



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 220 906**

⑤① Int. Cl.7: **A61K 9/50**
A61K 9/16
A61L 27/00
C12N 11/04

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **93907078 .5**
⑧⑥ Fecha de presentación: **01.03.1993**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0627912**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.1994**

⑤④ Título: **Geles para encapsulación de materiales biológicos.**

③⑩ Prioridad: **28.02.1992 US 843485**
20.04.1992 US 870540
07.10.1992 US 958870

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2004

⑦③ Titular/es: **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM**
201 West 7th Street
Austin, Texas 78701, US

⑦② Inventor/es: **Hubbell, Jeffrey A.;**
Pathak, Chandrashekhar P.;
Sawhney, Amarpreet S.;
Desai, Neil P.;
Hill, Jennifer L. y
Hossainy, Syed F.A.

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 220 906 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

Geles para encapsulación de materiales biológicos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para recubrir y/o encapsular superficies y objetos tridimensionales con redes reticuladas de polímeros hidrosolubles.

10 La tecnología de microencapsulación se contempla como prometedora en muchos ámbitos de la medicina. Por ejemplo, algunas aplicaciones importantes consisten en la encapsulación de células para el tratamiento de diabetes (Lim. F., Sun, A.M. "Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas", (1980), *Science* 210, 908-910), la encapsulación de hemoglobina para sustitutos de glóbulos rojos de la sangre, y la liberación controlada de fármacos. No obstante, al emplear los métodos de la técnica anterior, con frecuencia, los materiales que se han de encapsular se exponen a condiciones de tratamiento, incluyendo calor, disolventes orgánicos y pH no fisiológicos, que pueden eliminar o deteriorar funcionalmente células o desnaturalizar proteínas, con el resultado de una pérdida de actividad biológica. Por otra parte, aún en el caso de que las células sobrevivan a las condiciones de tratamiento, la rigurosidad de los requisitos de biocompatibilidad, estabilidad química, inmunoprotección y resistencia al supercrecimiento celular, de los materiales de encapsulación restringen la aplicabilidad de los métodos de la técnica anterior.

20 Por ejemplo, el método de encapsulación basado en la reticulación iónica de alginato (un polianión) con polilisina o poliornitina (policación) (Goosen, y cols., (1985), *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 146) ofrece unas condiciones de encapsulación relativamente suaves, pero la estabilidad mecánica y química a largo plazo de dichos polímeros iónicamente reticulados sigue siendo dudosa. Por otra parte, cuando se implantan *in vivo*, estos polímeros son susceptibles de un supercrecimiento celular (McMahon, y cols., (1990) *J. Nat. Cancer Inst.*, 82 (22), 1761-1765) que, con el tiempo, restringe la permeabilidad de la microcápsula a los nutrientes, metabolitos y proteínas de transporte del entorno. Esto puede conducir a la inanición y muerte de islotes de Langerhans encapsuladas (O'Shea, G.M. y cols., (1986) *Diabetes*, 35: 943-946).

30 Por consiguiente, aún sigue siendo necesario contar con un método de encapsulación de células relativamente suave que ofrezca un control sobre las propiedades del polímero de encapsulación y con el que se produzcan membranas en presencia de células que sean selectivas en cuanto a la permeabilidad, químicamente estables y muy altamente biocompatibles. Existe una necesidad similar en relación con la encapsulación de materiales biológicos distintos a células y tejidos, así como materiales en contacto con materiales biológicos.

35 Se considera que los materiales son biocompatibles cuando dichos materiales impulsan una respuesta humoral específica o inmune celular reducida o cuando no impulsan ninguna respuesta a cuerpo extraño no específica que impida que el material lleve a cabo su función pertinente, así como cuando el material no es tóxico al ser ingerido o al implantarlo. El material tampoco ha de impulsar ninguna reacción específica como trombosis si entra en contacto con la sangre.

40 Se ha demostrado que los geles preparados de polímeros que se hinchan en agua para formar un hidrogel, como por ejemplo poli(metacrilato de hidroxietilo) (poli(HEMA)), poliacrilatos hidrosolubles, y agarosa, son útiles para encapsular islotes y otros tejidos animales (Iwata, y cols., (1989) *Diabetes*, 38:224-225; Lambert, y cols., (1984) *Appl. Biochem. Biotech.*, 10, 101-105 (1984). Sin embargo, dichos geles presentan unas propiedades mecánicas no deseables. La agarosa forma un gel débil, y es necesario hacer precipitar los poliacrilatos desde disolventes orgánicos, que son potencialmente citotóxicos. Dupuy y cols., (1988) han descrito la microencapsulación de islotes por polimerización de acrilamida para formar geles de poliacrilamida. No obstante, el proceso de polimerización requiere la presencia de monómeros tóxicos tales como acrilamida y agentes de reticulación y, si se permite que proceda con rapidez hasta el final, genera calor local.

50 Se ha demostrado que las microcápsulas formadas a través de la coacervación de alginato y poli(L-lisina) son inmunoprotectoras, por ejemplo, tal como describe O'Shea, y cols., 1986. Sin embargo, se observó un serio supercrecimiento fibroso de estas microcápsulas tras la implantación (McMahon, y cols., 1990; O'Shea y cols., 1986). El uso de poli(óxido de etileno) (PEO) para aumentar la biocompatibilidad está bien documentado en la bibliografía. Se ha descrito la mejora significativa de la biocompatibilidad de microcápsulas de algina-poli(L-lisina) a través de la incorporación de un copolímero de injerto de PLL y PEO en la superficie de la microcápsula (Sawhney, y cols. "Poly (ethylene oxide)-Graft-Poly (L-Lysine) Copolymers to Enhance the Biocompatibility of Poly (L-Lysine)-Alginate Microcapsule Membranes", (1991) *Biomaterials*, 13, 863-870).

60 La cadena de PEO es altamente hidrosoluble y altamente flexible. Las cadenas de PEO tienen una motilidad extremadamente alta en agua y su estructura es esencialmente no iónica. La inmovilización de PEO sobre una superficie se ha llevado a cabo en gran medida a través de la síntesis de copolímeros de injerto que tienen cadenas laterales PEO (Sawhney, y cols.; Miyama y cols., 1988; Nagoaka, y cols.) Este proceso implica la síntesis habitual de monómeros y polímeros para cada aplicación. El uso de polímeros de injerto sin embargo no garantiza todavía que la superficie "vista" por una molécula consista enteramente en PEO.

Se ha utilizado reticulación de haz de electrones para sintetizar hidrogeles de PEO, descritos como no trombo-

génicos por Sun, *y cols.*, (1987) *Polymer Prepr.*, 28: 292-294; Dennison, K.A., (1986) Ph.D. Thesis. Massachusetts Institute of Technology. Sin embargo, el uso de un haz de electrones excluye la inclusión en el polímero de tejidos vivos ya que la radiación es citotóxica. Asimismo, las redes producidas a través de este método resultan difíciles de caracterizar debido a la reticulación no específica inducida por el haz de electrones.

5

Se ha utilizado la fotopolimerización de diacrilatos de PEG en presencia de una iniciación de luz ultravioleta de longitud de onda corta para atrapar células de levadura para fermentación y conversión química (Kimura, *y cols.*, (1981), "Some properties of immobilized glycolysis system of yeast in fermentative phosphorylation of nucleotides," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11-78-80; Omata *y cols.*, (1981), "Steroselectic hydrolysis of dl-methyl succinate by gel-entrapped *Rhodotorula minuta* u.zr. *texensis* cells in organic solvent," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11:199-204; Okada, T., *y cols.*, "Application of Entrapped Growing Yeast Cells to Peptide Secretion System", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 26, pp. 112-116 (1987). Se han utilizado también otros métodos de encapsulación de células dentro de materiales fotopolimerizables con radiación ultravioleta de longitud de onda corta con células microbianas (Kimura, *y cols.* 1981; Omata, *y cols.* 1981; Okada, *y cols.* 1987; Tanaka, *y cols.* 1977; Omata, *y cols.* 1979a; Omata, *y cols.* 1979b; Chun, *y cols.* 1981; Fukui, *y cols.* 1976; Fukui, *y cols.* 1984). Sin embargo, las células de levadura y algunas células microbianas son mucho más duras y resistentes a entornos adversos, temperaturas elevadas y radiación ultravioleta de longitud de onda corta que las células de mamífero o los tejidos humanos.

La patente estadounidense 4.298.002 se refiere a un material polimérico hidrófilo sintético para encapsular tejido biológicamente activo. Dicho material hidrófilo es insoluble en agua y el tejido biológicamente activo se inyecta en una cámara preformada del material polimérico o se dispersa en el material polimérico que se polimeriza posteriormente.

Estos métodos implican varios problemas, incluyendo el uso de métodos y/o materiales que son trombogénicos o inestables *in vivo*, o requieren condiciones de polimerización que tienden a destrozar el tejido de mamífero vivo o las moléculas biológicamente activas, como por ejemplo radiación ultravioleta de longitud de onda corta. Para encapsular tejido vivo para su implantación en seres humanos u otros mamíferos, las condiciones de polimerización no han de destruir el tejido vivo, y las células recubiertas con polímero resultantes deben ser biocompatibles.

Asimismo, existe la necesidad de encapsular materiales dentro de una capa de material muy fina que sea permeable a los nutrientes y gases, pero lo suficientemente fuerte y no inmunogénica. Por ejemplo, para el trasplante de islotes de Langerhans, anteriormente se han encapsulado los islotes, que tienen un diámetro de 100 a 200 micrómetros, dentro de microesferas que tienen un diámetro de 400 a 1000 micrómetros. Este diámetro tan grande puede tener como resultado una difusión más ralentizada de las moléculas nutritivas y volúmenes de trasplante grandes.

En suma, existe la necesidad de contar con materiales y métodos para su uso, que se puedan emplear para encapsular células y tejidos o moléculas biológicamente activas que sean biocompatibles, no impulsen respuestas inmunes no específicas o específicas, y que se puedan polimerizar en contacto con células o tejidos vivos sin dañar o matar a las células, dentro de un período de tiempo muy corto, y en una capa muy fina. Un importante aspecto del uso de estos materiales *in vivo* es que deben ser polimerizables dentro del período de un corto procedimiento quirúrgico o antes de que se disperse, se dañe o muera el material que se va a encapsular.

Por lo tanto, uno de los objetos de la presente invención consiste en proporcionar un material polimérico que se puede polimerizar en contacto con células y tejidos vivos, en un período de tiempo muy corto.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un material polimérico que es biocompatible y resistente a la degradación durante un período de tiempo específico.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un material polimérico que es permeable a nutrientes y gases y, además, puede proteger las células y tejidos del ataque *in vivo* de otras células.

50

Compendio de la invención

Se describe aquí un método para la polimerización de macrómeros mediante el uso de luz ultravioleta de longitud de onda larga o visible (luz UVA, 320 nm o mayor) para encapsular o recubrir ya sea directa o indirectamente tejido vivo con recubrimientos poliméricos que se adaptan a las superficies de las células, tejidos o soportes de los mismos en virtud de unas condiciones de polimerización suaves y rápidas. Los aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas 1, 2, 31, 32, 33 y 34.

Los polímeros se forman a partir de prepolímeros no tóxicos, denominados aquí macrómeros, que son hidrosolubles o sustancialmente solubles en agua y demasiado grandes como para difundirse por las células que se van a recubrir. Entre los ejemplos de macrómeros se incluyen hidrogeles de PEG altamente biocompatibles que se pueden formar rápidamente en presencia o ausencia de oxígeno, sin el uso de iniciadores de polimerización tóxicos, a temperaturas ambiente o fisiológicas, y a un pH fisiológico. La polimerización se puede iniciar utilizando colorantes no tóxicos tales como azul de metileno o eosina Y, que son fotopolimerizables con luz UVA o visible. También se pueden utilizar otros colorantes que se difunden en las células pero que no son tóxicos, tales como eosina de etilo. El proceso es no-citotóxico ya que las células absorben poca luz en ausencia del cromóforo apropiado. Las células son transparentes a esta luz en gran medida, en contraste con la radiación UV de longitud de onda corta que es fuertemente absorbida por proteínas celulares y ácidos nucleicos y puede ser citotóxica. Normalmente, son suficientes niveles bajos de radiación

ES 2 220 906 T3

(5-50 Mw) para inducir la polimerización en un período de tiempo comprendido entre milisegundos y unos segundos para la mayoría de los macrómeros. Una segunda razón de la falta de toxicidad es que la especie polimerizable no se difunde en las células.

5 Los polímeros resultantes pueden actuar como membranas semipermeables, como adhesivos como soportes de tejido, como conexiones, como barreras para impedir la interacción de un tejido celular con otra célula o tejido, y como vehículos de especies bioactivas. Se puede recubrir una amplia variedad de superficies con diferentes geometrías con una red reticulada tridimensional de estos materiales poliméricos. Los polímeros pueden configurarse en una matriz para la administración de materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, polisacáridos, compuestos orgánicos, con actividad de fármaco, y ácidos nucleicos.

10 En uno de los modos de realización preferibles, el polímero se utiliza para que forme una capa en la parte interior del lumen de un vaso sanguíneo, tanto para soporte estructural, prevención de trombosis y reacciones inflamatorias en la superficie del lumen, y/o administración de agentes terapéuticos al vaso sanguíneo. En otro modo de realización preferible, se utiliza el polímero para crear una barrera semipermeable alrededor de células, como por ejemplo islotes de Langerhans, para proteger la célula impidiendo el paso de células o moléculas de inmunoglobulinas, al mismo tiempo que se permite la libre transferencia de nutrientes, gases y productos celulares pequeños. Dichos islotes tratados pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades derivadas de deficiencias en el proceso metabólico, o enfermedades como diabetes que se originan a partir de concentraciones insuficientes de moléculas biorreguladoras.

20 Breve descripción de los gráficos

La Figura 1 es un esquema de reacción de la polimerización iniciada por eosina de etilo.

25 La figura 2A es una representación esquemática de la polimerización iniciada por colorante de una capa de PEG alrededor de microesferas de alginato reticuladas.

30 La figura 2B es una fotomicrografía de las microesferas de alginato/poli(L-lisina) que contienen islotes de Langerhans humanos recubiertos con un hidrogel de tetraacrilato de PEG 18,5 K mediante la aplicación de un método de unión de colorante descrito en la figura 2A.

La figura 3 es una representación esquemática de fotopolimerización de un recubrimiento de PEG sobre microesferas de alginato-poly-(L-lysine) suspendidas en aceite mineral.

35 La figura 4 es una fotomicrografía de islotes de Langerhans aislados de un páncreas humano encapsuladas en hidrogel de tetraacrilato de PEG 18,5 K.

La figura 5 es una representación esquemática de un aparato de co-extrusión utilizado para microencapsulación aplicando polimerización de láser.

40 La figura 6 es una fotomicrografía de microesferas producidas por polimerización de láser de diacrilato de PEG 400 alrededor de las células.

45 La figura 7A es una fotomicrografía de microesferas de alginato-PLL recuperadas al cabo de 4 días después de la implantación i.p. En ratones.

La figura 7B es una fotomicrografía de microesferas de Alginato-PLL recubiertas con un tetraacrilato de PEG 18,5K Da utilizando el método de difusión de colorante representado en la figura 1.

50 La figura 8A-F es un gráfico del número de células en relación con la composición de gel, para las células no unidas obtenidas del lavado de la cavidad peritoneal en ratones con diferentes composiciones de gel de recubrimiento de PEO: a 18,5 k; b-10% 0,5 K, 90%, 18,5k; c-50% 18,5 k, 50% 0,4k; d-10% 0,4 k, 90% 35k; e-50% 0,4 k, 50% 35 k; y f-control de alginato-poli(L-lisina).

55 La figura 9 es un gráfico del % de proteína liberada en relación con el tiempo en minutos, para la difusión de albúmina de suero bovino (cuadrados en blanco), IgG humana (triángulos) y fibrinógeno humano (cuadrados negros) a través de un gel de tetraacrilato de PEO 18,5K.

60 La figura 10 es un gráfico del % de difusión de albúmina de suero bovino a lo largo del tiempo en minutos a través de geles de diacrilato de PEO 400 (cuadrados blancos) y tetraacrilato de PEG 18,5K (triángulos).

La figura 11A es un gráfico de la longitud en mm de gel producido por polimerización inducida por láser iónico de argon frente a log (tiempo) (ms) de trimetilolpropano utilizando un sistema de iniciación de eosina de etilo y amina.

65 La figura 11B es una fotomicrografía de las espigas formadas como resultado de la radiación de láser de triacrilato de trimetilolpropano etoxilado durante períodos de 67 ms, 125 ms, 250 ms, 500 ms y 1 seg.

ES 2 220 906 T3

La figura 12A es una fotomicrografía de fibroblastos de prepucio humano cultivados durante 6 horas en un portaobjetos de vidrio recubierto con gel de tetraacrilato PEG 18,5 K.

La figura 12B es una fotomicrografía de fibroblastos de prepucio humano cultivados durante 6 horas sobre un vidrio que no estaba recubierto con PEG.

La figura 13 es una fotomicrografía de geles microesféricos de tetraacrilato de PEG 18,5K, implantados en ratones, y explantados al cabo de 4 días, que presentan un reducido supercrecimiento fibroso.

10 Descripción detallada de la invención

Tal como se describe aquí, los materiales poliméricos biocompatibles se forman para su uso en yuxtaposición con materiales biológicamente activos o células y tejidos, por polimerización de radicales libres de macrómeros hidrosolubles biocompatibles que incluyen al menos dos sustituyentes polimerizables. Dichos materiales de recubrimiento poliméricos pueden ser homopolímeros, copolímeros o copolímeros de bloque. Tal como se utiliza aquí, un polímero es una unidad formada que tiene un grado de polimerización superior a 10, y un oligómero tiene un grado de polimerización comprendido entre 2 y 10, significando el grado de polimerización el número de unidades que se repiten en la estructura, v.g., grado de polimerización = 3 se refiere a un trímero. La polimerización de un componente que tiene al menos dos sustituyentes polimerizables es equivalente a la gelificación; la polimerización tiene lugar para formar un gel reticulado tridimensional.

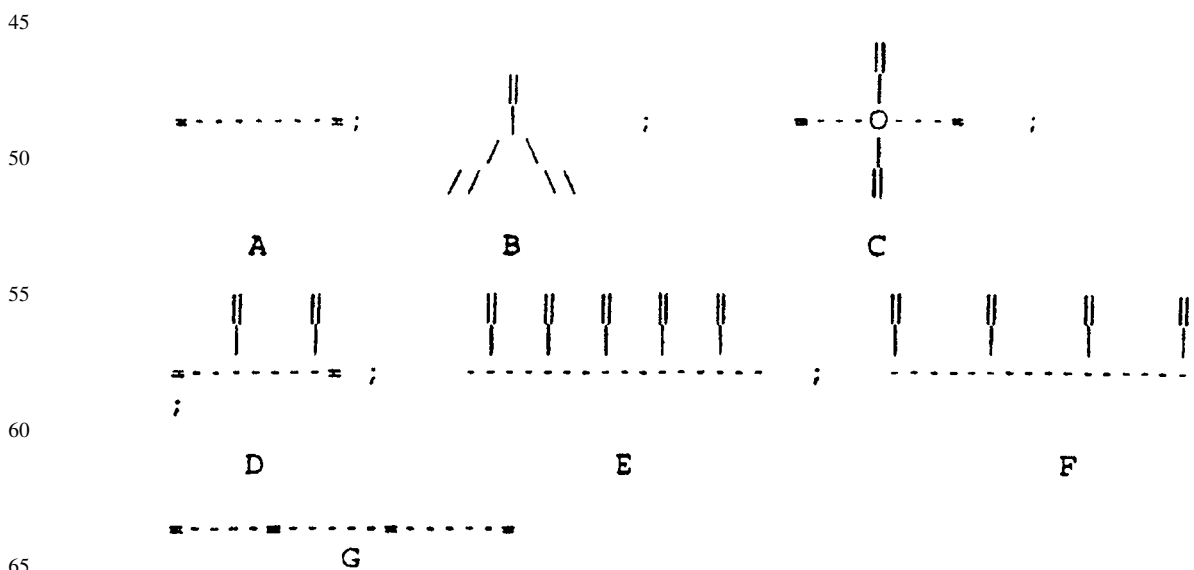
Prepolímeros (macrómeros) útiles para la obtención de geles

Los criterios generales para los prepolímeros (denominados aquí macrómeros) que se pueden polimerizar en contacto con materiales biológicos o células son que: son hidrosolubles o sustancialmente hidrosolubles, se pueden polimerizar o reticular además por polimerización de radicales libres, no son tóxicos y son demasiado grandes como para difundirse en células, es decir, tienen un peso molecular superior a 200. Sustancialmente hidrosoluble se define aquí como soluble en una mezcla de agua y disolvente(s) orgánico(s), constituyendo el agua la mayoría de la mezcla de disolventes.

