



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 368 036**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
G01N 33/559 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745605 .2**
96 Fecha de presentación : **10.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1407267**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Composiciones de gel.**

30 Prioridad: **10.07.2001 GB 0116860**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2011

73 Titular/es: **De Montfort University
Intellectual Property Advice Centre
Innovations Centre Oxford Street
Leicester LE1 5XY, GB**

72 Inventor/es: **Taylor, Margaret Joan**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 036 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

Composiciones de gel

La presente invención se refiere a unas composiciones de gel que comprenden unos restos gelificantes que se unen entre sí para formar un gel. La unión de los restos gelificantes depende del nivel de un analito específico y puede ser reversible. Tales geles se emplean en la supervisión del nivel del analito en una muestra y en la administración de fármacos en respuesta a unos niveles anormales del analito.

En la técnica anterior, el documento WO 93/13803 da a conocer un gel que, en una realización, comprende dextrano y concanavalina A (Con A). Los residuos de glucosa terminales de dextrano se unen con la Con A, lo que da como resultado la formación de un gel de una viscosidad más alta. La inversión de esta unión se produce cuando la glucosa libre compite con los residuos de glucosa del dextrano por la unión con la Con A. De este modo, el gel es sensible a la cantidad de glucosa libre con la que se pone en contacto. En ese sentido, el gel puede usarse como un sistema de administración de fármacos que usa un fármaco anti-hiperglucémico tal como la insulina. A unos niveles normales de glucosa, el dextrano se une con la Con A y el gel conserva la insulina en su interior. No obstante, cuando el nivel de glucosa se eleva, el grado de unión cae, liberando la insulina. En una situación fisiológica, la liberación de insulina dará como resultado que el nivel de glucosa caiga y el grado de unión aumentará, evitando de este modo la liberación de insulina adicional. De este modo, el sistema de administración de fármacos forma un sistema de "lazo cerrado" que tiene el mismo efecto que un páncreas que funciona normalmente, en el que se libera insulina a medida que se precisa (cuando la glucosa hace que el gel experimente una transición gel-sol) y se retiene cuando no se precisa (cuando la falta de glucosa hace que el gel experimente la transición sol-gel).

Geles similares se dan a conocer en Obaidat y Park, *Biomaterials* 18 (noviembre de 1997): 801 a 806; Obaidat y Park, *Pharmaceutical Research* 12 (supl. 9 de 1995); Obaidat y Park, *Pharmaceutical Research* 13 (julio de 1996): 989 a 995; y Valuev, y col., *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A & Seriya B* (1997): 751 a 754.

Un gel de este tipo se da a conocer para su uso como un sensor de glucosa en el documento DE-A-4203466. El gel se ubica en un tubo semipermeable de manera que el cambio en la viscosidad del gel que es resultado del cambio gel-sol reversible hace que la superficie del gel responda a una señal de oscilación. El grado de respuesta depende de la viscosidad del gel y por consiguiente de la concentración de glucosa. Un trabajo posterior describe la respuesta de un gel de este tipo a la glucosa tal como se mide mediante la resonancia de plasmones de superficie (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) para medir la cinética de la respuesta en lugar de la viscosidad en sí misma (Ballerstadt y Schultz, *Sensors and Actuators B Chemical*, (1998), 46: 557 a 567). En lugar de producir un gel, se inmovilizó una lectina sobre una superficie y se midió el desplazamiento de una lectina marcada con fluorescencia con una óptica láser. De este modo, este último trabajo no usaba el cambio en la viscosidad como una medida de los niveles de glucosa. De forma similar, el documento DE-A-4034565 describe la medición de la lectina radioactiva a partir de perlas de dextrano reticulado.

También en la técnica anterior, el documento US 4705503 da a conocer un detector de metabolito que tiene un gel sensible a la glucosa como un controlador de flujo para la liberación de insulina. Los restos gelificantes son dextrano y Con A, uno de los cuales puede estar covalentemente unido a una matriz de materiales en perlas, de malla o de fibras.

El documento WO 01/16575 da a conocer un gel en el que se unen Con A y glucosa a un hidrogel. Cuando hay glucosa libre presente, la reticulación de hidrogel producida por la Con A y la glucosa unida se reduce y el hidrogel se hincha, lo que da como resultado una señal que se relaciona con la concentración de glucosa.

Tauna y Taylor (1998), *Pharm. Pharmacol Common*. 4: 117 a 122, y Tanna y col. (1999), *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 1093 a 1098 hacen referencia a unos geles de polisacárido-lectina reversibles, en los que los restos gelificantes, dextrano y Con A, se unen de forma covalente entre sí mediante la reacción de Schiff.

El documento US 5889028 da a conocer un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal administrando localmente en el colon una cantidad efectiva de nicotina y un carbómero. El documento WO 98/22097 da a conocer un sistema de matriz de liberación controlada que comprende una mezcla de poli(ácido acrílico) y un monómero o un polímero polar. El documento WO 00/09165 da a conocer conjugados de dextrano-leptina. El documento US 5939094 da a conocer formas de dosificación para la administración transdérmica de la apomorfina.

Finalmente, el documento WO 99/48419 describe el uso de un circuito integrado sensible a la viscosidad para medir el cambio en la viscosidad de un gel reversible (específicamente un gel de Ficoll-Con A) para determinar el nivel de glucosa en una muestra que va a analizarse.

Un problema de los geles de este tipo es que son miscibles con agua y por consiguiente son propensos a dispersarse. Este problema se hace particularmente acusado si se usan *in vivo* para detectar un analito particular, debido a que los componentes del gel pueden dar lugar a una reacción inmunitaria no deseada: de hecho, la Con A es mitogénica. Por este motivo, los geles pueden estar encerrados por una membrana semipermeable que permitirá el paso del analito en contacto con el gel. No obstante, con el fin de que el gel reaccione a unos niveles cambiados de analito dentro de un intervalo razonable, el analito debe ser capaz de pasar rápidamente a través de la

membrana semipermeable. Además, en las situaciones en las que va a liberarse un fármaco, la membrana debe permitir una liberación rápida. Para asegurar tal pasaje rápido, la membrana necesita tener unas aberturas relativamente grandes y/o ser relativamente delgada, con el resultado de que los componentes del gel pueden filtrarse a través de la membrana semipermeable. Por ejemplo, un gel del tipo que se describe en el documento WO 93/13803 es miscible en agua y debe confinarse en una membrana de poros pequeños para evitar una dispersión rápida de los componentes gelificantes, especialmente en las formas de disolución inducidas por unos niveles de glucosa elevados. No obstante, los tamaños de poro (por ejemplo, 0,1 μm) que no limitan la velocidad para la liberación del hexámero de insulina de 36 kD aún permiten que escapen el tetrámero de Con A de 110 kD y, en un menor grado, el dextrano.

Es por lo tanto deseable producir un gel del tipo que se describe anteriormente que es menos propenso a dispersarse.

La invención se describirá con referencia a los dibujos que los acompañan, en los que:

la figura 1 ilustra la polimerización de unos derivados de metacrilato de dextrano y Con A;
 la figura 2 es una representación esquemática de un copolímero de dextrano–Con A que es resultado de la polimerización de unos derivados de metacrilato de dextrano y Con A;
 la figura 3 ilustra cómo puede formarse una matriz cuando al menos uno de los componentes de la matriz es al menos trivalente;
 la figura 4 es una representación esquemática de un gel de acuerdo con la presente invención;
 la figura 5 es una representación esquemática de otro gel de acuerdo con la presente invención;
 la figura 6 ilustra la adición de carbodiimida de una entidad que contiene amina, tal como la Con A, a un soporte que porta carboxilos, tales como carbómero;
 la figura 7 ilustra unas rutas de difusión de la insulina y unas estructuras antes y después de un injerto de Con A en unas superficies de partículas de carbómero;
 la figura 8 es una gráfica que ilustra que la adición de glucosa a un gel acuoso que se formula con dextrano y Con A conduce a una pérdida de viscosidad;
 la figura 9 es una gráfica que muestra que la adición de glucosa a unos geles con un contenido en carbómeros que se formulan con dextrano y Con A conduce a una pérdida de viscosidad en el mismo intervalo de concentraciones de glucosa que en una formulación acuosa;
 la figura 10 es una gráfica que muestra que la adición de glucosa a un gel con un contenido en carbómeros que se formula con dextrano y Con A conduce a una pérdida de viscosidad tanto a 20 °C como a 37 °C;
 la figura 11 es una gráfica que ilustra la reducción de viscosidad tras la adición de glucosa para unos geles que contienen carbómero que se formulan con dextrano y Con A, y un gel acuoso que se formula con dextrano y Con A, que se muestra como un porcentaje de la viscosidad original;
 las figuras 12a y 12b son unas gráficas que ilustran la liberación de proteínas a partir de un gel;
 las figuras 13a y 13b son unas gráficas que ilustran la liberación de la Con A a partir de unos derivados de metacrilato polimerizables de Con A que se han sometido a grados de polimerización variables;
 la figura 14 es una gráfica que ilustra la liberación de insulina por un gel copolimerizado de acuerdo con la presente invención en presencia o en ausencia de glucosa; y
 las figuras 15a–c son unas gráficas que ilustran los valores de la tangente del ángulo de pérdidas para una composición en ausencia de quimiotripsina a 20 °C, a 32 °C y a 37 °C respectivamente, y las figuras 15d–f son unas gráficas que ilustran los valores de la tangente del ángulo de pérdidas para la composición en presencia de quimiotripsina a 20 °C, a 32 °C y a 37 °C respectivamente,

La presente invención proporciona un gel reversible en el que el par de ligandos interactivos (los restos primero y segundo) se retienen dentro del gel (es decir, se evita su filtrado a las zonas circundantes). Además, se evita la separación de fases de los componentes durante las etapas líquidas de los ciclos de gel–sol, asegurando de este modo la yuxtaposición de los restos primero y segundo y aumentando la vida útil de la composición. Evitar la separación de fases es también importante debido a que promueve una probabilidad continua de interacción entre los ligandos relevantes.

Los restos primero y segundo se unen de forma reversible entre sí para formar un gel. Tanto el primer como el segundo resto pueden contribuir igualmente a la formación de gel. La sensibilidad del gel al nivel de dicho analito surge debido a que el segundo resto gelificante también se une al analito. De este modo, el analito compite con el primer resto gelificante y, cuando la concentración del analito es lo suficientemente alta, evitará la unión de los restos gelificantes primero y segundo, lo que da como resultado una disminución en la viscosidad del gel. Tal como se describe con más detalle a continuación, esta disminución de la viscosidad puede usarse para la liberación de un fármaco o para proporcionar una indicación del nivel del analito.

El enlace entre los restos primero y segundo se produce por unas fuerzas no covalentes tales como las fuerzas hidrófoba, iónica, de enlace de hidrógeno y similares. Estas interacciones se han estudiado bien en la técnica y sus efectos sobre el reconocimiento y la afinidad molecular se describen, por ejemplo, en Korolkovas y col., “*Essentials of Medicinal Chemistry*”, págs. 44 a 81 Wiley, 1976.

El segundo resto es la lectina Con A. Las lectinas son proteínas de unión a hidratos de carbono de las plantas y de

los animales con una amplia variedad de especificidades para los hidratos de carbono, (Lis y col., *Ann. Review of Biochemistry*, 42, 541 (1973); Goldstein y Hayes, *Adv. In Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 35, Tipson y Horton, eds. (Academic Press, Nueva York, 1978, págs. 128 a 341). Por ejemplo, la Con A, una lectina de la *Canavalia*, tiene especificidad para la α -D-manopiranososa y para la α -D-glucopiranososa; las lectinas de soja son específicas para las unidades de α - y de β -D-N-acetilgalactosamina y de α -D-galactosa, y la lectina del germen de trigo es específica para la β -D-N-acetilglucosamina. Otra lectina es la lectina del guisante (*Pisum sativum*). El primer resto es dextrano.

Puede usarse azul de dextrano (de Sigma). Éste está disponible en dos pesos moleculares (40 K y 2 M), y comprende dextrano covalentemente unido a un azul reactivo. Cada molécula de dextrano tiene muchos restos de colorante unidos a ella, y la molécula es azul y tiene grupos amina libres del colorante que están disponibles para su acoplamiento. Cuando se realiza el acoplamiento con azul de dextrano, el producto es azul. Esto proporciona una valoración cualitativa y cuantitativa del éxito del acoplamiento.

Los restos primero y segundo se proporcionan en forma de copolímero. Esto se hace polimerizando derivados preparados de los restos primero y segundo. En su forma más simple, esto puede producir un polímero lineal que porta ambos restos. Cualquier tipo de estructura principal de polímero producida por cualquier técnica de polimerización relevante es adecuada para su uso en esta realización de la presente invención.

