

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 861 359**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61M 1/36** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2010 PCT/US2010/058596**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11068897**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2010 E 10787652 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 2509604**

---

(54) Título: **Dispositivo para eliminar citoquinas de la sangre con polisacáridos inmovilizados en superficie**

(30) Prioridad:

**01.12.2009 US 265675 P**

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

**06.10.2021**

(73) Titular/es:

**EXTHERA MEDICAL CORPORATION (100.0%)  
57 Arnold Drive, Suite B  
Martinez, CA 94553, US**

(72) Inventor/es:

**WARD, ROBERT S.;  
MCCREA, KEITH R.;  
LARM, OLLE y  
ADOLFSSON, LARS**

(74) Agente/Representante:

**CAÑADAS ARCAS, Dolores**

ES 2 861 359 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**

Dispositivo para eliminar citoquinas de la sangre con polisacáridos inmovilizados en superficie

**5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un dispositivo para eliminar citoquinas y/o patógenos de la sangre o el suero sanguíneo (sangre) mediante el contacto de la sangre con un sustrato sólido, esencialmente no microporoso, cuya superficie ha sido tratada con un adsorbente polisacárido, como heparina, heparán sulfato y/u otras moléculas o grupos químicos (medio adsorbente o medio) con una afinidad de unión para la citoquina o el/los patógeno/s a eliminar (los adsorbatos), y tal que el tamaño de los canales intersticiales dentro de dichos medios se equilibra con la cantidad de superficie del medio y la concentración superficial de sitios de unión en los medios para proporcionar una capacidad de adsorción adecuada, permitiendo al mismo tiempo tasas de flujo relativamente altas de la sangre a través de los medios adsorbentes. El resultado es que el transporte de los adsorbatos a los sitios de unión en el medio se produce en gran medida por *convección* forzada. Por convección (forzada) se entiende, por ejemplo, un flujo producido por un gradiente de presión generado por una bomba, por la aplicación de presión externa a un recipiente flexible (o presión interna a un recipiente rígido), por una diferencia de gravedad por altura/elevación, o por la diferencia de presión arterial y presión venosa en el paciente que está siendo tratado. La invención proporciona una capacidad de adsorción clínicamente relevante dentro del rango de tasas de flujo seguras de uso típico en circuitos sanguíneos extracorpóreos clínicos, por ejemplo, en diálisis, bypass cardiopulmonar y oxigenación por membrana extracorpórea de la sangre. Esto contrasta directamente con el transporte *difusivo* mucho más lento de los adsorbatos que se requiere típicamente con los medios adsorbentes *porosos*, los cuales requieren que los adsorbatos difundan a través de una membrana microporosa y/o en poros microscópicos antes de unirse a sitios de adsorción sobre, detrás o dentro del medio, y que por tanto requieren tasas de flujo muy bajas para lograr una separación significativa durante cada pasaje de la sangre. La presente invención también permite tratar una enfermedad eliminando citoquinas y/o patógenos de la sangre mediante el contacto de la sangre con un sustrato esencialmente no poroso, revestido con un adsorbente polisacárido, como heparina, heparán sulfato y otros materiales adsorbentes.

**30 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Una gran variedad de condiciones patológicas se caracterizan por la presencia de concentraciones elevadas de citoquinas y/o patógenos en el torrente sanguíneo. Algunas de estas afecciones se tratan mediante terapias diseñadas para matar el patógeno, por ejemplo, mediante la administración de fármacos, por ejemplo, medicamentos antiinfecciosos. Otras afecciones se tratan mediante terapias que intentan reducir la concentración de citoquinas o patógenos transmitidos por la sangre en el paciente. Otras enfermedades se tratan mediante terapias que intentan eliminar directamente solo componentes específicos de la sangre del paciente.

Por ejemplo, actualmente se entiende que el síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmune desencadenado por una infección vírica que estimula el sistema inmunitario del organismo para producir en exceso anticuerpos u otras proteínas que pueden atacar el sistema nervioso del paciente, provocando niveles crecientes de parálisis. La mayoría de los pacientes se recuperan con el tiempo, aunque estos pacientes parecen ser susceptibles de sufrir una reaparición de la enfermedad por infecciones virales posteriores. Un método para tratar el síndrome de Guillain-Barré consiste en la plasmaféresis para "limpiar" la sangre del paciente eliminando los anticuerpos que se cree que atacan el sistema nervioso del paciente.

Ciertos carbohidratos y polisacáridos biológicamente activos pueden eliminar las sustancias nocivas de la sangre y los fluidos biológicos.

50 La heparina es un polisacárido que puede aislar de tejidos de mamíferos. Tiene una distribución muy específica en los tejidos de los mamíferos, estando presente únicamente en los gránulos basofílicos de los mastocitos. Desde su descubrimiento en 1916 por el científico estadounidense McLean, la heparina ha sido reconocida por su capacidad para evitar la coagulación de la sangre y por su vida media relativamente corta en el organismo. La heparina sistémica, administrada por inyección del fármaco libre, se utiliza clínicamente desde hace más de 50 años como agente anticoagulante y antitrombótico sanguíneo seguro y eficaz. Los efectos de la heparina sobre la coagulación de la sangre disminuyen con bastante rapidez después de interrumpir su administración, lo que hace que su uso durante la cirugía y otros procedimientos sea eficaz y seguro. Es decir, las propiedades anticoagulantes y antitrombogénicas de la heparina son útiles durante muchos procedimientos médicos, por ejemplo para minimizar las interacciones indeseables entre la sangre y las superficies artificiales de los circuitos extracorpóreos. Una vez finalizado el procedimiento, la administración de heparina puede suspenderse. La concentración de heparina en la sangre del paciente disminuye hasta un nivel seguro en pocas horas debido a su corta vida media en el organismo. Esto es especialmente importante después de la cirugía, cuando la curación depende de la capacidad de coagulación de la sangre en la zona quirúrgica para evitar complicaciones hemorrágicas. Además de su uso bien establecido y continuado en el tratamiento de los trastornos tromboembólicos, y la prevención de la trombogénesis inducida por la superficie, se ha descubierto más recientemente que la heparina tiene una amplia gama de otras funciones aparentemente no relacionadas con su función como anticoagulante. Por ejemplo, ahora se sabe que un gran número de proteínas de la sangre se unen con gran afinidad a la heparina y/o al polisacárido estrechamente

relacionado con ella, el heparán sulfato, que también se encuentra en los tejidos animales, incluida la superficie luminal de contacto con la sangre de los vasos sanguíneos sanos (donde puede contribuir a evitar que la sangre circulante se coagule al entrar en contacto con las paredes de los vasos sanguíneos). Algunos ejemplos son la antitrombina (AT), la fibronectina, la vitronectina, los factores de crecimiento (por ejemplo, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento similares a la insulina, etc.). La albúmina de suero humano (HSA) también se une a la heparina, pero con menor afinidad a pesar de su elevada concentración en la sangre.

Otros han considerado la posibilidad de utilizar las propiedades de adsorción selectiva de la heparina libre sistémica para evitar las infecciones, introduciendo fragmentos de heparina y/o los denominados fragmentos con contenido siálico directamente en el sistema vascular. Esta terapia se basaba en la suposición de que estos fragmentos se unirían a las lectinas de los microbios y las bloquearían para que no pudieran unirse a los receptores de la superficie celular de los mamíferos. Aunque este enfoque ha sido investigado por muchos científicos, hasta la fecha sólo se ha informado de un éxito limitado. El problema más común han sido las complicaciones hemorrágicas asociadas a las grandes cantidades de heparina *libre* introducidas en el torrente sanguíneo, por ejemplo, mediante inyección, para lograr una reducción clínicamente útil de los microbios patógenos. La *presente invención* no requiere el uso de heparina libre y sistémica para su eficacia y, por tanto, puede eliminar las complicaciones hemorrágicas. Esto se consigue uniendo la heparina o el heparán sulfato de forma permanente a un sustrato sólido con una gran superficie, y exponiéndolo a la sangre dentro de un cartucho o filtro que contiene este medio de adsorción.

Las siguientes referencias abordan los temas tratados anteriormente: Weber y otros (Weber V, Linsberger I, Ettenauer M, Loth F, y otros, Development of specific adsorbents for human tumor necrosis factor-alpha: influence of antibody immobilization on performance and biocompatibility. Biomacromolecules 2005; 6: 1864-1870) informaron de una unión significativa del TNF *in vitro* utilizando micropartículas de celulosa recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-TNF, mientras que Haase y otros (Haase M, Bellomo R, Baldwin I, Haase-Fielitz A, y otros, The effect of three different miniaturized blood purification devices on plasma cytokine concentration in an ex vivo model of endotoxinemia. Int J Artif Organs 2008; 31: 722-729) informaron de una reducción significativa de la IL-1ra, pero no de la IL-6, utilizando una metodología *ex vivo* similar a la nuestra pero con un dispositivo de adsorción poroso. *In vivo*, Mariano y otros (Mariano F, Fonsato V, Lanfranco G, Pohlmeier R, y otros, Tailoring high-cut-off membranes and feasible application in sepsis-associated acute renal failure: *in vitro* studies. Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 1116-1126), son capaces de reducir significativamente varias citoquinas circulantes con hemoperfusión y una membrana de polisulfona de alto punto de corte, pero también informaron de una pérdida de albúmina sérica. Schefold y otros demuestran la supuesta relevancia clínica de estos hallazgos (Schefold JC, von Haehling S, Corsepius M, Pohle C, y otros, A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoabsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. Shock 2007; 28: 418-425), que en un estudio aleatorio de 33 pacientes con shock séptico son capaces de reducir simultáneamente los niveles de endotoxina, IL-6 y C5a circulantes mediante la immunoabsorción selectiva, lo que resulta en una mejor función de los órganos.