Tal como se utiliza aquí, los macrómeros deben ser fotopolimerizables con luz únicamente o en presencia de un iniciador y/o catalizador, como por ejemplo un fotoiniciador de radicales libres, estando la luz en el rango ultravioleta de longitud de onda larga o visible, es decir, superior o igual a 320 nm. Pueden ser adecuadas otras condiciones reactivas para iniciar la polimerización de radicales libres siempre y cuando no afecten negativamente a la viabilidad del tejido vivo que se va a encapsular. Los macrómeros no deben generar tampoco productos o niveles de calor que sean tóxicos para el tejido vivo durante la polimerización. El catalizador o iniciador de radicales libres tampoco debe ser tóxico en las condiciones de uso.

Existe una amplia variedad de polímeros sustancialmente hidrosolubles, ilustrándose esquemáticamente algunos de ellos a continuación (_____) representa una región sustancialmente hidrosoluble del polímero, y (=) representa una especie polimerizable por radicales libres.

Entre los ejemplos se incluyen:



Entre los ejemplos de A se incluyen diacrilato de PEG, de un diol de PEG; de B se incluyen triacrilato de PEG,

ES 2 220 906 T3

formado a partir de un triol de PEG; de C se incluye tetraacrilato de PEG-ciclodextrina formado por injerto de PEG en un anillo central de ciclodextrina y posterior acrilación; de D se incluye tetraacrilato de PEG formado por injerto de dos dioles de PEG en un bis epóxido y posterior acrilación; de E se incluye metacrilato de ácido hialurónico, formado por acrilación de muchos sitios de una cadena de ácido hialurónico; de F se incluye multiacrilato de PEG-ácido hialurónico, formado por injerto de PEG en ácido hialurónico y posterior acrilación; de G se incluye éster de PEG-diácido insaturado formado por esterificación de un PEG diol con un diácido insaturado.

Entre los polisacáridos se incluyen por ejemplo alginato, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dextrano, sulfato de dextrano, heparina, sulfato de heparina, sulfato de heparano, quitosan, goma de gelano, goma xantana, goma guar, y K-carrejenano. Entre las proteínas se incluyen por ejemplo gelatina, colágeno, elastina y albúmina ya se producida de forma natural o a través de métodos recombinantes.

Los sustituyentes fotopolimerizables incluyen preferiblemente acrilatos, diacrilatos, oligoacrilatos, dimetacrilatos u oligometacrilatos, y otros grupos fotopolimerizables biológicamente aceptables.

Macrómeros poliméricos sintéticos

El macrómero hidrosoluble se puede derivar de polímeros hidrosolubles incluyendo, sin limitarse sólo a ellos, poli(óxido de etileno) (PEO), poli(etilen glicol) (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etiloxazolona)(PEOX) poliaminoácidos, ácidos de pseudopoliamino y polietiloxazolona, así como copolímeros de estos entre sí o con otros polímeros hidrosolubles u otros polímeros insolubles en agua, siempre y cuando el conjugado sea soluble en agua. Un ejemplo de conjugado hidrosoluble es un copolímero de bloque de polietilen glicol y polióxido de propileno, comercializado como agente tensioactivo Pluronic®.

Macrómeros de polisacárido

Asimismo, se pueden utilizar polisacáridos tales como alginato, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dextrano, sulfato de dextrano, heparina, sulfato de heparina, sulfato de heparano, quitosan, goma de gelano, goma xantana, goma guar, derivados de celulosa hidrosolubles y carragenano, que se unen por reacción con hidroxilos o aminas en los polisacáridos, para formar la solución de macrómero.

Macrómeros de proteína

Se pueden emplear proteínas tales como gelatina, colágeno, elastina, zeína y albúmina, ya sean naturales o producidas a través de métodos recombinantes, que se obtienen por polimerización de radicales libres por adición de fracciones que contienen enlaces dobles o triples carbono-carbono, incluyendo acrilato, diacrilato, metacrilato, etacrilato, acrilato de 2-fenilo, acrilato de 2-cloro, acrilato de 2-bromo, itaconato, oligoacrilato, dimetacrilato, oligometacrilato, acrilamida, metacrilamida, grupos estireno y otros grupos fotopolimerizables biológicamente aceptables, para formar la solución de macrómero.

Polimerización sensibilizada con colorante

La polimerización sensibilizada con colorante es muy conocida dentro de la bibliografía química. Por ejemplo, la luz de un láser iónico de argón (514 nm) en presencia de un colorante de xantina y un donador de electrones, como trietanolamina, para catalizar la iniciación, sirve para inducir una polimerización de radicales libres de los grupos acrílicos en una mezcla de reacción (Neckers, y cols., (1989) *Polym. Materials Sci. Eng.* 60:15; Fouassier y cols., (1991) *Makromol. Chem.* 192:245-260). Después de absorber la luz de láser, se excita el colorante en un estado de triplete. El estado de triplete reacciona con una amina terciaria, como por ejemplo trietanolamina, produciendo un radical libre que inicia la reacción de polimerización. La polimerización es extremadamente rápida y depende de la funcionalidad del macrómero y su concentración, la intensidad de la luz y la concentración del colorante y la amina.

Colorantes de fotoiniciación

Se puede utilizar cualquier colorante que absorba la luz que tenga una frecuencia comprendida entre 320 nm y 900 nm, que pueda formar radicales libres, que sea al menos parcialmente hidrosoluble y que sea no tóxico para el material biológico a la concentración utilizada para la polimerización. Existe un gran número de colorantes fotosensibles que se pueden utilizar para iniciar ópticamente la polimerización, como por ejemplo eosina de etilo, eosina Y, fluoresceína, 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, 2-metoxi-2-fenilacetofenona, canforquinona, rosa de bengala, azul de metileno, eritrosina, floxima, tionina, rioblavina, verde de metileno, naranja de acridina, colorante xantina y colorantes de tioxantina.

El colorante iniciador preferible es eosina de etileno dadas sus propiedades espectrales en solución acuosa (absorción max = 528 nm, coeficiente de extinción = $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, fluorescencia max = 547 nm, rendimiento cuántico = 0,59). En la figura 1 se muestra como ejemplo un esquema de reacción empleando eosina de etilo. El colorante se blanquea tras la iluminación y la reacción con amina para dar un producto incoloro, permitiendo así la penetración de haces en el sistema de reacción.

ES 2 220 906 T3

Cocatalizador

Los cocatalizadores útiles en combinación con los colorantes de fotoiniciación son compuestos a base de nitrógeno capaces de estimular la reacción de radicales libres. Son adecuadas aminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias como cocatalizadores, al igual que cualquier molécula rica en electrones que contenga átomos de nitrógeno. Entre los cocatalizadores se incluyen, sin limitarse sólo a ellos trietanolamina, trietilamina, etanolamina, N-metil dietanolamina, N,N-dimetilbencilamina, dibencil amina, N-bencil etanolamina, N-isopropil bencilamina, tetrametil etilendiamina, persulfato de potasio, tetrametil etilendiamina, lisina, ornitina, histidina y arginina.

Entre los ejemplos de sistema de colorante /fotoiniciador se incluyen eosina de etilo con amina, eosina Y con una amina, 2,2-dimetoxi-2-fenoxiacetofenona, 2-metoxi-2-fenoxiacetofenona, canforquinona con una amina y rosa de bengala con una amina.

En algunos casos, el colorante puede absorber la luz e iniciar la polimerización, sin ningún iniciador adicional como por ejemplo la amina. En estos casos, únicamente es necesario que estén presentes el colorante y el macrómero para iniciar la polimerización tras la exposición a la luz. La generación de radicales libres se termina cuando se retira la luz láser. Algunos fotoiniciadores, como 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, no requieren ninguna amina auxiliar para inducir la fotopolimerización; en estos casos únicamente se requiere la presencia del colorante, macrómero y luz de longitud de onda apropiada.

Medios de polimerización

Fotopolimerización

Entre las fuentes de luz preferibles se incluyen diversas lámparas y láseres tales como los que se describen en los ejemplos más adelante, que tienen una longitud de onda de aproximadamente 320-800 nm, más preferiblemente aproximadamente 365 nm o 514 nm.

Esta luz se puede proporcionar a través de una fuente apropiada capaz de generar la radiación deseable, como por ejemplo una lámpara de mercurio, lámpara UV de onda larga, láser He-Ne, o un láser iónico de argón, o a través del uso de fibra óptica.

Otros medios para la polimerización

Se pueden emplear otros medios distintos a la luz para la polimerización. Entre los ejemplos se incluyen la iniciación mediante iniciadores térmicos, que forman radicales libres a temperaturas moderadas, tales como peróxido de benzoílo, con o sin trietanolamina, persulfato de potasio, con o sin tetrametiletilendiamina y persulfato de amonio con bisulfito sódico.

Incorporación de materiales biológicamente activos

Los macrómeros hidrosolubles se pueden polimerizar alrededor de moléculas biológicamente activas para formar un sistema de administración para que las moléculas o células, tejidos, organelos sub-celulares u otros componentes sub-celulares polimerizados alrededor encapsulen el material biológico. Los macrómeros hidrosolubles también se pueden polimerizar para incorporar moléculas biológicamente activas para impartir otras propiedades adicionales al polímero, tales como resistencia al crecimiento bacteriano o disminuir la respuesta inflamatoria, así como para encapsular tejidos. Se puede encapsular o incorporar una gran variedad de materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, péptidos, polisacáridos, fármacos orgánicos o inorgánicos, ácidos nucleicos, azúcares, células y tejidos.

Entre los ejemplos de células que se pueden encapsular se incluyen cultivos primarios así como líneas celulares establecidas, incluyendo células transformadas. Entre ellas se incluyen, sin limitarse sólo a ellas, células de islote pancreáticas, fibroblastos de prepucio humano, células de ovario de hámster chino, insulomas de células beta, células de leucemia linfoblástica, fibroblastos 3T3 de ratón, células mesencefálicas ventrales que segregan dopamina, células neuroblastoides, células de médula suprarrenal, y células T. Tal como se puede deducir de esta lista parcial, se pueden encapsular con éxito a través de este método células de todos los tipos, incluyendo dérmicas, neurales, de la sangre, de órganos, de músculo, glandulares y del sistema inmune, así como especies de origen. Entre los ejemplos de proteínas que se pueden encapsular a través de estas técnicas se incluyen hemoglobina, enzimas como adenosina deaminasa, sistemas de enzima, factores de coagulación de la sangre, inhibidores o agentes de disolución de coágulos, tales como estreptocinasa y activador de plasminogeno de tejido, antígenos para inmunización, y hormonas, polisacáridos como heparina, oligonucleotidos tales como antisentido, bacterias y otros organismos microbianos, incluyendo virus, vitaminas, cofactores y retrovirus para terapia genética.

El material biológico se puede encerrar primero en una estructura como por ejemplo un gel de polisacárido (Lim. U.S.P.N. 4.352.883; Lim. U.S.P.N. 4.391909; Lim. U.S.P.N. 4.409.331; Tsang, y cols.; U.S.P.N. 4.663.286; Goosen y cols., U.S.P.N. 4.673.556; Goosen y cols., U.S.P.N. 4.689.293; Goosen y cols., U.S.P.N. 4.806.355; Rha y cols., U.S.P.N. 4.744.933; Rha y cols., U.S.P.N. 4.749.620. Dichos geles pueden proporcionar una protección estructural adicional al material, así como un nivel secundario de selectividad de permeabilidad.

Polimerización

Preferiblemente, se mezclan los macrómeros con el iniciador, se aplican sobre el material o sitio en el que se van a polimerización, y se exponen al agente de iniciación, como por ejemplo luz o calor.

En un método preferible, se añade un sistema de fotoiniciación a una solución acuosa de un macrómero fotopolimerizable para formar una mezcla acuosa; se añade el material biológicamente activo y se irradia la solución acuosa con luz. Preferiblemente, el macrómero está formado por un polímero hidrosoluble con sustituyentes fotopolimerizables. La absorción de luz mediante el sistema colorante/iniciador tiene como resultado la formación de radicales libres que inician la polimerización.

En un segundo método preferible, se recubre con el macrómero la superficie de un objeto tridimensional que puede ser de origen biológico o un sustrato sintético para su implantación en un animal. Se mezcla el macrómero hidrosoluble con un sistema de fotoiniciación para formar una mezcla acuosa; se aplica la mezcla a la superficie que se va a recubrir para formar una superficie recubierta; y se irradia la superficie recubierta con luz para iniciar la polimerización de macrómero.

En una variante de este modo de realización, el sustrato sintético puede ser una microesfera, microcápsula o perla hidrófila. Se mezclan las microesferas hidrófilas con una solución de macrómero hidrosoluble en combinación con un sistema de fotoiniciador para formar una mezcla acuosa; se suspenden las microesferas con agitación con el macrómero en aceite para formar una suspensión oleosa y se irradian las microesferas con luz.

En otro modo de realización particularmente preferible, se absorbe un colorante fotosensible en la superficie de tejido que se va a tratar, se elimina por dilución el colorante no absorbido o se elimina por lavado del tejido, se aplica la solución de macrómero en la superficie con el colorante acoplado, y se inicia la polimerización para dar como resultado una polimerización interfacial.

La polimerización se puede llevar a cabo a través de al menos cinco métodos diferentes empleando polimerización de bloque o polimerización interfacial. Estos modos de realización, se describirán más adelante en relación con aplicaciones específicas de los materiales y los procesos para su polimerización.

Polimerización de bloque

En la polimerización de bloque se coloca el material que se va a recubrir en contacto con una solución de macrómero, fotoiniciador y, opcionalmente, co-catalizador, y se induce la polimerización por ejemplo por exposición a radiación. A continuación, se exponen tres ejemplos de polimerización de bloque.

Método de polimerización de bloque en suspensión para encapsulación de material

Se mezcla el material biológico que se va a encapsular con una solución de macrómero acuosa, que incluye el macrómero, un cocatalizador y opcionalmente un acelerador, y un iniciador. Se forman estructuras geométricas globulares pequeñas como esferas, óvalos o rectángulos, preferiblemente por coextrusión de la solución acuosa con aire o con una sustancia no miscible como aceite, preferiblemente aceite mineral, o por agitación de la fase acuosa en contacto con una fase no miscible como, por ejemplo, una fase oleosa para formar pequeñas gotas. A continuación, se polimeriza el macrómero en los glóbulos exponiéndolo a radiación. Dado que el macrómero y el iniciador están confinados en glóbulos, la estructura que resulta de la polimerización es una cápsula en la que se encierra el material biológico. Esto es una "polimerización en suspensión" en virtud de la cual toda la porción acuosa del glóbulo se polimeriza para formar una membrana gruesa alrededor del material celular.

Método de polimerización en suspensión de microcápsula

En una variante del método de bloque en suspensión, se utiliza el material microencapsulado como un núcleo en torno al cual se polimeriza el macrómero en una reacción de polimerización en suspensión. Primero se encapsula el material biológico dentro de una microesfera, microcápsula o micropartícula (que se denominan aquí colectivamente microcápsula), por ejemplo, en microcápsulas de alginato. A continuación, se mezclan las microcápsulas con la solución de macrómero y el iniciador, y se polimeriza la solución de macrómero.

Este método es particularmente adecuado para su uso con macrómeros de PEG, teniendo en cuenta la ventaja de la enorme hidrofiliidad de los macrómeros de PEG, y se adapta especialmente bien para su uso con microcápsulas de hidrogel, tales como alginato-poli(L-lisina). La microesfera se infla con el agua. Cuando se fuerza a que se separe en fases la solución de macrómero que contiene catalizador y/o iniciador o acelerador en un medio hidrófobo, como por ejemplo aceite mineral, la solución de macrómero de PEG tiende a permanecer en la superficie hidrófila de la microcápsula de alginato. Cuando se irradia esta suspensión, el macrómero de PEG experimenta polimerización y gelificación, formando una capa fina de gel insoluble en agua polimérico alrededor de la microesfera.

Esta técnica implica preferiblemente la co-extrusión de la microcápsula en una solución de macrómero e iniciador, estando en contacto la solución con aire o un líquido que no es miscible con agua para formar gotas que caen en una solución, como por ejemplo aceite mineral, en la que no son miscibles las gotas. El líquido no miscible se selecciona

ES 2 220 906 T3

por su capacidad para mantener la formación de gota. Adicionalmente, si se pretende inyectar o implantar en un animal el material encapsulado en membrana, los residuos deberán ser no tóxicos y no inmunogénicos. Un líquido no miscible preferible es aceite mineral. Una vez que las gotas han entrado en contacto con el líquido no miscible, se polimerizan.

5 Esta técnica de co-extrusión tiene como resultado un recubrimiento de polímero reticulado de más de 50 micrómetros de grosor. Alternativamente, se pueden suspender las microcápsulas en una solución de macrómero e iniciador que se agita en contacto con una fase no miscible, como por ejemplo una fase oleosa. Se polimeriza la emulsión resultante para formar un recubrimiento de polímero, también de más de 50 micrómetros de grosor, alrededor de las microcápsulas.

10

Método de polimerización en bloque para adhesión de tejido

Se puede utilizar también el material polimérico para adherir tejido. Se aplica un macrómero polimerizable hidrosoluble en combinación con un fotoiniciador sobre una superficie de tejido sobre la que se desea adherir el tejido; se pone en contacto la superficie de tejido con el tejido sobre el que se desea adherirla, formando una unión de tejido; y se irradia la unión de tejido con luz hasta que se polimerizan los macrómeros. En un modo de realización preferible, esto se lleva a cabo en un período de tiempo comprendido entre segundos y minutos, más preferiblemente segundos.

15 En un modo de realización preferible, la mezcla de macrómero es una solución acuosa, como por ejemplo diacrilato de PEG 400 o tetraacrilato de PEG 18,5 K. Cuando esta solución entra en contacto con el tejido que tiene una capa de humedad de mucosa o fluido que la cubre, se entremezcla con la humedad que hay sobre el tejido. La capa de mucosa sobre el tejido incluye polisacáridos hidrosolubles que están en íntimo contacto con superficies celulares. Estas, a su vez, son ricas en glucoproteínas y proteoglicanos. Así pues, el entremezclado físico y las fuerzas de entrelazado superficial como consecuencia de la penetración en las grietas, forman parte de las fuerzas responsables de la adhesión del gel de PEG a una superficie de tejido tras la reticulación.

20 Entre las aplicaciones específicas para dichos adhesivos se incluyen anastomosis de los vasos sanguíneos, reconexión de tejido blando, ventaje de quemaduras con drenaje y unión retinal.

Polimerización de bloque para formar barreras de tejido

Si se polimeriza el gel de PEG fuera del tejido, después presenta una superficie no adhesiva para las células y el tejido en general, debido a la naturaleza altamente hidrófila del material.