Los derivados de metacrilato de la concanavalina A y del dextrano (sintetizados en primer lugar a partir del polisacárido y de la lectina sin procesar, usando una reacción con anhídrido metacrílico) se polimerizan para producir un polímero de estructura principal acrílica, que porta la concanavalina A y el dextrano como grupos colgantes (véase la figura 1).

El dextrano puede realizar la derivatización de metacrilato (es decir, en la fase de prepolimerización con anhídrido metacrílico) en muchos puntos a lo largo de su longitud, dependiendo el número de las condiciones, debido a que cada grupo hidroxilo de cada unidad de glucosa en la cadena de dextrano, es potencialmente susceptible a la metacrilación. Por consiguiente, los restos de dextrano pueden reticular permanentemente el copolímero lineal, produciendo una gama de redes tridimensionales simplemente debido a que puede comenzar a formar cadenas de polímero en cualquier punto en el que tiene una modificación de metacrilato. A menos que el grado de reticulación sea muy alto, los productos consiguientes van a ser probablemente flexibles y gelatinosos debido a la longitud y la movilidad del dextrano. La concanavalina A puede también ser multi-metacrilada, pero debido a que esta molécula es globular, el producto puede ser un conglomerado y no un gel en el que una conexión de redes flexible se extiende a través del mismo (véase la figura 2).

La característica fundamental de los productos producidos por un proceso de polimerización tal como el que se describe anteriormente es que son hidrófilos, pero, en los casos en los que el producto de polimerización se hace demasiado grande y es complicado que siga siendo soluble, el producto sencillamente se hincha con agua y no forma una disolución (se producen lentes de contacto blandas a partir de una versión no derivada de un acrílico de este tipo). Los enlaces permanentes dictan las características principales del producto en términos de sus cualidades viscoelásticas, y de este modo los productos que tienen menos derivatización del dextrano y la concanavalina A (por ejemplo) serán unos líquidos viscosos, mientras que los que tienen una modificación extensiva y por lo tanto permiten una reticulación complicada, serán hidrogeles sólidos.

No obstante, los ligandos interactivos son capaces de conectarse a través de las cadenas de polímero de forma no covalente produciendo un enlace temporal adicional con cualquiera de los enlaces permanentes que se producen durante la polimerización (véase la figura 2). Son éstos los que son cruciales en términos de la unión reversible del gel debido a que, al estar en contacto con el analito, por ejemplo, una glucosa libre, los enlaces temporales se desharán. Cuando esto sucede, se producirá un cambio en las propiedades del producto y se hará más permeable, a medida que los poros teóricos a lo largo de la estructura reticular se abren y dejan sólo las reticulaciones permanentes. Si la derivatización y la reticulación permanente posterior del gel han sido apropiadamente bajas, puede obtenerse como resultado un líquido viscoso cuando todos los enlaces permanentes y temporales están en su lugar. Cuando se añade el analito, este líquido perderá viscosidad y, debido a que la reacción es reversible, este cambio gel-sol puede depender de la concentración de analito que se ha difundido en el gel.

En un gel que comprende lectina y dextrano que no están acoplados entre sí o a otras partículas, la lectina está en su forma tetravalente natural que puede disociarse en unos dímeros estables a algunos valores de pH. Estos dímeros son obviamente más pequeños y presentan un riesgo más grande de escaparse del gel. La combinación de la concanavalina A tetravalente y el dextrano multivalente (ramificado) produce un gel, que consiste en una red de tres dimensiones estabilizada sólo con enlaces temporales. No obstante, los componentes pueden filtrarse al exterior gradualmente cuando están en el estado de sol: la separación de fases puede no ser obvia pero puede contribuir a una pérdida progresiva de acción después de varios ciclos.

No obstante, cuando se copolimerizan los componentes interactivos, cada componente puede ser monovalente, y éste aún formaría un gel, tal como se ilustra en la figura 4. Por consiguiente, el gel no requiere unos restos gelificantes primero y segundo que sean multivalentes. Pueden usarse unos dímeros de lectina (o unos tetrámeros estabilizados por la unión al entramado). El dextrano puede substituirse con una variedad de otras entidades

portadoras de glucosa, lo que incluye una glucosa sencilla colgante. No obstante, la glucosa sencilla colgante puede reducir la flexibilidad del gel resultante y de hecho, alguna reticulación permanente con el dextrano puede seguir siendo útil para proporcionar flexibilidad y evitar el filtrado al exterior en la fase de sol. Esto se muestra en la figura 5.

5 El gel de la invención puede proporcionarse en combinación con una membrana semipermeable o permeable. Unas membranas adecuadas pueden ser de las de tipo diálisis, por ejemplo, con unos pesos moleculares límite de 10 K a 500 K o pueden ser unas membranas de tipo microfiltración, por ejemplo, con unos tamaños de poro de 0,025 a 0,1 μm que pueden ser de celulosa o de policarbonato. Las primeras membranas se prefieren cuando el gel de la presente invención se usa como un detector y las últimas se prefieren cuando el gel se usa en un sistema de administración de fármacos.

10 La transición gel-sol de la composición de gel del gel descrito en respuesta a unos niveles aumentados del analito puede usarse para la liberación de un fármaco, que actúa preferentemente para reducir los niveles del analito. De este modo, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un sistema de administración de fármacos que comprende una composición de gel de acuerdo con la invención y un fármaco, estando el fármaco contenido o bien (a) dentro de la composición de gel o bien (b) en un depósito formando la composición de gel una barrera entre el depósito y el área en la que el fármaco va a liberarse.

15 En el segundo aspecto, se pretende que "fármaco" signifique cualquier agente activo, cuya administración tenga un efecto terapéutico o profiláctico deseado.

20 Tal como se menciona anteriormente, la unión de los restos gelificantes primero y segundo, y por consiguiente la viscosidad de la composición de gel, es sensible al nivel de un analito. Este cambio en la viscosidad puede usarse para controlar la permeabilidad de un soluto dentro del mismo. De este modo, las composiciones de gel de la presente invención pueden formar un cierre para un depósito o un envase que contiene un fármaco. La liberación del fármaco con respecto al envase se rige por la viscosidad del gel, es decir, el nivel del analito. Alternativamente, el fármaco puede estar contenido dentro del gel en sí mismo. Esto se prefiere si la composición de gel es sensible a la glucosa (por ejemplo, un gel basado en Con A/dextrano) y el fármaco que va a liberarse es un fármaco anti-hiperglucémico tal como la insulina. Es también posible que un gel sensible a la glucosa se use para controlar la liberación de un fármaco cualquiera, controlándose la liberación del fármaco mediante la administración de glucosa al paciente.

25 Cuando el sistema de administración de fármacos de la presente invención se usa para administrar insulina, se prefiere que se use por vía intraperitoneal debido a que esto permite que la glucosa alcance el sistema rápidamente y que la insulina se libere rápidamente, a que por ejemplo el sistema se use de forma subcutánea. Además, el fluido peritoneal tiene un nivel de glucosa que refleja los niveles de glucosa en sangre. Esto no pretende indicar que el sistema no pueda usarse de forma subcutánea o incluso externamente – la ubicación debería seleccionarse de tal modo que se adecue a la condición que va a tratarse y al fármaco que va a liberarse.

30 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sensor para detectar el nivel de un analito, comprendiendo el sensor una composición de gel de acuerdo con la invención y unos medios para detectar la viscosidad del gel.

El cambio en la viscosidad de las composiciones de gel de la presente invención en respuesta a unos niveles alterados de analito significa que las mismas pueden usarse para supervisar los niveles de analito.

35 La viscosidad del gel puede detectarse de la forma que se describe en el documento DE-A-4203466, Ballerstadt y Schultz, *Sensors and Actuators B Chemical*, (1998), 46: 557 a 567, en el documento DE-A-4034565 o en el documento WO 99/48419.

40 Con el fin de ser capaz de supervisar unos cambios en los niveles de analito casi en tiempo real, el analito debe ser capaz de difundirse con facilidad a través de la composición de gel y, cuando está presente, de la membrana. Tal como se menciona anteriormente, las composiciones de gel de la presente invención permiten esto sin un escape por parte de los componentes de gel. Con el fin de aumentar adicionalmente los tiempos de respuesta, es deseable detectar la viscosidad de una capa muy delgada de gel (por ejemplo, 4 mm o menos, preferentemente de 0,1 a 2 mm, a pesar de que también se contempla una monocapa dentro de la invención). En tales casos, es particularmente importante evitar la pérdida de gel.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

50 **Ejemplos**

Introducción

55 Se ha mostrado anteriormente que las formulaciones de concanavalina A (Con A) y de dextrano son sensibles a la glucosa. La Con A es una proteína con un receptor de glucosa en cada una de las subunidades que contribuyen a la estructura. La proteína es dimérica por debajo de un pH de 5,8 si bien es tetramérica entre un pH de 5,8 y de 7,0, punto por encima del cual comienza a formar unos conglomerados más grandes. Los receptores dan cabida a una

glucosa libre si bien también a las unidades de glucosa terminales en los polisacáridos tales como el dextrano. Debido a que el dextrano es multivalente en su complemento de tales terminales, una adición con la lectina produce unas estructuras complejas que pueden ser o bien un precipitado o bien gelatinosas. Las estructuras se desestabilizan mediante la adición de glucosa libre que compite por la ocupación de los sitios de receptor. En circunstancias en las que la glucosa se añade a una formulación gelatinosa de la mezcla, la viscosidad cae abruptamente si bien se recupera si la glucosa se dializa al exterior. Este mecanismo constituye la base de un dispositivo de administración para unos agentes hipoglucémicos tales como la insulina que se difundirían más lentamente a través del gel si los niveles de glucosa en el entorno fueran bajos pero que puede hacerse funcionar a una velocidad de administración más alta si la viscosidad se redujera mediante el contacto con la glucosa.

Un problema con este diseño es la tendencia de los componentes a filtrarse al exterior del gel. Los componentes pueden dispersarse en agua cuando el gel se deshace y se requiere algún medio mediante el que la forma sol se estabilice para evitar la pérdida a partir de la formulación pero que no evite los cambios de viscosidad de los que depende el diseño. En el siguiente Ejemplo comparativo 1, la lectina se expuso a un método para ligarla de forma covalente a un carbómero que se produce comercialmente de los tipos Carbopol 974 y 934 (a los que se hace referencia como C974 y C934). Estos materiales son derivados del poli(ácido acrílico) que se han reticulado de forma tridimensional para producir unas entidades gelatinosas, si bien granuladas, cada una con un peso molecular de varios billones. El enlace se ha hecho con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), mediante cuya acción se proporciona una estructura intermediaria temporal entre el EDAC y un resto de carboxilo (en este caso a partir de los sitios de carbómero (véase la figura 6)). El intermediario puede entonces ligarse con grupos de aminas, tal como se encuentran en las proteínas incluyendo la Con A en sitios de terminal y de lisina. Esto da como resultado la formación de una unión de amida y la pérdida del residuo de EDAC. La Con A puede hacerse efectivamente conjugada con el carbómero tal que la superficie de las partículas de carbómero se recubren permanentemente con lectina.

Los carbómeros C934 y C974 se diferencian de muchos geles poliméricos en que, a pesar de que son ambos reticulados, ninguno es una estructura íntegra. Cada partícula hidratada es en efecto un hidrogel discreto y unas regiones acuosas intersticiales la separan de las partículas vecinas. Esto significa que unas moléculas grandes como la insulina pueden difundirse a través de un gel de carbómero de este tipo más rápidamente (figura 7a) que a través de unos geles hechos de polímeros lineales (lo que incluye tipos de carbómero lineales) o a través de unos hidrogeles ordinarios. En ambos casos indicados en último lugar, las obstrucciones son más grandes debido a que los entrelazamientos físicos y químicos se producen respectivamente a lo largo de las estructuras y bien pueden ser determinantes para la velocidad para el transporte de insulina.

Reactivos

Carbopol 974 (C974), Carbopol 934 (C934) de BF Goodrich
 EDAC [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida], de Sigma
 MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico], de Sigma
 PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y 5,9)
 NaOH (microgránulos y disolución 1 M), Fisher Scientific
 dextrano (masa molecular relativa de 2.000.000), de Sigma
 azida de sodio, de Sigma
 concanavalina A, de Sigma
 agua destilada
 HCl (ácido clorhídrico) 1 M, BDH

Ejemplo comparativo 1 – Producción del gel y medición de la viscosidad

Se preparó una dispersión de carbómero al 1 % p/p en un tampón de MES 0,1 M, se ajustó a neutro y se agitó hasta que fue transparente. Se añadió entonces Con A a ésta de tal forma que la concentración final fue también de aproximadamente 1 % p/p y el pH se mantuvo neutro. El sistema se conjugó entonces usando EDAC 50 mM, extinguiéndose la reacción después de agitarla durante tres horas a temperatura ambiente diluyéndola con PBS con un pH de 5,9 y centrifugando los lavados a partir del carbómero conjugado deshidratado parcialmente hasta que los lavados no revelaron ninguna Con A adicional en el sobrenadante. La proteína total retirada se calculó ensayando unos lavados a granel y filtrados a 276 nm. La eficiencia de acoplamiento fue superior a un 90 %. Una cantidad de 1 g de una disolución de dextrano D2M de 20 % p/p (pm de 2 millones) en PBS (pH 7,4, preservada con azida de sodio al 0,01 %) se añadió entonces al conjugado de carbómero-Con A neutralizado y se mezcló de forma exhaustiva. El producto final por lo tanto contiene 200 mg de cada uno de carbómero y de dextrano D2M. El pH del gel se ajustó entonces a 7,4 usando NaOH 1 M y se obtiene como resultado un gel rígido y sensible a la glucosa. El peso final es ligeramente variable, dependiendo de los ajustes finales de pH y los contenidos se calculan en consecuencia.

