albúmina endógena cuando estos se reducen debido una enfermedad hepática. Por último, la retirada de endotoxina de la sangre de un individuo que tiene una enfermedad hepática puede ayudar a reducir el nivel de activación de neutrófilos en la sangre del individuo. Esta reducción de la activación de los neutrófilos puede reducir el riesgo de infección, insuficiencia orgánica y mortalidad, y puede mejorar la capacidad de respuesta del individuo a la terapia inmunosupresora y al tratamiento con esteroides o antibióticos.
- Los métodos y aparatos de la invención proporcionan así un enfoque dirigido al tratamiento de la enfermedad hepática, abordando múltiples factores relacionados con dicha enfermedad y beneficiando al individuo de múltiples maneras.
- En un aspecto, por lo tanto, la invención se refiere a un aparato para usar en el tratamiento de un individuo con enfermedad hepática. El aparato puede comprender una serie de componentes, que pueden usarse combinados o por separado. Un aparato de la invención comprenderá o consistirá esencialmente en medio para retirar selectivamente la albúmina de la sangre de un individuo, medio para retirar selectivamente la endotoxina de la sangre del individuo y medio para suministrar albúmina que no procede del individuo a la sangre del individuo, en donde dicho medio para retirar selectivamente la albúmina comprende medio para la diálisis de la albúmina que comprende una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa, y en donde el medio para retirar selectivamente la albúmina y el medio para retirar selectivamente la endotoxina son componentes separados del aparato.
- Cualquier medio descrito en el presente documento puede usarse para la retirada de albúmina o endotoxina, siempre

que los medios sean componentes separados del aparato. Se describe un solo componente del aparato utilizado para la retirada tanto de albúmina como de endotoxina. Por lo general, tal componente del aparato comprenderá tanto medios para retirar la albúmina como medios para retirar la endotoxina. Por ejemplo, cuando la albúmina y la endotoxina deben retirarse mediante la unión a ligandos específicos, se pueden utilizar uno o más ligandos específicos para la albúmina y uno o más ligandos específicos para la endotoxina juntos en el mismo componente del aparato. Por ejemplo, el aparato puede comprender un solo recipiente, tal como una columna o un lecho filtrante, que comprenda soporte/s sólido/s sobre el/los que se inmovilicen los dos ligandos. Los ligandos pueden inmovilizarse sobre diferentes soportes o sobre el mismo soporte. Por tanto, la albúmina y la endotoxina pueden retirarse simultáneamente de la sangre del individuo.

El aparato para usar en la presente invención incluye medios separados para la retirada de albúmina y endotoxina. El aparato puede incluir más de un medio capaz de retirar la albúmina y/o más de un medio capaz de retirar la endotoxina.

El aparato puede comprender otros componentes. El aparato comprende un medio para suministrar albúmina nueva, es decir, albúmina que no deriva del individuo, a la sangre. El aparato puede utilizarse *ex vivo*. Por ejemplo, el aparato puede estar diseñado de manera que la sangre del individuo pase a través de él para lograr la retirada de albúmina y la retirada de endotoxina antes de volver al cuerpo del individuo.

En la Figura 11, se ilustran dos posibles aparatos de la divulgación. Quedará claro a partir de la discusión del presente documento y de los dos aparatos que se ilustran en la Figura 11 que se puede utilizar una serie de componentes diferentes en una variedad de combinaciones para lograr los efectos deseados.

Los componentes del primer aparato ilustrado en la Figura 11 son los siguientes:

1. Medios para atrapar la albúmina. La trampa de albúmina retira selectivamente la albúmina de la sangre del paciente.
2. Medios para llevar a cabo la diálisis de la albúmina para retirar toxinas. Por ejemplo, el uso de una membrana de poro de gran tamaño (superior a 50 kDa) para permitir el intercambio de albúmina permite una mejor retirada de toxinas al permitir que la albúmina del paciente interactúe con los filtros de "limpieza". Esto también permite la retirada de la albúmina del paciente a medida que se intercambia a través del filtro con el dializado de albúmina.
3. Filtros para limpiar la albúmina.
4. Componente de retirada de endotoxina.
5. Infusión de albúmina nueva.

Los componentes del segundo aparato ilustrado en la Figura 11 son los siguientes:

1. Trampa de lipopolisacáridos bacterianos. Este es un medio para retirar LPS/endotoxina de la sangre del paciente.
2. Medios para llevar a cabo la diálisis de la albúmina para retirar toxinas. Por ejemplo, como se ha analizado para el primer aparato ilustrado en la Figura 11.
3. Filtros para limpiar la albúmina.
4. Medios de reemplazo de albúmina. Por ejemplo, un gradiente de difusión para retirar la albúmina del paciente y reemplazarla con albúmina nueva.
5. Infusión de albúmina nueva.

Se describe un método para tratar una enfermedad hepática utilizando el aparato de la invención. Por ejemplo, se puede poner en contacto sangre del individuo con un aparato para usar en la invención, de modo que la albúmina y la endotoxina se retiren de la sangre, y la albúmina que no procede del individuo pueda suministrarse opcionalmente a la sangre. Este método puede llevarse a cabo *ex vivo* y la sangre puede devolverse posteriormente al individuo.

Se describe un método para tratar a una persona que tiene una enfermedad hepática. El método comprende o consiste esencialmente en las siguientes etapas: (a) retirar albúmina de la sangre del individuo; y (b) reducir el nivel de endotoxina de la sangre del individuo. Esto se puede lograr mediante cualquier método o medio como se describe en el presente documento. Este método puede llevarse a cabo *ex vivo*. La etapa (a) se puede realizar utilizando diálisis. La etapa (a) se puede realizar utilizando un ligando capaz de unirse específicamente a la albúmina. La etapa (b) se puede realizar retirando directamente la endotoxina de la sangre. La etapa (b) se puede realizar utilizando un ligando que se une específicamente a la endotoxina. La etapa (b) se puede realizar administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de reducir el nivel de endotoxina en la sangre. Se puede usar cualquier combinación de los métodos de la etapa (a) y la etapa (b) descritos en el presente documento. Opcionalmente, el método incluye además la etapa de introducir albúmina que no procede del individuo en la sangre del individuo. La invención también se refiere a un método *in vitro* para tratar sangre extracorpóreamente mediante la retirada selectiva de albúmina y endotoxina de la sangre, en donde la sangre es de un individuo que tiene una enfermedad hepática, comprendiendo el método (a) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la albúmina y retirar así la albúmina de la sangre, (b) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la endotoxina y retirar, de ese modo, la endotoxina de la sangre; y añadir a la sangre albúmina que no procede del mismo individuo que la sangre;

en donde las etapas (a) y (b) del método comprenden diferentes medios para retirar la albúmina y reducir la endotoxina. Este método se puede realizar mediante cualquier medio adecuado que se describe en el presente documento, y comprende la etapa adicional de añadir a la sangre albúmina que no procede del individuo. La sangre que ha sido tratada de esta manera puede devolverse al individuo con fines terapéuticos o puede usarse para otro fin. Por ejemplo, la sangre se puede tratar de esta manera antes de la transfusión a un individuo diferente.

El individuo que se va a tratar de acuerdo con la invención es un individuo que tiene una enfermedad hepática. La insuficiencia hepática es la etapa final de la enfermedad hepática. La insuficiencia hepática se divide en tipos según la rapidez de aparición. La insuficiencia hepática aguda se desarrolla rápidamente, pero la insuficiencia hepática crónica puede tardar meses o años en desarrollarse. Por definición, la insuficiencia hepática tiene lugar cuando el hígado está tan enfermo y funciona tan mal, que la encefalopatía es evidente. Cualquier enfermedad hepática progresiva puede provocar insuficiencia hepática; los ejemplos incluyen: toxicidad del acetaminofeno, cirrosis, hepatitis vírica y cáncer metastásico del hígado. Otros signos de enfermedad hepática tales como ictericia, ascitis, *fetor hepaticus* e insuficiencia de la coagulación indican que el hígado tiene problemas para realizar sus funciones fisiológicas normales, pero no se denomina insuficiencia hepática hasta que aparecen los cambios en el estado mental.

El pronóstico de los pacientes con enfermedad hepática es difícil de estimar, porque la afección tiene muchas causas.

Por consiguiente, el individuo que se ha de tratar puede ser un individuo cuyo hígado esté descompensado o que muestre encefalopatía hepática. El hígado del individuo puede estar en un estado compensado. El individuo puede tener una enfermedad hepática crónica. El individuo puede tener cirrosis hepática, por ejemplo, con o sin hepatitis alcohólica. El individuo puede tener insuficiencia hepática aguda. El individuo puede tener encefalopatía hepática.

La aparición de una enfermedad hepática tanto aguda como crónica puede deberse a una causa xenobiótica. Por ejemplo, el individuo puede haber estado expuesto a una sustancia química, un fármaco o algún otro agente que cause daño hepático. El individuo puede tener una reacción a un fármaco de venta libre, fármaco recetado o droga que cause daño hepático. Es posible que el individuo haya estado tomando Rezulin™ (troglitazona; Parke-Davis), Serzone™ (nefazodona; Bristol-Myers Squibb) u otros fármacos que se cree que provocan daño hepático. El individuo puede ser alguien que haya tenido una sobredosis de un fármaco en particular o que superó la dosis recomendada de un fármaco capaz de provocar daño hepático. Por ejemplo, el individuo puede haber tomado una sobredosis de paracetamol. El individuo puede haber estado expuesto a sustancias químicas que pueden provocar daño hepático tales como, por ejemplo, en su lugar de trabajo. Por ejemplo, el individuo puede haber estado expuesto a dichas sustancias químicas en un contexto industrial o agrícola. El individuo puede haber consumido plantas que contengan compuestos que puedan provocar daño hepático, en particular, este puede ser el caso cuando el individuo es un animal, tal como un herbívoro. Por ejemplo, el individuo puede haber consumido una planta que contenga alcaloide de pirrolizidina tal como hierba cana. El individuo puede haber estado expuesto a toxinas ambientales que se cree que provocan enfermedad hepática.

La toxicidad hepática relacionada con fármacos comprende más del 50 % de todos los casos de enfermedad hepática aguda (insuficiencia hepática aguda). La toxicidad por acetaminofeno (también conocido como paracetamol y *N*-acetil-*p*-aminofenol) es la causa más común de insuficiencia hepática aguda en Estados Unidos y Gran Bretaña. Los consumidores de moderados a intensos de alcohol a largo plazo que toman acetaminofeno a dosis terapéuticas o moderadamente excesivas corren el riesgo de padecer una lesión hepática grave y, posiblemente, una insuficiencia hepática aguda. El consumo de alcohol potencia los efectos tóxicos del acetaminofeno. La toxicidad idiosincrásica del fármaco también contribuye a la insuficiencia hepática aguda. Se cree que la toxicidad idiosincrásica del fármaco es una respuesta de hipersensibilidad en donde el individuo responde a un fármaco de una forma farmacológicamente anormal. Esta respuesta anormal puede provocar insuficiencia hepática aguda.

La insuficiencia hepática aguda o la enfermedad hepática crónica pueden ser provocadas por una infección con un organismo patógeno. Por ejemplo, la enfermedad hepática puede deberse a una infección vírica. En particular, el individuo puede estar infectado o haber sido infectado, con un virus que provoca hepatitis. El individuo puede tener hepatitis vírica crónica. El virus puede, por ejemplo, ser virus de la hepatitis B, C o D. En algunos casos y, en particular, cuando el individuo tiene hepatitis vírica, el individuo también puede estar infectado con VIH-I o II. El individuo puede tener SIDA. Es posible que el individuo haya sido, o sea, infectado con otros organismos que provocan enfermedades hepáticas y, en particular, los que están presentes en el hígado durante alguna etapa de su ciclo de vida. Por ejemplo, el individuo puede tener, o haber tenido, un parásito hepático.