35 Esta característica se puede aprovechar para formar barreras sobre los tejidos para evitar el adosamiento de células al tejido recubierto. Entre los ejemplos de esta aplicación se incluye la formación de barreras en islotes de Langerhans o en el lumen de vasos sanguíneos para evitar la trombosis o vasoespasmo o colapso vascular; ya sea por polimerización de bloque (mezclando el iniciador de polimerización con el macrómero) o por polimerización interfacial (absorbiendo el iniciador en la superficie).

40

Polimerización interfacial

Para la polimerización interfacial, se adsorbe el iniciador de radicales libres en la superficie del material que se va a recubrir, se diluye el iniciador no adsorbido para eliminarlo o se lava, utilizando una solución de lavado o aplicando la solución de macrómero, y se aplica la solución de macrómero que contiene opcionalmente cocatalizador en el material que se polimeriza después. A continuación se exponen dos ejemplos de polimerización interfacial.

Método de polimerización interfacial de microcápsula

50 Se puede encapsular el material biológico tal como se ha descrito antes haciendo referencia a la polimerización en suspensión, pero utilizando polimerización interfacial para formar la membrana sobre la superficie del material biológico o microcápsula. Esto implica el recubrimiento del material biológico o microcápsula con fotoiniciador, la suspensión del material biológico o microcápsulas en la solución de macrómero y la inmediata polimerización, por ejemplo por radiación. Se forma una capa de polímero delgada de menos de 50 micrómetros de grosor, alrededor del material biológico o la microcápsula, ya que el fotoiniciador está presente solamente en la superficie de microcápsula y no tiene suficiente tiempo para difundirse más allá en la solución de macrómero.

55 En la mayoría de los casos, el iniciador, como por ejemplo un colorante, penetrará en el interior del material biológico o microcápsula, además de adsorberse en la superficie. Cuando se aplica la solución de macrómero, que contiene opcionalmente un cocatalizador como trietanolamina, sobre la superficie y se expone a un agente de iniciación como por ejemplo luz láser, están presentes todos los componentes esenciales de la reacción solamente en el interior de la interfaz del material biológico o microcápsula y la solución de macrómero. Según esto, la polimerización y gelificación (si se utiliza macrómero multifuncional) que se produce típicamente en aproximadamente 100 mseg, tiene lugar inicialmente solamente en la interfaz, inmediatamente debajo de ella e inmediatamente más allá de ella. Si se deja un período de tiempo más prolongado, el iniciador comienza a difundirse por el núcleo interior de la microesfera hasta la solución; de manera similar, los macrómeros comienzan a difundirse dentro del núcleo y se forma una capa de polímero más gruesa.

65

ES 2 220 906 T3

Método de polimerización interfacial directa

Polimerización interfacial para formar una membrana directamente sobre la superficie de tejidos. Se recubre directamente el tejido con iniciador, se elimina el exceso de iniciador, se aplica la solución de macrómero sobre el tejido y se polimeriza.

Control de la permeabilidad del polímero

La permeabilidad del recubrimiento se determina en parte por el peso molecular y la reticulación del polímero. Por ejemplo, en el caso de cadenas de PEG cortas entre reticulaciones, el "poro" producido en la red tendrá unas fronteras relativamente rígidas y será relativamente pequeño, de manera que una macromolécula que intente difundirse a través de este gel quedará restringida predominantemente por un efecto de tamizado. Si la longitud de cadena entre las reticulaciones es larga, la cadena se puede doblar y puede moverse con una alta motilidad de manera que las macromoléculas en difusión encontrarán un efecto de exclusión de volumen libre así como un efecto de tamizado.

Debido a estos efectos de contraste, no se puede definir completamente una relación directa entre el calibre del peso molecular para difusión y el peso molecular del oligómero de partida. Con todo, se puede obtener un perfil de liberación deseable para una proteína en particular o un fármaco como por ejemplo un péptido ajustando la densidad de reticulación y la longitud de los segmentos de PEG. En correspondencia, se puede designar un perfil de permeabilidad de proteína deseable para permitir la difusión de nutrientes, oxígeno, dióxido de carbono, productos residuales, hormonas, factores de crecimiento, proteínas de transporte y productos de síntesis celular secretados, tales como proteínas, al mismo tiempo que se restringe la difusión de moduladores inmunes tales como anticuerpos y proteínas complementarias, así como el ingreso de células, dentro del gel, para proteger células o tejido transplantado. La red polimérica covalentemente unida reticulada tridimensional es químicamente estable durante un período de tiempo prolongado en aplicaciones *in vivo*.

Para encapsular células y tejido en un modo que se prevenga el paso de anticuerpos a través de la membrana pero que se permita también el paso de nutrientes esenciales para el metabolismo celular, el tamaño del macrómero de partida preferible se encuentra dentro del intervalo de 10.000 D a 18.500 D, prefiriéndose sobre todo aproximadamente 18.500 D. Los macrómeros más pequeños tienen como resultado membranas de polímero de una densidad más alta con poros más pequeños.

Grosor y conformación de la capa de polímero

El grosor de membrana afecta a varios de los parámetros, incluyendo la selectividad de permeabilidad, la rigidez y el tamaño de la membrana. El grosor se puede variar según la selección de los componentes de reacción y/o las condiciones de reacción. Por ejemplo, se puede variar la concentración de macrómero desde un bajo porcentaje a 100%, dependiendo del macrómero. De manera similar, iluminaciones más intensas e iluminaciones más prolongadas producirán películas más gruesas que las de iluminaciones más cortas y menos intensas. También se pueden añadir aceleradores variando la concentración para controlar el grosor. Por ejemplo, se puede añadir N-vinilpirrolidina como acelerador, produciendo las concentraciones más capas más gruesas que las concentraciones más bajas, siendo todas las demás condiciones iguales. Como ejemplo, las concentraciones de N-vinilpirrolidina pueden oscilar entre 0 y 0,5%.

En el método de polimerización interfacial, la duración de la polimerización puede variar para ajustar el grosor de la membrana de polímero formada. Dicha correlación entre el grosor de membrana y la duración de la radiación tiene lugar porque el fotoiniciador se difunde a una velocidad constante, siendo la difusión un proceso que se produce de forma continua. Así pues, cuanto mayor es la duración de la radiación, más fotoiniciador iniciará la polimerización en la mezcla de macrómero, más macrómero se polimerizará y más gruesa será la membrana resultante. Otros factores adicionales que afectan al grosor de membrana son el número de grupos reactivos por macrómero y la concentración de aceleradores en la solución de macrómero. Esta técnica permite la creación de membranas muy delgadas ya que el fotoiniciador está presente primero en una capa muy fina en la superficie del material biológico y la polimerización solo se produce cuando está presente el fotoiniciador.

En el método de polimerización en suspensión, se forma una membrana en cierto modo más gruesa que en caso de la polimerización interfacial, ya que en el método por suspensión la polimerización tiene lugar a través de la solución de macrómero. Se determina el grosor de las membranas formadas a través del método de suspensión en parte por la viscosidad de la solución de macrómero, la concentración del macrómero en esa solución, el entorno mecánico de fluidos de la suspensión y los agentes tensioactivos de la suspensión. Estas membranas varían de grosor entre 50 y 300 micrómetros.

Superficies no biológicas

La solución de macrómero e iniciador se pueden aplicar también sobre una superficie no biológica que se pretenda poner en contacto con un entorno biológico. Entre dichas superficies se incluyen, por ejemplo, injertos vasculares, lentes de contacto, lentes intraoculares, membranas de ultrafiltración y recipientes para materiales biológicos.

Normalmente resulta difícil conseguir una buena adhesión entre los polímeros de propiedades físico-químicas muy

diferentes. El concepto de red de interpenetración en una superficie física ha sido presentado por Desai and Hubbel (N.P. Desai y cols. (1992)). Este método para incorporar en la superficie de un polímero un recubrimiento completo de un polímero de propiedades considerablemente diferentes implicaba el inflado de la superficie del polímero para su modificación (polímero base) en un disolvente mutuo, o un disolvente de inflado, para el polímero base y para el polímero que se iba a incorporar (polímero penetrante). El polímero penetrante se difundía en la superficie del polímero base. Se estabilizaba esta interfaz haciendo precipitar rápidamente o desinflando la superficie colocando el polímero base en un baño no disolvente. Esto tenía como resultado el enredamiento del polímero penetrante dentro de la matriz del polímero base en su superficie en una estructura que fue denominada una red de interpenetración en superficie física.

Este método se puede perfeccionar con la fotopolimerización del polímero penetrante sobre la superficie del polímero base en el estado inflado. Esto tiene como resultado una estabilidad mucho mejor con respecto a la del método anterior, así como una mejora de las respuestas biológicas de estos materiales. El polímero penetrante se puede modificar químicamente para convertirse en un macrómero de prepolímero, es decir, capaz de poderse polimerizar por sí mismo. Esta polimerización se puede iniciar térmicamente o por exposición a rayos gamma, infrarrojo, ultravioleta, visibles, o por radiación de haz de electrones, o en condiciones de plasma. En el caso de radiación de rayos gamma no específica relativamente o reacción por radiación de haz de electrones, puede no ser necesaria la incorporación química de sitios particularmente reactivos.

Poliétilen glicol (PEG) es un polímero penetrante particularmente útil para aplicaciones biomédicas en las que se desea una falta de adhesión de célula. El trabajo mencionado había demostrado un rendimiento óptimo a un peso molecular de 18.500 D sin reticulación química. Se pueden formar prepolímeros de PEG fácilmente por acrilación de los grupos hidroxilo en sus términos o en otro lugar de la cadena. Dichos prepolímeros se pueden polimerizar fácilmente. La polimerización fotoiniciada de estos prepolímeros es particularmente conveniente y rápida. Existen diversas reacciones iniciadas por luz ultravioleta e iniciadas por luz visible que se inician por absorción de luz a través de colorantes fotoquímicamente reactivos específicos. Este mismo método se puede utilizar con otros polímeros hidrosolubles, tales como poli(N-vinil pirrolidinona), poli(N-isopropil acrilamida), poli(etil oxazolona) y muchos otros.

Método para la formación de materiales poliméricos

Los objetos poliméricos se configuran según la forma deseada a través de técnicas convencionales conocidas entre los especialistas en este campo, configurándose la solución de macrómero que contiene preferiblemente catalizador e iniciador, y polimerizándose después. Por ejemplo, se pueden formar placas por colada en una superficie plana y formas discoidales por colada en recipientes discoidales. Se pueden formar cilindros y tubos por extrusión. Se pueden formar esferas a partir de un aceite en emulsión, por co-extrusión con aceite, o por co-extrusión con aire, otro gas o vapor. A continuación, se expone el macrómero a condiciones como radiación de luz, para iniciar la polimerización. Dicha radiación puede tener lugar después o, cuando se desee, simultáneamente a los procedimientos de moldeado.

Asimismo, se puede configurar el macrómero en relación con la estructura de soporte interna o externa. Las estructuras de soporte internas incluyen redes de detección selectiva de polímeros estables o degradables o metales no tóxicos. Las estructuras externas incluyen por ejemplo, colada del gel dentro de un cilindro para que la superficie interna del cilindro esté forrada con el gel que contiene los materiales biológicos.

Método de recubrimiento superficial

Estos materiales se pueden aplicar para el tratamiento de superficies macrocapsulares, como por ejemplo las utilizadas para ultrafiltración, hemodiálisis y inmunoadsorción no microencapsulado de tejido animal. La microcápsula en este caso será normalmente microporosa con un calibre de peso molecular por debajo de 70.000 Da. Puede presentarse en forma de una fibra hueca, un módulo espiral, una lámina plana u otra configuración. La superficie de dicha microcápsula se puede modificar utilizando un polímero, como por ejemplo PEG para producir una superficie no adhesiva a célula, no trombótica y no obturante. El recubrimiento sirve para mejorar la biocompatibilidad y para proporcionar una inmunoprotección adicional. Entre los materiales que se pueden modificar de esta forma se incluyen polisulfonas, membranas celulósicas, policarbonatos, poliamidas, poliimidazoles, polibencimidazoles, nilones, copolímeros de poli(acrilonitrilo-cloruro de vinilo), poliuretanos, poliestireno, copolímeros de poli(estireno-acrilonitrilo), poli(cloruro de vinilo) y poli(tereftalato de etileno).

Se pueden emplear diversos métodos para formar recubrimientos biocompatibles, dependiendo de la naturaleza física y química de la superficie. Se pueden recubrir las superficies hidrófilas aplicando una capa fina (por ejemplo entre 50 y 300 micrómetros de grosor) de una solución polimerizable como por ejemplo diacrilato de PEG que contenga cantidades apropiadas de colorante y amina. Las superficies hidrófobas se pueden hacer hidrófilas primero por tratamiento de descarga de plasma gaseoso y a continuación, se puede recubrir la superficie resultante de manera similar, o se puede tratar simplemente con un agente tensioactivo antes o durante el tratamiento con la solución de diacrilato de PEG. Por ejemplo, se podría tratar primero una superficie de poliestireno hidrófoba por exposición a un plasma de O₂ o un plasma de N₂. Esto tiene como resultado que la superficie queda más hidrófila en virtud de la creación de especies superficiales que contienen oxígeno o que contienen nitrógeno, respectivamente. Se podrían tratar posteriormente estas especies por reacción con una sustancia como cloruro de acrilato, capaz de producir especies sensibles a radicales libres unidos a la superficie. Alternativamente, se podría tratar primero una superficie de poliestireno hidrófoba con un agente tensioactivo, como por ejemplo un copolímero de bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de

ES 2 220 906 T3

propileno), que podría someterse después a acrilación si se desea. Dichos tratamientos tendrían como resultado una mejor adhesión entre las capas de recubrimiento hidrófilas y el material hidrófilo que se esté tratando.

Tratamiento de materiales e hidrogel con textura

Se puede tratar la superficie de materiales que tienen cierto grado de textura superficial, como por ejemplo dacron tejido, dacron velour, y membranas de poli(tetrafluoro-etileno) expandido (ePTFE) con el hidrogel. Las superficies con textura y macroporosas permiten una mejor adhesión del gel de PEG a la superficie del material, permitiendo el recubrimiento de materiales relativamente hidrófilos como PTFE y poli(tereftalato de etileno) (PET).

Los materiales implantables como por ejemplo electrodos enzimáticos y sensibles a iones, que tienen un hidrogel (como por ejemplo poli(HEMA), poli(alcohol vinílico) reticulado y poli(vinil pirrolidona)) en su superficie se recubren con el gel PEG más biocompatible de una manera similar a la absorción de colorante y la técnica de polimerización utilizada para microesferas de alginato-PLL tal como se expone en los siguientes ejemplos.

Tratamiento de materiales densos

Se pueden aplicar recubrimientos de genes sobre las superficies de materiales densos (v.g., sin textura, no geles) como polímeros, incluyendo PET, PTFE, policarbonatos, poliamidas, polisulfonas, poliuretanos, polietileno, polipropileno, poliestireno, vidrio y cerámica. Inicialmente, se tratan las superficies por descarga de plasma gaseoso o agente tensioactivo para hacer hidrófila la superficie. Esto asegura una mejor adhesión del recubrimiento de gel con la superficie. Alternativamente, se pueden emplear agentes de acoplamiento para mejorar la adhesión, tal como podrán deducir fácilmente los especialistas en este campo de síntesis de polímeros y modificación superficial.

Recubrimientos polimerizados interfacialmente delgados dentro de vasos sanguíneos y sobre otros tejidos

La metodología descrita anteriormente también se puede emplear para fotopolimerizar películas muy delgadas de recubrimientos de polímero no degradables dentro de los vasos sanguíneos para alterar la interacción de las plaquetas de la sangre con la pared de los vasos y administrar sustancias terapéuticas, tales como enzimas y otras proteínas, polisacáridos como ácido hialurónico, ácidos nucleicos como antisentido y ribozimas, y otros fármacos orgánicos e inorgánicos, aplicando los métodos antes descritos.

El efecto inmediato de la polimerización del polímero dentro de los vasos sanguíneos es reducir la trombogenicidad de una superficie de vasos sanguíneos dañada. Esto presenta una clara utilidad para mejorar el resultado de angioplastia con balón reduciendo la trombogenicidad del vaso y reduciendo la incidencia de lesiones creadas por la dilatación de balón. Otro efecto de esta modificación puede ser reducir la hiperplasia de células del músculo liso. Se espera esto por dos razones. En primer lugar, las plaquetas contienen un factor de crecimiento potente, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), si bien está relacionado con la hiperplasia posterior a la angioplastia. La interrupción de la administración de PDGF por sí misma implica una intervención farmacológica, ya que un "fármaco" que habría de ser distribuido por las plaquetas no puede distribuirse. La trombosis tiene como resultado la generación de trombina que es un mitógeno de células del músculo liso conocido. La interrupción de la generación de trombina y la administración a la pared vascular también implica una intervención farmacológica. Por otra parte, existen otros factores del crecimiento solubles en el plasma que, según se sabe son mitógenos de células del músculo liso. La capa de gel presenta una barrera selectiva de permeabilidad en la superficie del tejido y por tanto se espera que la capa de gel reduzca la hiperplasia tras la angioplastia. Por otra parte, el gel puede reducir el vasoespasmo protegiendo el vaso de la exposición de vasoconstrictores tales como trombina y puede reducir la incidencia de cierre agudo.

La restricción de la polimerización en una interfaz constituye una ventaja muy importante. Las lesiones patológicas dentro de un vaso sanguíneo son muy irregulares en su forma. Por lo tanto, es muy difícil utilizar un objeto preconfigurado, como un balón, para obtener una forma que contenga el material de polimerización adyacente al vaso sanguíneo.

Hay otros órganos en los que se necesita controlar la interacción con el tejido o crear barreras similares a través de polimerización de bloque interfacial. Esta metodología se puede aplicar igualmente a otros órganos, así como a la encapsulación de tipos de células o materiales biológicamente activos específicos tales como enzimas para el tratamiento de diversos defectos y enfermedades metabólicas, tal como se describe a continuación, por ejemplo.

(i) Encapsulación de células de liberación de neurotransmisor

La parálisis agitante, más comúnmente conocida como enfermedad de Parkinson, se caracteriza por una falta de la dopamina de neurotransmisor dentro del cuerpo estriado del cerebro. Las células que secretan dopamina, como por ejemplo las células del mesencéfalo ventral, de líneas celulares de neuroblastoide, o de la médula suprarrenal, se pueden encapsular aplicando el método y los materiales aquí descritos. Asimismo se pueden encapsular células, incluyendo células obtenidas por ingeniería genética, que secretan un precursor para un neurotransmisor, un agonista, un derivado, o un sucedáneo de un neurotransmisor en particular o análogos.

ES 2 220 906 T3

(ii) Encapsulación de hemoglobina para eritrocitos sintéticos

Se puede encapsular hemoglobina en su forma libre en geles de PEG y retenerla mediante la selección de una longitud de cadena de PEG y una densidad de reticulación que prevenga la difusión. La difusión de hemoglobina desde los geles se puede evitar además mediante el uso de polihemoglobina que es una forma reticulada de hemoglobina. La molécula de polihemoglobina es demasiado grande como para difundirse desde el gel de PEG. Se puede emplear una encapsulación adecuada tanto de hemoglobina nativa como reticulada para fabricar eritrocitos sintéticos. El atrapamiento de la hemoglobina en esferas pequeñas de menos de 5 micrómetros de diámetro de estos materiales altamente biocompatibles debería conducir a tiempos de circulación mejorados en relación con la hemoglobina reticulada o hemoglobina encapsulada con liposoma.