La Patente WO2008/157570 da a conocer un dispositivo para la eliminación extracorpórea de agentes nocivos de la sangre o de los componentes sanguíneos, comprendiendo el dispositivo un sustrato sólido en un recipiente, presentando dicho sustrato sólido una superficie heparinizada. El material del sustrato sólido puede ser quitosano, como uno de los ejemplos.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para la eliminación de citoquinas y/o patógenos de la sangre de mamíferos mediante el contacto de la sangre con un sustrato sólido, esencialmente no poroso, recubierto con moléculas, biomoléculas o grupos químicos adsorbentes selectivos. La invención se define en la reivindicación 1 anexa. Las realizaciones preferentes son objeto de las reivindicaciones dependientes. Las moléculas selectivamente adsorbentes pueden incluir polisacáridos, como heparina, heparán sulfato, polietilenimina (PEI), ácido siálico, ácido hialurónico y carbohidratos con secuencias de manosa. Cuando se utiliza de forma profiláctica, por ejemplo, durante la extracción o transfusión de sangre almacenada, o en la transfusión directa de sangre de paciente a paciente, el uso de la presente invención también puede utilizarse para disminuir o eliminar la propagación de enfermedades. Por tanto, la presente invención puede utilizarse tanto para prevenir la enfermedad como para ayudar a curarla en pacientes previamente infectados.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una terapia para el tratamiento de una enfermedad existente eliminando citoquinas y/o patógenos de la sangre de mamíferos mediante el contacto de la sangre con un sustrato sólido, esencialmente no poroso, recubierto con heparina y/u otras moléculas adsorbentes, y devolviendo la sangre al paciente que sufre la enfermedad.

Los objetos mencionados anteriormente no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 1. Eliminación de citoquinas o patógenos de la sangre

Un primer aspecto de la presente invención proporciona un dispositivo para la eliminación de citoquinas y/o patógenos de la sangre, como la sangre de mamíferos, mediante el contacto de la sangre con un sustrato sólido, por ejemplo, recubierto con heparina y/u otros carbohidratos y/o polisacáridos adsorbentes.

- 5 Conforme a ello, la heparina se inmoviliza en la superficie del sustrato. Los inventores han descubierto que la heparina inmovilizada unida a una superficie es eficaz para eliminar una cantidad significativa de citoquinas y patógenos de la sangre. Sin embargo, las tasas de flujo típicas de los circuitos sanguíneos extracorpóreos exigen que el "lecho" adsorbente esté diseñado para permitir tasas de flujo relativamente altas para funcionar con seguridad. Esto se debe en parte a la tendencia universal de la sangre en movimiento lento o estancada a formar peligrosos coágulos. En la presente invención, el sustrato está diseñado con dimensiones intersticiales lo suficientemente grandes como para permitir una alta tasa de flujo de sangre por el sustrato sin una gran caída de presión. Es decir, a medida que se extrae la sangre de un paciente mamífero, ésta pasa por el sustrato a una tasa de flujo, caracterizándose el suministro de adsorbatos a la superficie del lecho adsorbente principalmente por la convección forzada. Esto contrasta con el proceso mucho más lento de la difusión molecular que se produce en el uso de medios adsorbentes altamente porosos (por ejemplo, sílice porosa, sephadex, poliestireno reticulado y otros medios de exclusión por tamaño), y muchos otros medios microporosos. La difusión molecular también es necesaria cuando se utilizan membranas de barrera selectivamente permeables junto con medios de adsorción, por ejemplo, para evitar el contacto de los medios de adsorción con células sanguíneas y/o solutos de alto peso molecular durante la terapia de afinidad.
- 10 20 La unión de citoquinas y patógenos por la heparina y/u otras moléculas adsorbentes durante el transporte por convección es particularmente eficaz en las condiciones de flujo relativamente alto que se emplean típicamente en el funcionamiento (seguro) de los circuitos sanguíneos extracorpóreos, por ejemplo, cuando se mide por la velocidad del flujo lineal,  $\geq 8$  cm/min, preferentemente unos  $\geq 24$  cm/min, y más preferentemente unos 24-329 cm/min, o, cuando se mide por la tasa de flujo, alrededor de  $> 50$  mL/min y preferentemente  $> 150$  mL/min pero menos de unos 2000 mL/min. Por el contrario, la adsorción en los poros de los medios microporosos puede requerir tasas de flujo mucho más bajas a través de lechos de adsorción de tamaño práctico para lograr una separación o purificación adecuada, es decir, de  $< 50$  mL/min a un valor tan reducido como  $< 1$  mL/min.
- 15 25 30 Se reconoce que, estrictamente hablando, es el "tiempo de residencia" en la columna de adsorción el que necesita ser mucho más largo para un medio que requiere el transporte difusivo de adsorbatos al sitio de adsorción dentro del medio, cuando se compara con el menor tiempo de residencia necesario para transportar un adsorbato al sitio de unión (en un medio esencialmente no poroso) por convección forzada. Sin embargo, existen límites prácticos a las dimensiones de un cartucho, columna, filtro, etc., adsorbente, seguro y eficaz, especialmente en lo que respecta al volumen máximo de retención de sangre que puede contener y a la velocidad de flujo de la sangre o el suero que pasa por el medio de adsorción. Por este motivo, la tasa de flujo media a través del dispositivo de adsorción se considera una variable de diseño importante.
- 35 40 45 La cinética de convección y la cinética de difusión pueden compararse en la eliminación de citoquinas o patógenos de sangre que fluye: Los medios de adsorción que dependen del transporte por difusión suelen utilizar materiales muy porosos con una superficie interna extremadamente alta debido a la presencia de poros microscópicos. Los medios adecuados para el transporte por convección, en cambio, se basan generalmente en "canales" macroscópicos o intersticiales visibles entre materiales sólidos, esencialmente no porosos, como partículas, perlas, fibras, espumas reticuladas u, opcionalmente, membranas densas enrolladas en espiral.
- 50 55 60 Los medios que se basan en el transporte por convección forzada son generalmente más adecuados para tasas de flujo elevadas, mientras que los medios que se basan en el transporte por difusión, mucho más lento, son mucho menos eficaces cuando se requieren tasas de flujo elevadas y tiempos de residencia más cortos. Por esta razón, en un dispositivo de purificación de sangre extracorpórea, se prefiere especialmente un medio de adsorción que no requiera que el adsorbato difunda lentamente en los poros dentro del medio adsorbente. Cuando la sangre se bombea a través de circuitos fabricados con materiales artificiales, es una práctica generalizada emplear tasas de flujo de sangre relativamente altas para evitar el estancamiento y reducir el riesgo de coagulación. Por otro lado, deben evitarse las tasas de flujo extremadamente altas porque pueden exponer a las células sanguíneas a altas tasas de cizallamiento y a daños por impacto que pueden romper o dañar de otro modo las células sanguíneas. La presente invención, por lo tanto, proporciona un dispositivo para eliminar citoquinas y/o patógenos de la sangre utilizando las características preferentes del transporte por convección y su deseable cinética más rápida. Esto se consigue haciendo pasar/fluir la sangre sobre un sustrato esencialmente no microporoso, cuya superficie ha sido tratada con moléculas adsorbentes, por ejemplo, heparina, y que por lo tanto es capaz de unir la citoquina o los patógenos deseados para eliminarlos de la sangre. También es posible utilizar un sustrato microporoso en la presente invención si el tratamiento de la superficie hace que ese sustrato sea efectivamente no poroso. Esto puede ocurrir de forma intencionada o inadvertida, cuando los tratamientos superficiales durante la fabricación de los medios bloquean los poros. Esto convierte el sustrato microporoso en uno que no requiere la difusión del adsorbato en los poros para unirse al medio.
- 65 Los dispositivos reivindicados están destinados a ser aplicados principalmente en terapias o procedimientos extracorpóreos, aunque también son posibles los dispositivos implantables. "Terapias extracorpóreas" significa procedimientos que se llevan a cabo fuera del cuerpo, como las terapias en las que los productos deseados, como

oxígeno, anticoagulantes sanguíneos, anestésicos, etc., pueden añadirse a los fluidos corporales. Por el contrario, los productos no deseados, como las toxinas o los venenos naturales, también pueden eliminarse de los fluidos corporales con tipos específicos de circuitos extracorpóreos. Ejemplos son la hemodiálisis y la hemofiltración, que representan tecnologías mediante las cuales se eliminan productos de desecho de la sangre. La adsorción en carbón activado se ha utilizado para eliminar venenos transmitidos por la sangre, etc.

En la presente invención se puede utilizar sangre entera y suero sanguíneo de mamíferos. La cantidad de sangre o suero sanguíneo que se puede utilizar en los métodos reivindicados no pretende estar limitada. Puede abarcar desde menos de 1 mL y más de 1 L hasta, e incluyendo, todo el volumen de sangre del paciente cuando se emplea la recirculación continua hacia el paciente. Si es necesario, se pueden realizar una o varias "pasadas" por el lecho de adsorción. La sangre puede ser humana o animal.