El individuo puede tener una enfermedad hereditaria que provoque, o que aumente el riesgo de padecer, una enfermedad hepática por crono. Por ejemplo, el individuo puede tener una o más de entre hemocromatosis hepática, enfermedad de Wilson o deficiencia de α -1-antitripsina. El individuo puede tener un trastorno hereditario que provoque algún tipo de anomalía estructural o funcional en el hígado que aumente la probabilidad de fibrosis hepática. El individuo puede estar predispuesto genéticamente a desarrollar un trastorno autoinmunitario que dañe el hígado y que, por tanto, pueda contribuir a la fibrosis hepática.

La enfermedad hepática crónica puede estar inducida por el alcohol. Un hombre o una mujer que se ha de tratar puede ser, o haber sido, alcohólico o alcohólica. Él o ella puede estar, o haber estado, consumiendo una media de 50 o más

unidades de alcohol a la semana, 60 o más unidades de alcohol a la semana, 75 o más unidades de alcohol a la semana e incluso 100 o más unidades de alcohol a la semana. El hombre o la mujer puede estar, o haber estado, consumiendo una media de hasta 100 unidades de alcohol a la semana, hasta 150 unidades de alcohol a la semana e incluso hasta 200 unidades de alcohol a la semana. La medida de una unidad de alcohol varía de un país a otro. En este caso, una unidad equivale a 8 gramos de etanol de acuerdo con la norma del Reino Unido.

El hombre o la mujer puede haber consumido esos niveles de alcohol durante 5 o más años, 10 o más años, 15 o más años, o 20 o más años. El individuo puede haber estado consumiendo tales niveles de alcohol durante hasta 10 años, hasta 20 años, hasta 30 años e incluso hasta 40 años. En los casos de cirrosis hepática inducida por alcohol, el individuo puede estar envejecido, por ejemplo, 25 años o más, 35 años o más, 45 años o más e incluso más de 60 años.

El individuo puede ser varón o mujer. Las mujeres pueden ser más susceptibles a los efectos adversos del alcohol que los hombres. Las mujeres pueden desarrollar una enfermedad hepática crónica alcohólica en un período de tiempo más corto y con cantidades menores de alcohol que los hombres. Parece que no hay un solo factor que explique la mayor susceptibilidad al daño hepático por alcohol en las mujeres, pero el efecto de las hormonas sobre el metabolismo del alcohol puede desempeñar un papel importante.

Así pues, el individuo puede estar padeciendo de hepatitis alcohólica. La hepatitis alcohólica puede variar de una hepatitis leve, siendo las pruebas de laboratorio anormales la única indicación de enfermedad, a disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla provocada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática, ascitis, varices esofágicas sangrantes, coagulación sanguínea anormal y coma.

El individuo puede tener una o más de una serie de otras afecciones que se sabe que provocan daño hepático, tales como, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica autoinmunitaria y/o esquistosomiasis (infección parasitaria). El individuo puede tener o haber tenido un bloqueo del conducto biliar. En algunos casos, es posible que no se conozca la causa subyacente de la enfermedad hepática. Por ejemplo, el individuo puede haber sido diagnosticado de cirrosis criptogénica. Por consiguiente, se puede sospechar que el individuo tenga cualquiera de las afecciones enumeradas en el presente documento.

Los métodos para diagnosticar enfermedades hepáticas tales como insuficiencia hepática aguda y encefalopatía hepática son bien conocidos en la técnica y, en particular, para los médicos y veterinarios en el campo. Preferentemente, el individuo habrá sido diagnosticado de una enfermedad hepática y encefalopatía hepática, por ejemplo, por un médico o veterinario. El individuo puede mostrar uno o más síntomas asociados con una enfermedad hepática, tales como uno o más de entre ictericia, ascitis, cambios en la piel, retención de líquidos, cambios en las uñas, moretones con facilidad, hemorragias nasales, varices esofágicas y, en los varones, puede haber agrandamiento de las mamas. El individuo puede mostrar agotamiento, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, debilidad y/o pérdida de peso. El individuo también puede mostrar uno o más síntomas asociados con la encefalopatía hepática, tales como uno o más de entre confusión, desorientación, demencia, estupor, coma, edema cerebral, insuficiencia multiorgánica (insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardiovascular o insuficiencia renal), rigidez muscular, convulsiones o deterioro del habla. El individuo que se va a tratar puede estar tomando o no otros fármacos para tratar la enfermedad hepática. El individuo que se va a tratar puede estar en riesgo de desarrollar encefalopatía hepática.

La enfermedad hepática puede haber sido, o ser, confirmada mediante examen físico que incluye técnicas tales como la ecografía. Es posible que se hayan tomado biopsias de hígado para buscar la acumulación de fibrosis, células necróticas, degeneración celular y/o inflamación y otros rasgos característicos de la enfermedad hepática. Es posible que se haya evaluado la función hepática en el individuo para determinar si está comprometida en el individuo. Se puede caracterizar la naturaleza y la causa subyacente de la enfermedad hepática. Se puede determinar cualquier antecedente de exposición a agentes causantes de la enfermedad hepática.

El individuo que se va a tratar puede estar en riesgo de padecer episodios de encefalopatía hepática, por ejemplo, pacientes que esperan un trasplante de hígado, pacientes con hipertensión quirúrgica y/o portal. Una persona en riesgo de padecer episodios de encefalopatía hepática es una persona que no ha padecido ningún episodio de encefalopatía hepática o no ha padecido ningún episodio de encefalopatía hepática durante un período prolongado de tiempo (aproximadamente 12 semanas o más), pero que tiene un trastorno o una afección médica que crea un riesgo de padecer episodios de encefalopatía hepática. Un episodio de encefalopatía hepática es una afección clínica caracterizada por la presencia de disfunción cerebral en pacientes con enfermedad o disfunción hepática. Existe un amplio espectro de trastornos mentales en la encefalopatía hepática que varían de mínimos, donde los efectos principales son una reducción en la calidad de vida, a manifestos, que conducen al coma y, finalmente, a la muerte.

El individuo en el que se pone en práctica el método de la invención puede ser un paciente con trasplante de hígado, un individuo que padezca una lesión por reperusión, por ejemplo, en un injerto después de un trasplante de hígado o un paciente con riesgo de desarrollar o que ha desarrollado insuficiencia multiorgánica.

Cuando se reduce el nivel de endotoxina utilizando un agente que se administrará al individuo, el agente se puede administrar en una variedad de formas farmacéuticas. Así pues, un agente se puede administrar por vía oral, por

ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables. El agente también se puede administrar por vía parenteral, ya sea por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraesternal, por vía transdérmica o mediante técnicas de infusión. El agente también se puede administrar en forma de supositorio. Un médico podrá determinar la vía de administración requerida para cada paciente en particular.

La formulación de un agente dependerá de factores tales como la naturaleza del agente exacto, si se pretende un uso farmacéutico o veterinario, etc. Un agente que se va a utilizar para tratar la enfermedad hepática puede formularse para uso simultáneo, separado o secuencial.

Un agente normalmente se formula para su administración en la presente invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, p. ej. lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, p. ej. sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; p. ej. almidones, goma arábica, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, p. ej. almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón de sodio; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas utilizadas en formulaciones farmacéuticas. Tales preparaciones farmacéuticas pueden fabricarse de manera conocida, por ejemplo, mediante procesos de mezcla, granulación, preparación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con película.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma de mascar natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, p. ej., agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, p. ej., propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Las soluciones para la administración intravenosa o perfusión pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o, preferentemente, en forma de soluciones salinas isotónicas, acuosas, estériles.

La dosis de un agente se puede determinar de acuerdo con diversos parámetros, en especial, según la sustancia utilizada; la edad, el peso y el estado del paciente que se va a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido.

De nuevo, un médico podrá determinar la vía de administración y la dosis requeridas para cualquier paciente en particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal, según la actividad del inhibidor específico, la edad, el peso y el estado del individuo que se va a tratar, el tipo y la gravedad de la degeneración, y la frecuencia y vía de administración. Preferentemente, los niveles de dosis diaria son de 5 mg a 2 g.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la que pertenece esta invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudios de albúmina en pacientes con cirrosis

El objetivo de los presentes inventores era realizar una evaluación cualitativa de la funcionalidad de la albúmina en el aumento de la gravedad de la enfermedad hepática, utilizando un marcador de espín y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. Se añadió un marcador de espín para la albúmina, ácido 16-doxil-esteárico (SL), a las muestras de plasma de voluntarios sanos (control, n = 5), sujetos cirróticos estables bien compensados (cirróticos, n = 5) y pacientes con insuficiencia hepática aguda o crónica (IHAC, n = 10). Se trataron 5 pacientes con sistema de recirculación de absorción molecular (MARS, 4 sesiones) y 5 con terapia médica convencional. Las mediciones se realizaron antes y después de 7 días de MARS. A continuación, se añadieron alícuotas de etanol a las muestras de plasma marcadas y se registraron los espectros de EPR después de cada adición. El análisis de los espectros registrados proporcionó información sobre la configuración de la albúmina y las propiedades de unión. Para cada parámetro medido, se encontró que la albúmina del paciente tenía una capacidad funcional menor que la de los controles voluntarios sanos. En la insuficiencia hepática, se encontró una disminución adicional de la función. No se observaron cambios en el estado de la albúmina después del tratamiento con MARS.

| | Controles sanos | Cirróticos estables | IHAC |
|---|-----------------|---------------------|-------|
| Flexibilidad molecular (D_R) [≥ 1] | 4,706** | 1,194 | 1,613 |
| Unión de ácidos grasos (K_B) [$\geq 8,5$] | 17,34 * | 4,888 | 1,375 |
| Estabilidad conformacional (L_2) [2,9] | 2,939 | 2,335 †† | 1,301 |
| Calidad del transporte (RTQ) [%] | 84,60 * | 49,20 † | 10,83 |
| Eficiencia del transporte (RTE) [%] | 87,00 * | 49,20 | 42,33 |
| Capacidad de desintoxicación (DTE) [%] | 130,3 * | 49,80 † | 4,000 |
| *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ frente a sujetos cirróticos estables, † $p < 0,05$, ††, $p < 0,01$ frente a IHAC día 0. Los valores entre [] indican valores de referencia saludables normales establecidos previamente. | | | |

Los resultados de este estudio indicaron claramente que la albúmina del paciente estaba gravemente comprometida en cuanto a su estructura y función, que empeora en insuficiencia hepática. Estos pacientes suelen estar asociados con concentraciones en plasma reducidas de albúmina, y esta combinación de factores dará lugar a una capacidad funcional extremadamente baja. Aunque se ha demostrado que el MARS retira las toxinas unidas a la albúmina, no aborda el problema subyacente de la albúmina del paciente de mala calidad.

En este mismo grupo de pacientes también se han examinado muestras de plasma para detectar la presencia de albúmina modificada por isquemia (AMI). La AMI se determina examinando la capacidad de la albúmina para unirse a átomos de metal. En la albúmina funcional, la función de unión al metal es alta, pero, tras un estrés oxidativo (como puede ocurrir durante la isquemia y la reperfusión), la estructura de la proteína se daña y disminuye la capacidad para unirse a metales.

En el presente grupo de pacientes, los presentes inventores encontraron que la cantidad de AMI (en relación con el contenido de albúmina plasmática, véase la Figura 1) aumentó significativamente ($p < 0,001$) en pacientes con enfermedad hepática en comparación con sujetos de control sanos. También se encontró un aumento significativo entre los sujetos cirróticos estables y con IHAC, indicando de nuevo que el daño adicional de la albúmina está asociado con una mayor gravedad de la enfermedad.

Aunque la modificación exacta de la proteína que se produce durante la formación de AMI todavía es objeto de investigación, se ha identificado que la región está dentro de los 20 restos de aminoácido del extremo N-terminal. Esto es de interés, ya que se diferencia claramente de los sitios de unión de ácidos grasos identificados examinados utilizando la técnica de marcaje EPR descrita anteriormente, e indica que hay varios procesos de modificación posterior a la traducción asociados con la enfermedad hepática grave.

Ejemplo 2: Estudios de función de los neutrófilos

Los objetivos del presente estudio eran examinar sistemáticamente las funciones esenciales de los neutrófilos, (estallido oxidativo y fagocitosis) en pacientes con hepatitis alcohólica y examinar su relación con las tasas de infección, la insuficiencia orgánica y la supervivencia. En estudios *ex vivo*, se investigó si el defecto en la función de los neutrófilos se debía a un factor humoral y si la retirada de endotoxina del plasma restablecería la función de los neutrófilos del paciente.