Tanto el C974 como el C934 se conjugaron de esta forma y se sometieron a un ensayo de viscosidad en presencia de unas concentraciones variables de glucosa. Las mediciones de viscosidad se obtuvieron usando un viscosímetro de cono y placa RS75 de Haake Rheostress en un modo de rotación continua en el que la velocidad de corte se intensificó entre 0 y 5 s⁻¹. Los valores de viscosidad que se corresponden con un valor de velocidad de corte de 5 s⁻¹

se usaron para comparar los geles en las concentraciones de glucosa entre 0 y 5 % p/v. Los geles se compararon a 20 °C y el producto del C934 se midió también a 37 °C.

Se calculó que los conjugados producidos a partir de los carbómeros granulados, C974 y C934, tenían composiciones tal como sigue:

	C934 (código de fórmula E100)	C974 (código de fórmula E87-5)
Carbómero	2,6 % p/p	2,7 % p/p
Dextrano D2M	2,6 % p/p	2,7 % p/p
Con A	2,4 % p/p	2,5 % p/p

5

Las formulaciones fueron más bien opacas en comparación con la extrema transparencia de los geles de carbómero a partir de los cuales se obtienen. Es probable que el protocolo en el que la Con A se añadió en presencia de EDAC en exceso haya producido una variedad de productos que puede incluir unas cadenas de lectina añadidas al carbómero. Esto se debe a que la Con A también tiene unos grupos de carboxilo que son vulnerables a la acción de EDAC. No obstante, este procedimiento dio un resultado en el que la Con A se ligó en una alta proporción y se usó de forma preferente, en esta etapa, sobre uno en la que la reacción carbómero-EDAC se enfrió bruscamente antes de añadir la Con A.

10

En términos de la evaluación del rendimiento de las formulaciones, es útil comparar estos productos con unas combinaciones acuosas simples de dextrano 2DM y de Con A sin carbómero. No obstante, una analogía directa no fue posible, debido a que la Con A al 2,5 % forma sólo precipitados con bajas concentraciones de dextrano en adiciones acuosas libres de carbómero. Por consiguiente, la Con A al 2,5 % se combinó con D2M al 10 % p/p para formar un gel de baja viscosidad. Esta concentración de dextrano en presencia de carbómero dio un producto demasiado viscoso para ser útil en el estudio y el contenido de dextrano en las mismas es de aproximadamente un 3 % p/p.

15

20

La figura 8 muestra que la adición de glucosa produce una caída progresiva en la viscosidad de la formulación acuosa principalmente en las concentraciones de glucosa de 0 a 0,5 % p/p (resaltadas en la gráfica), que es un intervalo relevante para el diseño de productos útiles en el control de la diabetes mellitus. La respuesta depende de la estequiometría del mecanismo de desplazamiento que se describe anteriormente y es por lo tanto una función de las concentraciones relativas del dextrano y de la glucosa. Es esta respuesta la que es importante conservar.

25

Los resultados en la figura 9 muestran una caída en la viscosidad en un intervalo de glucosa similar al la formulación acuosa, demostrando que la sensibilidad a la glucosa se ha impuesto sobre las partículas de carbómero. No obstante, los niveles de viscosidad de referencia, en los que las uniones lectina-dextrano se han invertido con la glucosa, son mucho más altos cuando hay un carbómero presente debido a la viscosidad de este polímero.

30

La figura 9 también indica que la adición del dextrano y de la Con A ha aumentado la viscosidad del producto libre de glucosa en una cantidad mucho más grande en los sistemas de carbómero que en los acuosos normales, a pesar del contenido de dextrano más bajo usado en las formulaciones con un contenido en carbómero. Esto significa que la respuesta de la glucosa, en términos del cambio en la viscosidad, es de una magnitud más grande en las formulaciones de carbómero que en la acuosa, tal como se muestra también en la figura 9. Éste parece ser también el caso si no hay un enlace covalente de la lectina con el carbómero (no se muestra) y es por lo tanto una función de la presencia del carbómero en el sistema dextrano-Con A. Una explicación para esto se refiere a la heterogeneidad de la dispersión de carbómero que se discutió anteriormente. El dextrano y la Con A se limitan a los intersticios debido a que su tamaño (pm de 2 millones y de 100,000, respectivamente) debe excluirlos con respecto de los interiores de las partículas de C974 y de C934. Sus concentraciones localizadas deben por lo tanto ser mucho más altas que las concentraciones totales debido a que los intersticios forman una fracción del volumen total. Esto explica la diferencia en las propiedades físicas del complejo que se forma entre el dextrano y la Con A a las concentraciones muy bajas que se usan en los sistemas de carbómero en comparación con unos sistemas completamente acuosos, tal como se describe con anterioridad. En los sistemas de carbómero, la microviscosidad de la región intersticial claramente contribuye mucho a la sensibilidad a la glucosa de la formulación. No obstante, los cambios en la macroviscosidad provocados por la glucosa, tal como se detectó en este experimento, no parecen ser simplemente un promedio para un compartimento granuloso inerte y uno intersticial activo debido a que los cambios inducidos por la glucosa son mucho más grandes que en el sistema acuoso homogéneo. Esto parece implicar que la viscosidad intersticial no es el único motivo para la sensibilidad a la glucosa aumentada de este sistema si bien es probable que su presencia tenga influencia sobre la libertad de movimiento de las partículas en el gel como un todo y de este modo tiene un efecto adicional sobre su macroviscosidad.

35

40

45

50

Una caída de viscosidad similar se produce a 37 °C, tal como se muestra en la figura 10 para el conjugado de C934. Los valores de viscosidad y los cambios a 37 °C son ambos más bajos que para 20 °C como puede anticiparse a partir de los comportamientos similares de ambos carbómeros y de las formulaciones acuosas y libres de carbómero del dextrano y de la Con A (de las que no se muestra ninguna). No obstante, el sistema es claramente, a una temperatura fisiológica, un detector de glucosa sensible.

En los sistemas examinados a 20 °C, el cambio en la viscosidad cuando se expresa como una fracción del valor original es más bajo para los sistemas de carbómero que para los sistemas acuosos, como se muestra en la figura 11, a pesar de los valores absolutos más altos.

5 La razón principal para desear ligar de forma covalente la lectina con el carbómero es evitar su escape con respecto de la formulación sin sacrificar la actividad. Los cambios de viscosidad inducidos por la glucosa muestran que, después de lavar el carbómero varias veces centrifugando el sobrenadante a partir del mismo, éste tiene sensibilidad a la glucosa. Esto sugiere que la lectina se ha anclado con éxito a la superficie de la partícula de carbómero usando EDAC como agente de enlace. Una mezcla de carbómero y lectina normal no retiene la actividad cuando se lava de esta forma (no se muestra).

10 *Ejemplo comparativo 2 – Difusión de la insulina*

Los geles que se describen en el Ejemplo 1 se sometieron también a unos ensayos de difusión de la insulina a 37 °C. En estos experimentos, se usaron seis pequeñas células de administración, cada una capaz de contener 0,5 ml de disolución de insulina o una disolución control de tampón. Cada una se montó vacía en unos vasos receptores de temperatura regulada, que contienen 10 ml de tampón y estaban conectados mediante un flujo individual a través de unos sistemas a un espectrofotómetro Lambda 40 de Perkin Elmer, programado secuencialmente para explorar cada disolución de receptor entre 250 y 500 nm a unos intervalos de diez minutos. Las células se llenaron mediante una jeringa en los instantes requeridos y entonces se cerraron herméticamente usando una disposición con llave de paso para hacerlas estancas al agua. En cada célula, una capa delgada del gel se intercaló entre dos membranas de filtro de tal forma que la insulina se difundió a través del gel desde el depósito con el fin de alcanzar la disolución de receptor. Puede añadirse glucosa a las disoluciones de receptor individuales en la concentración requerida en cualquier instante durante el experimento. Para retirar la glucosa, el fluido de receptor se reemplazó entre las lecturas con un tampón nuevo a 37 °C, el flujo a través del circuito se lavó y el tampón se reemplazó de nuevo antes de que tocara realizar la siguiente lectura.

Para las células de difusión que contienen insulina, la adición de glucosa en los puntos que se muestran en la figura 12a ha dado como resultado un rendimiento aumentado en un plazo de aproximadamente 60 minutos respecto de la adición de glucosa al 0,5 %. La figura 12b muestra los resultados respecto de las células de control que contienen un tampón y representa que la glucosa ha causado la liberación de la Con A. Esto indica que la pérdida de la Con A respecto de la capa de gel se ha minimizado debido a que, en unas dispersiones acuosas, se hubiera producido una liberación inducida por la glucosa similar a la de la insulina (no se muestra). A pesar de que se ha mostrado por lo tanto que la pérdida de la Con A es casi inapreciable, se ha corregido no obstante este efecto en los resultados en la figura 12a. Además, se ha hecho una corrección tanto en los sistemas de control como en los de insulina, para una densidad óptica tal como se mide a 460 nm. La densidad óptica es una medida de la precipitación de proteínas, lo que incluye la producción de fibrillas. La fibrilación es un problema mucho más grande con la insulina que con la Con A en este experimento. Se obtiene como resultado a partir de la aplicación de fuerzas de corte tal como experimentarían unas disoluciones que circularan a través de una bomba peristáltica. La velocidad de flujo en el sistema de circulación del receptor al espectrofotómetro se mantuvo tan baja como fue posible en este experimento para reducir el problema, de una forma consistente con el mantenimiento del proceso de liberación respecto del dispositivo como el proceso de determinación de la velocidad. El efecto necesita compensarse mediante la substracción respecto del perfil de 276 nm, no obstante, debido a que no permanece constante a lo largo del experimento a medida que la glucosa se retira mediante el reemplazo de fluido y debido a que es una función no constante de la concentración de proteínas.

El resultado del enlace covalente de la lectina con los carbómeros C934 y C974 y su combinación con el dextrano ha mantenido por lo tanto la actividad de la mezcla del dextrano y de la Con A dependiente de la glucosa en términos del control de la difusión de la insulina como una función del contenido en glucosa. Esto se ha llevado a cabo a una concentración de glucosa que representa un estado bastante grave de diabetes. El procedimiento también ha creado una formulación a partir de la que la Con A no puede filtrarse a través de unas aberturas más pequeñas que las que conservan carbómeros en la capa de gel. Debido a que los carbómeros como el C934 y el C974 tienen unos pesos moleculares de billones (y un tamaño de partícula en un intervalo de micrómetros), esto permite efectivamente el uso de unas membranas de restricción de poros muy grandes en la configuración que se describe en este ejemplo. La ventaja de esto es que el gel en sí mismo – y no las membranas de celulosa entre las que se intercala el gel – serán determinantes para la velocidad para la insulina. Esto ha constituido un problema en unas mezclas no conjugadas que requieren unas membranas de poros con un límite molecular cercano al tamaño de la insulina con el fin de retener la lectina.

Los datos que se presentan en los Ejemplos comparativos 1 y 2 indican que es posible producir unos conjugados poco usuales entre unos carbómeros granulados, tales como el C974 o el C934, y un segundo componente, tal como una proteína, en los que pueden preservarse algunas de las características químicas de la proteína. En este caso, la Con A se ha ligado a unos carbómeros reticulados para producir unos sistemas en los que las regiones intersticiales de las formulaciones se han hecho sensibles a la glucosa. Se ha usado el procedimiento de EDAC, si bien son posibles otras alternativas. Si se añade dextrano a este conjugado, el sistema se hace viscoso debido a los enlaces temporales que se forman entre la lectina y los extremos ramificados en el dextrano. La viscosidad de este sistema es entonces una función del contenido libre de glucosa debido a la competición por los receptores de

glucosa en la lectina. Este mecanismo funciona bien en las mezclas simples de Con A y de dextrano pero funciona de una forma mejorada en la formulación conjugada de forma covalente. Parece ser que esta mejora se relaciona con la estructura heterogénea de los geles de carbómero granuloso en los que los complejos de lectina–dextrano se forman en esa fracción del sistema entre partículas, creando unas altas concentraciones localizadas de los componentes sensibles a la glucosa. Se ha mostrado que estas formulaciones conjugadas producen unas reducciones dependientes de la glucosa en la macroviscosidad. También han sido capaces de transmitir insulina de una forma relacionada con la glucosa sin la pérdida de lectina libre. La última permanece unida de forma covalente a las partículas de carbómero y por lo tanto retenida por los tamaños de poro de la membrana que sólo necesitan ser lo bastante pequeños como para retener las partículas de carbómero, lo que de este modo compromete el proceso de determinación de la velocidad en este sistema de transporte dependiente de la glucosa.