(iii) Atrapamiento de enzimas para la corrección de enfermedades metabólicas y quimioterapia

Existen muchas enfermedades y defectos que se derivan de una deficiencia de enzimas. Por ejemplo, la deficiencia congénita de la enzima catalasa causa acatalasemia. La inmovilización de catalasa en redes de gel de PEG podría proporcionar un método de sustitución de enzima para tratar esta enfermedad. El atrapamiento de glucosidasa puede ser similarmente útil para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Los geles de PEG microesféricos que atrapan ureasa se pueden utilizar en sangre extracorpórea para convertir la urea en amoníaco. Algunas enzimas como asparaginasa pueden degradar aminoácidos que necesitan células tumorales. La inmunogenicidad de estas enzimas evita el uso directo de quimioterapia. El atrapamiento de dichas enzimas en geles de PEG inmunoprotectores, sin embargo, puede servir como apoyo de una quimioterapia con éxito. Se puede diseñar una formulación adecuada para liberar lentamente o no liberar la enzima.

(iv) Microencapsulación celular para la evaluación de fármacos anti virus de inmunodeficiencia anti-humana *in vivo*

Se pueden encapsular células T-linfoblastoides humanas infectadas con VIH o no infectadas en geles de PEG como en el caso de las células antes mencionadas. Dichas microcápsulas se pueden implantar en un animal no humano y tratarse después con fármacos de ensayo. Tras el tratamiento, se pueden recoger las microcápsulas y realizar una detección selectiva de las células encapsuladas para determinar la viabilidad y la normalidad funcional. La supervivencia de células T infectadas indica una acción con éxito del fármaco. La falta de biocompatibilidad es un problema documentado en este método para evaluar fármacos, pero los geles altamente biocompatibles aquí descritos deberían resolver este problema.

(v) Polimerización de recubrimientos estructurales dentro de vasos sanguíneos y otros lúmenes de tejido

Al igual que se pueden polimerizar dentro de los vasos sanguíneos recubrimientos intravasculares muy finos, también se pueden polimerizar dentro de los vasos capas más gruesas de geles estructurales, que se pueden utilizar para reducir el cierre abrupto, para retener disecciones de la pared vascular, para resistir el vasoespasmio y para reducir hiperplasia de célula del músculo liso. Estos geles se pueden producir por polimerización de bloque o interfacial y, cuanto mas grueso y con una mayor densidad de reticulación sea el material, más fuerte será la estructura dentro de la pared vascular. Este procedimiento podría llevarse a cabo en muchos órganos o dentro de muchos órganos del organismo.

Los ejemplos que se exponen a continuación sirven para describir los modos de realización preferibles así como las utilidades de la presente invención, no pretendiéndose limitar con ellos la invención a no ser que se especifique de otra forma en las reivindicaciones adjuntas. En conjunto, los ejemplos ilustran demostraciones representativas del mejor modo de implantación de la invención, tal como se entiende actualmente.

Ejemplo 1

Síntesis de diacrilato de PEG 6K

Se adquirieron en el comercio acrilatos de PEG de pesos moleculares 400 Da y 1000 Da comercializados por Sartomer y Dajac Inc., respectivamente. Se disolvieron 20 g de diol de PEG 6K en 200 ml de diclorometano en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Se enfrió el matraz a 0°C y se añadieron 1,44 ml de trietilamina y 1,3 ml de cloruro de acrililo con agitación constante bajo una atmósfera de nitrógeno seca. A continuación, se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. A continuación, se filtró y se hizo precipitar el filtrado por adición de un gran exceso de hexano. Se purificó el monómero en bruto disolviéndolo en diclorometano y haciéndolo precipitar en hexano. Rendimiento 60%.

Ejemplo 2

Síntesis de tetraacrilato de PEG 18,5 K

Se adquirieron 30 g de un PEG hidrosoluble de tetrahidroxi (peso en moles 18.500) (PEG 18,5 k) de Polysciences, Inc.

ES 2 220 906 T3

Se secó el PEG disolviéndolo en benceno y eliminado por destilación el azeotropo agua-benceno. Se disolvieron 59 g de PEG 18,5 k en 300 ml de benceno en un matraz de 500 ml. Se añadieron a esto 3,6 ml de trietilamina y 2,2 ml de cloruro de acrilóilo bajo una atmósfera de nitrógeno y se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 2 horas. A continuación, se enfrió y se agitó durante toda la noche. Se separó el hidrocloreto de trietilamina por filtración y se volvió a recuperar el copolímero del filtrado por precipitación en un gran exceso de hexano. Se volvió a purificar el polímero disolviéndolo en cloruro de metileno y se lo hizo precipitar de nuevo en hexano. Se secó el polímero a 50°C al vacío durante 1 día. Rendimiento 68%.

Ejemplo 3

Recubrimiento de microesferas de alginato -PLL con contenido en islotes por absorción de colorante superficial

Se utilizó el método de polimerización interfacial de microcápsula para formar una membrana alrededor de microcápsulas de alginato -PLL que contenían islotes. Se suspendieron microesferas coacervadas de alginato-PLL, que contenían uno o dos islotes pancreáticos humanos, en una solución de CaCl₂ al 1,1% y se aspiraron para liberar el exceso de solución y obtener un denso tapón de microesferas. Se preparó una solución de eosina de etilo (0,04% p/v) en una solución de CaCl₂ al 1,1%. Se esterilizó con filtro esta solución pasándola a través de un filtro de 0,45 μm. Se suspendió el tapón de microesferas en 10 ml de la solución de eosina durante 2 minutos para permitir la absorción del colorante. A continuación, se lavaron las microesferas cuatro veces con CaCl₂ al 1,1% nueva para eliminar el exceso de colorante. Se añadieron 2 ml de una solución (23% p/v) de tetraacrilato de PEG 18,5K que contenía 100 μl de una solución al 3,5% p/v de trietanolamina en solución salina tamponada con ácido etanosulfónico de hidroxietilpiperazina (HEPES) a 0,5 ml de estas microesferas. Se expusieron las microesferas a luz de láser iónica de argón durante 30 minutos con agitación periódica. Se exploró por escáner uniformemente la suspensión de microesferas con la luz durante este período. A continuación, se lavaron las microesferas con solución cálcica y se repitió el proceso con el fin de estabilizar más el recubrimiento.

En la figura 2B se muestran microesferas de alginato/PLL que contienen islotes recubiertos a través de esta técnica.

Se llevó a cabo un ensayo de estimulación de glucosa estática (SGS) en islotes encapsulados en las microesferas recubiertas con el gel de PEG. Los datos para la secreción de insulina como respuesta a esta estimulación se exponen en la tabla 1. Se observa que los islotes son viables por manchado con ditiazona.

Los datos del ensayo SGS confirman la vitalidad y funcionalidad de los islotes.

TABLA 1

Función SGS de células de islote encapsuladas

	Concentración de glucosa (% mg)		
	Inicial		posterior
	60	300	60
	<u>Insulina/islote/hora (μU/ml)*</u>		
Método de recubrimiento por difusión	1,0	10,4±3,56	2,54±0,76
Método de recubrimiento aceite mineral	1,0	10,23±3,28	1,02±0,78
Control sin islotes	1,0	3,74±1,4	1,9±0,17

* Los valores son la media ± desviación típica, todos están normalizados en comparación con los 60 mg % iniciales, después de la exposición a 300 mg % de glucosa, se vuelve a someter los islotes a la dosis inicial.

Los macrómeros de diacrilato de PEG se pueden polimerizar de forma idéntica al macrómero de tetraacrilato de PEG descrito en este ejemplo.

Ejemplo 4

Método de recubrimiento por polimerización en suspensión de microesferas de alginato-PLL que contienen islotes

5 Este método aprovecha la naturaleza hidrófila de monómeros PEG. Se mezclaron 2 ml de microesferas de alginato/PLL, que contenían uno o dos islotes pancreáticos humanos, con solución de macrómero de tetraacrilato de PEG (peso molar PEG 18,5 kD, solución 23% en solución salina) en un tubo de centrífuga transparente de 50 ml. Se mezclaron trietanolamina (0,1 M) y eosina de etilo 0,5 M con solución de macrómero. Se decantó la solución de macrómero que sobraba, se añadieron 20 ml de aceite mineral al tubo y se agitó con torbellino la mezcla de reacción a fondo durante 5 minutos. El aceite de silicona se comportará igual de bien en esta síntesis pero es posible que sus características adyuvantes sean más deficientes si existe algún remanente. Se puede utilizar cualquier líquido no miscible en agua como fase "oleosa". Las concentraciones de trietanolamina aceptable oscilan entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM. Las concentraciones de eosina de etilo aceptables oscilan entre aproximadamente 0,01 mM y más de 10 mM.

15 Las perlas eran de un tono ligeramente rojo debido al delgado recubrimiento de solución de macrómero/colorante y fueron irradiadas durante 20-50 segundos con láser iónico de argón (potencia 50-500 mW). El blanqueado del color de eosina de etilo (rojo) indica que se ha completado la reacción. A continuación, se separaron las perlas del aceite mineral y se lavaron varias veces con solución salina. Se llevó a cabo todo el procedimiento en condiciones estériles.

20 En la figura 3 se muestra una representación esquemática del proceso de recubrimiento de macroesfera en aceite. Las cápsulas de alginato/polilisina son solubles en citrato sódico a un pH 12. Cuando las microesferas recubiertas entran en contacto con citrato sódico a un pH 12, se disuelve el coacervato de alginato/polilisina interior y se puede seguir observando una membrana polimérica de PEG (los geles de PEG reticulados son sustancialmente insolubles en todos los disolventes incluyendo agua y citrato sódico a un pH 12). Las microesferas de control sin recubrir se disuelven completamente y rápidamente en la misma solución.

30 Se llevó a cabo la estimulación de glucosa estática en los islotes como en el ejemplo 3. En la tabla 1 se muestran también estos datos. Los islotes son viables y funcionales.

Ejemplo 5

Encapsulación de islotes de Langerhans

35 En este ejemplo se utiliza la polimerización interfacial directa. Se encapsularon islotes de Langerhans aislados de un páncreas humano en geles de macrómero de tetraacrilato de PEG. Se formó un aglomerado de 500 islotes suspendidos en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero bovino fetal por centrifugado a 100 g durante 3 minutos. Se volvió a suspender el aglomerado en 1 ml de solución al 23% p/v de macrómero de tetraacrilato de PEG 18,5 K en solución salina tamponada con HEPES. Se añadieron 5 μ l de una solución de eosina de etilo en vinil pirrolidona (a una concentración de 0,5%) junto con 100 μ l de una solución 5 M de trietanolamina en solución salina. A continuación, se añadieron 20 ml de aceite mineral al tubo que fue agitado vigorosamente para formar una dispersión de gotas de 200-500 μ m de tamaño. A continuación, se expuso esta dispersión a láser iónico de argón con una potencia de 250 mW, que emitía a 514 nm, durante 30 segundos. A continuación se separó el aceite mineral dejando que se sedimentaran las microesferas y se lavaron las microesferas resultantes dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), una vez con hexano y tres veces con medio.

45 En la figura 4 se muestran islotes de Langerhans encapsulados en un gel de PEG-tetraacrilato. Se verificó la viabilidad de los islotes a través de un método de manchado con yoduro de propidio y naranja de acridina, así como por manchado con ditiazona. Para someter a ensayo la normalidad funcional, se llevó a cabo un ensayo SGS con estos islotes. Se comparó la respuesta de los islotes encapsulados con la de islotes sueltos mantenidos en cultivo durante el mismo período de tiempo. Se mantuvieron todos los islotes en el cultivo durante una semana antes de llevar a cabo el SGS. En la tabla 2 se resumen todos los resultados. Se puede observar que los islotes encapsulados segregaron significativamente ($p < 0,05$) cantidades más altas de insulina que los islotes sueltos. El proceso de encapsulación con gel de tetraacrilato de PEG no deterioró la función de los islotes y, de hecho, ayudó a que mantuvieran su función en cultivo mejor que cuando no estaban encapsuladas.

60

65

TABLA 2

Secreción de insulina desde células de islote

	Secreción de insulina de islote		
	Concentración de glucosa (% mg)		
	60	300	60
	Insulina/islote/hora (μU/ml)*		
Islotes libres	1,0	3,74 \pm 1,40	1,9 \pm 0,17
Islotes encapsulados	1,0	20,81 \pm 9,36	2,0 \pm 0,76

*Los valores son la media \pm desviación típica, normalizados a un nivel de referencia inicial a un 60 mg% de glucosa.

Ejemplo 6

Microencapsulación de células animales

Se sintetizaron diacrilatos de PEG de diferentes pesos moleculares por reacción de cloruro de acrilófilo con PEG como en el ejemplo 1. Se mezcló una solución de 20 a 30% de macrómero con una suspensión celular y el sistema de iniciación de eosina de etilo y trietanolamina antes de exponerlo a luz de láser a través de un aparato de flujo de aire de coextrusión, mostrado en la figura 5. Se prepararon microesferas a través de un proceso de atomización de aire en el que se atomizó una corriente de macrómero a través de una corriente anular de aire. La velocidad del flujo de aire fue 1.600 cc/minuto y la velocidad de flujo de macrómero fue 0,5 ml/min. Se dejó que cayeran las gotas en una placa petri que contenía aceite mineral y se expusieron a luz de láser durante aproximadamente 0,15 segundos cada una para polimerizar las microesferas para hacerlas insolubles en agua. Se separaron las microesferas del aceite y se lavaron a fondo con tampón PBS para eliminar el macrómero sin reaccionar y el iniciador residual. El tamaño y la forma de las microesferas dependió de la velocidad de extrusión (0,05 a 0,1 ml/min) y el diámetro de capilaridad de extrusión (calibre 18 a 25). Los tiempos de polimerización dependieron de la concentración de iniciador (concentración de eosina de etilo (5 μ M a 0,5 mM), concentración de vinil pirrolidona (0,0% a 0,1%), concentración de trietanolamina (5 a 100 mM), potencia de láser (10 mW a 1 W) y concentración de macrómero (mayor que 10% p/v).

Se utilizó un macrómero de diacrilato de PEG de peso molecular 400 Da como una solución al 30% en PBS, que contenía 0,1 M de trietanolamina como cocatalizador y 0,5 nM de eosina de etilo como fotoiniciador. En la figura 6 se muestran esferas preparadas utilizando este método. Se llevaron a cabo las polimerizaciones a un pH fisiológico en presencia de aire. Esto es significativo ya que las polimerizaciones de radiales pueden verse afectadas por la presencia de oxígeno, y la polimerización de acrilato sigue siendo lo suficientemente rápida para proseguir con eficacia.

El proceso también funciona a temperaturas más bajas. Para la encapsulación celular, se utilizó una solución al 23% de diacrilato de PEG aplicando las mismas condiciones de iniciación y de polimerización que las utilizadas en la técnica de atomización de aire. Se comprobó la viabilidad celular después de la encapsulación a través del ensayo de exclusión con azul de tripano. Se observó que eran viables después de la encapsulación (más de un 95%) fibroblastos de prepucio humano (HFF), células de ovario de hámster chino (CHO-K.) y línea de insuloma de células beta (RIN5F). Se puede utilizar una amplia gama de concentraciones de diacrilato de PEG superiores a 10% con igual de eficacia, al igual que macrómeros de tetraacrilato de PEG.

Ejemplo 7

Recubrimiento de microesferas de alginato-PLL que contienen células animales y células individuales por adsorción de colorante superficial

Se suspendieron microesferas coacervadas de alginato-PLL que contenía células animales en una solución de CaCl_2 al 1,1% y se aspiraron para eliminar el exceso de solución para obtener un tapón denso de microesferas. Se suspendió el tapón de microesferas en 10 ml de solución de eosina durante 2 minutos para permitir la absorción de colorante. Se añadieron 2 ml de solución (23% p/v) de tetraacrilato de PEG 18,5 que contenía 100 μ l de una solución al 3,5 p/v de trietanolamina en solución salina tamponada con HEPES a 0,5 ml de estas microesferas. Se expusieron las microesferas a un láser iónico de argón durante 30 segundos con agitación periódica. Se exploró con escáner la suspensión de microesferas con el láser durante este período. A continuación, se lavaron las microesferas con solución cálcica y se repitió el proceso una vez más con el fin de obtener un recubrimiento estable.

Para verificar la supervivencia de las células tras el proceso de recubrimiento, se expusieron las células en suspensión sin microcápsula de alginato/PLL a condiciones poliméricas similares. Se centrifugó 1 ml de células de leucemia

ES 2 220 906 T3

linfoblástica (RAJI) (5×10^5 células) a 300 g durante 3 minutos. Se añadió 1 ml de solución de eosina de etilo esterilizada con filtro al 0,04% tamponada con solución salina de tampón fosfato (PBS) y se volvió a suspender el aglomerado. Se expusieron las células al colorante durante 1 minuto y se lavaron dos veces con PBS y después se volvieron a aglomerar. Se añadieron 10 μ l de solución de trietanolamina (0,1 M) al aglomerado y se agitó con torbellino el tubo para resuspender las células. A continuación, se mezclaron 0,5 ml de macrómero de tetraacrilato de PEG 18,5 K en esta suspensión y se expuso la mezcla resultante a láser iónico de argón (514 nm, 50 mW) durante 45 segundos. A continuación, se lavaron las células dos veces con 10 ml de solución salina y una vez con medio (RPMI 1640 con FCS al 10% y antibiótico al 1%, antimicótico). Se observó una capa delgada de gel de tetraacrilato de PEG que se formaba alrededor de cada célula individual.

No se observó ninguna diferencia significativa en la viabilidad entre la población de control (93% viable) y las células tratadas (95% viable) por exclusión con azul de tripano. Se llevó a cabo un ensayo para determinar la viabilidad y función celular adaptando el ensayo MTT-Formazan para las células RAJI. Este ensayo indica más de un 90% de supervivencia. Se llevaron a cabo ensayos similares con otras dos líneas celulares de modelo. Las células de ovario de hámster chino (CHO-K1) no muestran una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la función metabólica según se evalúa a través del ensayo MTT-Formazan. Los fibroblastos de ratón 3T3 tampoco presentaron una reducción significativa ($p > 0,50$) de la actividad metabólica.

Ejemplo 8

Método de recubrimiento por polimerización en suspensión de microesferas de alginato-PLL con contenido en células animales

Utilizando el mismo método que el descrito en el ejemplo 7, se recubrieron células RAJI encapsuladas en microesferas de alginato-PLL con una membrana polimérica de tetraacrilato de PEG 18,5K. Se comprobó la viabilidad de estas células por exclusión con azul de tripano y se encontró que era viable más de un 95%.

Ejemplo 9

Recubrimiento de islotes de Langerhans individuales por absorción de colorante superficial

Aplicando el mismo método que el descrito en el ejemplo 7, se adsorbió eosina de etilo en la superficie de islotes, se aplicó una solución del macrómero PEG con trietanolamina a las células recubiertas con colorante y se expusieron las células a la luz de láser iónico de argón para formar una membrana polimérica PEG gruesa sobre la superficie de los islotes. Se demostró la viabilidad de los islotes por falta de manchado con yoduro de propidio.

Ejemplo 10

Biocompatibilidad de PEG sobre microesferas

Se llevó a cabo la evaluación *in vivo* del grado de respuesta inflamatoria a las microesferas preparadas en los ejemplos 7 y 8 por implantación en la cavidad peritoneal de ratones. Se suspendieron aproximadamente 0,5 ml de microesferas en 5 ml solución salina tamponada con HEPES estéril. Se inyectaron 2,5 ml de esta suspensión en la cavidad peritoneal de ratones blancos suizos macho ICR. Se recuperaron las microesferas al cabo de 4 días por lavado de la cavidad peritoneal con 5 ml de 10U heparina/ml PBS. Se inspeccionó visualmente el grado de crecimiento celular en las microesferas con un microscopio de contraste de fase. Se hizo el recuento del número de células no unidas presentes en el fluido de lavado recuperado utilizando un contador de Coulter.