Los medios de adsorción para eliminar citoquinas o patógenos de la sangre están optimizados según la presente invención para su uso en la circulación sanguínea extracorpórea tradicional con tasas de flujo > 50 mL/min, y preferentemente entre unos 150 y 2000 mL/min. Si se mide por la velocidad de flujo lineal, ≥ 8 cm/min, preferentemente unos ≥ 24 cm/min y más preferentemente unos 24-329 cm/min. Tales tasas de flujo elevadas crean tiempos de residencia cortos dentro de la columna de adsorción y el transporte por convección domina sobre el transporte difusivo browniano. Esto es especialmente importante para la unión de proteínas de alto peso molecular o citoquinas como el TNF- $\alpha$  y partículas más grandes como virus, bacterias y parásitos, ya que difunden muy, muy lentamente. En la presente invención, los sitios de adsorción dominantes disponibles para la eliminación de citoquinas y patógenos se encuentran en las superficies dentro de los intersticios del lecho de medio, a través de los cuales fluye la sangre o se suministra por convección forzada. Para tratar la sangre, los canales intersticiales deben ser lo suficientemente grandes como para permitir el transporte de glóbulos rojos, que tienen un diámetro medio de 6 micras. Para que un cartucho de adsorción empaquetado pueda colocarse en un circuito extracorpóreo con una tasa de flujo sanguíneo elevada, los canales intersticiales deben ser varias veces mayores que el diámetro de los glóbulos rojos. Esto puede evitar las altas tasas de cizallamiento que conducen a la hemólisis mientras que simultáneamente se minimiza la caída de presión en la sangre que fluye a través del lecho o cartucho empaquetado. Además, el medio es preferentemente rígido para minimizar la deformación que podría obstruir el cartucho filtrante por compactación. Basándose en estas preferencias, un medio rígido optimizado equilibra el tamaño del canal intersticial y la superficie total, por ejemplo, para la eliminación eficiente de patógenos y/o citoquinas en circuitos sanguíneos extracorpóreos de alto flujo.

## 2. El sustrato utilizado en la invención.

Variados materiales, en forma y composición, se pueden utilizar como sustrato en la presente invención. Todos los sustratos adecuados proporcionan una gran superficie mientras promueven el transporte de los adsorbatos a los sitios de adsorción que los unen (principalmente) por transporte de convección forzada. El medio se suministra típicamente empaquetado dentro de un contenedor, como una columna, que está diseñado para mantener el medio de manera que no sea arrastrado por la sangre que fluye (también conocido como migración del medio) y permitir el flujo de la sangre pasando esencialmente por toda superficie del medio. Los sustratos útiles para crear el medio de adsorción incluyen perlas rígidas no porosas, partículas, espumas reticuladas de relleno, un lecho monolítico rígido (por ejemplo formado por perlas o partículas sinterizadas), una columna rellena de telas tejidas o no tejidas, una columna rellena de un hilo o fibras sólidas o huecas, monofilamentosas, densas (no microporosas), un cartucho enrollado en espiral formado por una película plana o una membrana densa, o una combinación de medios como un cartucho mixto de perlas/tela. Un sustrato adecuado para el uso en la presente invención es uno que inicialmente es microporoso pero se vuelve esencialmente no poroso durante el tratamiento de la superficie antes, durante o después de la creación de los sitios de adsorción, por ejemplo, a través de heparina unida por el extremo.

La columna tiene una estructura macroporosa que presenta una gran superficie para la sangre o el suero, al tiempo que evita una gran caída de presión y altas tasas de cizallamiento. Además de la posibilidad de dañar la sangre por hemólisis, deben evitarse las caídas de presión elevadas porque pueden apagar los circuitos extracorpóreos equipados con cierres automáticos que responden a la caída de presión.

El sustrato también puede adoptar la forma de una membrana densa o, también conocida como, de barrera. En esta realización, la superficie de una película no porosa se modifica uniendo heparina, heparán sulfato u otro polisacárido adsorbente junto con grupos adsorbentes opcionales no derivados de heparina, heparán sulfato o el polisacárido adsorbente a la superficie de la membrana. Alternativamente, una membrana microporosa puede volverse no porosa o "densa" antes, durante o después de la unión de los sitios de unión llenando los poros con material esencialmente no poroso, por ejemplo, un polímero. La membrana en forma de lámina o de fibra (hueca) puede estar dispuesta dentro de una carcasa para presentar una superficie elevada para el contacto con la sangre, que sea adecuada para su uso en la práctica de la presente invención.

### 2.1 Perlas como sustrato

Un sustrato útil es en forma de perlas o partículas sólidas. Las "perlas" puede fabricarse de materiales que son lo suficientemente rígidos como para resistir deformaciones/compactación bajo las tasas de flujo presentes. La resistencia a la deformación es necesaria para mantener el volumen libre y la consiguiente baja caída de presión

del "contactor" de lecho empaquetado. La ausencia sustancial de poros accesibles en la mayor parte del sustrato elimina la necesidad de que los adsorbatos difundan en los poros antes de la adsorción. Los sitios de adsorción de la presente invención se encuentran principalmente en la superficie del medio y, por lo tanto, están ubicados de forma accesible para los adsorbatos en la sangre, suministrados a esa superficie en gran medida por transporte convectivo.

Los sustratos adecuados no tienen por qué ser perfectamente lisos en su superficie, ya que la rugosidad produce un aumento deseable de la superficie para la unión de los sitios de unión, por ejemplo, mediante la unión covalente o iónica de heparina. Por otro lado, se evitan en gran medida los poros internos accesibles con dimensión molecular para eliminar la necesidad de que los adsorbatos difundan en los poros antes de unirse a los sitios de unión.

En la invención se pueden utilizar varios tipos de perlas. Las perlas útiles deben tener un tamaño y una rigidez suficientes para evitar la deformación/compactación durante su uso en el método, y tener una superficie suficiente para poder ser recubiertas con heparina para su uso en el método.

Una prueba de una rigidez suficiente del sustrato es la ausencia de un aumento significativo de la caída de presión a lo largo del lecho de adsorción durante aproximadamente una hora de flujo de agua o solución salina a velocidades típicas del uso clínico: por ejemplo, <10-50% de aumento en relación con la caída de presión inicial (medida en el primer minuto de flujo), cuando se mide a una tasa de flujo similar, por ejemplo, de solución salina. Las perlas u otros sustratos de gran superficie pueden estar compuestos por una variedad de diferentes materiales biocompatibles, tales como polímeros naturales o sintéticos o materiales no poliméricos, incluyendo vidrios, cerámicas y metales, que están esencialmente libres de impurezas lixiviadas. Algunos polímeros ejemplares incluyen poliuretano, polimetilmetacrilato, polietileno o copolímeros de etileno y otros monómeros, polietilenimina, polipropileno y polisobutileno. Los ejemplos de sustratos útiles incluyen el polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE) no poroso. Otras perlas adecuadas son poliestireno, polietileno de alta densidad y baja densidad, sílice, poliuretano y quitosano.

Los métodos para fabricar dichas perlas son en sí conocidos de la técnica. Las perlas de polietileno y otras perlas de poliolefinas se producen directamente durante el proceso de síntesis y se pueden utilizar frecuentemente sin una reducción de tamaño adicional. Otros polímeros pueden requerir molienda o secado por aspersión y clasificación, u otro tipo de procesamiento para crear perlas con la distribución de tamaños y forma deseadas.

Tal como se ha mencionado anteriormente, para el uso en el dispositivo de la invención, el tamaño de los canales o el espacio intersticial entre las perlas individuales para la filtración sanguínea extracorpórea debe optimizarse para evitar una caída de presión fuerte entre la entrada y la salida del cartucho, para permitir el pasaje seguro de las células sanguíneas entre las perlas individuales en un entorno de flujo elevado y proporcionar la superficie intersticial apropiada para la unión del adsorbente polisacárido a las citoquinas o patógenos en la sangre. En un lecho de empaquetamiento compacto de perlas aproximadamente esféricas de 300 micras, un tamaño de poro intersticial apropiado es de aproximadamente 68 micras en diámetro. Las perlas útiles tienen un tamaño que abarca desde aproximadamente 100 hasta más de 500 micras de diámetro. El tamaño medio de las perlas puede ser de 150 a 450 micras. Por ejemplo, las perlas de polietileno de Polymer Technology Group (Berkeley, EE.UU.) que tienen un diámetro medio de 0,3 mm son adecuadas. Los poros intersticiales dependen del tamaño de las perlas.

Para su uso, las perlas adecuadas se alojan en un recipiente, como una columna. A continuación se describen otras formas adecuadas de sustrato.

Las espumas reticuladas tienen células abiertas y pueden fabricarse de, por ejemplo, poliuretanos y polietilenos. El control del tamaño de poro puede lograrse controlando el método de fabricación. En general, las espumas reticuladas pueden tener entre 3 y 100 poros/pulgada y pueden presentar una superficie  $\geq 66 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .

Las perlas se pueden sinterizar para formar una estructura porosa monolítica tanto por medios químicos como físicos. Las perlas de polietileno se pueden sinterizar calentando las perlas por encima de su temperatura de fusión en un cartucho y aplicando presión. El tamaño de poro intersticial resultante es ligeramente inferior que el tamaño de poro intersticial de un lecho empaquetado de perlas no sinterizadas de igual tamaño. Esta reducción se puede determinar empíricamente y utilizar para producir el tamaño de poro intersticial final deseado.

Una columna u otra forma de alojamiento puede rellenarse o bien con tela heparinizada tejida o no tejida o heparina, heparán sulfato o se pueden unir sitios de adsorción sin heparina opcionales, por ejemplo, mediante enlaces covalentes, iónicos u otros enlaces químicos o físicos, después de llenar el alojamiento con el medio de sustrato. Controlando el denier de la fibra o la densidad de la tela durante el tejido o tejido de punto o durante la creación de una tela no tejida, se puede controlar el tamaño de poro intersticial. Las telas no tejidas útiles pueden ser en forma de fieltros, telas meltblown o hiladas electrostáticamente, con una orientación aleatoria, que se mantienen unidas por el entrelazamiento de las fibras y/o la adhesión o cohesión de las fibras que se cruzan. Las telas tejidas útiles tienen una estructura más definida y no aleatoria.