Para experimentos con células, se utilizaron sangre entera o neutrófilos aislados (y plasma del paciente) para realizar los ensayos Phagoburst® o Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania). En todos los experimentos, se tomaron precauciones estrictas para evitar la contaminación por endotoxina, trabajando de forma aséptica y utilizando equipos sin endotoxina.

Métodos

Selección de pacientes

Todos los pacientes o sus familiares dieron su consentimiento informado por escrito, y el estudio fue aprobado por el comité de ética local. Para este estudio, se examinaron pacientes ingresados con evidencia de cirrosis alcohólica, en el momento de una biopsia hepática transyugular clínicamente indicada. Los pacientes fueron incluidos si ingresaban con descompensación aguda de cirrosis alcohólica manifestada por ictericia creciente, ascitis o encefalopatía hepática de grado 1 o 2, y no, si existía evidencia microbiológica (cultivos de orina de rutina, sangre, esputo y ascitis) de infección. Se excluyó a los pacientes que tenían <18 o >75 años, que tenían evidencia de: fallo orgánico (necesidad de inotrópicos, insuficiencia renal - creatinina > 150 , encefalopatía hepática de grado 3 o 4, necesidad de ventilación mecánica, disfunción cardíaca grave), hiponatremia, malignidad hepática/extrahepática, en el transcurso de los 3 días

posteriores a la hemorragia gastrointestinal o, si recibieron alguna terapia inmunomoduladora, antes de ingresar al estudio.

Diseño del estudio

Tras la corrección de cualquier alteración electrolítica o hipovolemia asociada, se tomaron muestras de sangre y se utilizaron para determinar la bioquímica de rutina, la función de los neutrófilos, el perfil de citocinas y la detección de ácido tiobarbitúrico (T-BARS/MDA modificado). La sangre venosa periférica se recogió asépticamente en tubos libres de pirógenos (BD Vacutainer Lithium-Heparin, 60 U por tubo, Beckton y Dickinson, Plymouth, RU de pacientes y voluntarios sanos. Para experimentos con células, se mantuvo la sangre a temperatura ambiente, para recoger plasma, se colocó la sangre en hielo inmediatamente. Tras la centrifugación, se dividió el plasma en alícuotas en condiciones libres de pirógenos en criotubos sin endotoxina (Corning Inc., Corning, NY) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Se utilizaron 100 µl de sangre entera o 50 µl de neutrófilos aislados y 50 µl de plasma para realizar el Phagoburst® o el Phagotest®. En todos los experimentos, se tomaron precauciones estrictas para evitar la contaminación por endotoxina, trabajando de forma aséptica y utilizando equipos sin endotoxina. Se evaluó de forma rutinaria la bilirrubina, la albúmina, las pruebas de función hepática, el parámetro de coagulación, el hemograma completo y la proteína C reactiva (CRP, *C-Reactive Protein*). Se calcularon la función discriminante de Maddrey y la puntuación de Pugh. Los pacientes fueron seguidos prospectivamente durante un período de 90 días. Se registró la aparición de disfunción orgánica y mortalidad. Se realizaron hemocultivos de cribado con regularidad, y la política unitaria fue utilizar antibióticos profilácticos en el momento de la presentación en la mayoría de los pacientes.

Neutrófilos

Los neutrófilos se investigaron en un análisis de sangre entera (como se describe a continuación) o después del aislamiento mediante una centrifugación en gradiente de una etapa (como se indica en la sección de resultados, véase el apéndice).

Activación de neutrófilos (estallido oxidativo) y fagocitosis: Se utilizó el kit Phagoburst® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) para determinar el porcentaje de neutrófilos que producen oxidantes reactivos mediante estimulación con bacterias *E. coli* opsonizadas o sin ningún estímulo según las instrucciones del fabricante. Se utilizó Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) para medir el porcentaje total de neutrófilos que mostraban fagocitosis y la actividad fagocítica celular individual utilizando bacterias *E. coli* opsonizadas marcadas con FITC (véase el apéndice). Los neutrófilos se seleccionaron según las características de dispersión frontal y lateral (Figura 2) y, posteriormente, se analizó el porcentaje de células positivas en CD16 - células positivas en FITC, correspondiente al porcentaje de neutrófilos sometidos a fagocitosis y la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF), correspondiente al número de bacterias engullidas por una célula. Para evitar la variabilidad debido a la diferencia de bacterias entre lotes, los resultados se normalizaron con respecto a la media de al menos 3 muestras de control sanas por cada nuevo lote de bacterias utilizado. Las muestras se analizaron por triplicado o por duplicado.

Incubación con endotoxina

Se preparó endotoxina (*E. coli* 0111: B4 Lote 085K4068, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) como una solución madre de 1 mg/ml y se diluyó nuevamente con PBS a las concentraciones indicadas. Se incubó sangre entera durante 1 h con la respectiva concentración de endotoxina a 37 °C en un baño de agua antes de realizar Phagotest® o Bursttest®.

Retirada de endotoxina de las columnas de pacientes

Utilizando Detoxigel: se usaron columnas preenvasadas Detoxi-Gel® Affinity-pack (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) que contenían un gel de retirada de endotoxina que consiste en polimixina B inmovilizada que se une a la parte de lípido A del lipopolisacárido bacteriano para retirar la endotoxina de las muestras de plasma. Se incubaron 100 µl de esta muestra de plasma diluida, libre de endotoxina, con 50 µl de suspensión celular y se realizó Bursttest® o Phagotest® como se indica. (véase el apéndice). *Utilizando el anticuerpo CD14:* se incubaron 100 µl de plasma y 50 µl de PBS con 5 µl de un anticuerpo anti-CD14 humano (Clon 11D18, Immuntols, Friesoythe, Alemania) (conocido por neutralizar el LPS) durante 60 minutos antes de realizar el Phagotest® o el Bursttest®.

Citocinas

Se determinaron los niveles de TNFα, sTNFαR1, sTNFαR2, IL-6 e IL-8 en plasma utilizando conjuntos disponibles en el mercado (BioSource International, Nivelles, Bélgica).

Malondialdehído y prostaglandina F2α

Se determinó el malondialdehído (MDA) utilizando un ensayo de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico modificado como se conoce en la técnica. Se ensayó el 8-isoprostano F2alfa libre con un kit de EIA comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Estadística

Para comparar la prueba de chi-cuadrado de dos grupos, se utilizaron la prueba t o la prueba de Mann-Whitney según fue apropiado, para la comparación de más de dos grupos, se utilizó la prueba ANOVA con los análisis *ad hoc* de Turkey (varianzas iguales) o Dunnett C (sin varianzas iguales) para conjuntos de datos, según fue apropiado. Para evaluar la precisión del diagnóstico, se construyeron curvas de características operativas del receptor (ROC, *Receiver Operating Characteristic*) y se calcularon las áreas bajo la curva (AUROC, *Area Under the Receiver Operating characteristic Curve*). Se analizaron las diferencias en la supervivencia mediante la prueba de rango logarítmico. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la relación entre las variables. Los resultados se dan como la media \pm ETM. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

Resultados

Características de los pacientes

De los 72 pacientes examinados, se incluyeron 63 pacientes. Los pacientes se clasificaron histológicamente en aquellos con inflamación significativa, utilizando un sistema de puntuación de NASH modificado (cirrosis + HA) en comparación con la cirrosis sola. Los pacientes con cirrosis + HA ($n = 23$) estaban más gravemente enfermos, como lo demuestra una puntuación de MELD y Pugh más alta ($p < 0,001$) en comparación con los pacientes solo con cirrosis ($n = 40$). Los pacientes con cirrosis + HA también tenían valores significativamente superiores de CRP ($p < 0,005$), glóbulos blancos ($p < 0,001$), bilirrubina ($p < 0,001$) y tiempo de protrombina ($p < 0,001$). Los pacientes tenían niveles más altos de TNF α , IL6, IL8, sTNF α R1, sTNF α R2, MDA y prostaglandina F2 α que los controles. Los pacientes con cirrosis + HA tenían niveles significativamente más altos de IL6, IL8 y sTNF α R2, pero no se observaron cambios estadísticamente significativos para el TNF α , sTNF α R1 y estrés oxidativo. No se encontró correlación con la gravedad de la enfermedad. Para los experimentos *ex vivo*, se utilizó sangre o plasma de 16 de estos 63 pacientes. Los datos clínicos iniciales de estos 63 pacientes no fueron significativamente diferentes de los de la cohorte entera. La Tabla 1 muestra las características basales para todos los pacientes y para los subgrupos que tenían estallido en reposo alto y bajo (véase más adelante).

Estallido oxidativo y fagocitosis en pacientes con cirrosis alcohólica

En los neutrófilos de pacientes no estimulados, el estallido oxidativo de los neutrófilos aumentó en comparación con los controles. Los neutrófilos de pacientes con cirrosis alcohólica global tuvieron un estallido oxidativo en reposo 5,6 veces superior ($p < 0,001$) al de los controles sanos. Los neutrófilos de pacientes con cirrosis + HA tuvieron un estallido oxidativo en reposo significativamente superior en comparación con los pacientes con cirrosis sola ($p < 0,001$) o controles ($p < 0,001$, Figura 2A). La estimulación con fMLP, indicando sensibilización, provocó una reacción de estallido oxidativo significativamente superior en pacientes con cirrosis ($p = 0,01$) y cirrosis + HA ($p = 0,001$) en comparación con los controles, mientras que no hubo diferencias en la respuesta a PMA entre los grupos. La diferencia entre el estallido en reposo y la respuesta de fMLP fue significativamente inferior en los pacientes con cirrosis + HA ($1,8 \pm 4,7$) que en los pacientes con cirrosis ($22,4 \pm 6,9$, $p = 0,02$), mostrando que la adición de fMLP en los pacientes con cirrosis + HA ya no puede potenciar la función de las células. Asimismo, tras la estimulación con *E. coli*, el aumento relativo en el estallido oxidativo de los niveles en reposo disminuyó significativamente en los pacientes con cirrosis + HA en comparación con los de solo cirrosis ($p = 0,001$) o los controles ($p < 0,001$, Figura 2B).

Se midió la capacidad fagocítica mediante la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF), que indica el número de bacterias engullidas por una célula. Los pacientes con cirrosis + HA engulleron significativamente menos bacterias que los controles ($p = 0,031$, Figura 2C). El porcentaje de células que engulleron al menos una bacteria no difirió entre los grupos.

Asociación del estallido oxidativo en reposo y la fagocitosis con infección, la insuficiencia orgánica y la supervivencia

Diecisiete (26 %) desarrollaron insuficiencia orgánica y 13 (21 % de todos los pacientes estudiados) murieron durante el ingreso hospitalario índice. El fallo orgánico más común encontrado fue el renal, observado en 15 de los pacientes con insuficiencia orgánica (88 %), desarrollando 4 pacientes este como parte de la insuficiencia multiorgánica con necesidad de ventilación y apoyo circulatorio. A los 90 días, 14 (22 %) pacientes habían fallecido, 47 estaban vivos y 2 se perdieron durante el seguimiento. Se descubrió que el estallido oxidativo en reposo predice la supervivencia a 90 días (AUROC 0,77, $p = 0,003$, Figura 3A) y la insuficiencia orgánica (AUROC 0,76, $p < 0,001$). Un corte del estallido en reposo < 55 % tenía una sensibilidad del 77 % y una especificidad del 69 % para predecir la muerte. Los pacientes con un estallido oxidativo en reposo < 55 % sobreviven significativamente mejor que aquellos con un estallido en reposo ≥ 55 % ($p < 0,005$, Figura 3B). La función fagocítica también fue predictiva de supervivencia (AUROC 0,80, $p = 0,02$, Figura 4A) y la insuficiencia orgánica (AUROC 0,91, $p < 0,0001$). Una MGIF inferior al 42 % de la normal dentro de la población de pacientes estudiada tuvo una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 70 % para predecir la mortalidad (Figura 4B).