En la figura 7A se muestra una fotografía de microesferas de alginato-poli(L-lisina) recuperadas al cabo de 4 días, mientras que en la figura 7B se muestran esferas similares que han sido recubiertas con gel PEG a través del proceso de difusión de colorante antes de la implantación. Tal como se esperaba, las cápsulas de alginato-polilisisina de doble capa que no contenían una capa exterior de alginato quedaron completamente cubiertas con células debido a la naturaleza altamente adhesiva de las células de la superficie de PLL, mientras que las microesferas recubiertas con PEG quedaron prácticamente libres de células adherentes. Se esperaba un recubrimiento prácticamente completo de alginato-poli(L-lisina) ya que la polilisisina tiene grupos amino en la superficie y las aminas con carga positiva superficiales pueden interactuar con los proteoglucanos de la superficie de la célula y soportar el crecimiento celular (Reuveny, y cols., (1983) *Biotechnol. Bioeng.*, 25:469-480). Las fotografías de la figura 7B indican sólidamente que la superficie adhesiva celular y altamente cargada de PLL se cubre con una capa estable de gel de PEG. No pareció que se viera comprometida la integridad del gel.

Se evaluó a tendencia no adhesiva a célula de estas microesferas como el porcentaje del área de microesfera total que aparece cubierta con supercrecimiento celular. Estos resultados se resumen en la tabla 3.

ES 2 220 906 T3

TABLA 3

Recubrimiento de esfera con supercrecimiento celular tras la implantación intraperitoneal durante 4 días

Composición de gel PEG	% recubrimiento células
18,5 K	<1
18,5 k 90% : 0,4k 10%	<1
18,5k 50%: 0,4k 50%	<1
35k 90%: 0,4k 10%	5,7
35k 50%: 0,4k 50%	<1
Alginato-poli(L-lisina)	60-80

Un aumento del recuento de células se debe a la activación de macrófagos residentes que segregan factores químicos tales como interleucinas e inducen a macrófagos no residentes a emigrar hacia el lugar del implante. Los factores también atraen a fibroblastos responsables de la síntesis de colágeno. La variación de recuentos celulares según la composición química del recubrimiento se muestra en la figura 8 (A-F). Se puede observar en la figura que todas las esferas recubiertas con PEG tienen recuentos celulares sustancialmente reducidos. Esto se corresponde con el recubrimiento de PEG que generalmente no causa irritación de la cavidad peritoneal.

No obstante, la composición de PEG es diferente en cuanto a la biocompatibilidad y el aumento de los pesos moleculares está asociada a una reducción del recuento de células. Esto podría deberse a que los geles hechos de oligómeros de peso molecular más alto tienen un mayor potencial de repulsión estérica debido a las longitudes de cadena más largas.

Ejemplo 11

Permeabilidad de geles de PEG

Se disolvieron 20 mg de albúmina de suero bovino, IgG humano, o fibrinógeno humano en 2 ml de solución al 23% p/v de tetraacrilato de PEG 18,5 k oligomérico en PBS. Se polimerizó por láser esta solución para producir un gel 2 cm x 2 cm x 0,5 cm de tamaño. Se llevó un seguimiento de la difusión de albúmina de suero bovino, IgG humano y fibrinógeno humano (peso molar 66 kDa, 150 kDa y 350 kDa, respectivamente) a través de una cara de 2 cm x 2 cm de estos geles utilizando un reactivo de ensayo de proteína total (Biorad). En la figura 9 se muestra un perfil de liberación típico para un gel de PEG 18,5 k. Este gel permitió un lento transporte de albúmina pero no permitió que se difundieran el IgG y el fibrinógeno. Esto indica que estos geles se pueden utilizar como barreras inmunoprotectoras. Esto es un requisito vital para un material de microencapsulación de tejido animal con éxito.

Se observó que el perfil de liberación iba en función de la densidad de reticulación y el peso molecular del segmento de polietilén glicol del monómero. En la figura 10 se muestra la liberación de albúmina de suero bovino (BSA) a través de geles preparados a partir de soluciones al 23% de diacrilatos y tetraacrilatos de PEO de 0,4k y 18,5k, respectivamente. Es evidente que el gel de 18,5K era libremente permeable a la albúmina, mientras que el gel de 0,4K restringió la difusión de albúmina. La liberación de sustancias desde estos geles depende de la densidad de reticulación de la red y depende también de la motilidad de los segmentos de PEG en la red. Este efecto también dependió de la funcionalidad del macrómero. Por ejemplo, la permeabilidad de un gel de tetraacrilato de PEG de 18,5K fue inferior a la de un gel de diacrilato de PEG 20 K similar.

Ejemplo 12

Tratamiento de caucho de silicona para formar capa de gel de PEG para mejorar la biocompatibilidad

Se sumergieron piezas de 2 x 2 cm de caucho de silicona de tipo médico durante 1 hora en benceno que contenía 23% de diacrilato de PEG 0,4K y acetofenona de 2,2-dimetoxi-2-fenilo al 0,5%. Se irradió el caucho inflado durante 15 minutos con una lámpara UV de onda larga (365 nm). Tras la radiación, se lavó la muestra en benceno y se secó. Se midieron los ángulos de contacto con el aire del caucho de silicona bajo agua antes y después del tratamiento. El ángulo de contacto menor de 50° tras el tratamiento, con respecto al ángulo de contacto inicial de 63° para el caucho de silicona sin tratar, refleja un aumento de la hidrofiliidad debido a la presencia del gel PEG sobre la superficie de caucho.

Esta técnica demuestra que se puede utilizar la polimerización de macrómero para modificar una superficie de polímero con el fin de mejorar la biocompatibilidad. Por ejemplo, se puede tratar un catéter de poliuretano a través de este método para obtener un dispositivo implantable recubierto con PEG. El PEG quedó firmemente anclado a la superficie del catéter de poliuretano porque se dejó que penetrara el macrómero en la superficie del catéter (a una profundidad de 1-2 micrómetros) durante el período de inmersión antes de la fotopolimerización. Tras la radiación, se produjo una red interpenetrante de PEG y poliuretano. A continuación, se entremezcló inextricablemente el PEG de esta forma con el poliuretano.

Ejemplo 13

Velocidad de polimerización

5 Se determinaron las cinéticas de una reacción típica para demostrar la rapidez de gelificación en polimerizaciones iniciadas por láser de monómeros acrílicos multifuncionales. Se irradió triacrilato de trimetilolpropilo, que contenía 5×10^{-4} M de eosina de etilo como fotoniciador en 10 μ moles de N-vinil pirrolidona por ml de mezcla de macrómero y 0,1 M de trietanolamino como catalizador con un láser iónico de argón de 500 mW (514 nm longitud de onda, potencia $3,05 \times 10^5$ W/m², diámetro de haz 1 mm, diámetro de gel medio producido 1 mm). En la figura 11A se muestra un gráfico de la longitud de la espiga del gel formado por penetración del haz de láser en el gel en relación con el tiempo de radiación de láser. En la figura 11B se pueden observar las espigas formadas como resultado de la penetración de luz de láser en el macrómero.

15 Se colocaron 100 μ l de una solución al 23% p/p de diversos macrómeros en solución salina tamponada con HEPES que contenía 3 μ l de solución de iniciador (300 mg/ml de 2,2-dimetoxi-2-fenoxiacetofenona en N-vinil pirrolidona) en un portaobjetos de vidrio y se irradió con una lámpara (Black-Ray, modelo 3-100A con flujo) de UV de longitud de onda de baja intensidad (LWUV). Se anotaron las veces necesarias para que se produjera la gelificación, y se indican en la tabla 4. Estas veces se encuentran típicamente dentro del intervalo de 10 segundos.

TABLA 4

Tiempos de gelificación de polímero irradiado

Tamaño de polímero	Tiempo de gelificación (segundos)
	(media \pm desviación típica)
0,4K	6,9 \pm 0,5
1K	21,3 \pm 2,4
6K	14,2 \pm 0,5
10K	8,3 \pm 0,2
18,5K	6,9 \pm 0,1
20K	9,0 \pm 0,4

35 Son suficientes períodos de tiempo de aproximadamente 10-100 ms para gelificar una gota de 300 μ m de diámetro, un tamaño típico de gel utilizado en la tecnología de macroencapsulación. Esta rápida gelificación, si se utiliza en conjunción con una selección apropiada de macrómeros, puede conducir al atrapamiento de células vivas en una red polimérica unida covalentemente tridimensional. La luz de láser monocromática no será absorbida por las células a no ser que esté presente un cromóforo apropiado, y se considera como inofensiva si la longitud de onda es superior a aproximadamente 400 nm. La exposición a luz ultravioleta de longitud de onda larga, superior a 360 nm, es inofensiva a intensidades y duraciones prácticas.

45 La velocidad de polimerización del macrómero dependerá de la concentración de macrómero, la concentración de iniciador y la funcionalidad del macrómero, v.g. la difuncionalidad de un diacrilato de PEG o la tetrafuncionalidad de un tetraacrilato de PEG, así como el grado de acrilación del material.

Ejemplo 14

Interacciones de gel de PEG

50 Se demostró la biocompatibilidad con células HFF (fibroblastos de prepucio humano) del siguiente modo. Se sembraron células HFF sobre geles de tetraacrilato de PEG 18,5K a una densidad de 18.000 células/cm² en medio de Eagle modificado con Dulbecco que contenía 10% de suero de becerro fetal. A continuación, se incubaron los geles a 37°C en un entorno de CO₂ al 5% durante 4 horas. Al final de este período, se lavaron los geles con PGS para eliminar las células no adherentes y se observaron con un microscopio de contraste de fase con un aumento de 200 X.

60 En la figura 12A se muestra el crecimiento de estas células sobre un gel de PEG típico en comparación con una superficie de vidrio (figura 12B). Se observó que el número de células unidas/cm² era 510 ± 170 sobre las superficies de gel en comparación con 13.200 ± 3.910 para una superficie de vidrio de control. Las células en estos geles tenían un aspecto redondeado y no se presentaron en su morfología extendida normal, lo que indica claramente que estos geles no favorecen la unión celular.

65 Se demostró la biocompatibilidad sobre macroesferas del siguiente modo. En la figura 13 se muestra una fotografía de microesferas explantadas de ratones como en el ejemplo 10; al cabo de 4 días se observa un supercrecimiento fibroso muy reducido. La resistencia de las cadenas PEG a la adsorción de proteína y por lo tanto el crecimiento celular está bien documentado. En la tabla 5 se resume el grado de supercrecimiento celular en estas microesferas formadas de varios geles de diacrilato de PEG tras su implantación intraperitoneal durante cuatro días.

ES 2 220 906 T3

TABLA 5

Grado de supercrecimiento celular sobre geles

5	Geles de diacrilato de PEG (peso molar/Daltons)	Grado de supercrecimiento celular
	400	5-10%
	1.000	15-25%
10	5.000	3-5%
	6.000	2-15%
	10.000	10-20%
15	18.500	4-10%

Ejemplo 15

Caracterización y análisis mecánico de geles de PEG

20 Se añadieron 10 μ l de una solución de iniciador que contenía 30 mg/ml de 2,2-dimetoxi-2-fenil actofenona en vinil-2-pirrolidona por ml a soluciones al 23% p/v de diacrilatos de PEG (0,4K, 6K, 10K) y tetraacrilatos de PEG (18,5K). Se colocó la solución de macrómero que contenía iniciador en un molde de 4,0 x 1,0 x 0,5 cm y se expuso a una lámpara ultravioleta de longitud de onda larga (365 nm) durante aproximadamente 10 segundos para inducir la gelificación. Se dejó que se equilibraran las muestras en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante 1 semana antes de realizar el análisis.

30 Se cortó una serie de muestras de “hueso” (muestras cortadas de una placa en forma de hueso, con regiones anchas en ambos extremos y una sección más estrecha en la región alargada del centro) de una prueba de resistencia a la tracción definitiva. El grosor de las muestras se definió como el grosor de la muestra de la que se cortaron. Dicho grosor osciló entre aproximadamente 0,5 mm y 1,75 mm. Las muestras tenían 20 mm de longitud y 2 mm de ancho en la región estrecha del “cuello”. Se llevaron a cabo las pruebas de esfuerzo-deformación en el control de longitud a una velocidad de 4% por segundo. Después de cada prueba, se determinó el área de la sección transversal. En la tabla 6 se muestran los datos de la resistencia a la tracción definitivos. Se puede observar que los macrómeros de peso molecular más bajo en general proporcionan geles más fuertes que son menos extensibles que los obtenidos empleando macrómeros de peso molecular más alto. Se observa que el gel de tetraacrilato de PEG 18,5K es anómalo en esta serie, como resultado de la multifuncionalidad del macrómero y la densidad de reticulación más alta correspondiente del gel resultante. Este tipo de resultado de refuerzo podría obtenerse de manera similar con macrómeros obtenidos que tienen un número distinto a cuatro de grupos sensibles a radicales libres, como por ejemplo grupos acrilato.

TABLA 6

Ensayo de resistencia de gel

	Peso molecular de precursor de acrilato de PEG			
	0,4K	6K	10K	18,5K
45 Esfuerzo (kPa)*	168+/-51	98+/-15	33+/-7	115+/-56
50 %				
55 Deformación*	8+/-3	71+/-13	110+/-9	40+/-15
Pendiente	22+/-5	1,32+/-0,31	0,27+/-0,04	2,67+/-0,55

*Los valores son la media+/-desviación típica

60 Para las pruebas de fluencia, se cargaron ocho muestras de aproximadamente 0,2 x 0,4 x 2 cm sumergiéndolas en solución salina. Se sometieron a prueba con una carga determinada previamente única constante durante una hora y una carga de recuperación pequeña durante diez minutos. Se utilizaron para este estudio geles obtenidos de diacrilatos de PEG de 1K, 6K y 10K y tetraacrilatos de PEG de 18,5K de peso molecular. Se terminó el ensayo de 10K debido a un error de límite (la muestra se estiró más allá del trayecto del marco de carga). Se sometió a prueba la muestra de 1K con una carga de 10 g y una carga de recuperación de 0,2 g. Se sometió a prueba la muestra de 6K a una carga de 13 g con una carga de recuperación de 0,5 g. Se sometió a ensayo la muestra de 18,5 K a una carga de 13 g con una

ES 2 220 906 T3

carga de recuperación de 0,2 g. La selección de las cargas para estas muestras produjo curvas de fluencia clásicas con regiones primarias y secundarias. En las figuras 14A-C, respectivamente, se muestran Las trazas para la fluencia para las muestras de 1K, 6K y 18,5K.

5 Ejemplo 16

Contenido en agua de geles de PEG

10 Se prepararon soluciones de varios macrómeros tal como se ha descrito anteriormente. Se utilizaron geles con forma de discos utilizando un molde. Se utilizaron 400 μ l de solución para cada disco. Se radiaron las soluciones durante 2 minutos para asegurar una gelificación completa. Se separaron los geles con forma de disco y se secaron al vacío a 60°C durante 2 días. Se pesaron los discos (W1) y después se extrajeron repetidamente con cloroformo durante 1 día. Se volvieron a secar los discos y se pesaron (W2). Se calculó la fracción de gel como W2/W1. En la tabla 7 se exponen los datos.

15 Después de la extracción, se dejó que se equilibraran los discos con HBS durante 6 horas y se pesaron (W3) después de haber eliminado el exceso de agua cuidadosamente con un escobillón. Se calculó el contenido en agua total como (W3-W2) X 100/W3. En la tabla que se muestra a continuación, se resumen los datos sobre el contenido de agua del gel.

20 TABLA 7

Datos sobre el contenido de agua del gel

Código de polímero	% total de agua	% contenido gel
0,4	-	99,8 \pm 1,9
1K	79,8 \pm 2,1	94,5 \pm 2,0
30 6K	95,2 \pm 2,5	69,4 \pm 0,6
10K	91,4 \pm 1,6	96,9 \pm 1,5
18,5K	91,4 \pm 0,9	80,3 \pm 0,9
20K	94,4 \pm 0,6	85,0 \pm 0,4

35

Ejemplo 17

Estabilidad mecánica de geles de PEG tras la implantación

40 Se moldearon diacrilato de PEG (10K) y tetraacrilato de PEG (peso molar 18,5K) en formas de hueso tal como se ha descrito en el ejemplo 15. Se vertió un 23% p/p de diacrilato o tetraacrilato de PEG en solución salina tamponada con HEPES estéril (HBS) (0,9% de NaCl, 10 nM de HEPES, pH 7,4), con un contenido de 900 ppm de 2,2-dimetoxi-2-fenoxiacetofenona como iniciador, en un molde de aluminio y se irradió con una lámpara UVA (Black ray) durante 1 minuto. Se observó que los pesos iniciales de estas muestras después del secado en el horno de estos geles eran un peso constante. Se extrajeron según el método Soxhlet con cloruro de metileno durante 36 horas para extraer por lixiviación el prepolímero sin reaccionar de la matriz de gel (lixiviación con sol), antes de realizar la prueba. Se continuó el proceso de extracción hasta que los geles secados dieron un peso constante.

45

50 Se anestesiaron ratones blancos macho ICR suizos, de 6-8 semanas de vida (Sprague-Dawley) mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. Se afeitó la región abdominal del ratón y se preparó con betadine. Se realizó una incisión central ventral de 10-15 mm de longitud. Se insertó la muestra de polímero, totalmente hidratada en PBS estéril (solución salina tamponada con fosfato) o solución salina tamponada con HEPES (para los estudios de calcificación) a través de la incisión y se colocó sobre el mesenterio, alejado del lugar de la herida. Se cerró la pared peritoneal con una sutura de puntos (4,0 seda, Ethicon). Se cerró la piel con grapas para piel de acero inoxidable y se aplicó un antibiótico (furacin) tópico sobre el sitio de la incisión. Se utilizaron tres animales para cada punto en el tiempo. Se implantó una muestra de hueso por ratón y se explantó al cabo de 1 semana, 3 semanas, 6 semanas y 8 semanas. Se lavaron los geles en HBS dos veces y después se trataron con 0,3 mg/ml de pronasa (Calbiochem) para eliminar las células adherentes y el tejido. A continuación, se secaron en el horno las muestras a un peso constante, se extrajeron y se volvieron a hinchar tal como se ha mencionado anteriormente.

55

60

65 Se llevaron a cabo las pruebas de esfuerzo-deformación tanto en los controles (no implantados) como en los huesos explantados en un dispositivo de tipo Instron horizontal pequeño. El dispositivo es una plataforma de aluminio que consiste en dos pinzas montadas planas sobre un tablero de madera entre dos guías de aluminio paralelas. La pinza superior está fija, mientras que la de abajo es móvil. Se recubren ambas superficies de fricción de la pinza móvil y la plataforma con Teflón con soporte de aluminio (Cole-Parmer) para reducir al mínimo la resistencia a la fricción. Se ajusta la pinza móvil a un dispositivo capaz de aplicar una carga en aumento gradual. Se coloca todo el conjunto preparado horizontalmente debajo de un microscopio de disección (Reichert) y se vigila la elongación de

ES 2 220 906 T3

la muestra utilizando una cámara de vídeo. Se toma la imagen de la cámara mediante un procesador de imágenes (Arhys-10, Hamamatsu) y se envía a un monitor. Después de la rotura, se corta una sección transversal de la superficie de rotura y se mide el área. Se divide la carga en la rotura por esta sección transversal para averiguar la resistencia a la tracción máxima. En la tabla 8 se enumeran las resistencias a la fractura de hidrogeles de tetraacrilato de PEG (18,5K) explantados en varios intervalos de tiempo. No se evidencia ningún cambio significativo en la resistencia a la tracción con el tiempo. Así pues, los geles parecen mecánicamente estables a la biodegradación *in vivo* dentro de un intervalo de tiempo máximo de implante en ratones.