Una columna puede llenarse con fibras o hilos hechos de fibras. El polietileno y otras fibras pueden ser extraídas en fibras monofilamentosas finas huecas o sólidas, o en hilos multifilamentosos, que pueden utilizarse de empaquetamiento en cartuchos, de la misma manera que las membranas de fibra hueca se instalan en los

cartuchos de hemodiálisis convencionales o en los oxigenadores de sangre. En la presente invención, las fibras huecas originalmente porosas se convierten en densas o no porosas antes, durante o después de la unión de heparina u otros adsorbentes a la superficie exterior y/o interior. Dyneema Purity® de Royal DSM es una fibra sólida altamente resistente fabricada de UHMWPE. Dyneema se puede heparinizar y empaquetar en un cartucho para proporcionar un soporte de gran superficie para eliminar citoquinas y patógenos.

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

## 2.2.Unión del polisacárido adsorbente

El polisacárido adsorbente de la invención puede unirse a la superficie del sustrato sólido por varios métodos, incluyendo la unión covalente o la unión iónica.

Los medios de adsorción de la presente invención pueden comprender heparina unida covalentemente a la superficie del sustrato sólido. Se pueden utilizar varios métodos en sí conocidos para unir la heparina al sustrato deseado, como se describe en un artículo de revisión de Wendel y Ziemer. ( H.P Wendel y G. Ziemer, European Journal of Cardio-thoracic Surgery 16 (1999) 342-350 ). En una realización, la heparina está unida al sustrato sólido mediante una unión covalente del extremo. Este método aumenta la seguridad del dispositivo al reducir o eliminar la liberación de heparina de la superficie del sustrato que podría entrar en el torrente sanguíneo. Se debe evitar la "lixiviación" de la heparina por y en la sangre porque puede aumentar el riesgo de hemorragia y de trombocitopenia inducida por la heparina.

La unión covalente del polisacárido, como la heparina, a un sustrato sólido proporciona un mejor control de parámetros como la densidad de la superficie y la orientación de las moléculas inmovilizadas en comparación con la unión no covalente. Los inventores han demostrado que estos parámetros son importantes para proporcionar una unión óptima de citoquinas o patógenos a las moléculas de carbohidratos inmovilizadas. La concentración superficial de heparina en el sustrato sólido puede estar en el rango de 1-10 µg/cm<sup>2</sup>. La unión covalente por el extremo significa que el polisacárido, como la heparina, se une covalentemente al sustrato sólido a través del residuo terminal de la molécula de heparina. La heparina también puede unirse en múltiples puntos. Se prefiere la unión por el extremo.

Si se utilizan perlas, se pueden hidrofilizar antes de la unión del polisacárido, como la heparina, u otro compuesto. Los posibles métodos de preparación de las perlas incluyen el grabado con ácido, el tratamiento con plasma y la exposición a oxidantes fuertes como el permanganato de potasio.

## 2.3.Cantidad de polisacárido/gramo de sustrato

La cantidad de adsorbente polisacárido por gramo de sustrato puede variar. En una realización particular, si se utilizan perlas, la cantidad de polisacárido, como la heparina por gramo de perla, se determina en función del número de capas utilizadas y también del tamaño de las perlas. Cuanto más grande sea la perla, menos polisacárido, como la heparina, se alcanza por gramo de perla. Una cantidad preferente es de 2,0 ± 0,5 mg de heparina/g de perla según el método MBTH.

El peso molecular del polisacárido utilizado en los métodos reivindicados puede variar. Por ejemplo, la heparina nativa tiene un peso molecular medio de 22 kDa. La heparina degradada con ácido nítrico tiene un peso molecular de 8 kDa.

## 3. Mezcla de perlas con diferente funcionalidad superficial

La heparina es un carbohidrato biológicamente activo que puede unir citoquinas, patógenos y otras proteínas. Pero la heparina es más conocida y se utiliza más ampliamente como anticoagulante que impide la coagulación de la sangre. Se ha utilizado clínicamente de forma segura durante 50 años como anticoagulante sistémico inyectable.

Además, los fabricantes lo utilizan desde hace muchos años como revestimiento o tratamiento superficial de los dispositivos médicos con el único fin de mejorar su seguridad en las aplicaciones de contacto con la sangre. Esto es especialmente importante en aquellos dispositivos que deben exponer una gran superficie a la sangre con fines de transporte en masa. Los ejemplos incluyen dializadores y oxigenadores de sangre. La superficie del medio de adsorción utilizado en la presente invención incorpora heparina con dos fines: 1) la capacidad de la heparina de unirse a patógenos, citoquinas y otras sustancias transmitidas por la sangre que contribuyen a enfermedades, y 2) la capacidad de la heparina de evitar la coagulación de la sangre y las reacciones relacionadas al entrar en contacto con una superficie extraña, por ejemplo, artificial. Por este motivo, la heparina es un componente crítico de los medios de adsorción de la presente invención porque proporciona tanto eficacia como seguridad durante la eliminación de sustancias nocivas de la sangre y otros fluidos biológicos.

Además de la heparina y el heparán sulfato, existen otras fracciones químicas biológicamente activas, incluidos otros carbohidratos, que pueden eliminar de la sangre y de los fluidos biológicos sustancias nocivas que no se

eliminan eficazmente sólo con heparina inmovilizada. Por ejemplo, el quitosano, un carbohidrato altamente catiónico y con carga positiva, se une a las endotoxinas. Otras moléculas con carga positiva, como el polietilenimina (PEI), también pueden unir endotoxinas. Sin embargo, las superficies catiónicas son significativamente menos compatibles con la sangre que las superficies heparinizadas y pueden provocar un aumento de la trombogenicidad,

5 una condición peligrosa en los dispositivos en contacto con la sangre. (See Sagnella S. y Mai-Ngam K. 2005, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 42, pp. 147-155 , *Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials*, y Keuren J.F.W., Wielders S.J.H., Willems G.M., Morra M., Cahalan L., Cahalan P. y Lindhout T. 2003, Biomaterials, Vol. 24, pp. 1917-1924 .*Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces*). Aunque es posible utilizar un cartucho de adsorción que contenga PEI, quitosano u otras superficies inherentemente trombogénicas como adsorbente bioactivo para eliminar los LPS o las endotoxinas de la sangre, debido al grave riesgo de coagulación, el paciente necesitaría una dosis elevada de anticoagulante sistémico. En el caso de la heparina sistémica, esto podría suponer un riesgo de hemorragia y una posible trombocitopenia.

10 15 Según la invención, se prepara el lecho de adsorción a partir de una mezcla de medios heparinizados y medios intrínsecamente trombogénicos. Al ensamblar un cartucho de adsorción con superficies heparinizadas y, por ejemplo, superficies catiónicas (u otras superficies inherentemente trombogénicas), las citoquinas, los patógenos y las endotoxinas pueden ser eliminados de forma segura de la sangre o del fluido biológico.

20 Otro carbohidrato biológicamente activo, pero trombogénico, es el ácido siálico. Se sabe que el ácido siálico se une a las lectinas de los virus, incluido el de la gripe. (C, Mandal. 1990, Experientia, Vol. 46, pp. 433-439 , Sialic acid binding Lectins). Un cartucho mixto de perlas heparinizadas y perlas recubiertas de ácido siálico puede ser útil en el tratamiento de pacientes, como por ejemplo durante una pandemia de gripe. El shock séptico abdominal suele estar causado por *E. coli*, que es una bacteria gram negativa. Las bacterias gram negativas no suelen unirse a la heparina, por lo que sería útil disponer de una columna de adsorción con multifuncionalidad para unir estas bacterias además de las citoquinas y/o endotoxinas. Se sabe que los carbohidratos con secuencias de manosa, como el metil- $\alpha$ -D-manopiranósido, se unen a *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* y *Salmonella*. ( Ofek I., and Beachey E.H. 1, 1978, Infection and Immunity, Vol. 22, pp. 247-254, Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of Escherichia coli and Sharon, N. 2, 1987, FEBS letters, Vol. 217, pp. 145-157 Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease). El uso de esta realización se basa en el concepto de que una superficie antitrombogénica en íntimo contacto con, o en estrecha proximidad a una superficie trombogénica puede prevenir la formación de trombos clínicamente significativos que de otro modo ocurrirían si la superficie inherentemente trombogénica se utilizara sola. En el caso de los medios de adsorción en forma de perlas o partículas, una aplicación preferida de esta invención es mezclar los diferentes medios de adsorción antes de empaquetarlos en un cartucho u otro alojamiento. Esto proporciona un contacto íntimo entre las diversas químicas de la superficiales de las perlas adyacentes, permitiendo al mismo tiempo la fabricación eficiente de cartuchos o filtros de adsorción. Un enfoque relacionado consiste en colocar los diferentes medios en capas en una disposición de tipo "parfait" dentro del alojamiento, de manera que la sangre entre en contacto con los diferentes medios en un flujo en serie o en paralelo. Una disposición de los diferentes medios dentro de un cartucho consiste en colocar medios antitrombogénicos no mezclados a la entrada y/o a la salida del cartucho, con una región opcionalmente mezclada 30 35 40 45 50 que contiene los medios más trombogénicos, interpuesta entre las regiones de entrada y salida. En el caso de los medios en forma de fibra, se puede preparar una estructura mixta tejida, de punto o no tejida mediante métodos bien conocidos en la industria textil para formar tejidos a partir de la fibra mixta. Alternativamente, se puede preparar un hilo a partir de un hilo multifilamento más fino o un monofilamento hecho de dos o más fibras con diferentes químicas superficiales, siempre que un tipo de fibra contenga una superficie que impida activamente la coagulación de la sangre al contacto. El hilo de fibra mixta puede utilizarse entonces para preparar el tejido para el contacto con la sangre. Los medios de adsorción de fibra hueca o de fibra sólida pueden mezclarse y utilizarse para fabricar cartuchos que se asemejen a dializadores u oxigenadores de fibra hueca. En el caso de los medios de adsorción de tipo membrana o película del tipo que se utiliza en los cartuchos de adsorción enrollados en espiral, se pueden utilizar dos o más químicas superficiales muy próximas entre sí, de manera que la sangre debe entrar en contacto con ambas químicas superficiales (casi) simultáneamente. Esto podría hacerse con una disposición regular o aleatoria de los distintos grupos de unión dentro de la capa superficial de la película de membrana, o formando una vía de flujo para la sangre entre dos películas de membrana muy cercanas, una de las cuales es antitrombogénica.