En 42 (66 %) pacientes se sospechó clínicamente de infección en el transcurso del ingreso hospitalario, aunque ninguno de los pacientes incluidos tenía una infección comprobada en el momento en que se evaluó la función de los neutrófilos. Estos datos deben considerarse en su contexto, ya que el presente protocolo de tratamiento requiere el uso de antibióticos de amplio espectro tan pronto como se sospeche una infección. En 26 de estos pacientes (62 %), se verificó infección con cultivo positivo. En 13, se encontró más de un organismo. Los pacientes con un estallido en reposo alto (> 55 %) tenían más probabilidades de desarrollar infecciones con cultivo positivo (57 % frente al 27 %, chi-cuadrado $p = 0,01$), antes durante la estancia hospitalaria (8 frente a 23 días, $p = 0,04$) y con más de un organismo ($n = 10$; $n = 3$ en pacientes con estallido en reposo bajo). Los pacientes con cirrosis + HA tenían más probabilidades de desarrollar infecciones con cultivo positivo (65 % frente al 28 %, $p = 0,004$). Aquellos pacientes que desarrollaron infecciones con cultivo positivo, tenían más probabilidades de desarrollar insuficiencia orgánica ($p = 0,001$) y de morir ($p = 0,002$). El 67 % de los pacientes con una MGIF inferior al 42 % desarrollaron infección con cultivo positivo, mientras que solo ocurrió en el 21 % de los pacientes con una MGIF superior al 42 % ($p = 0,007$). Los pacientes con una MGIF baja desarrollaron infecciones antes durante su estancia hospitalaria (9 frente a 47 días, $p = 0,03$)

Efecto del plasma de los pacientes y del plasma normal sobre el estallido oxidativo en neutrófilos

El plasma de pacientes con estallido en reposo alto (> 55 %; $n = 6$) indujo un estallido en reposo alto en los neutrófilos normales ($p = 0,005$), mientras que el plasma de pacientes con un estallido en reposo bajo (<55 %; $n = 6$) no lo hizo (Figura 5). El efecto inductor del estallido se detectó inmediatamente después de mezclar plasma y células, pero también se pudo demostrar tras hasta una hora de incubación (resultados no mostrados). Este resultado indicó que existe un factor transmisible presente en el plasma del paciente que provoca la activación de los neutrófilos.

Cuando se incubaron neutrófilos aislados de pacientes con estallido en reposo alto en el análisis de sangre entera con plasma normal, el estallido en reposo disminuyó significativamente en comparación con los neutrófilos aislados incubados con el propio plasma del paciente ($p = 0,02$; Figura 6). Estos experimentos sugirieron que la retirada de un factor presente en el plasma pudo reducir el estallido en reposo alto en las células de los pacientes.

Efecto del plasma de los pacientes y del plasma normal sobre la fagocitosis

Los neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes con un estallido en reposo bajo no difirieron del control, mientras que los neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes con estallido en reposo alto mostraron una disminución del 22 % de la MGIF ($p = 0,03$, $n = 6$). Los neutrófilos de los pacientes incubados durante 60 minutos con plasma normal mostraron un aumento del 22 % ($p = 0,03$, $n = 6$) de la fagocitosis en comparación con los neutrófilos de los pacientes incubados con su propio plasma. Estos resultados indican que el deterioro de la función fagocítica puede deberse a un factor sérico que es transmisible y reversible.

Efecto de la endotoxina sobre el estallido oxidativo y la fagocitosis

Se incubó la sangre de cinco voluntarios sanos con concentraciones crecientes de endotoxina. Hubo un aumento dependiente de la dosis del estallido en reposo ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional con análisis *post hoc* de Turkey; Figura 7). Mediante la incubación de los neutrófilos del paciente con endotoxina, la MGIF relativa se redujo en un 20 % ($n = 8$, $p = 0,02$, Figura 8). Estos resultados indican que la endotoxina activa los neutrófilos normales de una manera dependiente de la dosis, imitando así el efecto observado por la incubación con plasma de los pacientes.

Efecto de la retirada de endotoxina del plasma de los pacientes

a. Utilizando columnas Detoxi-Gel: El plasma de los pacientes que demostraron tener un estallido en reposo alto en el análisis de sangre entera fue capaz de inducir un estallido en reposo alto en los neutrófilos normales. El plasma libre de endotoxina (obtenido del paso a través de las columnas) no indujo un estallido en reposo alto en los neutrófilos normales ($p < 0,001$, $n = 9$). El plasma de pacientes con estallido en reposo bajo ($p = 0,91$, $n = 4$) y plasma normal ($p = 0,25$, $n = 3$) no cambió el estallido en reposo (Figura 9). La retirada de endotoxina del plasma de pacientes con un estallido en reposo alto ($n = 11$) aumentó la MGIF en un 31 % ($p = 0,03$) en comparación con las células incubadas con plasma no tratado. El plasma de pacientes con estallido en reposo bajo ($p = 0,16$, $n = 8$) y plasma normal ($p = 0,85$, $n = 5$) que se pasó por encima de la columna provocó cambios en la MGIF (Figura 11). Este conjunto de experimentos muestra que la retirada de endotoxina por la polimixina B revierte el efecto inductor de estallido y reductor de la fagocitosis del plasma de los pacientes.

b. Utilizando anticuerpos neutralizantes de LPS: La incubación con un anticuerpo anti-CD14 humana neutralizante de LPS evitó la inducción de un estallido alto en células normales por el plasma de pacientes con un estallido alto ($p < 0,001$, $n = 7$). La incubación del plasma de pacientes con estallido bajo ($p = 0,733$, $n = 8$) o plasma normal ($p = 0,25$, $n = 3$) con el anticuerpo no cambió el estallido (Figura 9). La incubación de plasma de pacientes con un estallido alto con un anticuerpo anti-CD14 humana neutralizante de LPS aumenta la MGIF en un 20 % ($p = 0,04$, $n = 11$), mientras que este anticuerpo no provoca cambios en la MGIF cuando se usa plasma de pacientes con estallido bajo ($p = 0,17$, $n = 8$) o plasma normal ($p = 0,78$, $n = 3$) (Figura 10). Este hallazgo respalda la observación de que la endotoxina puede ser responsable de la inducción de un estallido en reposo alto en los neutrófilos.

Tabla 1

| | todos (n = 63) | estallido en reposo bajo (n = 35) | estallido en reposo alto (n = 28) |
|---|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Muerte (%) | 22 | 9 | 42 |
| Insuficiencia orgánica (%) | 26 | 12 | 43 |
| Edad (años) | 50,3 ± 1,3 | 52,4 ± 2,0 | 47,8 ± 1,6 |
| Función hepática | | | |
| Bilirrubina (mmol/l) | 151,2 ± 20,9 | 104,8 ± 21,8 | 199,8 ± 34,8 ¹ |
| PT (s) | 15,3 ± 0,61 | 13,5 ± 0,5 | 16,8 ± 0,9 ¹ |
| Albúmina (g/l) | 29,8 ± 1,1 | 32,7 ± 1,3 | 28,8 ± 1,3 ¹ |
| FD de Maddrey (n = 23 con HA) | 43,4 ± 6,8 | 40,0 ± 9,5 | 44,6 ± 8,0 |
| Puntuación de Pugh | 9,3 ± 0,4 | 8,3 ± 0,4 | 10,2 ± 0,5 ¹ |
| MELD | 15,6 ± 1,8 | 12,2 ± 2,0 | 19,1 ± 3,5 |
| Sensibilización (respuesta a fMLP) | 57,5 ± 5,1 | 47,5 ± 7,9 ² | 89,1 ± 3,2 ^{1,2} |
| Citocina/Inflamación | | | |
| TNFα (pg/ml) | 19,6 ± 6,5 | 18,3 ± 6,9 | 22,3 ± 14,6 |
| IL-6 (pg/ml) | 49,4 ± 14,9 | 21,9 ± 7,9 | 106,1 ± 39,6 |
| IL-8 (pg/ml) | 180,5 ± 56,9 | 101,8 ± 55,8 | 337,9 ± 122,8 |
| Estrés oxidativo | | | |
| MDA (μM/l) | 3,2 ± 0,5 | 3,2 ± 0,58 | 3,0 ± 0,7 |
| Prostaglandina P2α (pg/ml) | 346,8 ± 49,6 | 296,9 ± 43,8 | 394,7 ± 81,2 |
| ¹ significativo frente al estallido bajo | | | |
| ² significativo frente al control | | | |

Tabla 2

| | Niño C (n = 27) | Niño B (n = 26) | Niño A (n = 10) | control (n = 13) |
|---|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| % de estallido en reposo | 67,0 ± 6,5 ^{1,2,3} | 38,2 ± 7,2 ^{1,3} | 36,0 ± 9,0 ¹ | 8,9 ± 2,7 |
| estallido tras la estimulación - % de estallido en reposo | 32,4 ± 6,8 ^{1,2,3} | 57,5 ± 7,0 ^{1,3} | 60,4 ± 8,7 ¹ | 76,8 ± 7,7 |
| % de fagocitosis | 105,9 ± 2,8 | 110,18 ± 3,3 | 107 ± 5,5 | 99,4 ± 7,5 |
| % de MGIF | 50,7 ± 9,5 ¹ | 87,1 ± 13,6 | 104,6 ± 17,1 | 101,0 ± 9,2 |
| 1 p < 0,05 frente al control | | | | |
| 2 p < 0,05 frente al Niño B | | | | |
| 3 p < 0,05 frente al Niño A | | | | |

TABLA DE INFECCIONES

Infecciones con cultivo positivo documentadas en pacientes estudiados

| estallido alto | | | | | estallido bajo | | | | |
|----------------|------------------|--------------------|-------------------|-----------|----------------|------------------|--------------------------|-------------------|-----------|
| paciente | primer organismo | | segundo organismo | | paciente | primer organismo | | segundo organismo | |
| | día | organismo | día | organismo | | día | organismo | día | organismo |
| 1 | 4 | EC | 29 | SARM | 2 | 16 | EC | | |
| 4 | 14 | EC | 19 | SNC | 14 | 23 | <i>E. coli</i> | | |
| 5 | 9 | SNC | 34 | EC | 17 | 9 | SARM | | |
| 7 | 4 | EC | 10 | SNC | 23 | 15 | <i>St. aureus</i> | | |
| 12 | 2 | <i>C. albicans</i> | | | 33 | 15 | <i>Propionibacterium</i> | 34 | SNC |
| 13 | 10 | <i>St. aureus</i> | | | | | | | |
| 15 | 8 | SNC | | | | | | | |
| 20 | 5 | EC | 5 | SNC | | | | | |
| 35 | 6 | EC | | | | | | | |
| 36 | 4 | SNC | 4 | EC | | | | | |
| 45 | 2 | SNC | 3 | SNC | | | | | |
| 48 | 20 | <i>E. coli</i> | | | | | | | |
| 61 | 6 | <i>C. albicans</i> | | | | | | | |
| 62 | 7 | <i>C. albicans</i> | 9 | EC | | | | | |

EC: *Enterococcus*, SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, SNC: *Staphylococcus* negativo en coagulasa, St.: *Staphylococcus*, Str.: *Streptococcus*, C.: *Candida*

Metodología

5

Activación de neutrófilos (estallido oxidativo) y fagocitosis

Se utilizó el kit Phagoburst® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) para determinar el porcentaje de neutrófilos que producen oxidantes reactivos mediante estimulación con bacterias *E. coli* opsonizadas o sin ningún estímulo según las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron durante 20 minutos 100 µl de sangre entera heparinizada o neutrófilos aislados (como se indica) con 20 µl de la bacteria, *N*-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP), 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) o sin estímulo a 37 °C. La formación de los oxidantes reactivos durante el estallido oxidativo se controló mediante la adición y oxidación de dihidrorrodamina 123. Para identificar los neutrófilos, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD16-PE (IOtest®, Beckman Coulter) y se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia. (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*), (Becton Dickinson FACSscan, San José, California) utilizando el software Cellquest™. Los neutrófilos se seleccionaron según las características de dispersión frontal y lateral y, posteriormente, el porcentaje de células positivas en CD16 que producían metabolitos reactivos de oxígeno determinado mediante medición de fluorescencia verde (FL-1). Las muestras se analizaron por triplicado o por duplicado. El coeficiente de variación (CV) entre ensayos para el estallido en reposo fue del 5,4 %, para un 4,2 % de estallido estimulado, el CV dentro del ensayo para el estallido en reposo fue del 4,7 %, para un 2,4 % de estallido estimulado.