Ejemplo 1 – Geles copolimerizados

Procedimientos

Metacrilación de concaavalina A

La concaavalina A se sometió a reflujo a 50 °C durante de 2 a 3 horas con anhídrido metacrílico en solución salina tamponada con fosfato a 7,4. 500 mg de Con A se disolvieron en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se les añadieron 0,05 ml de anhídrido metacrílico destilado. Después del reflujo, la reacción se enfrió bruscamente con agua destilada (20 ml) y toda la disolución se dializó frente a agua destilada durante 2 días para retirar los productos de pm < 12 a 14,000. Este proceso no puede eliminar Con A no ligada.

Metacrilación de dextrano

Una cantidad de dextrano de D500 de 10 g, de pm 500.000, se pesó y se secó sobre pentóxido de fósforo. Separadamente se secó dimetilsulfóxido (DMSO) sobre hidruro de calcio y entonces se destiló. Una cantidad de 100 ml de DMSO destilado se añadió entonces al dextrano secado y la mezcla resultante se agitó para disolverse a 50 °C sobre un baño de aceite. A esto se añadieron 200 mg de dimetilaminopiridina (DMAP) y 2,77 ml de anhídrido metacrílico destilado. La mezcla se agitó entonces a 50 °C en el baño de aceite durante 24 horas bajo reflujo. La precipitación se logró añadiendo gota a gota a 1 l de acetona para dar copos blancos de metacrilato de dextrano. El producto se disolvió entonces en 500 ml de agua destilada y se dializó frente a agua destilada para retirar productos de pm pequeño tales como DMSO, DMAP y anhídrido metacrílico.

Reticulación *uv* de los derivados metacrilados

Un iniciador, Irgacure (fotoiniciador, de Ciba Speciality Chemicals), se usó para iniciar un proceso de curado de *uv*. Se añadieron 20 µl de una disolución acuosa de 40 mg/5 ml de Irgacure. La muestra se irradió entonces a 365 nm a 10 mW/cm² durante un tiempo predeterminado, que se divide para una irradiación igual a ambos lados de una película espaciada entre placas de vidrio.

Las variables en el sistema son:

- 35 concentración de componentes
- concentración de iniciador
- grado de sustituciones del dextrano y de la Con A
- tiempo de irradiación

Estas variables permiten que se hagan unos geles de una amplia variedad. En el siguiente caso, se varió el tiempo de irradiación entre 2 y 50 minutos.

Ensayos de difusión

Los geles hechos tal como se describe anteriormente se sometieron entonces a los mismos ensayos de difusión tal como se hace referencia en el Ejemplo 2 y los resultados fueron tal como sigue:

Resultados

En la figura 13a, se representa el filtrado a partir de unos derivados metacrilados polimerizables de la proteína Con A antes y después de la provocación con la glucosa (experimento realizado a 37 °C, usando unos filtros de tamaño de poro de 0,2 µm, y una concentración de desencadenamiento de glucosa de 1 % p/v). El aumento del tiempo de radiación de un gel sometido a *uv* y un iniciador apropiado, conduce a una reducción en el pico de proteína producida a medida que el gel se ablanda al entrar en contacto con la glucosa. Unos tiempos de irradiación cortos (por ejemplo, de 5 min – símbolos de triángulos) no logran esto, mientras que el tiempo de curado de 20 minutos (símbolos de diamantes) produce sólo un filtrado ligero. La polimerización ha conseguido por lo tanto el objetivo de bloquear la proteína dentro de estos geles irradiados durante un tiempo más largo, pero aún no rígidos. No obstante, la comparación con el control libre de gel (símbolos de cuadrados rellenos) muestra que se produce alguna liberación de proteínas a su través, aunque ligera, incluso con una irradiación de 20 minutos.

La figura 13b muestra que unos tiempos de irradiación mucho más largos resuelven este problema y que 50 minutos parecen proporcionar un producto que apenas pierde proteínas en absoluto, o bien antes, o bien durante o bien después de la adición de glucosa. Éste es también no rígido y por lo tanto adecuado para el fin.

5 La figura 14 indica que bajo estas condiciones de filtrado de componentes minimizado, la glucosa puede mostrarse para provocar una liberación de insulina a partir de un depósito que se mantiene bajo una capa de gel en una configuración exactamente análoga. El gel es por lo tanto capaz de respuesta, de tal forma que se libera la insulina, si bien no se filtrará fuera el componente de proteína Con A. El gel parece reformarse después de la retirada de la glucosa, de modo que el flujo de insulina se restaura a los niveles anteriores a la glucosa. Estos medios son verdaderamente reversibles, lo que implica que no se pierde ningún componente de gel.

10 Conclusión

La polimerización es un procedimiento efectivo para producir unos geles que son tan sensibles como las mezclas normales pero que resisten la tendencia a perder componentes.

Ejemplo comparativo 3 – Conjugación de gelatina: carbómero con EDAC

15 La conjugación entre gelatina y carbómero se ha realizado con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), que proporciona una estructura temporal intermedia entre el EDAC y el resto carboxilo de carbómero. Los enlaces intermedios con los grupos de aminas, tales como se encuentran en gelatina en los sitios terminales y de hidroxilisina, entre otros. La gelatina se conjuga efectivamente con el carbómero de tal forma que la superficie de las partículas de carbómero se recubre permanentemente con gelatina mientras que el residuo de EDAC abandona el sitio de enlace permanente. El procedimiento en este caso promueve algún enlace gelatina-
20 gelatina además del enlace carbómero-gelatina debido a que en la gelatina se producen tanto carboxilos como aminas. Esto no supone una desventaja debido a que significa que toda la gelatina que se añade, incluso a unas concentraciones bastante altas es probablemente que se ligue, incluso de forma distante, al soporte de carbómero, que por lo tanto puede tener no simplemente monocapas sino multicapas de gelatina ligadas a cada micro- (o mini-)partícula de carbómero hidratada del gel. No obstante, el procedimiento puede modificarse para producir el intermedio (entre el carbómero y EDAC), lavarse para retirar el EDAC en exceso y entonces ligar la gelatina, caso en el que el contenido en gelatina se minimizará (sólo en el caso de monocapa).

Cada partícula de carbómero hidratado 974 o 934 es un hidrogel discreto y separado de los otros por unas regiones acuosas intersticiales. Esto significa que la gelatina ligada a la superficie puede aumentar la viscosidad de los intersticios hasta que se hidroliza por la enzima o por una acción química.

30 Reactivos

Carbopol 974 (C974), Carbopol 934 (C934) de BF Goodrich
EDAC [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida], de Sigma MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico], de Sigma
35 PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y 5,9)
NaOH (gránulos y disolución 1 M), Fisher Scientific
azida de sodio, de Sigma
gelatina, de Sigma
agua destilada
HCl (ácido clorhídrico) 1 M, BDH

40 Procedimiento

Se preparó una dispersión de carbómero 1 % p/p en un tampón de MES 0,1 M, se ajustó a neutro y se agitó hasta que fue transparente. Se añadió entonces gelatina a ésta de tal forma que la concentración final fue de entre 0 y 8 % p/p, dependiendo del producto deseado y el pH se mantuvo neutro. El sistema se conjugó entonces usando EDAC 50 mM, enfriándose bruscamente la reacción después de agitarla durante tres horas a temperatura ambiente
45 diluyéndola con PBS con un pH de 5,9 y centrifugando lavados a partir del carbómero conjugado deshidratado parcialmente hasta que los lavados no revelaron ninguna Con A adicional en el sobrenadante. La proteína total retirada se calculó ensayando unos lavados a granel y filtrados a 276 nm. El pH del gel se ajustó entonces a 7,4 usando NaOH 1 M y se obtiene como resultado un gel rígido, que responde a unas temperaturas por encima de los 37 °C ablandándose de forma significativa, debido a la influencia de la gelatina.

50 Realización de ensayos de reología

Se sometieron unos geles con un contenido de un 8 % en gelatina y de un 2 % de carbómero 974 a una realización de ensayos reológicos. Los ensayos apropiados son los ensayos oscilatorios y no destructivos que se presentan en este caso en términos de la tan delta o tangente del ángulo de pérdidas. Este parámetro es la proporción de los módulos viscoso y elástico y en consecuencia un valor unitario indica que las contribuciones a partir de cada uno de éstos es igual. Un valor más grande que uno significa que el material ha adquirido un carácter más líquido. Por lo tanto se hacen barridos de esfuerzo y de frecuencia con la intención de una evaluación de los perfiles de tan delta.

5 Los resultados se muestran en las figuras 15a–f. En estas gráficas, los perfiles se han medido tanto a través del esfuerzo como de la frecuencia lo que proporciona unas gráficas tridimensionales que claramente indican una actividad de quimiotripsina en términos de tan delta aumentadas, particularmente a unos valores de esfuerzos más altos, siendo éstos mucho más bajos con un contenido de enzimas cero. La excepción a esto se da a temperaturas que se aumentan por encima de los 37 °C, la temperatura a la que se funde la gelatina. De este modo, a 37 °C, este sistema no sería efectivo debido a que el material ya se habría ablandado mucho sin una enzima. Afortunadamente, la temperatura de la piel es de alrededor de 32 °C, a la que el efecto es tan perceptible como a 20 °C.

10 Este ensayo, con una enzima muy similar a una enzima quimotriptica de estrato córneo (SCCE, *stratum corneum chymotryptic enzyme*) que se encuentra sobreexpresada en la placa psoriásica, sugiere que el material perdería viscosidad de forma selectiva sobre la placa y no sobre un tejido normal, de forma muy similar a como se hace en estas condiciones artificiales. La difusibilidad de los fármacos a través de la fase rica en gelatina (es decir, las regiones intersticiales del material), se relaciona con la viscosidad en la misma y la conclusión es que la administración de fármacos se aumentaría en áreas sobre una piel anormal.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de gel que comprende unos restos gelificantes primero y segundo que se unen de forma reversible entre sí para formar un gel, en la que

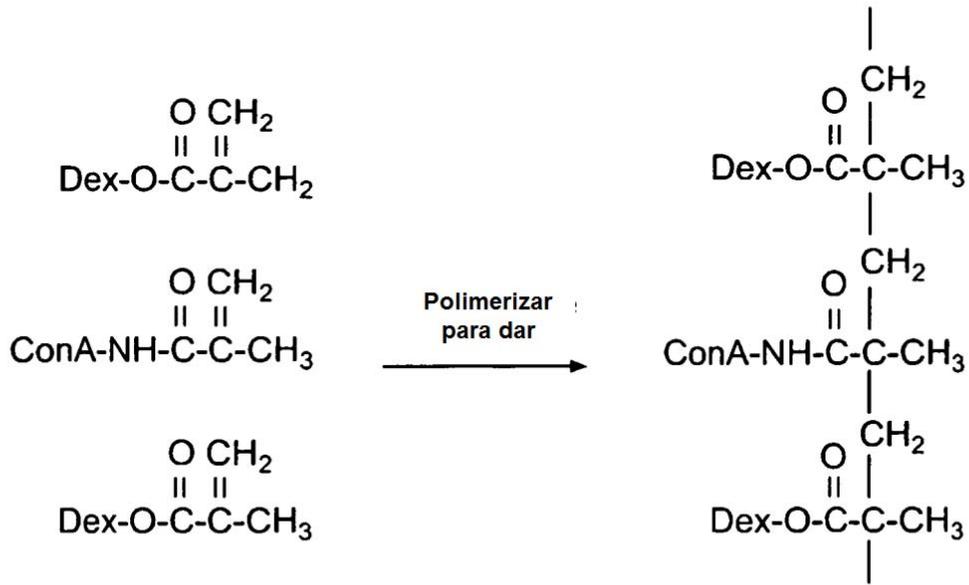
- 5 (a) el primer resto gelificante es dextrano y el segundo resto gelificante es concanavalina A,
(b) los restos gelificantes se copolimerizan mediante derivados de metacrilato de polimerización de los mismos, siendo el copolímero una estructura principal de polímero que porta los restos gelificantes.

2. Una composición de gel tal como se reivindica en la reivindicación 1, en combinación con una membrana semipermeable o permeable.