TABLA 8

Resistencia a la degradación de implantes de polímero

TIEMPO IMPLANTADO	TENSIÓN (KPa) (mediaterror*)	RESISTENCIA TRACCIÓN MEDIA (mediaterror*)
1 semana	52,8±16,7	0,32±0,19
3 semanas	36,7±10,6	0,37±0,17
6 semanas	73,3±34,9	0,42±0,26
8 semanas	34,1#	0,30#
control	44,9±5,3	0,22±0,22

*Error en función de un margen de confianza de 90%

*# Muestra simple

Ejemplo 18

35 Seguimiento de la calcificación de geles de PEG

Se implantaron intraperitonealmente hidrogeles de tetraacrilato de PEG con forma de disco (peso molar 18,5k) en ratones tal como se ha descrito anteriormente durante un período de 1 semana, 3 semanas, 6 semanas u 8 semanas. Se enjuagaron los geles explantados en HBS dos veces y se trataron con Pronasa (Calbiochem) para eliminar las células y los residuos celulares. A continuación, se equilibraron las muestras en HBS para permitir la difusión de Ca⁺⁺ libre desde la matriz de gel. A continuación, se secaron en horno los geles (Blue-M) a un peso constante y se transfirieron a crisoles de óxido de aluminio (COORS, resistente a altas temperaturas). Se incineraron en una caldera a 700°C durante al menos 16 horas. Se comprobó la incineración total de los crisoles, y cuando se observó algún remanente o residuo se incineró durante 12 horas más. A continuación, se introdujeron en los crisoles 2 ml de HCl 0,5 M para disolver la sal de Ca⁺⁺ y otros minerales de la muestra. Se filtró esta solución y se analizó por espectroscopia de absorción atómica (AA) para determinar el contenido en calcio.

En la tabla 9 se exponen los datos de calcificación en los implantes de gel de tetraacrilato de PEG (peso molar 18,5K). No se observó ningún aumento significativo de la calcificación durante un período de 8 semanas de implantación en ratones.

TABLA 9

Datos de calcificación en implantes de gel de tetraacrilato de PEG (peso molar 18,5K)

TIEMPO (días)	CALCIFICACIÓN (mediaterror) (mg calcio/g de peso gel seco)
7	2,33 ± 0,20
21	0,88 ± 0,009
42	1,08 ± 0,30
56	1,17 ± 0,26

*Error en función de márgenes de confianza de 90%

ES 2 220 906 T3

Ejemplo 19

Uso de geles de PEG como adhesivo para volver a unir nervio cortado

5 Se utilizó una formulación de tetraacrilato de PEG (10%, 18,5K), como adhesivo para estabilizar la aposición sin sutura de los extremos de nervios ciáticos seccionados de rata. Durante los procesos quirúrgicos estériles las ratas fueron sometidas a anestesia con pentobarbital. Se expuso el nervio ciático a través de un acceso lateral desviando las cabezas de los bíceps femoralis a nivel de medio muslo. Se movilizó el nervio ciático aproximadamente 1 cm y se seccionó con unas tijeras de iridectomía a una distancia de aproximadamente 3 mm de la bifurcación tibial-peroneal. 10 El espacio entre ambos extremos de los nervios cortados fue 2-3 mm. Se irrigó la herida con solución salina y se limpió con escobillón para eliminar el exceso de solución salina. Se aplicó solución de tetraacrilato de PEG sin polimerizar estéril sobre la herida. Empleando unas pinzas finas para retener los adventicios o perineurio, se pusieron en aposición los extremos de los nervios, se aplicó la solución de macrómero que contenía 2,2-dimetoxi-2-fenoxiacetofenona como fotoiniciador en los extremos de los nervios y se expuso la herida a luz UV de longitud de onda larga (365 nm) durante 15 aproximadamente 10 segundos para polimerizar el adhesivo. Se empujaron suavemente las pinzas. Se dedicó cuidado a evitar que la solución de macrómero fluyera entre los dos muñones del nervio. Alternativamente, se protegió la unión del muñón del nervio de iluminación, v.g., con una hoja de metal, para evitar la gelificación de la solución de macrómero entre los muñones; a continuación se eliminó por lavado simplemente el resto de la solución de macrómero.

20 En un método alternativo, se pueden mantener juntos ambos extremos del nervio seccionado con un par de pinzas. Se recubren ligeramente las puntas de las pinzas con petrolato para evitar la reacción con el adhesivo.

El adhesivo polimerizado sirve para encapsular la herida y adherir los nervios al músculo subyacente. La anastomosis de los extremos de nervio resiste la movilización suave de la unión, lo que demuestra un grado moderado de estabilización. Se cerraron el músculo y la piel con suturas. El examen posterior al cabo de un mes demuestra que los nervios cortados siguen reconectados, a pesar de la actividad sin limitaciones de los animales.

Ejemplo 20

Adhesivo quirúrgico

Se extirparon colgajos musculares abdominales de conejos blancos neocelandeses hembra y se cortaron en tiras de 1 cm x 5 cm. Los colgajos tenían un grosor de aproximadamente 0,5 a 0,8 cm. Se obtuvo un reborde, 1 cm x 1 cm, utilizando los dos colgajos. Se evaluaron dos composiciones de macrómero diferentes di- y tetraacrilato de PEG, 0,4K (di-) y 18,5K (tetra-). La composición de 0,4K era un líquido viscoso y se utilizó sin posterior dilución. Se utilizó la composición de 18,5K como una solución al 23% p/p en HBS. Se añadieron 125 μ l de solución de eosina de etilo en n-vinil pirrolidona (20 mg/ml) junto con 50 μ l de trietanolamina a cada ml de la solución adhesiva. Se aplicaron 100 μ l de solución adhesiva a cada uno de los colgajos colgantes. A continuación, se irradió el reborde por escáner con un láser iónico de argón de 2 W durante 30 segundos por cada lado. Se evaluó la resistencia de las uniones resultantes midiendo la fuerza necesaria para desplazar en cizalla el reborde. Se grapó uno de los extremos del reborde y se aplicó una carga en aumento en cada uno de los extremos, al mismo tiempo que se mantenía la unión horizontalmente hasta que falló. Se sometieron a prueba cuatro uniones para cada composición. Las uniones de 0,4 K tenían una resistencia de $12,0 \pm 6,9$ KPa (media \pm error típico), mientras que las uniones de 18,5 K tenían una resistencia de $2,7 \pm 0,5$ KPa. Es significativo observar que fue posible conseguir una fotopolimerización y una resistencia de unión razonable a pesar del grosor de 6-8 mm del tejido. Una estimación espectrofotométrica utilizando 514 nm de luz mostró una transmisión del 1% a través de dicho tejido muscular.

Ejemplo 21

Modificación de polialcohol vinílico

Se disolvieron 2 g de polialcohol vinílico (peso molar 100.000-110.000) en 20 ml de DMSO caliente. Se enfrió la solución a temperatura ambiente y se añadieron 0,2 ml de trietilamina y 0,2 ml de cloruro de acrilófilo con agitación vigorosa, bajo una atmósfera de argón. Se calentó la mezcla de reacción a 70°C durante 2 horas y se enfrió. Se hizo precipitar el polímero en acetona, se volvió a disolver en agua caliente y se hizo precipitar de nuevo en acetona. Finalmente, se secó al vacío durante 12 horas a 60°C. Se mezclaron 5-10% p/v de solución de este polímero en PBS con el fotoiniciador UV y se polimerizó utilizando una luz de UV de longitud de onda larga para preparar microsferas de 200-1000 micrómetros de tamaño.

60 Estas microsferas fueron estables al autoclaveado en agua, lo que indica que el gel está reticulado covalentemente. El gel es enormemente elástico. Se puede utilizar este macrómero, multiacrilato de PVA, para aumentar la densidad de reticulación en geles de diacrilato de PEG, con los cambios correspondientes en las propiedades mecánicas y la permeabilidad. Podría perseguirse este método con cualquier número de polímeros hidrosolubles químicamente modificados con grupos fotopolimerizables, por ejemplo, con polímeros hidrosolubles seleccionados entre polivinilpirrolidinona, polietiloxazolina, copolímeros de polióxido de etileno-polióxido de propileno, polisacáridos como dextrano, alginato, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de heparano, goma guar, goma de gelano, goma xantana, goma de carragenano y proteínas, tales como albúmina, colágeno y gelatina.

ES 2 220 906 T3

Ejemplo 22

Uso de fracciones fotopolimerizables alternativas

5 Se pueden utilizar muchos grupos fotopolimerizables para dar lugar a la gelificación. Para ilustrar una síntesis alternativa típica, a continuación se describe la síntesis de metacrilato de uretano de PEG 1K.

10 Se disolvieron en un matraz de fondo redondo de 250 ml, 10 g de diol de PEG 1K en 150 ml de benceno. Se introdujeron lentamente 3,38 g de metacrilato de 2-isocianatoetilo y se introdujeron lentamente 20 μ l de dilaurato de dibutylestano en el matraz. Se sometió a reflujo la reacción durante 6 horas, se enfrió y se vertió en 1000 ml de hexano. A continuación, se filtró el precipitado y se secó al vacío a 60°C durante 24 horas. En este caso, se unió un grupo polimerizable de radicales libres de metacrilato al polímero a través de una unión uretano, en lugar de una unión éster tal como se obtiene, v.g., cuando se hace reaccionar con cloruro de ariloxi.

15 Ejemplo 23

Formación de microcápsulas de alginato-PLL-alginato con policaciones fotopolimerizables

20 Se obtienen microcápsulas de alginato-polilisina-alginato absorbiendo, o coacervando, un policación, como por ejemplo polilisina (PLL), sobre una microesfera gelificada de alginato. Se mantiene la membrana resultante unida a través de las interacciones entre las cargas y tiene por tanto una estabilidad limitada. Para aumentar esta estabilidad, se puede hacer fotopolimerizable el policación por adición de un enlace doble carbono-carbono, por ejemplo. Esto se puede utilizar para aumentar la estabilidad de la membrana por sí misma, o para su reacción por ejemplo con PEG fotopolimerizable para aumentar la biocompatibilidad.

25 Para ilustrar la síntesis de dicho policación fotopolimerizable, se pesó 1 g de hidrocloreto de polialilamina en un vaso de precipitados de vidrio de 100 ml y se disolvió en 10 ml de agua destilada (AD). Se ajustó el pH de la solución de polímero a 7 utilizando una solución de hidróxido sódico 0,2 M. A continuación, se separó el polímero haciéndolo precipitar en un gran exceso de acetona. A continuación, se volvió a disolver en 10 ml de agua destilada y se transfirió la solución a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se introdujeron lentamente 0,2 ml de metacrilato de glicidilo en el matraz de reacción y se agitó la mezcla de reacción durante 48 horas a temperatura ambiente. Se vertió la solución en 200 ml de acetona y se separó el precipitado por filtración y se secó al vacío. Este macrómero es útil para estabilizar fotoquímicamente el alginato-PLL-alginato, tanto en presencia como en ausencia de una segunda especie polimerizable como por ejemplo diacrilato de PEG.

35 Además del uso en la encapsulación de células en materiales como alginato, estos policaciones fotopolimerizables pueden ser útiles como un agente de imprimación o acoplamiento para aumentar la adhesión del polímero a las células, agregados de células, tejidos y materiales sintéticos, en virtud de la absorción de la unión de polímero fotopolimerizable al gel fotopolimerizable de PEG.

40 Ejemplo 24

Encapsulación de hemoglobina para eritrocitos sintéticos

45 Se puede encapsular hemoglobina en su forma libre en geles de PEG y retener mediante la sección de una longitud de cadena de PEG y una densidad de reticulación que evite la difusión. La difusión de la hemoglobina desde los geles se puede impedir además con el uso de polihemoglobina que es una forma reticulada de hemoglobina. La molécula de polihemoglobina es demasiado grande como para difundirse desde el gel de PEG. La encapsulación adecuada de hemoglobina tanto nativa como reticulada se puede emplear para la fabricación de eritrocitos sintéticos. El atrapamiento de hemoglobina en esferas pequeñas, inferiores a cinco micrómetros, de estos materiales altamente biocompatibles debería conducir a unos tiempos de circulación mejorados en relación con la hemoglobina reticulada o la hemoglobina encapsulada en liposoma.

55 Se mezcla la hemoglobina en PBS con el prepolímero según la siguiente formulación:

Hemoglobina a la cantidad deseada

60 PEG DA (PM 10000)	35%
PEG DA (PM 1000)	5%
PBS	60%

con 2,2-dimetoxi, 2-fenil- acetofenona a 1,6% de esta solución.

65 Se coloca esta solución en aceite mineral en una proporción de 1 parte de hemoglobina/solución de prepolímero por 5 partes de aceite mineral y se agita con rapidez con una mezcladora con motor para formar una emulsión, que se ilumina después con luz ultravioleta de longitud de onda larga (360 nm) durante 5 minutos para reticular el prepolímero de PEG para formar un gel. Se puede seleccionar el peso molecular del prepolímero para que resista la difusión de

ES 2 220 906 T3

la hemoglobina desde el gel, dando una menor difusión los pesos moleculares de PEG más reducidos. El PEG DA de peso molecular 100.00, reticulados además con PEG DA 1000, deberá poseer la selectividad de permeabilidad apropiada para restringir la difusión de hemoglobina y deberán poseer la biocompatibilidad apropiada para circular dentro de la corriente sanguínea.

5

Ejemplo 25

Atrapamiento de enzimas para corrección de trastornos metabólicos y quimioterapia

10 La deficiencia congénita de la enzima catalasa causa acatalasemia. La inmovilización de catalasa en redes de gel de PEG podría proporcionar un método de sustitución de enzima para tratar esta enfermedad. El atrapamiento de glucosidasa puede ser similarmente útil para el tratamiento de enfermedad de Gaucher. Se pueden utilizar geles de PEG microesféricos que atrapan ureasa en sangre extracorpórea para convertir urea en amoníaco. Las enzimas como asparaginasa se pueden degradar en aminoácidos que necesitan las células de tumor. La inmunogenicidad de estas
15 enzimas previene el uso directo para quimioterapia. El atrapamiento de estas enzimas en geles PEG, sin embargo, puede servir como apoyo de una quimioterapia con éxito. Se puede desarrollar una formulación adecuada tanto para la liberación lenta como para no liberar la enzima.

Se mezcla catalasa en PBS con el prepolímero según la siguiente formulación:

20

Catalasa en la cantidad deseada

25

PEG DA (PM 10000)	35%
PEG DA (PM 1000)	5%
PBS	60%

con 2,2-dimetoxi, 2-fenil acetofenona a 1,6% de esta solución.

30

Se coloca esta solución en aceite mineral en una proporción de 1 parte de solución catalasa/prepolímero por 5 partes de aceite mineral y se agita con rapidez con una mezcladora de motor para formar una emulsión. Se ilumina esta emulsión con una luz ultravioleta de longitud de onda larga (360 nm) durante 5 minutos para reticular el prepolímero de PEG para formar un gel. Se puede seleccionar el pm del prepolímero para que resista la difusión de la catalasa desde el gel, produciendo una menor difusión pesos moleculares de PEG DA más reducidos.

35

PEG DA de PM 10.000, reticulado además con PEG DA 1000, deberá poseer la selectividad de permeabilidad apropiada para restringir la difusión de catalasa y deberá poseer la selectividad de permeabilidad apropiada para permitir la difusión del peróxido de hidrógeno en la catalasa atrapada en el gel para evitar la eliminación enzimática del peróxido de hidrógeno de la corriente sanguínea. Por otra parte, deberá poseer la biocompatibilidad apropiada para circular dentro de la corriente sanguínea.

40

De esta forma, se utiliza el gel para que contenga de forma controlada un agente bioactivo dentro del cuerpo. El agente activo (enzima) es grande y se retiene dentro del gel, y el agente sobre el que actúa (sustrato) es pequeño y se puede difundir en el compartimento rico en enzimas. No obstante, se prohíbe que el agente activo abandone el cuerpo o el compartimento del organismo diana, ya que no puede salirse por difusión del compartimento de gel.

45

Ejemplo 26

Microencapsulación celular para la evaluación de fármacos de anti-virus de inmunodeficiencia humana in vivo

50

Se pueden encapsular células T-linfoblastoides humanas infectadas con VIV o sin infectar en geles PEG tal como se ha descrito para otras células arriba. Estas microcápsulas se pueden implantar en un animal no humano para crear un sistema de ensayo para fármacos anti-VIH, y tratarse después con fármacos de ensayo como AZT o DDI. Después del tratamiento, se pueden recoger las microcápsulas y realizar una detección selectiva de las células encapsuladas para determinar la viabilidad y la normalidad funcional utilizando un ensayo de célula viva/muerta de diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio. La supervivencia de las células infectadas indica una acción del fármaco con éxito. La falta de biocompatibilidad es un problema documentado en este método para evaluaciones de fármaco, pero se puede superar utilizando los geles aquí descritos.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método no citotóxico para encapsular, sellar, conectar, o soportar un material biológico o para la preparación de un sustrato biocompatible, incluyendo dicho método:

a) Proporcionar una mezcla de monómero mezclando:

10 (i) Un macrómero biocompatible hidrosoluble polimérico sintético que comprende al menos dos sustituyentes polimerizables por radicales libres, siendo el macrómero no tóxico y con un peso molecular de al menos 400; y

(ii) un iniciador de polimerización de radicales libres no tóxico seleccionado entre un iniciador de radicales libres que se puede activar por la luz ultravioleta de longitud de onda larga o luz visible;

15 (b) Recubrir un material biológico o un sustrato *in vitro* con la mezcla de macrómero, seleccionándose el material biológico del grupo que consiste en células de mamífero, orgánulos sub-celulares, componentes subcelulares, y agregados de células de mamífero y seleccionándose el sustrato entremicrocápsulas, matrices tejidas, matrices porosas e implantes prostéticos; y

20 c) exponer el material biológico recubierto o sustrato recubierto a luz ultravioleta de longitud de onda larga o visible para causar la polimerización de los macrómeros, formando así un gel polimérico con un grado de polimerización superior a 10.

25 2. Un método no citotóxico para encapsular, sellar, conectar o soportar un material biológico, consistiendo dicho método en:

a) Poner en contacto un material biológico con una solución de un iniciador de polimerización de radicales libres no tóxico seleccionado del grupo que consiste en iniciadores que se pueden activar por luz ultravioleta de longitud de onda larga o luz visible, para permitir la unión del iniciador con el material biológico;

30 b) eliminar el iniciador sin unir por lavado o dilución;

35 c) poner en contacto el material biológico *in vitro* con un macrómero biocompatible no tóxico hidrosoluble que consiste en al menos dos sustituyentes polimerizables por radicales libres, teniendo el macrómero un peso molecular de al menos 400; y

d) exponer el material biológico a un agente que activa dicho iniciador para causar la polimerización de los macrómeros, formando así un gel polimérico con un grado de polimerización superior a 10.

40 3. El método de la reivindicación 2, en el que el material biológico se selecciona del grupo que consiste en células de mamífero, organelos subcelulares, componentes subcelulares y agregados de células de mamífero.

4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que los sustituyentes polimerizables por radicales libres contienen enlaces dobles o triples carbono-carbono.

45 5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que se utiliza el iniciador junto con un catalizador no tóxico.

50 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el macrómero hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en poli(etilen glicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(vinil pirrolidona), poli(etiloxazolina) o un copolímero de bloque o al azar de los mismos, que comprende dos o más sustituyentes polimerizables por radicales libres.

55 7. El método de la reivindicación 2 en el que el monómero hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en poli(aminoácidos), polisacáridos, proteínas o un copolímero de bloque o al azar de los mismos, que comprende dos o más sustituyentes polimerizables por radicales libres.