Fagocitosis de neutrófilos

Se utilizó Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) para medir el porcentaje total de neutrófilos que mostraban fagocitosis y la actividad fagocítica celular individual utilizando bacterias *E. coli* opsonizadas marcadas con FITC. Se incubaron 100 µl de sangre entera o neutrófilos aislados (como se indica a continuación) con 20 µl de bacterias a 37 °C durante 20 min mientras una muestra de control negativo permanecía en hielo. Para identificar los neutrófilos, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD-16-PE (IOtest®, Beckman Coulter). Los neutrófilos se seleccionaron según las características de dispersión frontal y lateral (Figura 2A) y, posteriormente, se analizó el porcentaje de células positivas en CD16 - células positivas en FITC, correspondiente al porcentaje de neutrófilos sometidos a fagocitosis y la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF), correspondiente al número de bacterias engullidas por una célula (Figura 1B, D, F). Para evitar una mala interpretación de los resultados debido a la variabilidad de las bacterias entre lotes, los resultados se normalizan con respecto a la media de al menos 3 muestras de control sanas por cada nuevo lote de bacterias utilizado. Las muestras se analizaron por triplicado o por duplicado. El CV entre ensayos para el porcentaje de fagocitosis fue del 6,8 %, del 10,1 % para la MGIF, y el CV dentro de su respectivo ensayo para el porcentaje de fagocitosis fue del 4,1 %, y del 1,6 % para la MGIF.

Aislamiento de neutrófilos

40

Se dispusieron en capas 4 ml de sangre entera sobre 5 ml de Polymorphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se centrifugaron durante 30 min a 400 g, a temperatura ambiente. Se recogieron los neutrófilos de la segunda superficie de contacto y se lavaron con PBS ((Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se contaron los neutrófilos en un hemocitómetro Thoma y se volvieron a suspender en PBS a una densidad de 5×10^6 células en 50 μ l. Se utilizaron 50 μ l de suspensión celular y 50 μ l de plasma para un ensayo. Se probó la viabilidad mediante exclusión de azul de tripano, y fue superior al 98 %.

Columnas de retirada de endotoxina

Se usaron columnas preenvasadas Detoxi-Gel Affinity-pack (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) que contenían un gel de retirada de endotoxina que consiste en polimixina B inmovilizada que se une a la parte de lípido A del lipopolisacárido bacteriano para retirar la endotoxina de las muestras de plasma. Las columnas se regeneraron con desoxicolato de sodio al 1 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se lavaron con agua estéril y se equilibraron con cloruro de sodio estéril al 0,9 % suplementado con 50 UI/ml de heparina (Multipharm, Waxham, RU) a temperatura ambiente. Las muestras de plasma se diluyeron 1:1 con PBS y se aplicaron en la columna y, después de descartar el vacío, se recogió la muestra en un tubo de muestra libre de pirógenos. Se incubaron 150 μ l de esta muestra de plasma diluida, libre de endotoxina, con 50 μ l de suspensión celular y se realizó Bursttest® o Phagotest® como se indica.

Citocinas

Se determinaron TNF α , sTNF α R1, sTNF α R2, IL-6 e IL-8 a partir de muestras de plasma anticoaguladas con etilendiamina-tetraacetato utilizando conjuntos disponibles en el mercado (BioSource International, Nivelles, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite inferior para la detección de citocinas fue de 3 pg/ml. El coeficiente de variación dentro del ensayo fue del 5,4 % al 6,4 %. La IL-6 y la IL-8 fueron indetectables en los controles.

Ejemplo 3: Efectos de la administración de albúmina y del secuestro de endotoxina bacteriana en un modelo de roedor de cirrosis descompensada.

El fin de este estudio fue probar si la retirada de albúmina y/o endotoxina sería beneficiosa en un modelo de roedor de cirrosis descompensada. En este modelo, se genera el daño adicional secundario a la cirrosis a través de la infusión de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, LPS) que se usa comúnmente para simular los efectos de una infección.

Métodos.

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las pautas del Ministerio del Interior según la Ley de Procedimientos Científicos de Animales de 1986. Se dio acceso libre a ratas macho Sprague-Dawley (230-280 g, Charles Rivers Ltd.) a agua y comida normal para roedores, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, 19-23 °C y una humedad de aproximadamente el 5,0 %.

Se realizó la ligadura de los conductos biliares (BDL) haciendo una incisión abdominal en la línea media bajo anestesia. En el grupo de BDL, se aisló el conducto biliar común, se ligó triplemente con seda 3-0 y se seccionó entre las ligaduras. Tras la BDL, todos los animales siguieron aumentando de peso y fueron comparables con los controles sin tratamiento previo. La mortalidad total fue inferior al 10 % y se produjo en el transcurso de las 36 horas posteriores a la operación.

Entre 24-26 días después de la cirugía, los animales se anestesiaron y se introdujeron cánulas permanentes en la arteria carótida izquierda y la vena yugular derecha. Se utilizó la vía arterial para la monitorización continua de la presión arterial (Biopac Systems, Goleta, California, EE. UU.) y la toma de muestras de sangre, y la vía venosa para la infusión continua de líquidos.

Todos los animales con BDL recibieron una infusión intravenosa de LPS (1 mg/kg, *Klebsiellapneumoniae*, Sigma, Poole. RU) durante 20 minutos seguida de una infusión continua (10 ml/kg/hora) de: i) Solución salina; ii) Albúmina (1,5 g/kg, Zenalb, BPL, Elstree. RU) en solución salina; iii) Polimixina B (2 mg/kg, Sigma, Poole. RU); o iv) albúmina más polimixina B (como antes): hasta un tiempo experimental total de 3 horas tras la cirugía. Se tomaron muestras arteriales a las 0, 1, 2 y 3 horas para el análisis de la función de los neutrófilos.

Los animales fueron sacrificados mediante exanguinaciones bajo anestesia, con la sangre extraída para su análisis. Todos los estudios se realizaron en tejido hepático entre 25 y 28 días después de la LBD y se utilizaron 4 animales en el análisis final en cada grupo.

Al final del experimento, se recogió la sangre en tubos estériles helados (sistema BD Vacutainer, Becton Dickenson. RU) y se mantuvo sobre hielo antes de la centrifugación (3000 rpm, 4 °C, 10 minutos) para separar el plasma que luego se almacenó a -80 °C antes de los análisis.

El plasma se analizó para determinar el contenido de endotoxina utilizando el sistema Endosafe disponible en el mercado (Charles Rivers Laboratories, Cedex, Francia) medido con un lector de placas de 96 pocillos Tecan Sunrise

(Tecan, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase, por ejemplo, Stadlbauer *et al.*, *J. Hepatol* 2007; 47: 726-727). También se midió el contenido de albúmina en plasma, ALT y urea, utilizando un analizador de laboratorio Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics, Sussex, RU).

- 5 La función de los neutrófilos se midió utilizando un kit de ensayo Phagoburst (Orpegen, Heidelberg, Alemania) utilizando un citómetro de flujo FACScanto (Becton Dickinson, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase, por ejemplo, Mookerjee *et al.*, "Hepatology" 2007; 46: 831-840).

10 Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software Graphpad Prism (Graphpad, California, EE. UU.) utilizando los métodos indicados.

Resultados.

15 Puede verse en la Figura 12 que la endotoxina fue fácilmente detectable en el plasma de los animales tratados con solución salina después de 3 horas. En los grupos que recibieron polimixina B, ya sea sola o en combinación con albúmina, se encontró que el nivel de endotoxina estaba por debajo del límite de detección del ensayo. Se encontró una pequeña cantidad presente en el grupo tratado solo con albúmina, aunque todavía era una pequeña fracción en comparación con los animales tratados con solución salina ($p < 0,001$). Aunque se sabe que la albúmina tiene la capacidad de unirse a la albúmina, no se encontró que fuera tan eficaz a la dosis administrada como la polimixina.

20 Se sabe que los animales con BDL tienen concentraciones de albúmina en plasma significativamente reducidas como resultado de la lesión hepática en curso. Se encontró que la administración de albúmina aumenta significativamente los niveles de albúmina en plasma medidos ($p < 0,05$ frente a solución salina) en aproximadamente un 25 %. Aunque esto resultó ser todavía significativamente menor que las muestras tomadas de animales sanos sin tratamiento previo ($p < 0,01$, Figura 13A).

30 Aunque cabría esperar que los animales con BDL tuvieran niveles aumentados de transaminasas (ALT, Figura 13B) fue interesante observar que cada uno de los grupos de tratamiento resultó tener puntuaciones de ALT inferiores. Aunque estas diferencias no resultaron significativas debido a la variación dentro de los grupos, parece que la endotoxina agrava la enfermedad hepática subyacente, y su retirada es beneficiosa para el hígado.

35 Los niveles de urea se elevaron en todos los grupos en comparación con los animales sanos sin tratamiento previo, pero resultaron ser significativamente inferiores en el grupo de albúmina/polimixina en comparación con el grupo de albúmina sola ($p < 0,05$, Figura 13C). También se observaron niveles reducidos en el grupo de polimixina sola.

40 La Figura 14 muestra los datos de presión arterial media medidos recopilados durante el período de estudio. Se puede observar que el grupo de solución salina mantiene la presión inicial durante los primeros 90 minutos, tras lo que se observa un deterioro progresivo. Tanto el grupo de albúmina como el de albúmina/polimixina mantienen la presión arterial durante todo el período de estudio, mostrando los animales de albúmina/polimixina un aumento de la presión a las 3 horas. Cabe señalar que todos los animales con BDL se consideran hipotensos al comienzo del estudio, ya que la PAM normal para una rata anestesiada debería ser de aproximadamente 120 mmHg.

45 En la Figura 15, se puede observar que hay una mejora progresiva en la capacidad de los neutrófilos para responder a las bacterias patógenas tanto en el grupo de la albúmina como en el de la albúmina/polimixina, aparentemente con una mejor respuesta con la terapia de combinación. No es evidente ningún cambio en los animales tratados con solución salina. El grupo de solo polimixina B no se ha incluido en esta figura debido a irregularidades en la coagulación, que impiden que se presente un tamaño de muestra representativo. También se realizaron mediciones de la actividad espontánea de los neutrófilos, aunque no se observaron diferencias entre los grupos en estas muestras.

Discusión

50 Es evidente que la administración de albúmina a un modelo de cirrosis de rata establecido es beneficiosa para prevenir un deterioro agudo tras la exposición a toxinas bacterianas. Asimismo, estos efectos se mejoran mediante la adición sinérgica de un agente para unir y retirar endotoxina.

55 En la Figura 12, la retirada de endotoxina medible del sistema solo se logró en los grupos tratados con polimixina B, aunque el grupo de solo albúmina logró una reducción sustancial. Puede ser que un aumento adicional de la dosis de albúmina haya reducido aún más el nivel de endotoxina en plasma, sin embargo, se seleccionó esta dosis para reflejar una cantidad típica administrada a pacientes hospitalizados, y no estaba dirigida específicamente a la unión de LPS. 60 No está claro cuánta endotoxina libre se requiere en el sistema para ejercer una respuesta fisiológica negativa.

Aunque, como era de esperar, la administración de albúmina provocó un aumento significativo en los niveles medidos en plasma, estos todavía resultaron ser inferiores a los de los animales sanos. En este estudio, el objetivo de los presentes inventores era proporcionar una dosis diaria terapéutica típica de albúmina, aunque cabría esperar que los 65 pacientes hospitalizados recibieran este tratamiento en días sucesivos. Es probable que la albúmina existente en estos animales haya sido dañada por el proceso de la enfermedad, y que el suministro de albúmina "saludable", sana, tenga

un beneficio metabólico sustancial para el animal.