- 10 3. Un sistema de administración de fármacos que comprende una composición de gel tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, y un fármaco, estando el fármaco contenido o bien (a) dentro de la composición de gel o bien (b) en un depósito formando la composición de gel una barrera entre el depósito y la zona en la que el fármaco va a liberarse.

4. Un detector para detectar el nivel de un analito, comprendiendo el detector una composición de gel tal como se reivindica en la reivindicación 1, y unos medios para detectar la viscosidad del gel.

15



Este producto se escribe por lo demás como

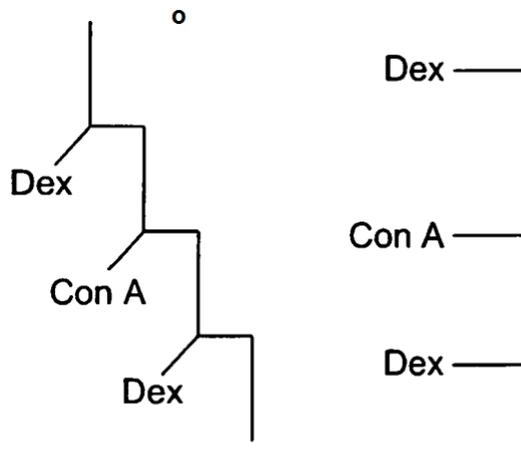


Fig. 1

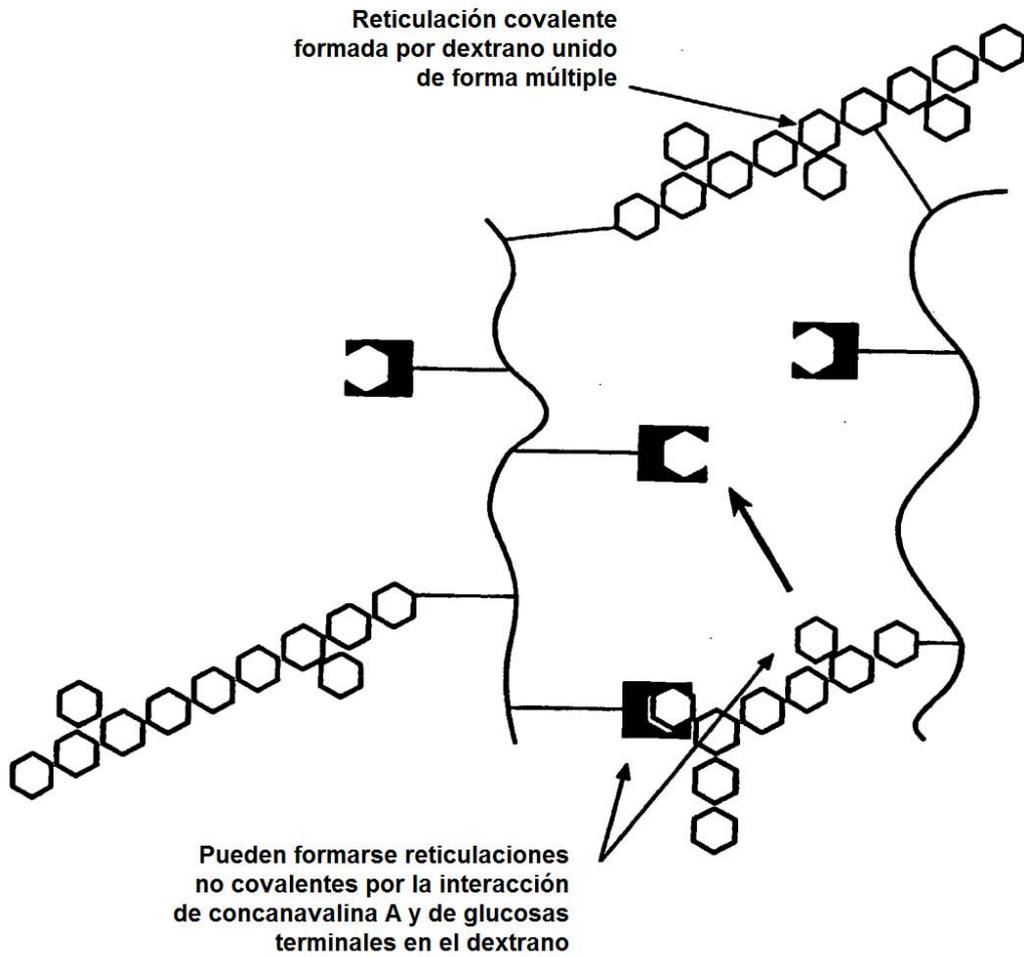