8. El método de la reivindicación 7 en el que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en alginato, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dextrano, sulfato de dextrano, heparina, sulfato de heparina, sulfato de heparano, quitosán, goma de gelano, goma xantana, goma guar y k-carragenano.

60 9. El método de la reivindicación 7 en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en gelatina, colágeno, albúmina, zeína y elastina.

65 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el gel se prepara a partir de macrómeros que comprenden un poli(etilen glicol) terminado en acrilato.

11. El método de la reivindicación 1 ó 2 para encapsular una molécula biológicamente activa, seleccionándose la

ES 2 220 906 T3

molécula biológicamente activa del grupo que consiste en péptidos, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, fármacos orgánicos y fármacos inorgánicos.

5 12. El método de la reivindicación 1 ó 2 en el que los iniciadores de polimerización se seleccionan del grupo que consiste en colorante de eosina, colorante de eosina sustituida, eosina Y, eosina de etilo, riboflavina, acetofenona, una acetofenona sustituida, un colorante de fluoresceína, un colorante de fluoresceína sustituida, canforquinona, rosa de bengala, verde de metileno, azul de metileno, naranja de acridina, eritrosina, floximina, tionina, colorantes de xantina y colorantes de tioxantina.

10 13. El método de la reivindicación 5 en el que el catalizador es una amina.

15 14. El método de la reivindicación 13 en el que la amina se selecciona del grupo que consiste en trietanolamina, trietilamina, etanolamina, N-metil dietanolamina, N,N-dimetil bencilamina, dibencil amina, N-bencil etanolamina, N-isopropil bencilamina, tetrametil etilen-diamina, lisina, ornitina, histidina y arginina.

15 15. El método de la reivindicación 1 ó 2 en el que la polimerización se inicia con luz que tiene una longitud de onda comprendida entre 320 nm y 800 nm.

20 16. El método de la reivindicación 15 en el que la luz tiene una longitud de onda de 514 nm a 365 nm.

20 17. El método de la reivindicación 3 en el que el iniciador sin unir se elimina por dilución con la solución de macrómero de manera que la polimerización tiene lugar solamente en la superficie de la célula de mamífero, organelo subcelular, componente subcelular o agregado celular de mamífero.

25 18. El método de la reivindicación 1, en el que la solución de macrómero se moldea y después se polimeriza.

19. El método de la reivindicación 1, en el que el gel contiene una estructura de soporte.

30 20. El método de la reivindicación 1 en el que se selecciona el polímero y se controla la polimerización para producir una permeabilidad deseada alrededor del material biológico o sustrato biocompatible encapsulado.

21. El método de la reivindicación 1 en el que se recubre el macrómero sobre la superficie de un objeto tridimensional y se irradia la superficie recubierta con luz para iniciar la polimerización de macrómero.

35 22. El método de la reivindicación 1, en el que se pre-absorbe el policatión fotopolimerizable en el material biológico o sustrato que se va a encapsular para aumentar la unión del gel al material biológico o sustrato.

40 23. El método de la reivindicación 1 ó 2 en el que el material biológico se selecciona entre líneas de células de mamífero primarias o establecidas, organelos subcelulares y componentes no organelo subcelulares.

45 24. El método de la reivindicación 23 en el que la línea celular se selecciona entre células de islote pancreático, fibroblastos de prepucio humano, células de ovario de hámster chino, insulomas de células beta, células de leucemia linfoblástica, células 3T3 de ratón, fibroblastos, células mesencefálicas ventrales que segregan de dopamina, células neuroblastoides, células de médula suprarrenal y células T.

45 25. El método de la reivindicación 1 en el que se encapsula primero el material biológico en una microcápsula.

50 26. El método de la reivindicación 25 en el que la microcápsula consiste en polímeros coagulables iónicamente o coagulables térmicamente que son no tóxicos para el material encapsulado.

50 27. El método de la reivindicación 1 en el que la solución de macrómero incluye además un acelerador para acelerar la velocidad de polimerización.

55 28. El método de la reivindicación 27 en el que el acelerador consiste en una molécula pequeña que contiene un grupo alilo, vinilo o acrilato.

60 29. El método de la reivindicación 28 en el que el acelerador se selecciona del grupo que consiste en N-vinil pirrolidinona, 2-vinil piridina, 1-vinil imidazol, 9-vinil carbazol, ácido acrílico y 2-aliil, 2-metil, 1-3-ciclopentano diona.

60 30. El método de la reivindicación 1 en el que la mezcla de macrómero es una solución acuosa.

65 31. Un material biológico o un sustrato biocompatible que se puede obtener a través del método de la reivindicación 1 o un material biológico que se puede obtener a través del método de la reivindicación 2 para su uso en medicina.

65 32. Uso de un material biológico o un sustrato biocompatible que se puede obtener a través del método de la reivindicación 1, o un material biológico que se puede obtener a través del método de la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de defectos o enfermedades metabólicas.

ES 2 220 906 T3

33. Uso de una mezcla de macrómero según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 16, 18 a 20, 22 y 27 a 30 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o defectos metabólicos.

5 34. Uso de una mezcla de macrómero según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 16, 18 a 20, 22 ó 27 a 30 en la fabricación de un medicamento para su uso como adhesivo, soporte de tejido o conexión, o como barrera para prevenir la interacción de un tejido celular con otro tejido o célula.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

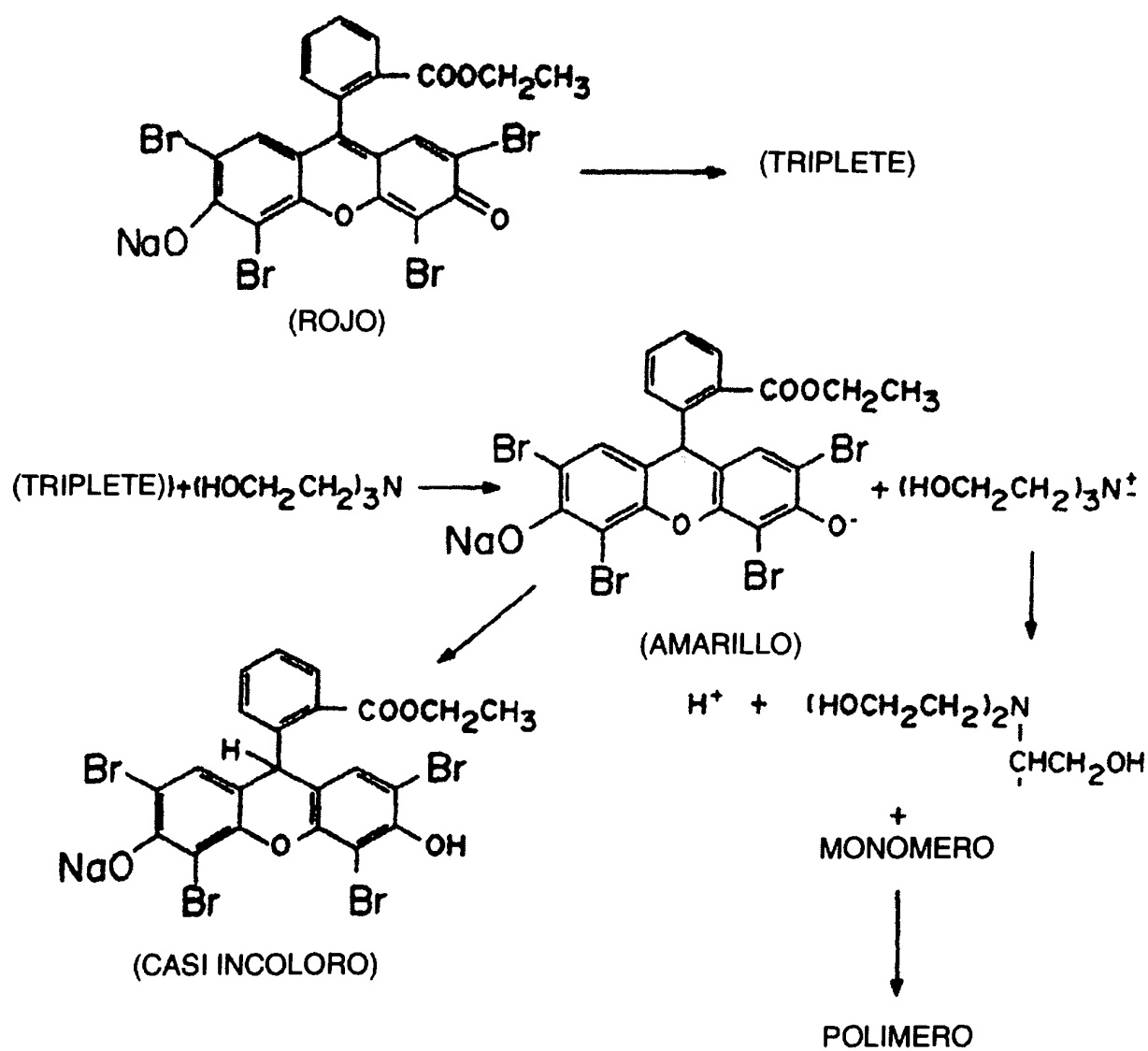


FIG. 1

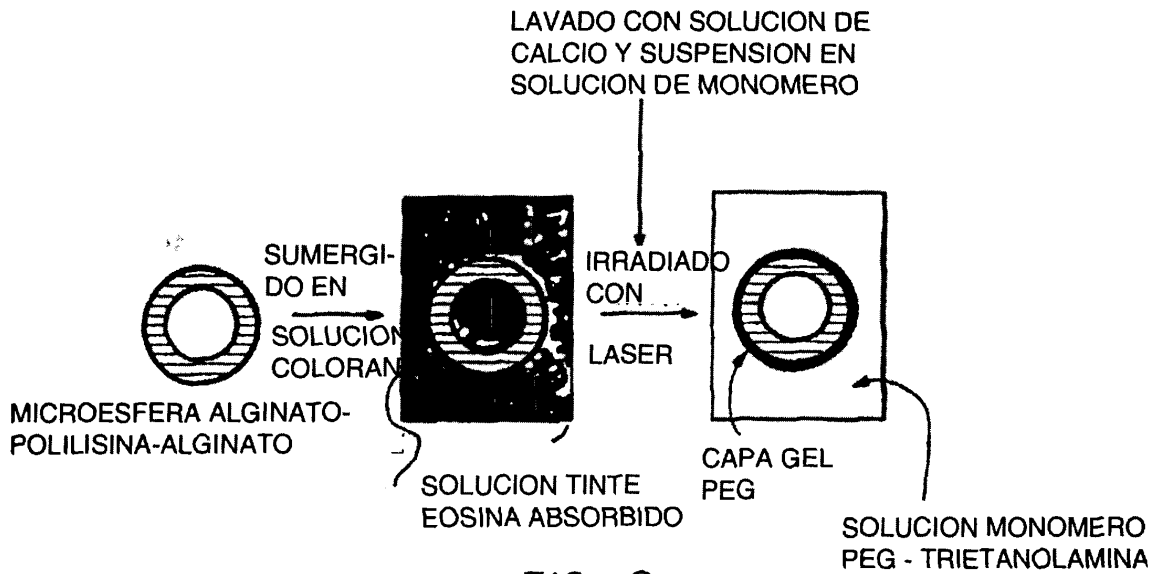


FIG. 2a

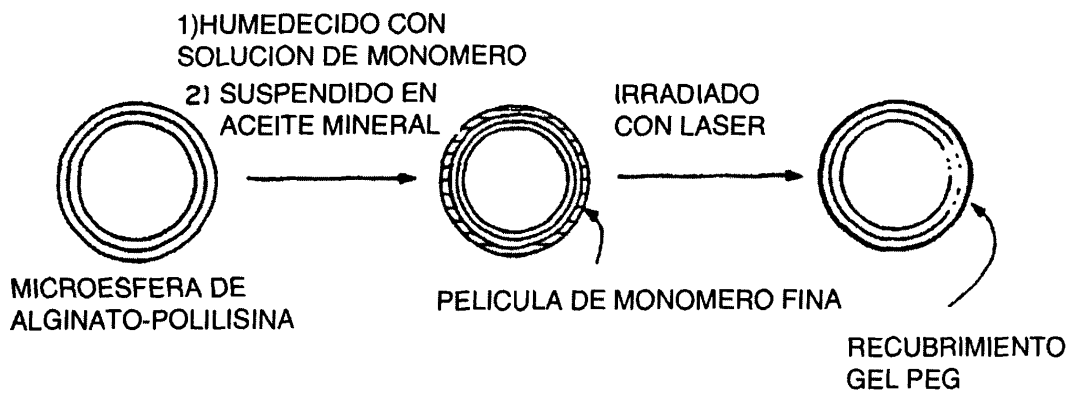


FIG. 3

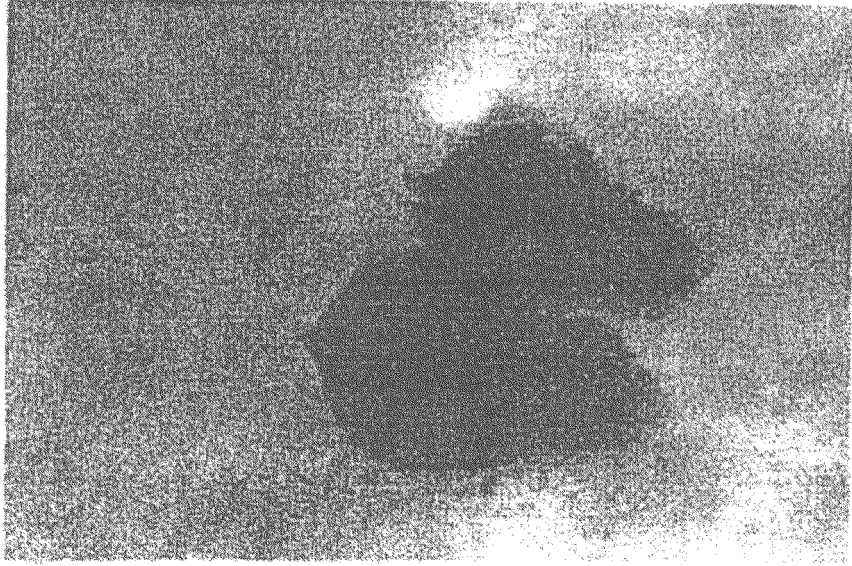


FIG. 4

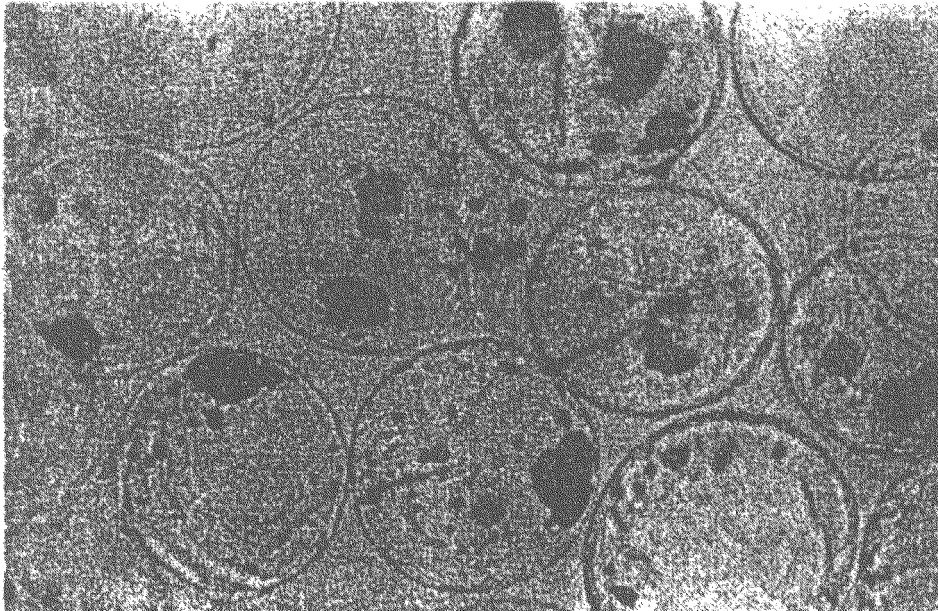
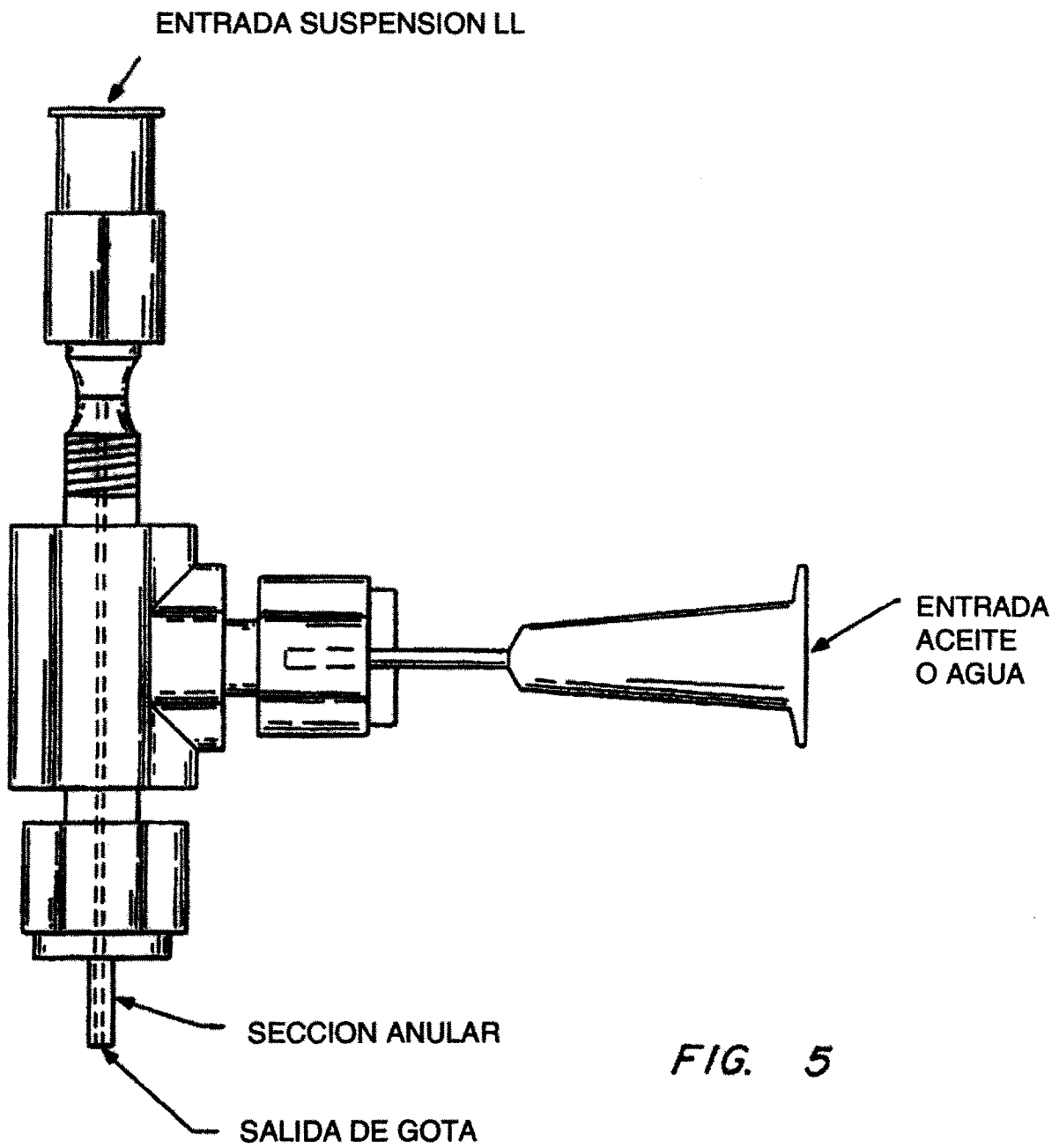