Se esperaba encontrar niveles elevados de ALT en todos los animales con BDL debido al daño hepático continuo, sin embargo, parece como si la administración de endotoxina provocara un mayor deterioro en el estado del hígado que mejoró en los grupos de tratamiento. Aunque estas diferencias no resultaron significativas debido a la variación dentro de los grupos, parece que el tratamiento con polimixina B es el más eficaz para prevenir un mayor daño hepático.

Los niveles de urea son un reflejo tanto de los procesos sintéticos debidos a la descomposición de las proteínas como de la capacidad de los riñones para excretar productos de desecho del organismo. Es interesante señalar que se observó una diferencia significativa entre los grupos tratados solo con albúmina y con albúmina/polimixina. Los animales tratados con albúmina mostraron un ligero aumento en los niveles de urea en comparación con el grupo de solución salina, lo que puede reflejar la cantidad de proteína que se administra. De forma interesante, los animales que recibieron el tratamiento de combinación tenían niveles de urea en plasma significativamente inferiores. Esta reducción de la urea en plasma puede estar relacionada con la mejora de los niveles de presión arterial media observados en estos animales (Figura 15). Tal y como se ha señalado anteriormente, se descubrió que todos estos animales con BDL eran hipotensos, lo que se sabe que provoca una reducción del flujo sanguíneo renal y, por tanto, de la función. Al mejorar la presión sistémica, aunque solo sea marginalmente, es probable que se produzca un consiguiente efecto beneficioso sobre el flujo sanguíneo renal y la función excretora.

En resumen, se descubrió que la administración de albúmina a animales cirróticos mejora el estado del animal y previene una serie de síntomas de la descompensación inducida. Asimismo, la adición de un agente para retirar endotoxina mejoró significativamente los efectos de la albúmina.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para usar en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad hepática, que comprende:

- 5 (a) medio para retirar selectivamente albúmina de la sangre de un individuo;
 (b) medio para retirar selectivamente endotoxina de la sangre de un individuo; y
 (c) medio para suministrar albúmina que no procede del individuo a la sangre del individuo;

10 en donde dicho medio (a) comprende un medio para la diálisis de albúmina que comprende una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa, y en donde (a) y (b) son componentes separados del aparato.

2. Un aparato para usar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

- 15 (d) medio para retirar las toxinas unidas a la albúmina de la sangre del individuo.

3. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar *ex vivo*.

20 4. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho medio (a) comprende un soporte sólido capaz de unirse selectivamente a albúmina.

5. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho medio (b) comprende un soporte sólido capaz de unirse selectivamente a endotoxina.

25 6. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la albúmina de la parte (c) es albúmina de calidad farmacéutica.

7. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sangre del individuo pasa a través del dispositivo *ex vivo*.

30 8. Un aparato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde otros componentes retirados con la albúmina se devuelven a la sangre del individuo.

9. Albúmina que no procede de la sangre de un individuo que se va a tratar para usar en un método de tratamiento de la enfermedad hepática, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35 (a) retirar albúmina de la sangre del individuo;
 (b) reducir el nivel de endotoxina en la sangre del individuo; y
 (c) introducir dicha albúmina que no procede del individuo que se va a tratar en la sangre del individuo;

40 en donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante diálisis utilizando medios que comprenden una membrana que tiene un tamaño de poro superior a 50 kDa e inferior a 100 kDa, y en donde las etapas (a) y (b) del método comprenden diferentes medios para retirar la albúmina y reducir el nivel de endotoxina.

45 10. La albúmina para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las etapas (a) y (c) se llevan a cabo mediante diálisis.

11. La albúmina para usar de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde: (i) la etapa (b) comprende retirar la endotoxina de la sangre del individuo; o (ii) la etapa (b) comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de reducir el nivel de endotoxina en la sangre.

50 12. La albúmina para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la albúmina de la etapa (c) es albúmina de calidad farmacéutica.

55 13. La albúmina para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el método se lleva a cabo utilizando un aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Un método *in vitro* de tratamiento extracorpóreo de la sangre mediante la retirada selectiva de albúmina y endotoxina de la sangre, en donde la sangre es de un individuo que tiene una enfermedad hepática, comprendiendo el método:

- 60 (a) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la albúmina y retirar, de ese modo, la albúmina de la sangre;
 (b) poner en contacto la sangre con un soporte sólido que se une selectivamente a la endotoxina y retirar, de ese modo, la endotoxina de la sangre; y
 65 (c) añadir a la sangre albúmina que no procede del mismo individuo que la sangre;

en donde las etapas (a) y (b) del método comprenden diferentes medios para retirar la albúmina y reducir la endotoxina.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el soporte sólido de (a) comprende un anticuerpo que se une específicamente a la albúmina.