Fig. 2

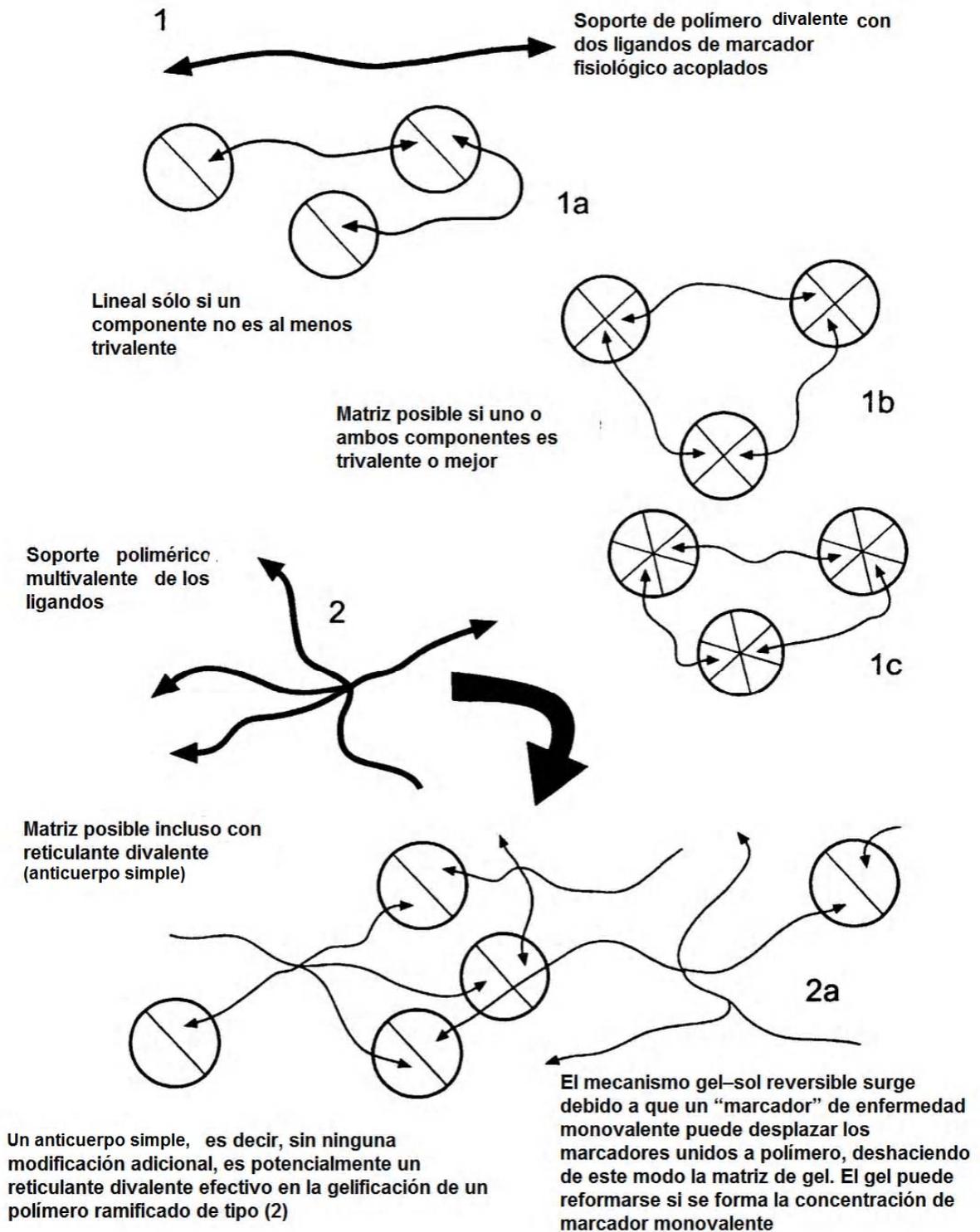


Fig. 3

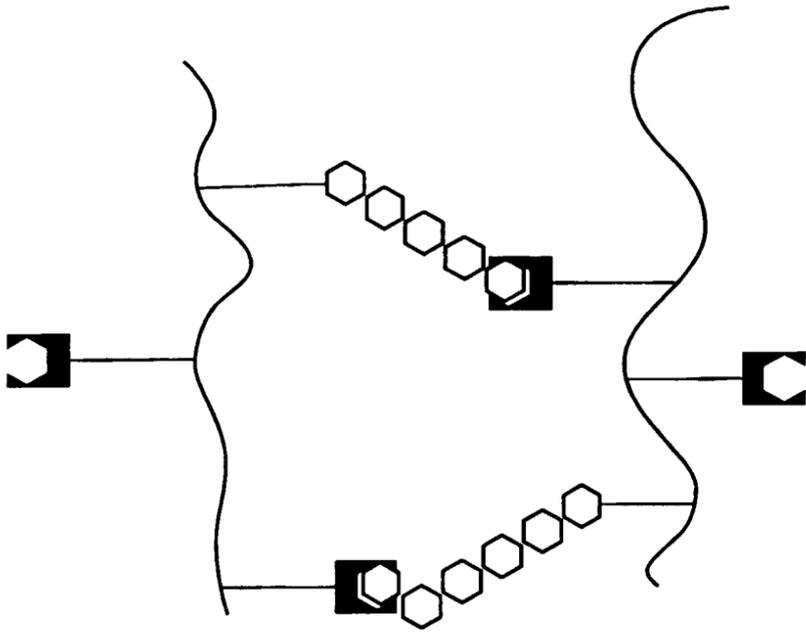


Fig. 4

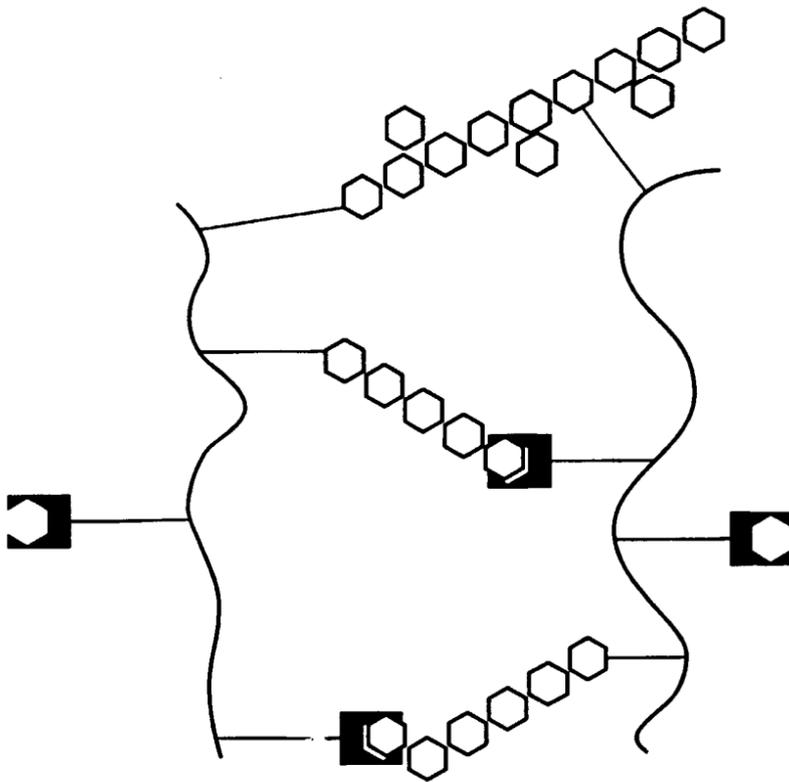


Fig. 5

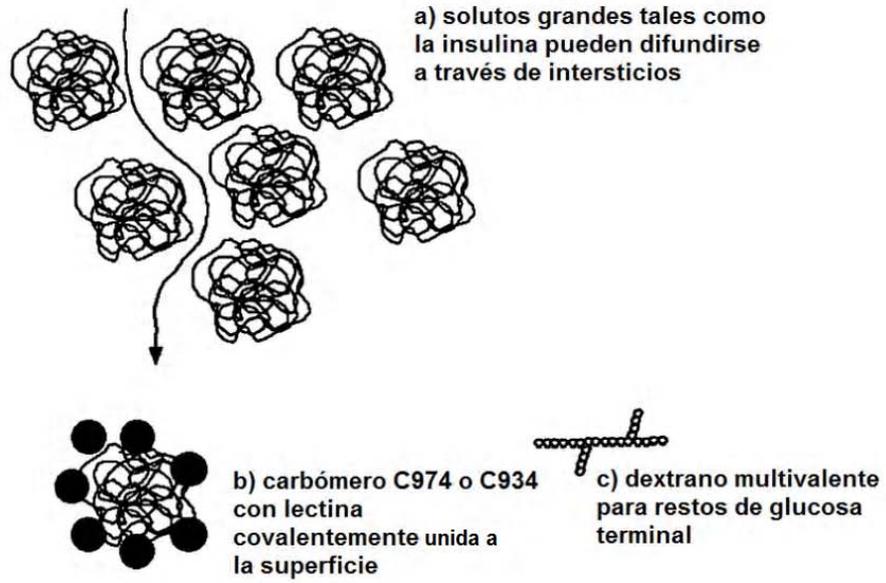


Fig. 7a

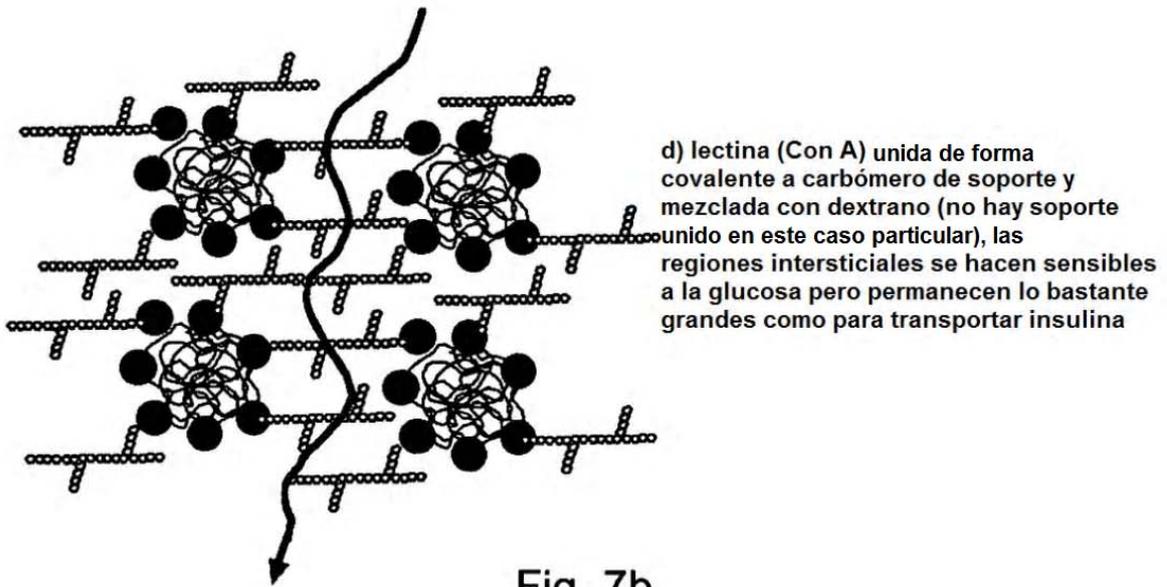


Fig. 7b

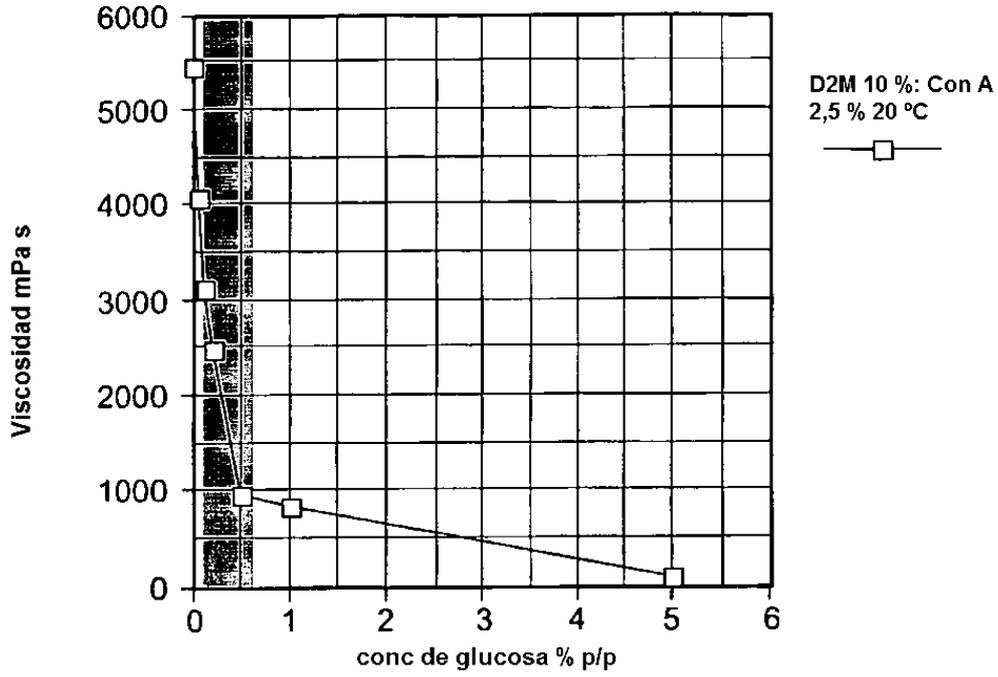


Fig. 8

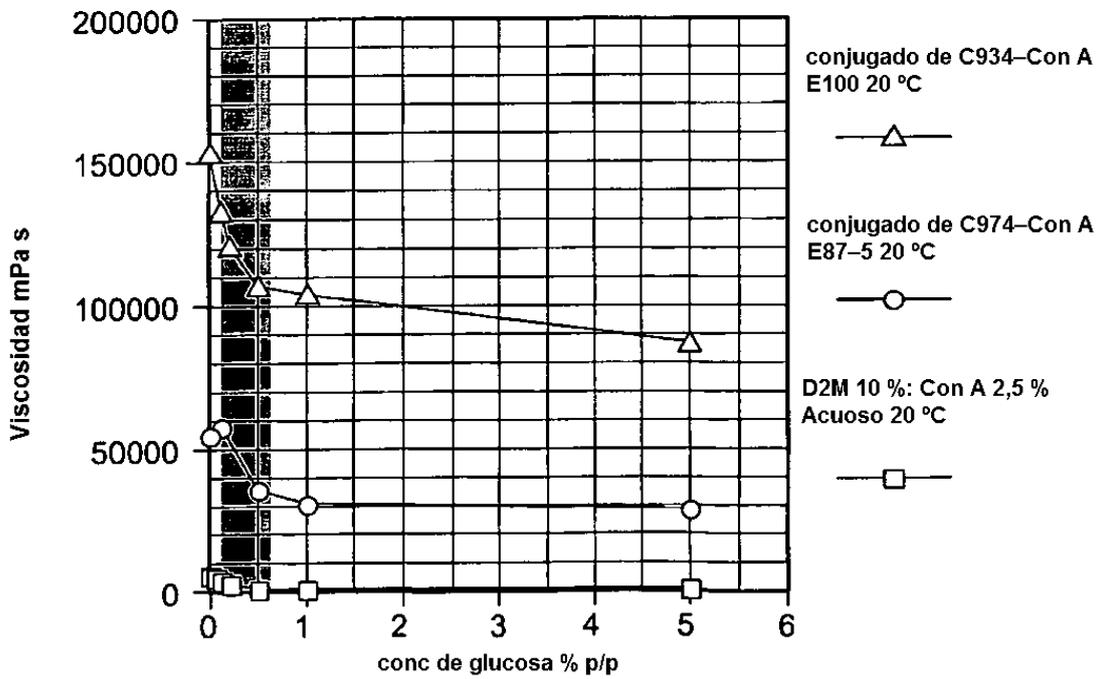


Fig. 9

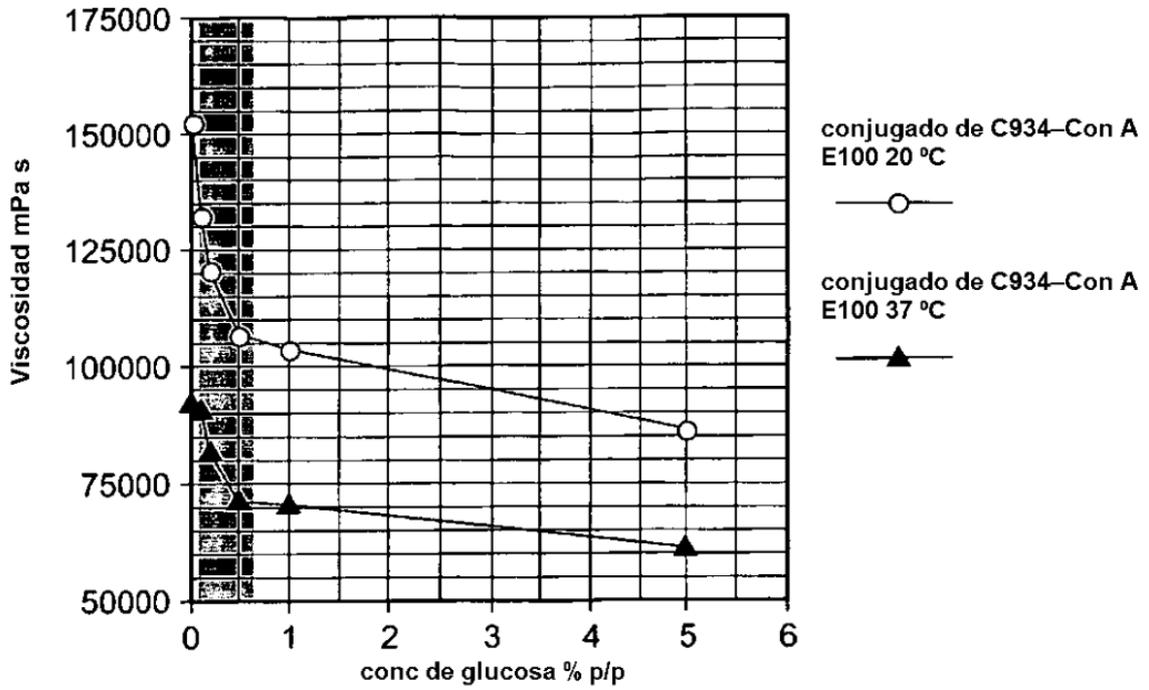


Fig. 10

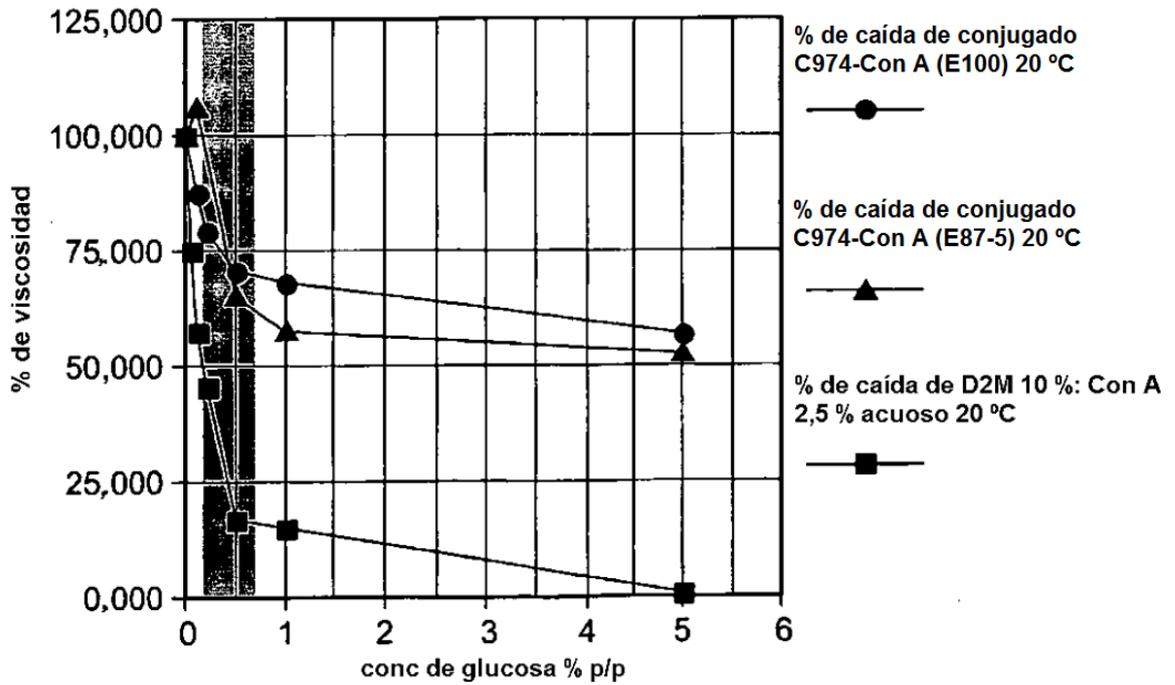


Fig. 11

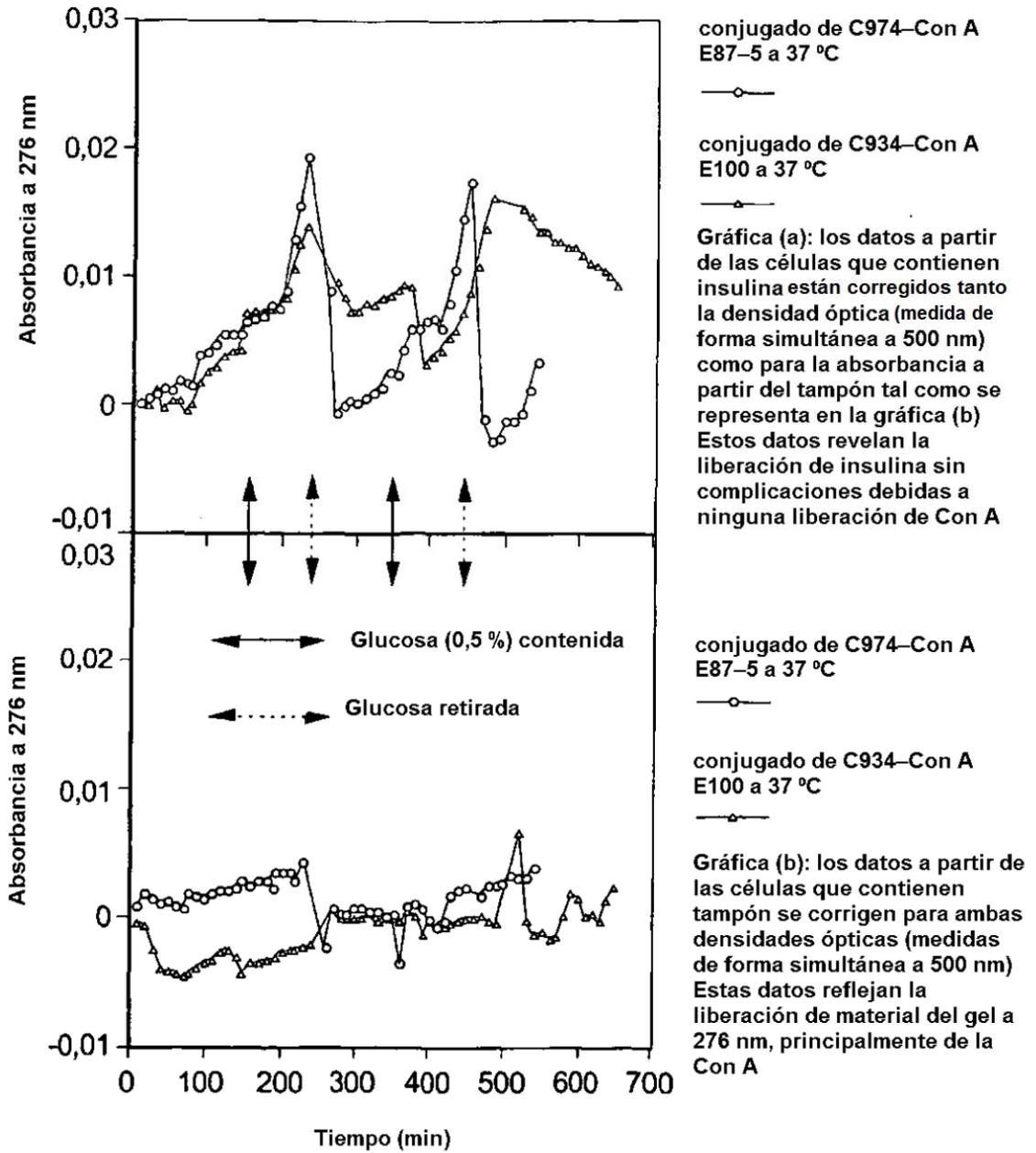


Fig. 12

Una comparación del efecto del tiempo de irradiación de muestras sobre la liberación de componentes de geles D70-MA + Con A-MA

- experimento realizado a 37 °C
- se usan filtros de tamaño de poro de 0,2 µm