FIG. 2b



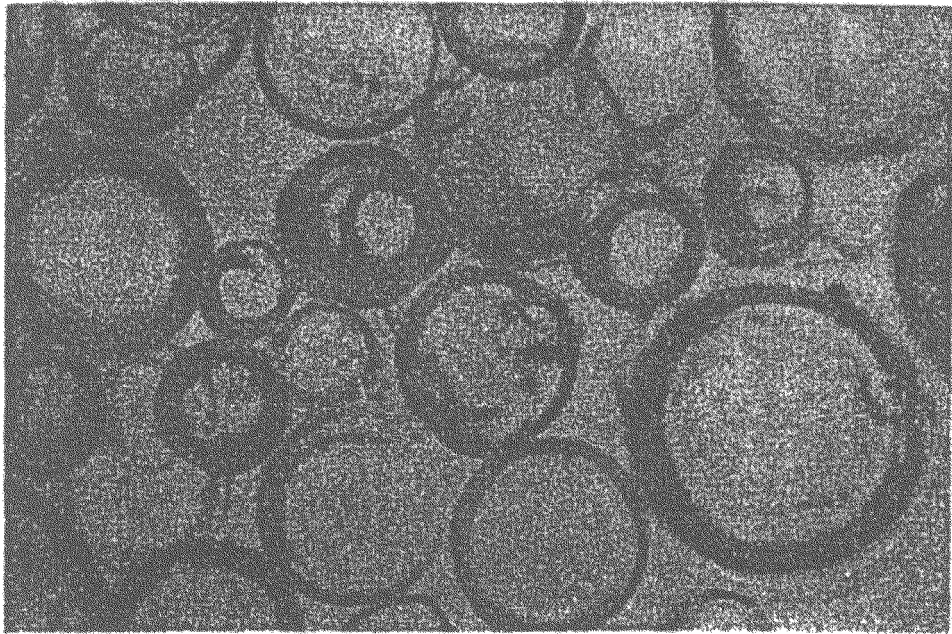


FIG. 6

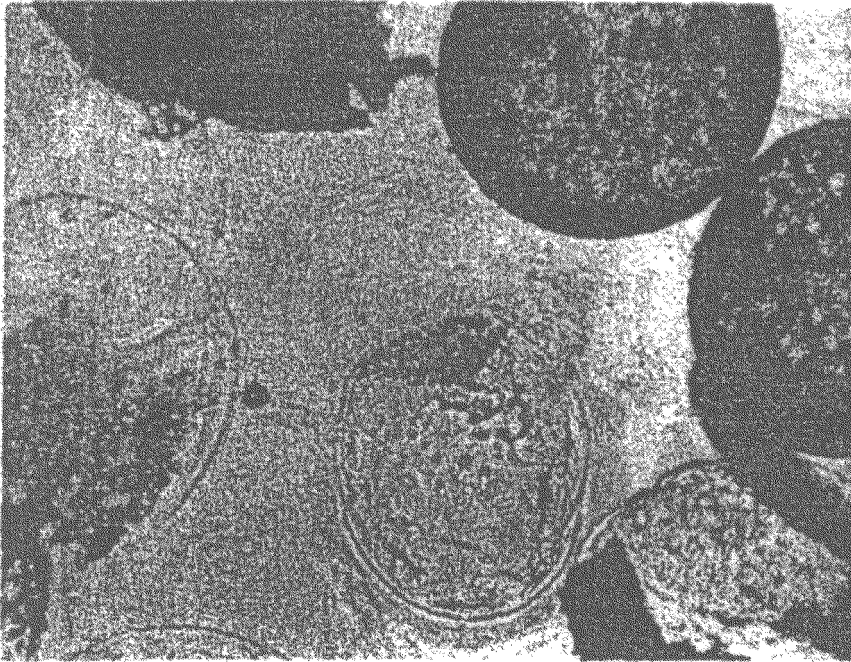


FIG. 7a

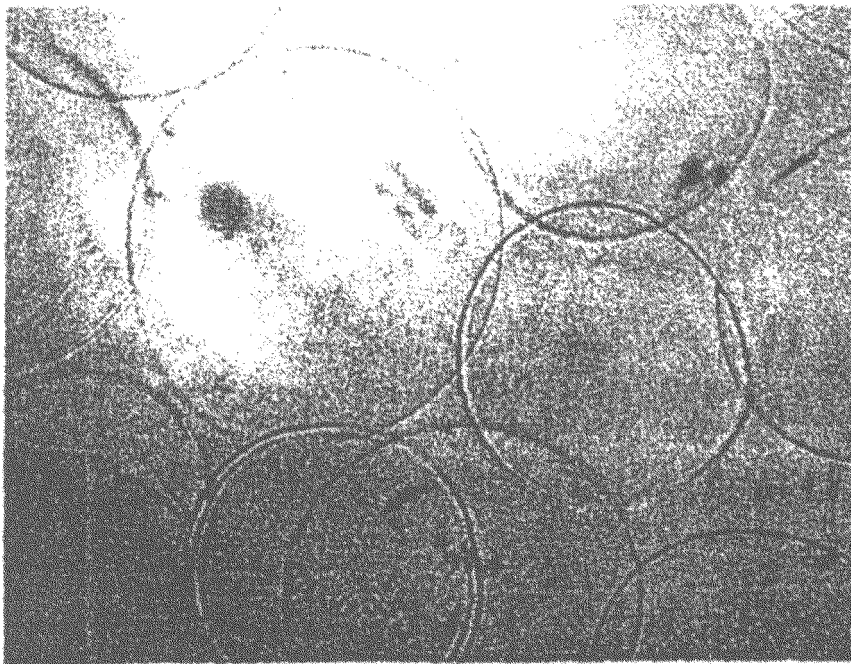


FIG. 7b

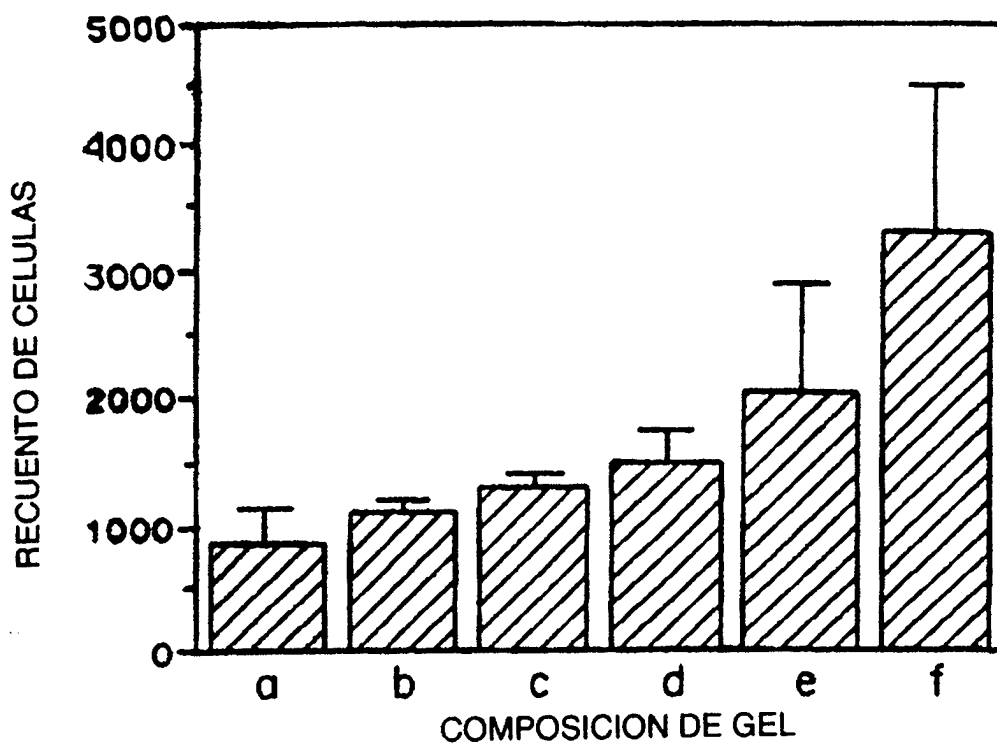


FIG. 8

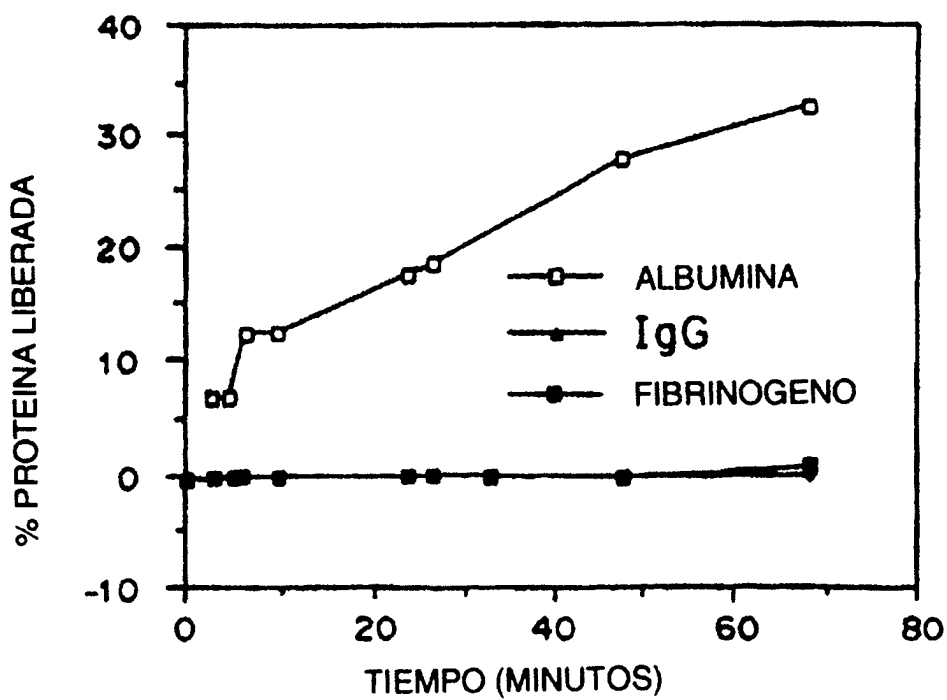


FIG. 9

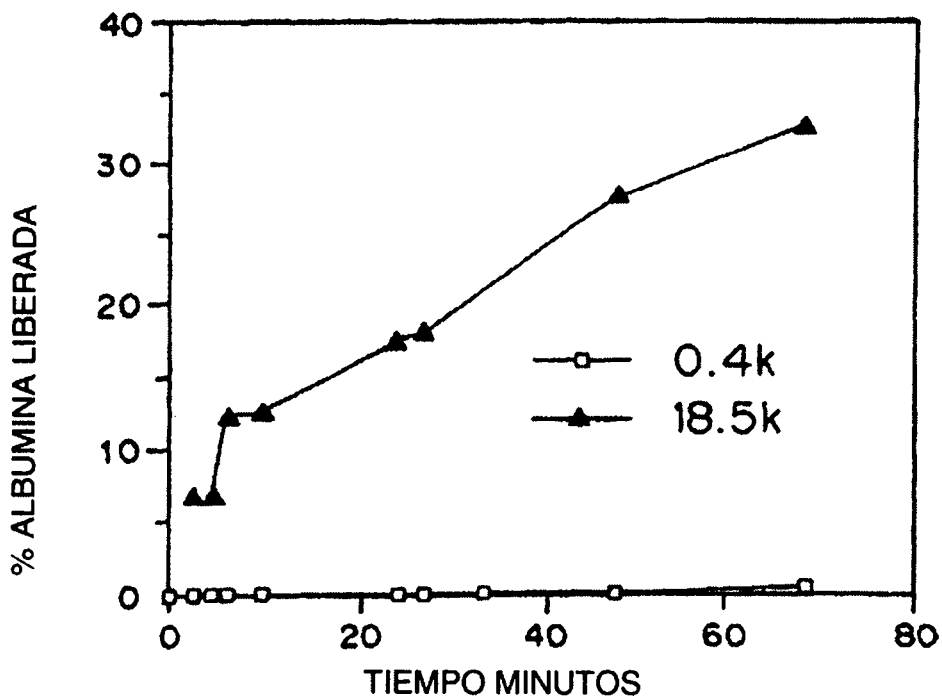


FIG. 10

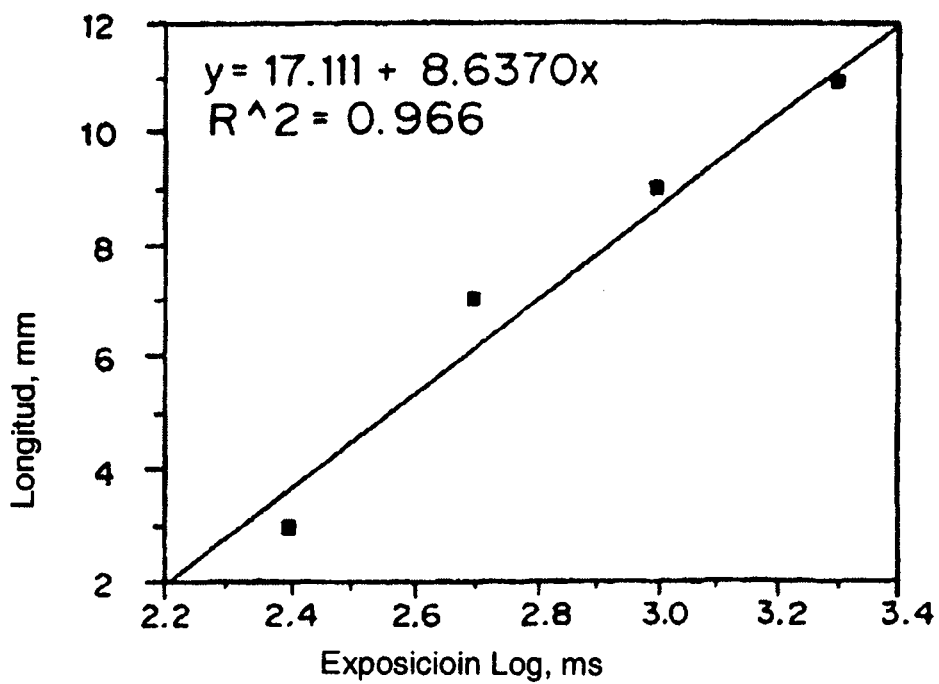


FIG. 11a



FIG. 11b

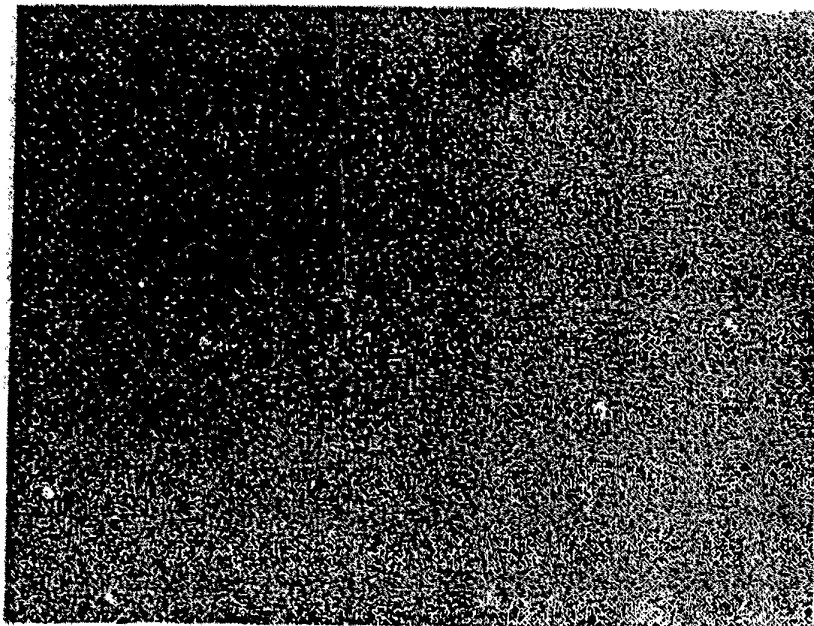


FIG. 12a

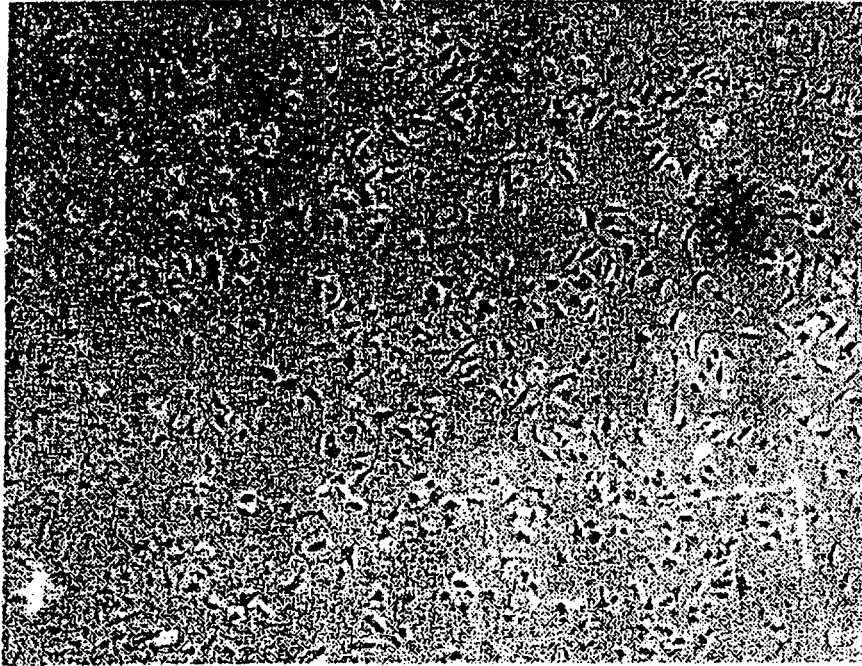


FIG. 12b

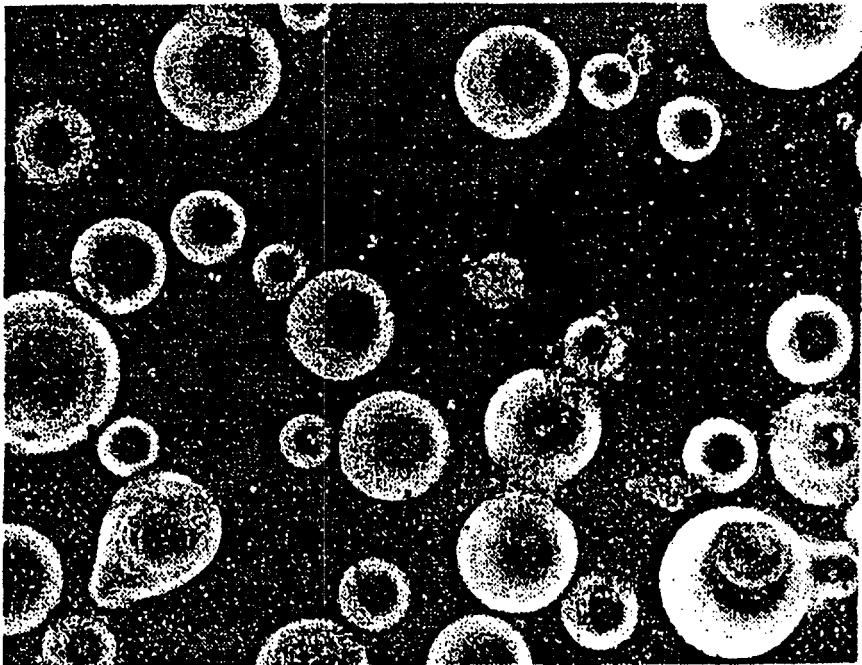


FIG. 13