#### 55 4. Dispositivo de la invención

El dispositivo de la invención comprende el sustrato sólido modificado con adsorbente, el adsorbente que tiene una afinidad de unión para una citoquina o patógeno, para la eliminación extracorpórea de la citoquina o patógeno de la sangre de mamíferos.

60 Un dispositivo según la invención puede comprender un dispositivo convencional para el tratamiento extracorpóreo de la sangre y el suero de pacientes, por ejemplo, que sufren de insuficiencia renal.

65 Se sabe que los patrones de flujo sanguíneo local en la sangre que entra en contacto con los dispositivos médicos para la circulación extracorpórea influyen en la formación de coágulos a través de la activación del cizallamiento y la agregación de las plaquetas en las zonas estancadas. En consecuencia, un dispositivo como el utilizado en los diversos aspectos de la invención debe ser diseñado de manera que no cree estos problemas.

Un dispositivo como el utilizado en algunas realizaciones de la invención puede, por ejemplo, tener las siguientes propiedades:

- 5 Un flujo sanguíneo en el rango de 150-2000 ml/min, o si se mide por velocidad de flujo lineal de  $\geq 8$  cm/min.  
Baja resistencia al flujo.
- 10 Gran superficie de sustrato con carbohidratos inmovilizados en él, por ejemplo, alrededor de 0,1-1 m<sup>2</sup>.  
Recubrimiento estable (sin fugas clínicamente significativas de carbohidratos a la sangre en contacto con el mismo).
- 15 Propiedades hemodinámicas adecuadas en el dispositivo (sin zonas de estancamiento).  
Biocompatibilidad óptima.

Un ejemplo no limitante de tal dispositivo, que puede ser utilizado en un uso o un método según la presente invención, es un dializador de hemoflujo pediátrico que es un dispositivo de filtración sanguínea extracorpórea para eliminar las moléculas de citoquinas y que es compatible con altas tasas de flujo. Uno de estos dispositivos está disponible de Exthera Medical. También pueden utilizarse otros modelos o tipos de dispositivos para el tratamiento extracorpóreo de la sangre o el suero, como el hemofiltro/dializador Prisma M10 de Gambro AB, Suecia.

Las condiciones de alto flujo pueden definirse como un flujo sanguíneo superior al límite de difusión.

## 20 5. Citoquinas

Como se utiliza en el presente documento, el término "citoquina" significa una proteína, liberada por ejemplo en relación con una infección microbiana o la inmunización, seleccionada del grupo que consiste en interleucinas, 25 interferones, quimiocinas y factores de necrosis tumoral. Ejemplos de la(s) citoquina(s) son la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), la proteína regulada por activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES), el interferón, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el factor de necrosis tumoral beta (TNF-beta), la interleucina-1 (IL-1), IL-8, GRO- $\alpha$  e interleucina-6 (IL-6).

30 El método también permite la eliminación selectiva de citoquinas de la sangre mediante moléculas fuertemente adsorbentes que se unen a la heparina. Algunas moléculas tienen una mayor afinidad de unión a la heparina que otras. Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  tiene una gran afinidad por la heparina.

## 35 6. Patógenos

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad mediante la eliminación de citoquinas y/o patógenos de la sangre de mamíferos, poniendo en contacto la sangre de mamíferos con el sustrato sólido divulgado en el método anterior. Entre los ejemplos de patógenos que se 40 pueden eliminar de la sangre utilizando el sustrato heparinizado según la invención se incluyen:

Virus - Adenovirus, Coronavirus, Virus del Dengue, Hepatitis B, Hepatitis C, IIIV, VPH Citomegalovirus y otros.  
Bacterias - *Bacillus anthracis*, *Chlamydia pneumoniaem*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, SARM, *Streptococcus pyrogenes*, *Yersinia enterocolitica* y otras  
Parásitos - *Giardia lamblia*, *plusmodium spp.* y otros.

45 Véase también, Chen, Y. Gotte M., Liu J., y Park P.W., Mol. Cells, 26, 415-426 .

Un ejemplo de enfermedad a tratar con el dispositivo divulgado en el presente documento es la sepsis. En general, 50 se considera que la sepsis es una respuesta sistémica a una infección que puede provocar un fallo orgánico y, a menudo, la muerte. La afección puede ser provocada por una infección bacteriana, vírica, parasitaria o fúngica. Se sabe que esta afección es especialmente peligrosa en los hospitales, donde los pacientes pueden estar ya inmunodeprimidos. Durante la sepsis, el paciente experimenta la llamada *tormenta de citoquinas* y el sistema inmunitario del organismo ataca los tejidos sanos, lo que provoca un fallo multiorgánico en los órganos muy perfundidos. La reducción del TNF- $\alpha$  y de otras moléculas inflamatorias modulará la respuesta inmunitaria y podría 55 actuar como estrategia de preservación de órganos. Además, se puede eliminar cualquier patógeno en la sangre que se une a la heparina, lo que ayudaría a reducir una mayor colonización y podría reducir la cantidad de antibióticos necesarios para tratar una infección. Esto podría mejorar la seguridad del paciente al reducir los riesgos de efectos secundarios asociados a la terapia con antibióticos.

60 Los métodos divulgados en el presente documento pueden emplearse antes o después de otros tratamientos convencionales, como la administración de antibióticos.

## 7. Combinación de las invenciones con pasos adicionales de filtración/separación

65 En el tratamiento dado a conocer en el presente documento, la extracción y reintroducción de sangre puede realizarse en un bucle continuo, comprendiendo dicho bucle una parte del torrente sanguíneo del sujeto.

En otro aspecto, los métodos descritos anteriormente pueden combinarse con otros métodos para filtrar o tratar la sangre de los mamíferos. Por ejemplo, un cartucho basado en la cinética de convección puede entonces utilizarse en serie con circuitos extracorpóreos convencionales como BCP, hemodiálisis y oxigenación.

## 5 8. Ejemplos

Los diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no pretenden ser limitativos. Por ejemplo, en los presentes ejemplos se utiliza heparina. Sin embargo, se pueden utilizar otros adsorbentes carbohidratos y polisacáridos solos (fuera de la presente invención) o además de los sustratos recubiertos de heparina que se ejemplifican a continuación.

### 10 8.1. Ejemplo 1

#### 15 *Preparación de la columna de heparina*

Perlas de polietileno (PE), con un diámetro medio de 0,3 mm (lote nº 180153), son suministradas por Polymer Technology Group (Berkeley, EE.UU.) y las columnas (Mobicol, 1 mL) se obtienen de MoBiTec (Alemania). La heparina y la polietilenimina (PEI) se adquieren de Scientific Protein Laboratories (Waunakee, Wisconsin, EE.UU.) y de BASF (Ludwigshafen, Alemania) respectivamente. Todos los productos químicos utilizados son de grado analítico o superior. La inmovilización de la heparina en las perlas se realizó según lo descrito por Larm y otros. (Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. Biomater Med Devices Artif Organs 1983; 11: 161-173).

20 La superficie polimérica fue heparinizada mediante el procedimiento general descrito a continuación.

25 La superficie polimérica se graba con un agente oxidante (permanganato de potasio, peroxidisulfato de amonio) para introducir características hidrofílicas junto con algunos grupos funcionales reactivos (-SO<sub>3</sub>H, -OH, -C=O, -C=C-). La superficie también se puede grabar con plasma o corona. Por ejemplo, las perlas de PE se graban con un agente oxidante (permanganato de potasio en ácido sulfúrico). Estas perlas hidrofilizadas, que contienen, entre otras cosas, grupos OH y dobles enlaces, se utilizan posteriormente como controles.

30 Las funciones amino reactivas se introducen mediante el tratamiento con una poliamina, polietilenimina (PEI) o quitosano. Para algunos fines, las poliaminas se pueden estabilizar en la superficie mediante enlaces cruzados con reactivos bifuncionales, como el crotonaldehído o el glutaraldehído.

35 El recubrimiento se estabiliza adicionalmente por medio de un enlace cruzado iónico con un polisacárido sulfatado (sulfato de dextrano o heparina). Si es necesario, se repiten estos pasos y se construye una estructura de sándwich. Se debe realizar un enjuague cuidadoso (agua, tampones adecuados) entre cada paso. Tras una última adición de PEI o quitosano, se realiza la unión de la heparina nativa por el extremo (EPA, end-point attachment) a la superficie aminada mediante aminación reductora, utilizando la función aldehídica en el residuo terminal reductor de la heparina nativa.