5

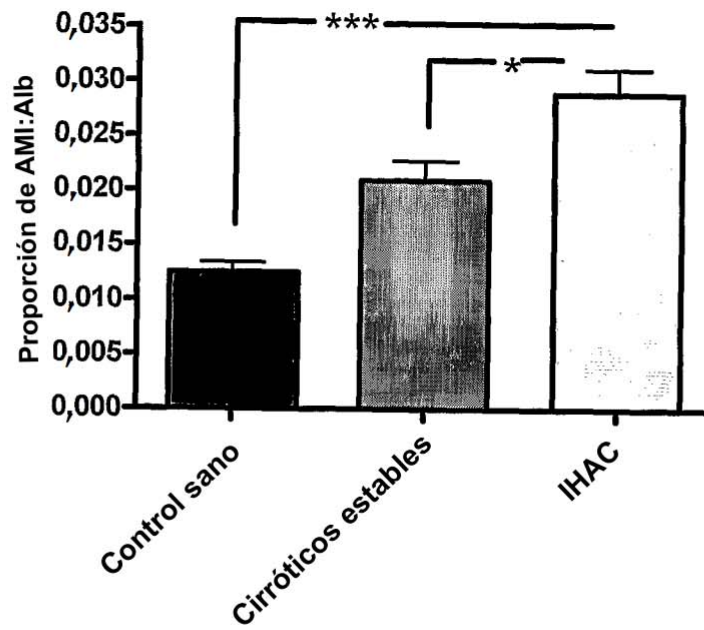


Figura 1

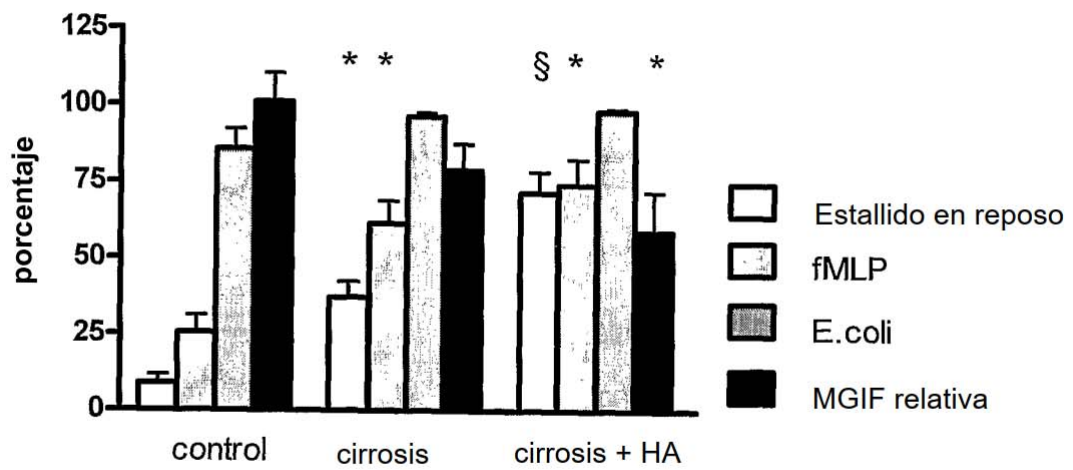


Figura 2

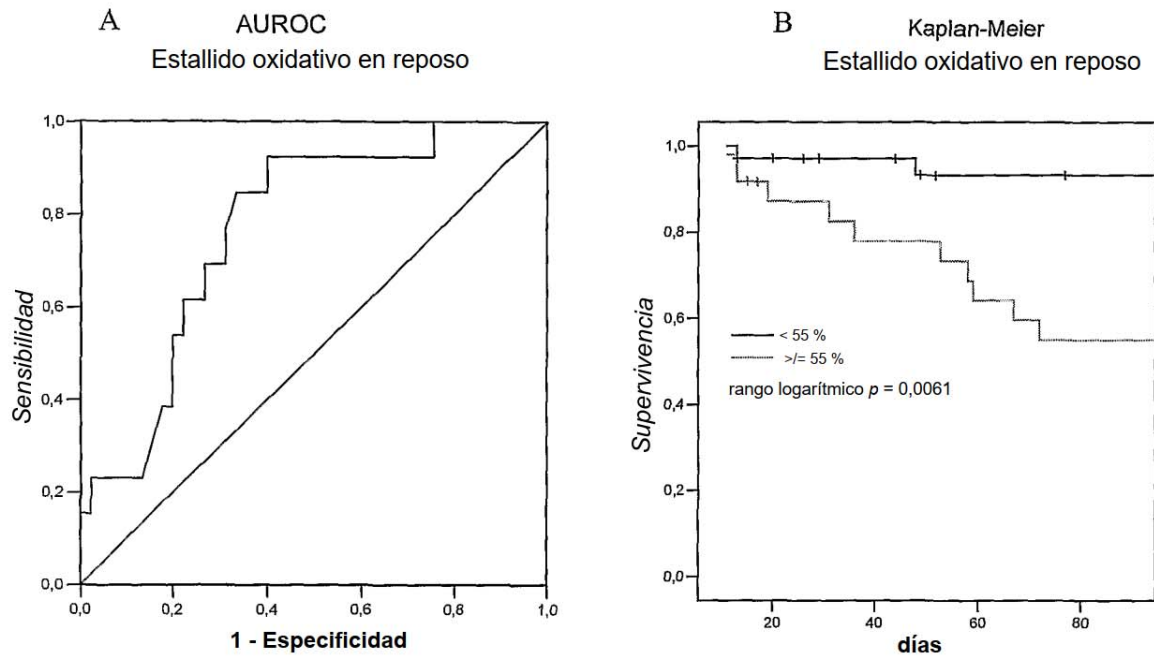


Figura 3

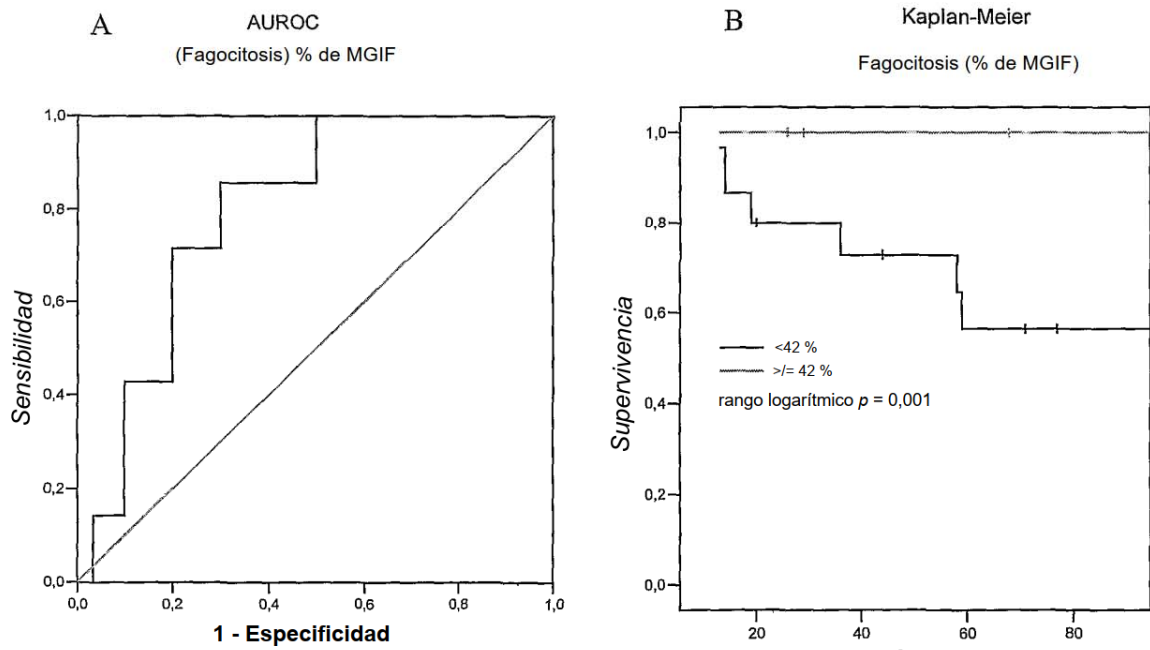


Figura 4

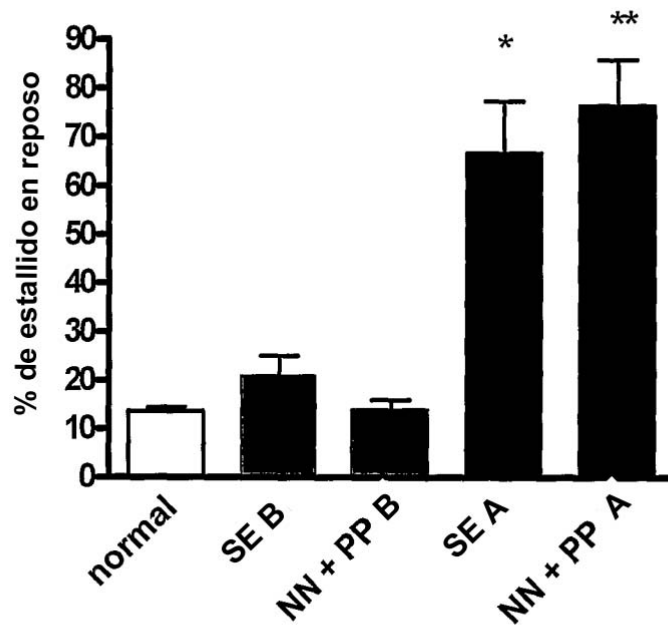


Figura 5

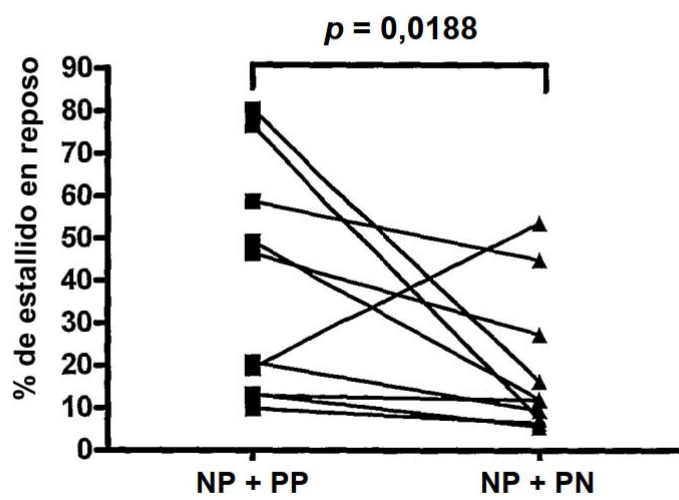


Figura 6

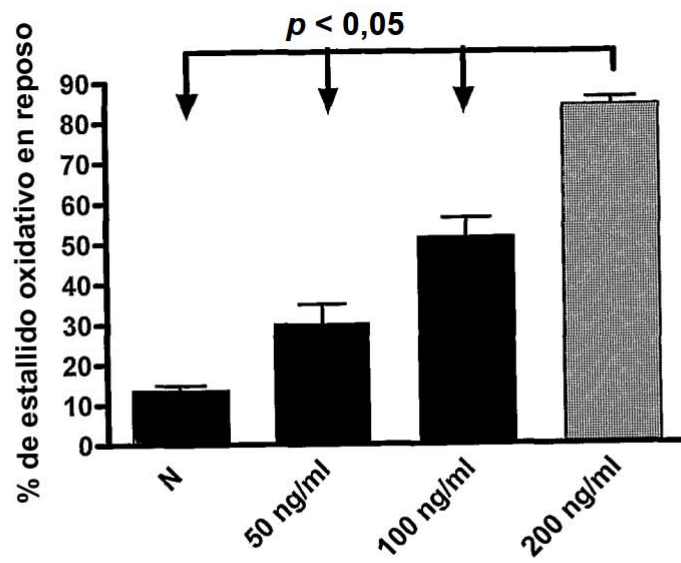


Figura 7

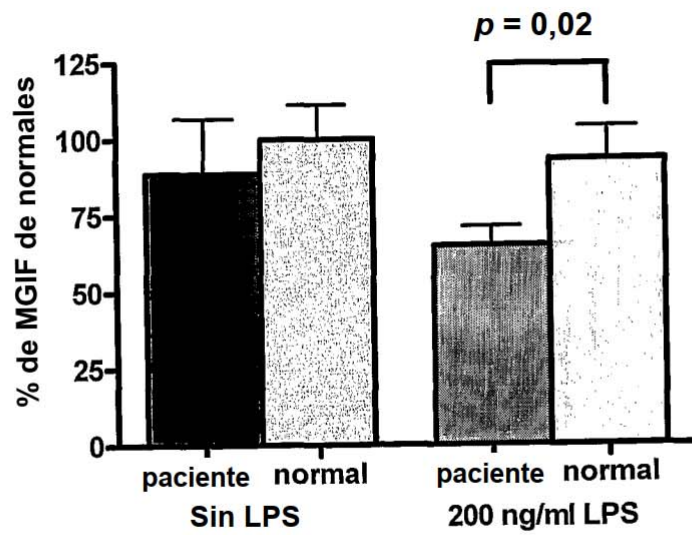


Figura 8

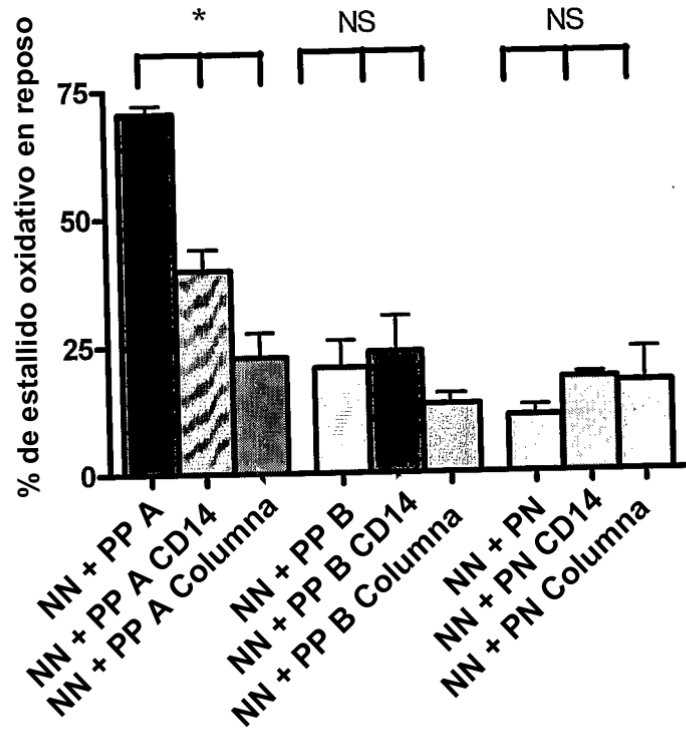