- concentración de desencadenamiento de glucosa de 1 % p/v

- CONTROL DE APARATO**
- t = 20 min ga1209 (el expt. se continuó a partir de ga1208)
 - ◇— t = 15 min ga1212
 - t = 12 min ga1211
 - ▽— t = 12 min ga1211
 - t = 5 min ga1210

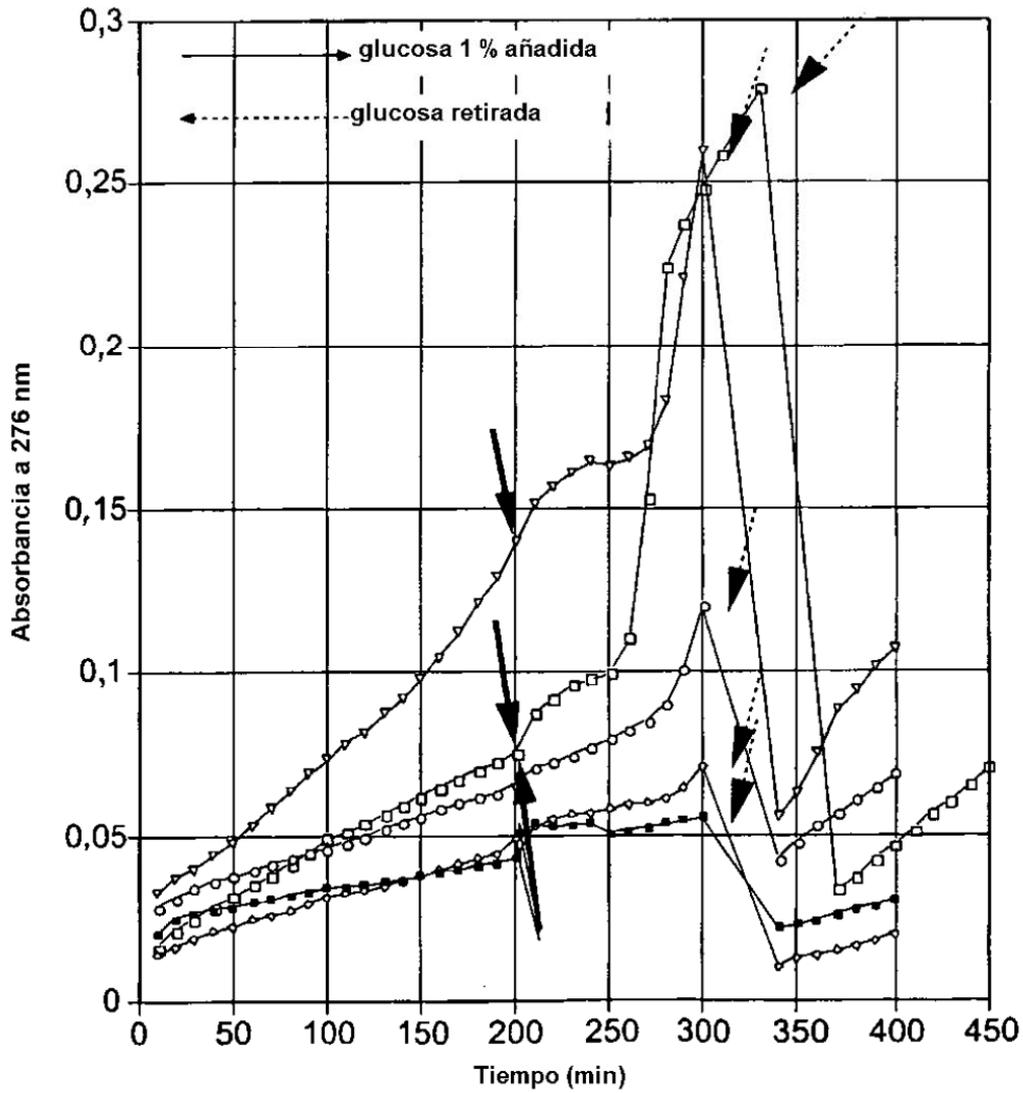


Fig. 13a

Una comparación de los perfiles de liberación de componentes prueba 9 de CL23 (t = 40 min) y prueba 2 de CL24 (t = 45)

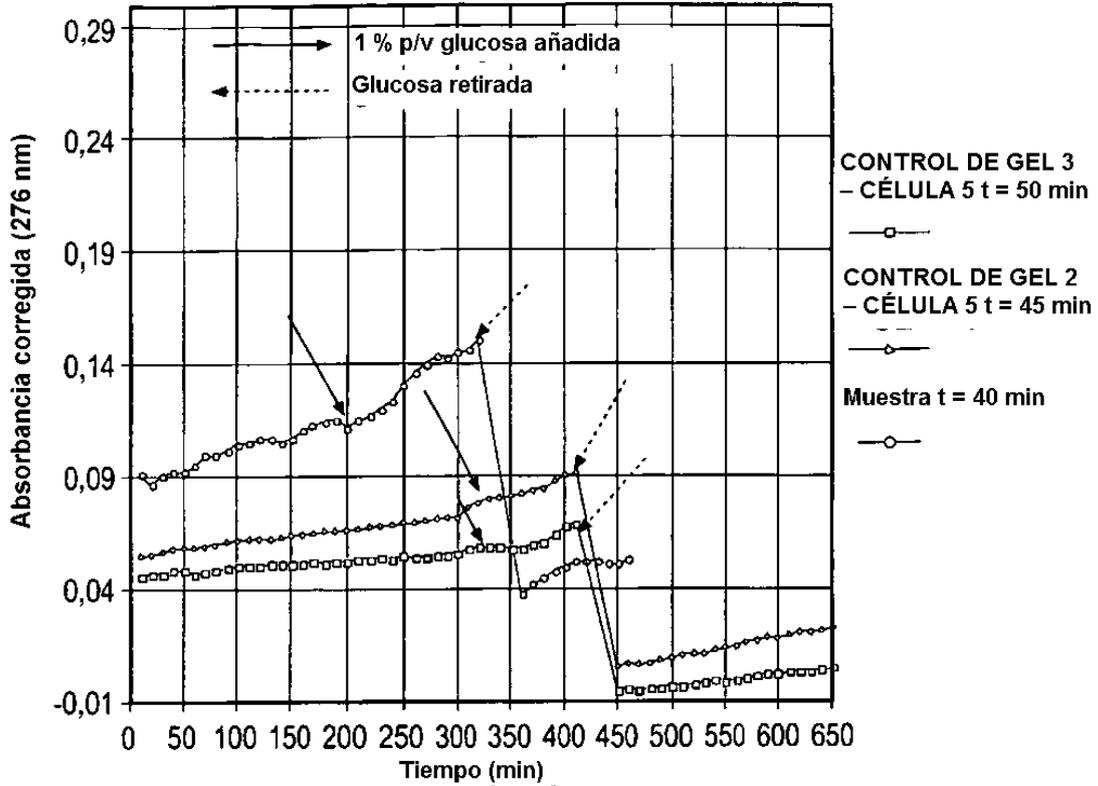


Fig. 13b

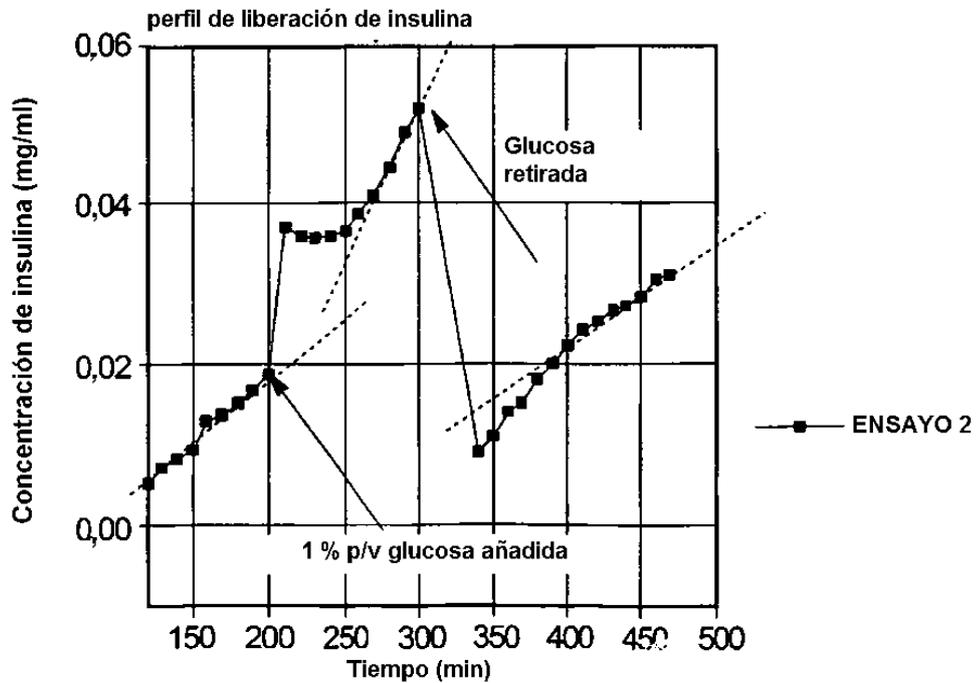


Fig. 14

Estudio 3 (mezcla 2)
 Comparación de los valores
 tangentes del ángulo de pérdidas
 para la mezcla de un 2 % de C974-8
 % de gelatina con un 0 % de
 quimiotripsina. Medidos a 20 ° C