40 Se puede conseguir una función aldehídica más reactiva en el residuo terminal reductor mediante la degradación parcial de la heparina con ácido nitroso. Esto acorta el tiempo de reacción, pero la heparina inmovilizada tendrá un menor peso molecular. El acoplamiento se realiza en solución acuosa, por aminación reductora (cianoborohidruro, CNBH<sub>3</sub>-).

45 En este método alternativo, el medio aminado se suspende en tampón de acetato (800 ml, 0,1 M, pH 4,0) y se añaden 4,0 g de heparina degradada con ácido nitroso (heparina de Farmacia, Suecia). Tras agitar durante 0,5 h, se añade NaBH<sub>3</sub>CN (0,4 g). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas y luego se procesa como se ha indicado anteriormente, obteniendo medios heparinizados.

50 Se pueden acoplar de 1 a 10 µg/cm<sup>2</sup> de heparina a todas las superficies hidrófilas como vidrio, celulosa, quitina, etc., y más o menos a todos los polímeros hidrofóbicos como cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, poliestireno, PTFE, etc.

55 Las perlas de PE resultantes, con heparina unida covalentemente por el extremo, se esterilizan con óxido de etileno (ETO) y se enjuagan con cloruro sódico al 0,9% y agua ultra pura. La cantidad de heparina se determinó en 2,0 mg de heparina/perla con el método MBTH. (Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. Biomater Med Devices Artif Organs 1983; 11: 161-173 y Riesenfeld J, Roden L. Quantitative analysis of N-sulfated, N-acetylated, and unsubstituted glucosamine amino groups in heparin and related polysaccharides. Anal Biochem 1990; 188: 383-389).

60 65 Las perlas de polietileno utilizadas tenían un diámetro medio de 0,3 mm y estaban heparinizadas con una tecnología que garantizaba que las moléculas de heparina estaban covalentemente unidas por el extremo a la superficie, haciendo así que las cadenas de carbohidratos fueran más accesibles para las proteínas con afinidad

por la heparina/el heparán sulfato. El peso molecular medio de la heparina inmovilizada era de unos 8 kDa, mientras que en cada gramo de perlas se acoplaban 2 mg (que equivalen aproximadamente a 360 UI). La integridad de esta superficie se verificó por la eliminación esperada del 75% de las concentraciones de antitrombina (AT) de la sangre pasada por las perlas heparinizadas, pero no por las no heparinizadas.

5 Estos datos se corresponden bien con las observaciones previas de la asistencia pulmonar extracorpórea (ECLA) en pacientes sépticos que utilizan oxigenadores de superficie heparinizados, publicadas por Bindslev y otros. (Bindslev L, Eklund J, Norlander O, Swedenborg J, y otros, Treatment of acute respiratory failure by extracorporeal carbon dioxide elimination performed with a surface heparinized artificial lung. Anesthesiology 1987; 67: 117-120).

## 10 8.2. Ejemplo 2

### *Pacientes*

15 El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético local del Hospital Universitario Karolinska y se obtuvo el consentimiento informado firmado de cada paciente. Se extrajo sangre arterial de los hemodializadores de tres pacientes sépticos ( fiebre >38°C, escalofríos, leucocitos >12 x10<sup>9</sup> células/L) (2M/1F, de 43, 56 y 68 años; **tabla 1**).

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes que donaron sangre.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Temperatura corporal (°C)	Frecuencia cardíaca (latidos /min)	Presión arterial media (mmHg)	Frecuencia respiratoria (respiraciones /min)	Recuento de glóbulos blancos (10 <sup>9</sup> /L)
1	M	43	39,2°	110	76	20	19,0
2	M	56	38,6°	90	95	18	17,5
3	F	68	38,5°	100	89	21	19,5

20 A los pacientes se les administran previamente antibióticos de amplio espectro (ceftazidima o cefuroxima junto con un aminoglucósido; una dosis de cada uno) y heparina (200 UI/kg de peso corporal al inicio de la diálisis). La sangre se recogió en tubos de vacío con EDTA y se trasladó inmediatamente a una sala adyacente donde se aplicó 1 mL a las columnas previamente preparadas y se hizo pasar por ellas utilizando una bomba de rodillo a 1, 5 y 10 mL/min. La sangre que había pasado por las columnas se recogió inmediatamente en el otro extremo y se centrifugó en frío (4500 G). Los sobrenadantes se recogen posteriormente y se congelan a -80° C para su posterior análisis.

## 30 8.3. Ejemplo 3

### *Análisis cuantitativo de citoquinas*

35 Las cantidades de citoquinas se determinan mediante fotoluminiscencia con un lector de placas (Multiskan Ascent). Cada muestra se midió en tres pocillos y se utilizó la media geométrica para el análisis. El coeficiente de variación intraensayo fue inferior al 8% en todos los kits. Se utilizaron: Coamatic antithrombin kit (Haemochrom, cat # 8211991), Quantikine Human IL-6 (R&D Systems, cat # D6050), Quantikine Human IL-10 (R&D Systems, cat # D1000B), Protein C Antigen Test 96 (HL Scandinavia AB, product #H5285), Human CCL5/RANTES Quantikine (R&D Systems, cat #DRN00B), Quantikine Human sVCAM-1 (CD106) (R&D Systems, cat # DVC00), Quantikine Human IFN-gamma (R&D Systems, cat # DIF50), Quantikine HS TNF-alpha/TNFSF1A (R&D Systems, cat # HSTA00D) y BD OptEIA Human C5a ELISA Kit II (BD Biosciences, cat # 557965).

### *Evaluación estadística*

40 Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis pareada para comparar las concentraciones sanguíneas de cada citoquina antes y después de la columna, con un valor p de dos colas inferior a 0,05 que indica relevancia. Los resultados se resumen en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Concentraciones de citoquinas medidas antes y después del pasaje de la sangre por diferentes columnas.

Citoquina	Perlas de control		Perlas heparinizadas		
	Antes del pasaje	Después del pasaje	valor p	Después del pasaje	valor p
<b>10 g de perlas / 1 mL de sangre</b>					
VCAM (ng/mL)	115,5	99,0 (-14%)	0,30	88,8 (-23%)	<0,05
IL-6 (pg/mL)	19,7	17,4 (-12%)	0,17	15,0 (-24%)	0,16
RANTES (pg/mL)	147,1	832,5 (+466%)	<0,05	156,4 (+6%)	0,61
Interferon-g (pg/mL)	340,0	296,0 (-13%)	0,32	287,0 (-16%)	0,45

TNF- $\alpha$ (pg/mL)	50,3	45,6 (-9%)	0,46	20,6 (-59%)	<0,01
Antitrombina (%) de actividad)	105,0	92,5	0,10	26,0	<0,01
<b>1 g de perlas / 1 mL de sangre</b>					
VCAM (ng/mL)	115,5	99,5 (-14%)	0,30	89,2 (-23%)	<0,05
IL-6 (pg/mL)	19,7	17,5 (-11%)	0,17	15,9 (-19%)	0,16
RANTES (pg/mL)	147,1	833,0 (+466%)	<0,05	156,8 (+7%)	0,61
Interferon- $\gamma$ (pg/mL)	340,0	296,7 (-13%)	0,32	287,5 (-15%)	0,45
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	50,3	45,3 (-8%)	0,46	21,1 (-58%)	<0,01
Antitrombina (%) de actividad)	105,0	93,0	0,10	26,8	<0,01

*Unión de citoquinas*

- 5 Las concentraciones de las citoquinas analizadas antes y después de la columna se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1. En resumen, el pasaje a través de las perlas heparinizadas dio lugar a una disminución significativamente mayor de VCAM y TNF en sangre en comparación con las perlas no heparinizadas.

*Impacto del volumen de las perlas*

- 10 Los datos obtenidos con un volumen de sangre por perla de 1:1 y 1:10 no variaron significativamente (tabla 2).

*Impacto de la tasa de flujo*

- 15 La variación del flujo sanguíneo de 1 a 10mL/min no afectó significativamente a la cantidad eliminada de las respectivas citoquinas, lo que indica que la unión observada a las moléculas de heparina inmovilizadas es un evento muy rápido y claramente no depende de la cinética de difusión.

8.4. Ejemplo 4

- 20 En este ejemplo, se probaron 5 litros de plasma pobre en plaquetas al que se había añadido TNF- $\alpha$  recombinante con un cartucho de tamaño clínico. Se empaquetó un cartucho de 300 ml con perlas de PE heparinizadas como se describe en el ejemplo 1. El dispositivo se esterilizó mediante esterilización ETO utilizando el ciclo de 16 horas con una temperatura de 50 grados. Se dejó que el dispositivo se "desgasificara" durante 12 horas más antes del inicio del estudio.

- 25 Se adquirieron 5,1L de plasma porcino congelado, sin filtrar, heparinizado, pobre en plaquetas de Innovative Research, y se almacenaron en un congelador a -20 grados hasta el día de su uso. Se recibió 1mg de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  humano recombinante de Invitrogen en forma de polvo.

- 30 La mañana del procedimiento, se sacó el plasma del congelador a -20 grados C y se colocó en un baño de agua caliente para descongelarlo. Se mezcló 1 ml de agua estéril con 1 mg de TNF- $\alpha$  en polvo para reconstituirlo a una concentración de 1 mg/ml.