Figura 9

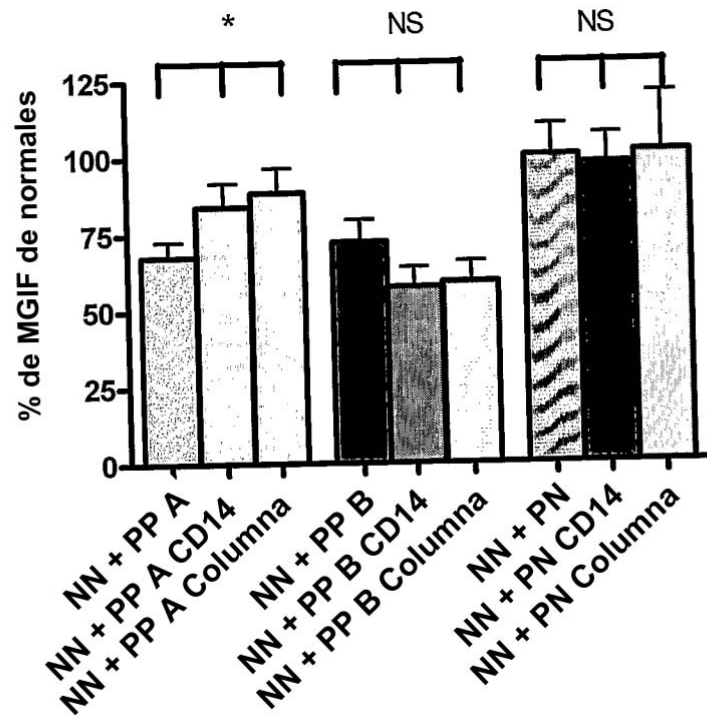


Figura 10

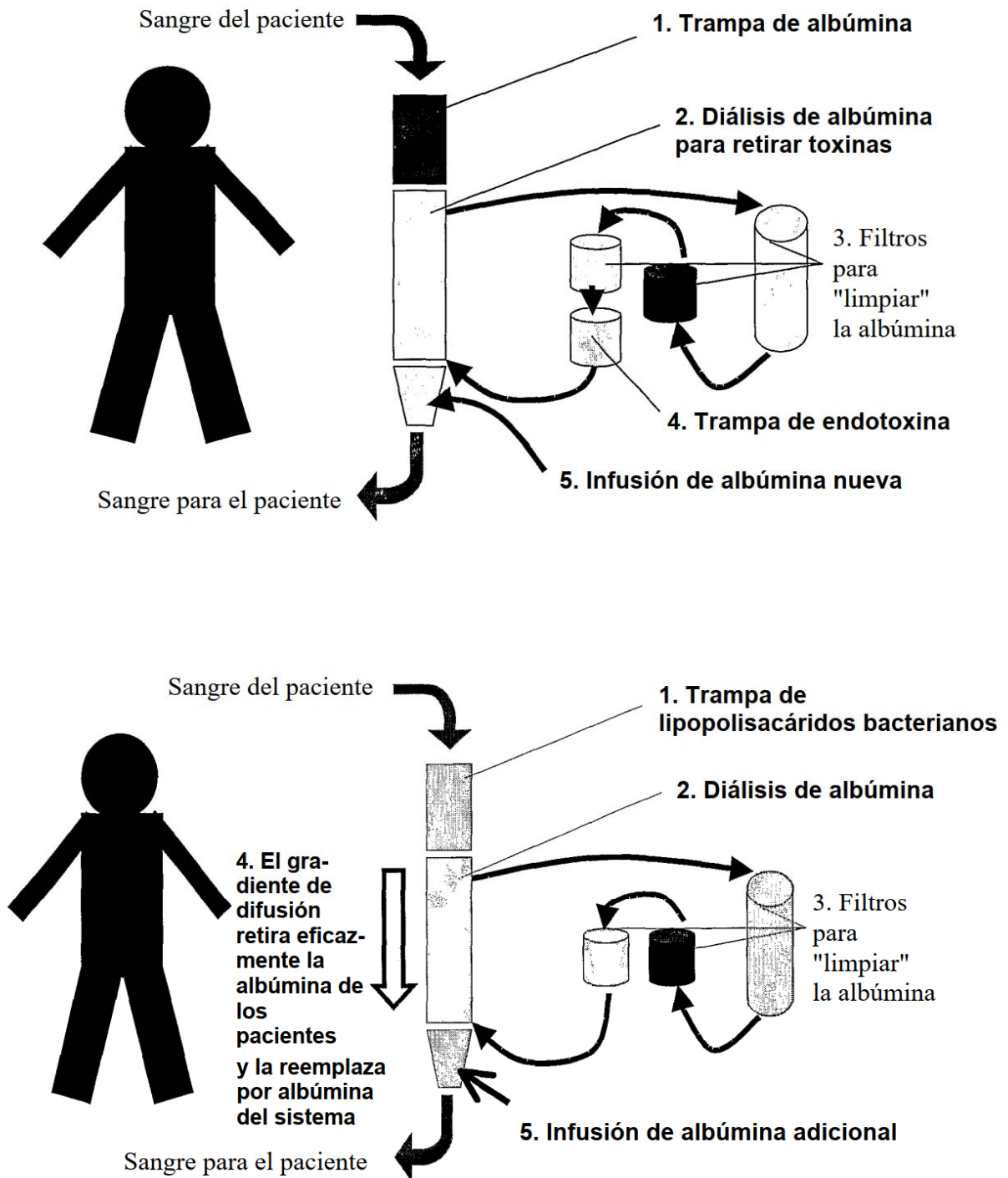


Figura 11

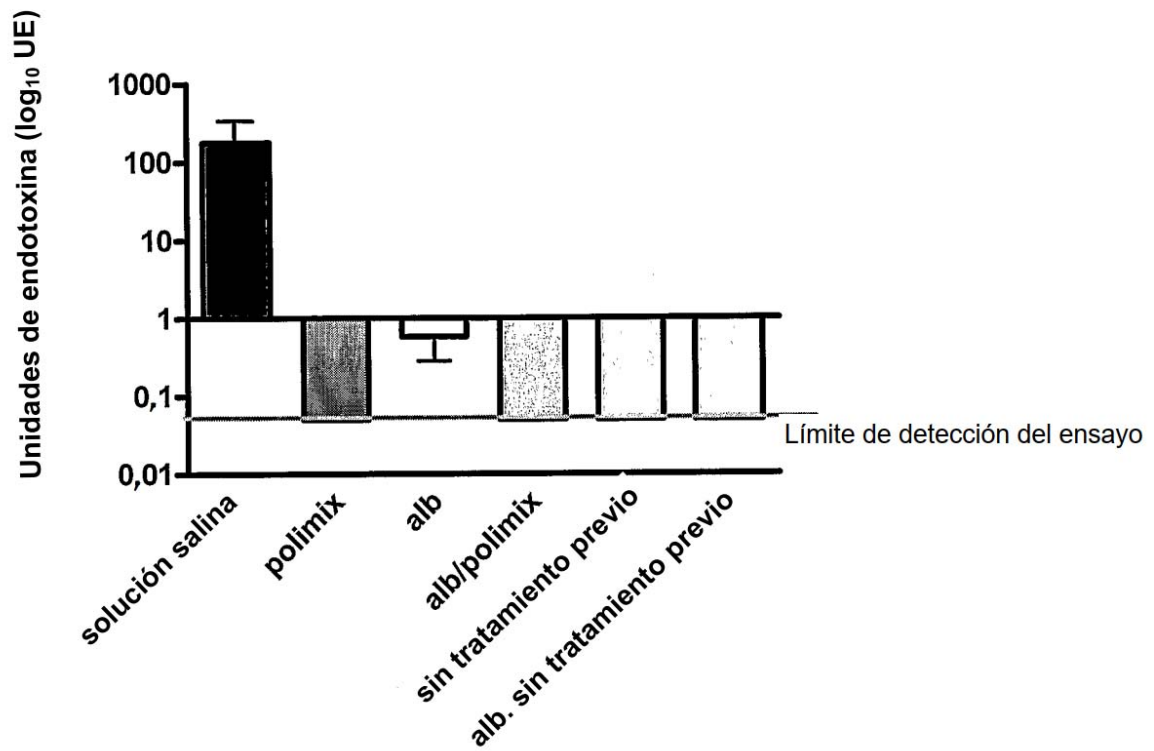


Figura 12

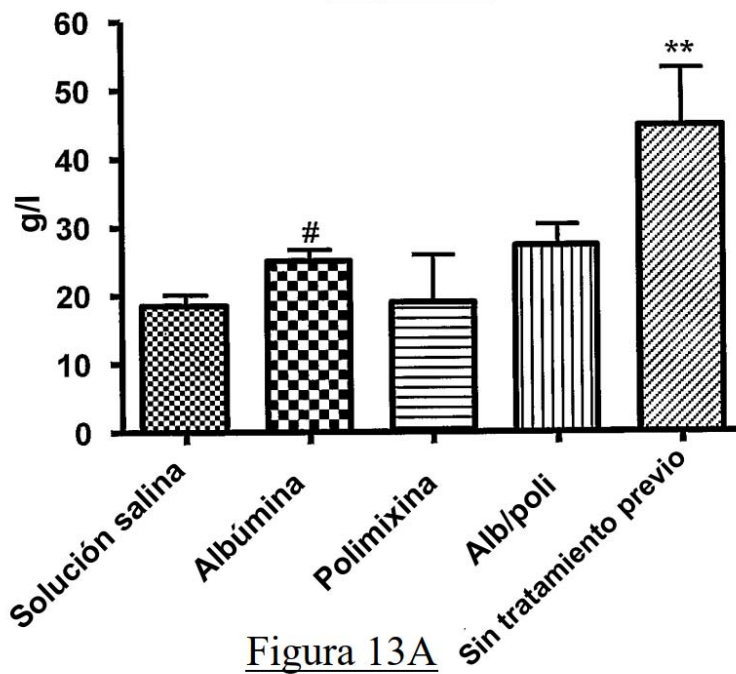


Figura 13A

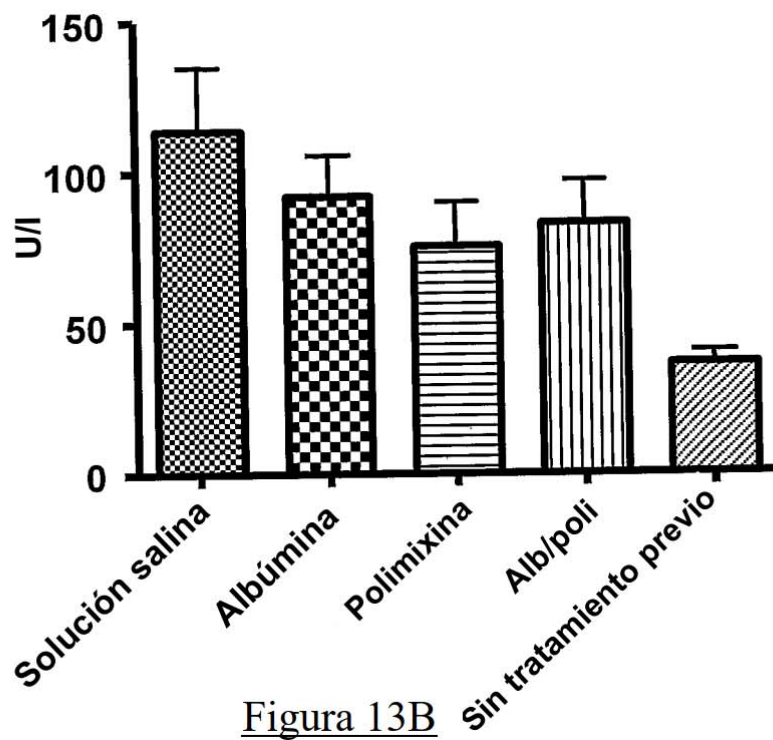


Figura 13B

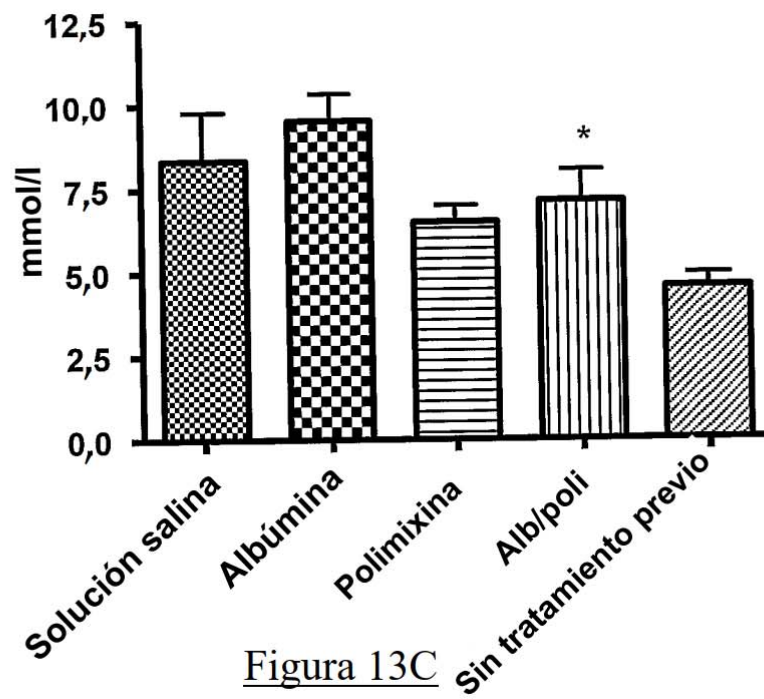


Figura 13C

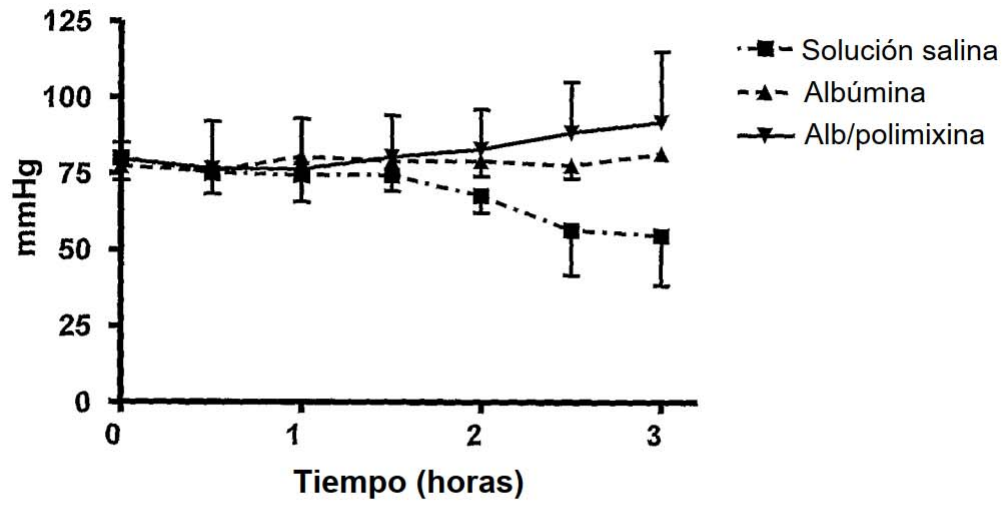


Figura 14

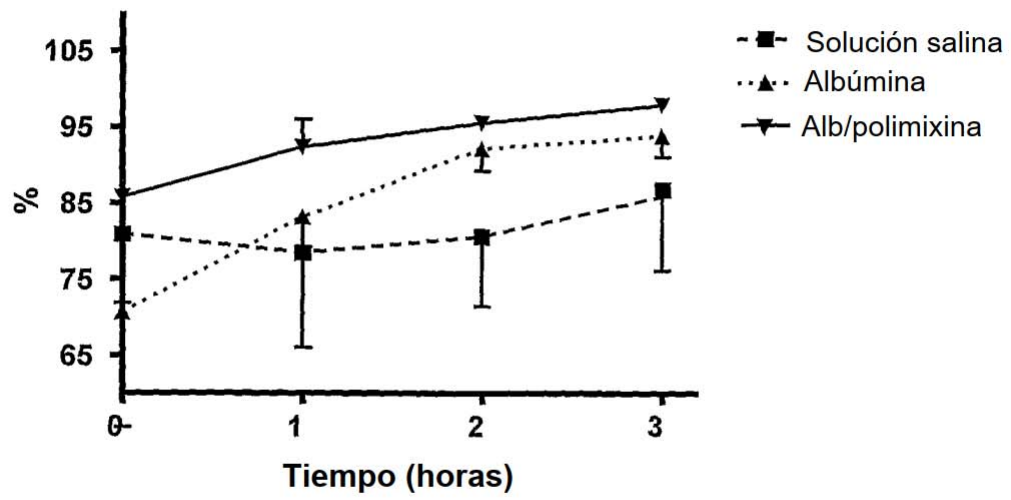


Figura 15