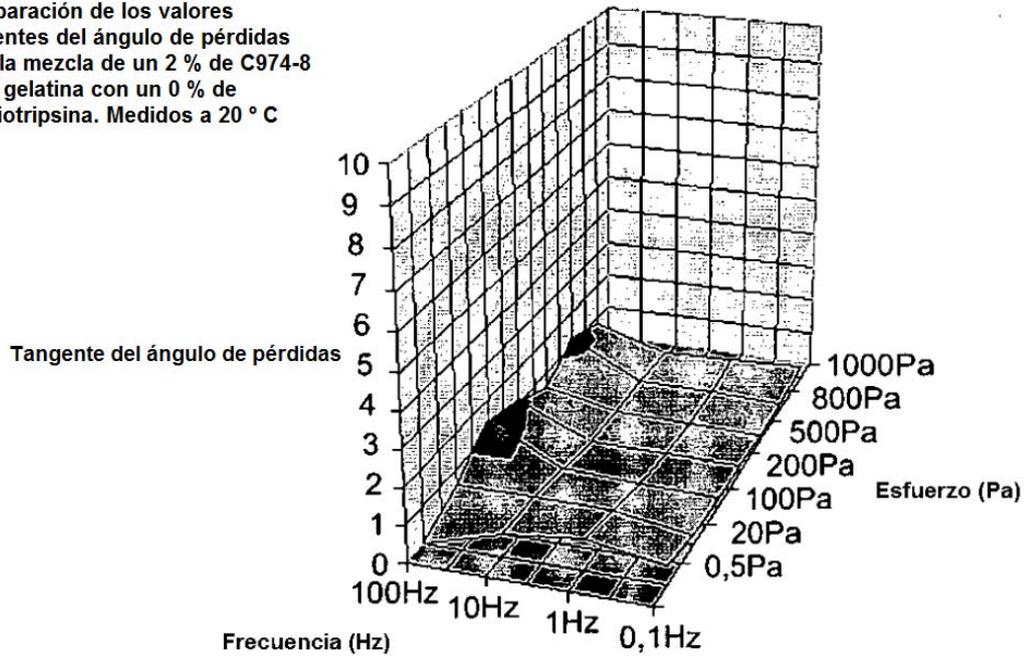


Fig. 15a

Gráfica 10 (estudio 3,1) (mezcla 2)
 Comparación de los valores de la tangente del
 ángulo de pérdidas para una mezcla de un 2 % de
 C974-8 % de gelatina con un 0 % de quimiotripsina.
 Medidos a 32 °C

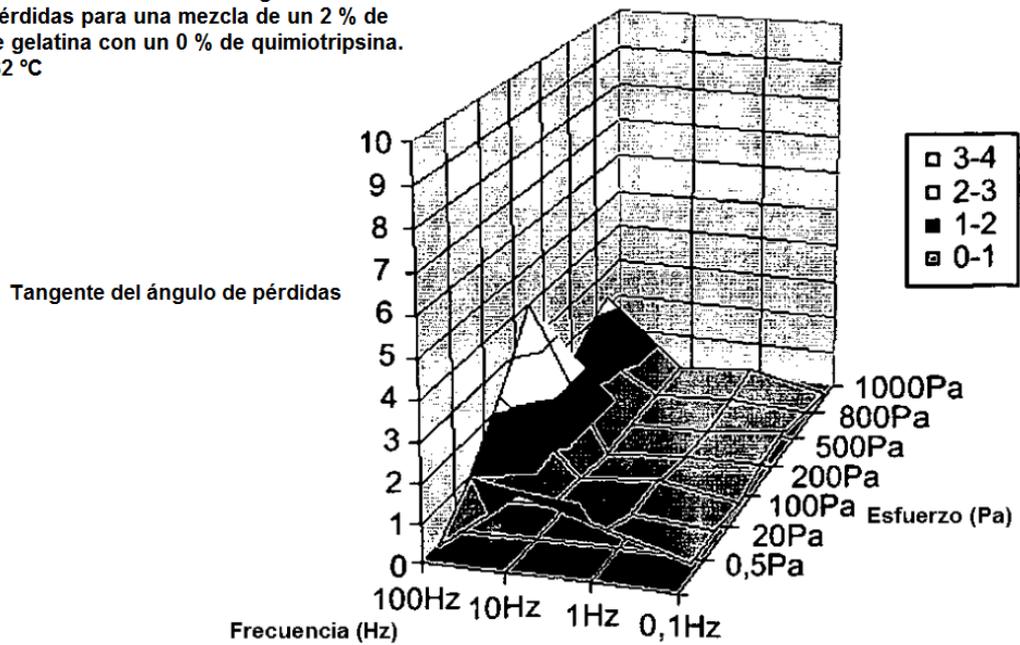


Fig. 15b

Gráfica 12 (estudio 3,1) (mezcla 32)
 Comparación de los valores de la tangente del ángulo de pérdidas para una mezcla de un 2 % de C974-8 % de gelatina con un 0 % de quimiotripsina. Medidos a 37 °C

Tangente del ángulo de pérdidas

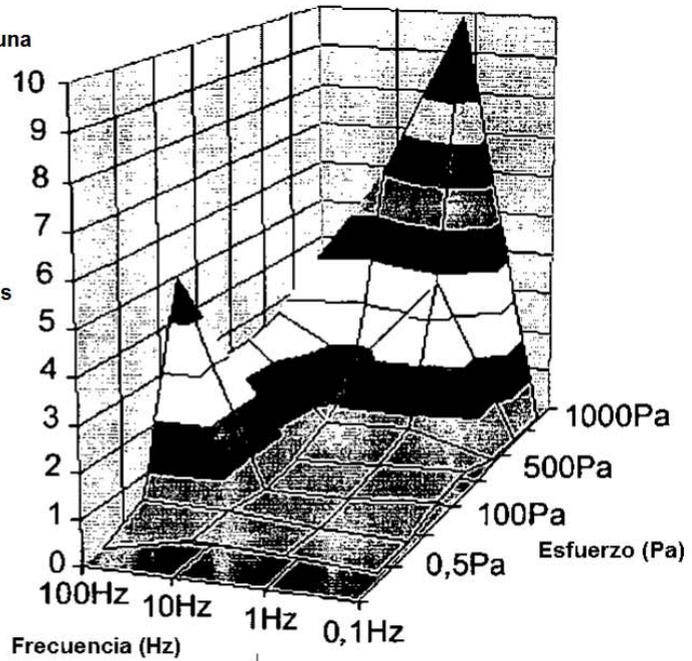


Fig. 15c

Estudio 14 (estudio 3,1) (mezcla 2)
 Comparación de los valores de la tangente del ángulo de pérdidas para una mezcla de un 2 % de C974-8% de gelatina con un 0 % de quimiotripsina. Medidos a 20 °C

Tangente del ángulo de pérdidas

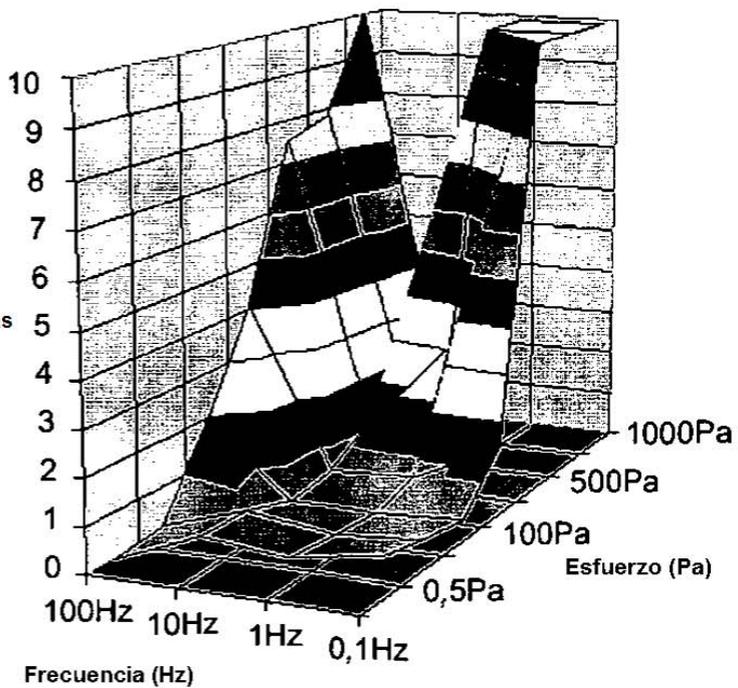


Fig. 15d

Estudio 17 (estudio 3,1) (mezcla 2)
 de los valores de la tangente del ángulo de
 pérdidas para la mezcla de un 2 % de
 C974-8 % de gelatina con un 0,1 %
 de quimiotripsina. Tomados a 32 °C

Tangente del ángulo de pérdidas

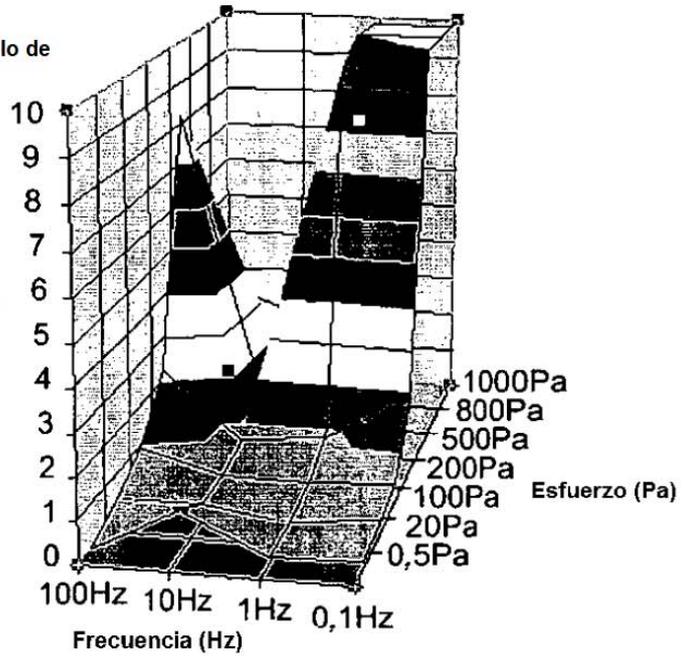


Fig. 15e

Gráfica 19 (estudio 3,1) (mezcla 2)
 Comparación de los valores de la
 tangente del ángulo de pérdidas para
 una mezcla de un 2 % de C974-8 % de
 gelatina con un 0,1 % de
 quimiotripsina. Tomados a 37 °C

Tangente del ángulo de pérdidas

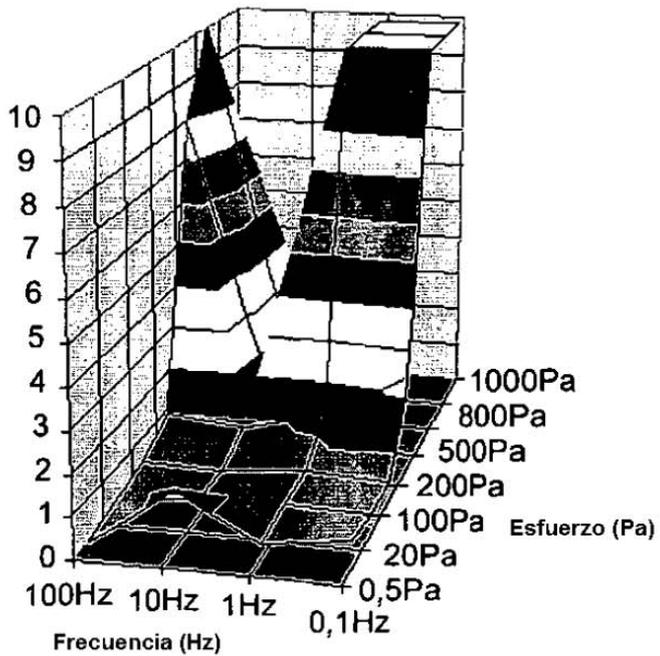


Fig. 15f