- 35 Se configuró una máquina de diálisis Fresenius 2008K con un tubo de sangre de hemodiálisis "Combiset" (tubo estándar utilizado en la máquina Fresenius) en un sistema cerrado configurado con el hemofiltro seraph en lugar del riñón Fresenius. Se transfirieron 5L de plasma a una bolsa de depósito de 5L que se conectó a las líneas arterial y venosa del paciente. La máquina de diálisis, junto con los tubos, se preparó con suero fisiológico para garantizar su correcto funcionamiento y que no hubiera aire en el circuito cerrado.

- 40 La bolsa de plasma de 5L se colocó en un balancín de placa envuelta en una manta de calentamiento Bair Hugger para mantener la temperatura durante todo el procedimiento. En este momento se recogió la muestra de control previa a la infusión y se colocó en nitrógeno líquido para su congelación instantánea. A continuación, la muestra se trasladó a una caja de almacenamiento de muestras y se colocó en hielo seco. Una vez confirmadas todas las conexiones, se inyectaron 0,415 ml de TNF- $\alpha$  en el puerto de la bolsa de depósito. El plasma con TNF- $\alpha$  se mezcló en el balancín durante 10 minutos antes de recoger la muestra de control posterior a la infusión. La muestra posterior a la infusión se recogió, se congeló en nitrógeno líquido y se trasladó a la caja de muestras en hielo seco. Se purgó la solución salina del sistema de diálisis y el reloj del sistema se puso en marcha cuando el plasma pasó por el sistema cerrado. La primera muestra se recogió aguas arriba del filtro a los 5 minutos.

- 45 50 Durante la primera hora de la prueba, se recogieron muestras cada 5 minutos en el puerto inmediatamente aguas arriba y también inmediatamente aguas abajo del hemofiltro. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se colocaron en la caja de almacenamiento de muestras en hielo seco.

Durante la segunda y la tercera hora de la prueba, se recogieron muestras cada 10 minutos en el puerto inmediatamente aguas arriba y también inmediatamente aguas abajo del hemofiltro. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se colocaron en la caja de almacenamiento de muestras en hielo seco.

5 Durante la cuarta y la quinta hora de la prueba, se recogieron muestras cada 20 minutos en los puertos aguas arriba y también aguas abajo. Estas muestras también se congelaron en nitrógeno líquido y se colocaron en la caja de almacenamiento de muestras en hielo seco.

10 En cada recogida de muestras, tanto aguas arriba como aguas abajo en cada momento, se utilizó una nueva aguja y una nueva jeringa para evitar el TNF- $\alpha$  residual.

15 Se realizaron pruebas ELISA para controlar la cantidad de TNF- $\alpha$  en el plasma. Para recubrir las placas de 96 pocillos, se diluyeron 10  $\mu$ L del anticuerpo de captura en 10  $\mu$ L de tampón de recubrimiento A y se añadieron 100  $\mu$ L a cada pocillo. La placa se cubrió con parafilm y se almacenó a 4°C durante la noche o el fin de semana. Las muestras se sacaron del congelador a -80°C, se registraron y se dejaron descongelar. Se sacaron las placas de la nevera a 4°C y se aspiraron los pocillos, se lavaron una vez con 400  $\mu$ L/pocillo de tampón de ensayo, se invirtieron y se secaron en papel absorbente. Se añadieron 300  $\mu$ L de tampón de ensayo a cada pocillo y las placas se incubaron durante 60 minutos. Durante este tiempo, se prepararon estándares a partir del estándar de TNF- $\alpha$  incluido en el CytoSet mediante dilución en tampón de ensayo. Las muestras descongeladas se diluyeron en 20 tampón de ensayo. Una vez diluidas las muestras, se volvieron a colocar en los lugares adecuados de las cajas de congelación y se devolvieron al congelador a -80°C, tal como indica el registro. Las placas se lavaron de nuevo con 400  $\mu$ L/pocillo de tampón de ensayo, se invirtieron y se secaron. Los 100  $\mu$ L se colocaron en los pocillos según las hojas de la plantilla de ELISA. Las muestras y los estándares se procesaron por duplicado y se incluyó una curva estándar en cada placa. Se diluyeron 8,8  $\mu$ L de anticuerpo de detección en 5,49 mL de tampón de ensayo y 25 se añadieron 50  $\mu$ L a cada pocillo en cuanto se añadieron todas las muestras y los estándares. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Las placas se lavaron y aspiraron 5 veces como se ha descrito anteriormente. El conjugado de estreptavidina (16  $\mu$ L) se diluyó en 10 mL de tampón de ensayo y se añadieron 100 mL a cada pocillo. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en el agitador orbital y luego se lavaron con el tampón de ensayo 5 veces, como se ha descrito anteriormente. Se 30 añadieron 100  $\mu$ L de la solución de TMB a cada pocillo y las placas se incubaron otros 30 minutos en el agitador orbital. Se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de parada a cada pocillo y la placa se leyó a 450 nm en un lector de placas Vmax en los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

35 Los resultados de la prueba se representan en la figura 1. En 40 minutos de ciclo continuo de suero rico en TNF, se observó una reducción del 80% del TNF, sin liberación posterior. Con una mezcla ideal, todo el TNF del plasma habría pasado por la columna de adsorción en 33 minutos. Queda demostrada la eliminación del TNF- $\alpha$  mediante la adsorción basada en la cinética de convección, ya que la mayor parte del TNF se capturó en este periodo de tiempo.

#### 40 8.5. Ejemplo 5

45 Se realizó un experimento de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) para intentar normalizar la capacidad de unión no competitiva del TNF- $\alpha$  a una superficie heparinizada. La QCM es una técnica que permite detectar el peso de los adsorbentes en cristales especialmente preparados. El límite mínimo de detección es de 0,5 ng/cm<sup>2</sup>. La QCM detecta la frecuencia de resonancia del cristal. A medida que la masa del cristal aumenta a través de la adsorción, la frecuencia de resonancia cambia en proporción a la ganancia de masa. El cambio de masa ( $\Delta m$ ) se describe en la siguiente ecuación

$$\Delta m = -C \frac{1}{n} \Delta f$$

50 C = 17,7 ngcm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>  
n - sobretono

donde  $\Delta f$  es el cambio de frecuencia.

55 Los cristales de QCM recubiertos de poliestireno fueron heparinizados siguiendo el método descrito en el ejemplo 1. Se preparó una solución de 120 ml en la que se añadió TNF- $\alpha$  recombinante a PBS para obtener una concentración final de 83  $\mu$ g/L. A continuación, se hizo fluir la solución a través de una célula que contenía 4 cristales de QCM a una velocidad de 50  $\mu$ L/min. Dos cristales estaban heparinizados y dos eran cristales de control (poliestireno sin tratar). El tiempo total del experimento fue de 20 horas. Los resultados de la cantidad de TNF- $\alpha$  adsorbida en los cristales heparinizados y en los controles se muestran en la Figura 2. Un máximo de 1234 ng/cm<sup>2</sup> de TNF- $\alpha$  se adsorbió en el cristal heparinizado y una adsorción en las superficies de control fue insignificante.

#### 60 8.6. Ejemplo 6

Se llevó a cabo un estudio en el que se comprobó la eliminación de citoquinas de muestras de plasma de macacos infectados con *Bacillus anthracis* utilizando perlas heparinizadas. El plasma se recogió en el momento de la muerte de varios animales y se agrupó. Se empaquetaron jeringas de filtración de 1 ml con 0,5 gramos de perlas de PE heparinizadas siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1 o con perlas de PE no tratadas para utilizarlas

- 5 como controles. Se utilizaron un total de tres jeringas de muestra y tres jeringas de control. Se colocó una placa porosa en la parte superior de las perlas para evitar que éstas flotaran mientras se añadía solución salina o plasma a las jeringas de filtración. Las jeringas de filtración se prepararon utilizando 2 ml de solución salina tamponada con Tris (TBS). Los 2 ml de suero salino se pasaron por la jeringa de filtración con una jeringa de 5 ml. A continuación se retrajo el émbolo de la jeringa de 5 ml y se llenó con 4 ml de aire. A continuación, se hizo pasar el  
10 aire a través de la jeringa de filtración para forzar la salida de la solución salina restante de las perlas. A continuación, se introdujeron 0,5 ml de plasma en la jeringa de 5 ml y se presionaron a través de la jeringa de filtración. Se pasaron otros 4 ml de aire a través de la jeringa de filtración para eliminar el plasma residual. Despues de que el plasma drenara a través de la jeringa, se tomaron muestras y se ultracongelaron para el análisis de la  
15 concentración de citoquinas. Se utilizó un ensayo Luminex® Multiplex para analizar GRO- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\beta$ , Rantes y TNF- $\beta$ . Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3.

Citoquina	Niveles antes del pasaje (pg/ml)	Pasaje a través de las perlas de control (pg/ml)	% eliminado control	Pasaje a través de las perlas con heparina (pg/ml)	% eliminado perlas con heparina
GRO- $\alpha$	263,5	158,5	39,8%	77,66	70,6%
IL-8	504,9	460,8	8,7%	312,4	38,1%
MIP-1 $\beta$	66,2	56,4	14,8%	51,8	21,8%
RANTES	1105,3	930,3	15,8%	559,7	49,4%
TNF- $\beta$	7,3	7,9	-8,2%	4,3	41,4%

## 8.7. Ejemplo 7

*Cartucho para unir citoquinas y endotoxinas mediante un montaje en capas*

Se construye un cartucho utilizando dos medios de adsorción diferentes. Las perlas heparinizadas se utilizan para capturar citoquinas y las perlas de PEI para capturar endotoxinas. Controlando la proporción entre perlas heparinizadas y de PEI, se puede mantener la compatibilidad sanguínea. Las perlas de PEI se fabrican siguiendo los dos primeros pasos del ejemplo 1.

En este ejemplo, se construye un cartucho con perlas heparinizadas y perlas recubiertas de polietilenimina (PEI). Una columna de adsorción de 300 ml se fija a un soporte vertical. A continuación, se añaden al cartucho 50 ml de perlas heparinizadas de 300 micras de media y se dejan sedimentar. A continuación, se añade una mezcla 50:50 de PEI y perlas heparinizadas, que constituye los siguientes 200 ml. Luego, el cartucho se llena hasta arriba con 50 ml finales de perlas heparinizadas. A continuación, el cartucho se sella y el estrecho empaquetamiento de las perlas mantiene la estructura en capas del medio de adsorción. En este cartucho, 2/3 de las perlas están heparinizadas mientras que 1/3 están aminadas y, por tanto, es intrínsecamente trombogénico.

## 8.8. Ejemplo 8

*Cartucho para unir citoquinas y endotoxinas mediante una mezcla uniforme de perlas**Cartucho para unir citoquinas y endotoxinas mediante una mezcla uniforme de perlas*

Se construye un cartucho utilizando dos medios de adsorción diferentes. Las perlas heparinizadas se utilizan para capturar citoquinas y las perlas de PEI para capturar endotoxinas. Controlando la proporción entre perlas heparinizadas y de PEI, se puede mantener la compatibilidad sanguínea general del dispositivo.

En este ejemplo, se construye un cartucho con perlas heparinizadas y perlas recubiertas de PEI. Una columna de adsorción de 300 ml se fija a un soporte vertical. Se añaden 100 ml de perlas recubiertas de PEI a 200 ml de perlas heparinizadas y se mezclan bien. A continuación, se añaden los 300 ml de perlas al cartucho y se sella. El estrecho empaquetamiento de las perlas mantiene la mezcla aleatoria de las perlas. En este cartucho, 2/3 de las perlas están heparinizadas y 1/3 aminadas.

## 8.9. Ejemplo 9

*Cartucho para unir citoquinas, bacterias gram negativas y endotoxinas mediante un montaje en capas*

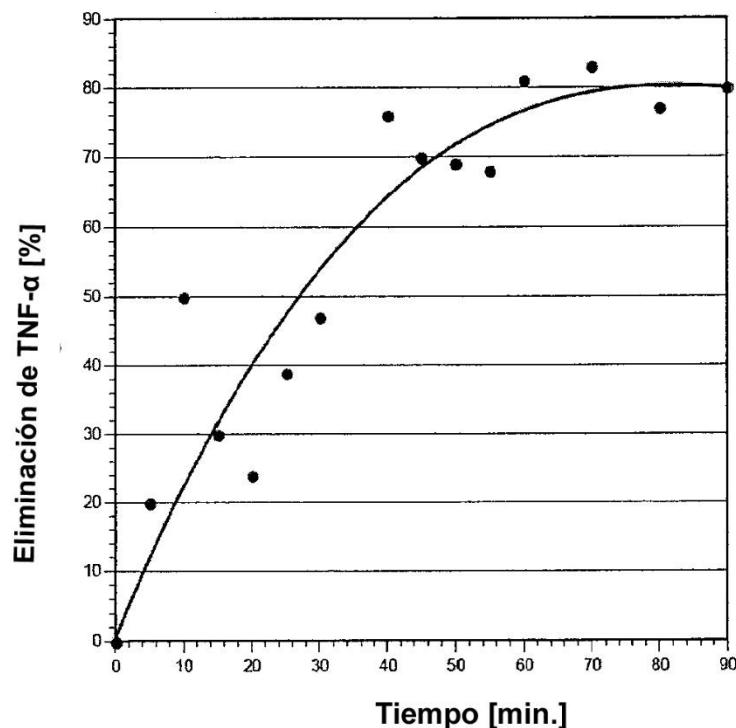
Se construye un cartucho utilizando tres medios de adsorción diferentes. Las perlas heparinizadas se utilizan para capturar citoquinas, las perlas funcionalizadas con manosa se utilizan para capturar bacterias gram negativas y las perlas de PEI se utilizan para capturar endotoxinas. Controlando la proporción entre perlas heparinizadas, perlas funcionalizadas con manosa y perlas revestidas de PEI, se puede mantener la compatibilidad sanguínea.

- Una columna de adsorción de 300 ml se fija a un soporte vertical. A continuación, se añaden al cartucho 50 ml de perlas heparinizadas de 300 micras de media y se dejan sedimentar. Luego, se añaden al cartucho 200 ml de perlas, con cantidades iguales de perlas heparinizadas, perlas de PEI y perlas funcionalizadas con manosa. A continuación, el cartucho se llena hasta arriba con 50 ml finales de perlas heparinizadas. A continuación, el cartucho se sella y el estrecho empaquetamiento de las perlas mantiene la estructura en capas del medio de adsorción. En este cartucho, el 55,6% de las perlas están heparinizadas, el 22,2% son perlas de PEI y el 22,2% están funcionalizadas con manosa.
- 5
- 10 Las realizaciones de la presente invención se describen con más detalle en las reivindicaciones siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para eliminar como mínimo una citoquina o patógeno de la sangre, que comprende un sustrato sólido en un recipiente, teniendo dicho sustrato sólido uno o más adsorbentes polisacáridos en su superficie con 5 afinidad de unión para la citoquina o el patógeno, siendo como mínimo uno de dichos uno o más adsorbentes polisacáridos heparina, y siendo el tamaño de los espacios de los canales intersticiales entre las porciones individuales de dicho sustrato sólido y la cantidad de superficie del sustrato intersticial tal que la fracción principal de la como mínimo una citoquina o patógeno que se une a dicho adsorbente lo hace por transporte convectivo al adsorbente unido a la superficie, **caracterizado por que** el recipiente comprende tanto superficies heparinizadas 10 como superficies inherentemente trombogénicas.
2. El dispositivo, según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígido.
- 15 3. El dispositivo, según la reivindicación 2, en el que dichas perlas de polímero rígido son perlas de polietileno rígido.
4. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las superficies inherentemente trombogénicas son superficies catiónicas.
- 20 5. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la heparina tiene un peso molecular medio de aproximadamente 8 kDa.
6. El dispositivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la heparina se une al sustrato sólido mediante unión covalente por el extremo.
- 25 7. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dichas perlas tienen un diámetro que oscila entre 100 y 450 micras.
- 30 8. El dispositivo, según la reivindicación 7, en el que dichas perlas tienen un diámetro medio de 0,3 mm.
9. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que dichas perlas están recubiertas con 0,5 - 10 mg de heparina por gramo de perla.
- 35 10. El dispositivo, según la reivindicación 9, en el que dichas perlas están recubiertas con  $2 \pm 0,5$  mg de heparina por gramo de perla.
11. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las superficies inherentemente trombogénicas tienen afinidad por una endotoxina.
- 40 12. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las superficies inherentemente trombogénicas comprenden un miembro seleccionado del grupo que consiste en quitosano, polietilenimina y ácido siálico.
- 45 13. El dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en la eliminación extracorpórea de como mínimo una citoquina, patógeno o endotoxina de la sangre o el suero.
- 50 14. El dispositivo, según la reivindicación 13, para el uso en la eliminación extracorpórea de como mínimo una citoquina, en el que la citoquina se selecciona del grupo que consiste en IL-6, VCAM, TNF, GRO- $\alpha$ , IL-8 y RANTES.
15. El dispositivo, según una de las reivindicaciones 13 o 14, para el uso en la eliminación extracorpórea de un patógeno, seleccionándose el patógeno entre un virus, una bacteria o un parásito.

Fig. 1



**Figura 1: Eliminación de TNF- $\alpha$  de 5 L de plasma pobre en plaquetas**

**Gráfico de QCM: Masa de heparina adsorbida**

Fig. 2A

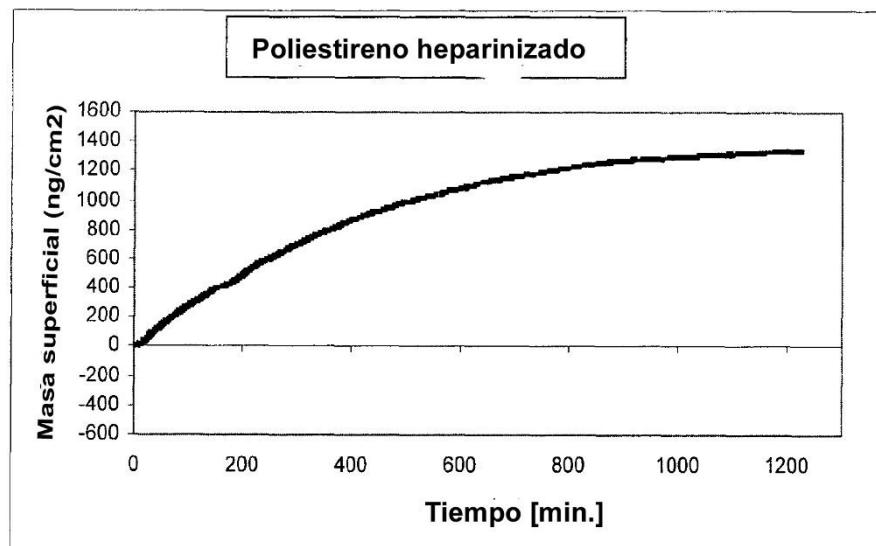


Fig. 2B

