

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 479**

51 Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05798990 .7**

96 Fecha de presentación: **27.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1928918**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **HIDROGEL FUNCIONALIZADO CON UNA PORCIÓN POLIMERIZABLE Y SUS UTILIZACIONES COMO BIOSENSORES O BIORREACTORES.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1
621, AVENUE CENTRALE
38400 ST. MARTIN D'HERES, FR y
BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY**

72 Inventor/es:
**MARKS, Robert;
COSNIER, Serge;
ABU-RABEAH, Khalil;
IONESCU, Elena Rodica y
POLYAK, Boris**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 377 479 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

Hidrogel funcionalizado con una porción polimerizable y sus utilidades como biosensores o biorreactores.

5 La presente invención se refiere a un nuevo hidrogel funcionalizado con una porción polimerizable, a los hidrogeles polimerizados, a las películas y los geles que comprenden el mismo y a su utilización para la encapsulación de células, proteínas, ADN u otras moléculas, que incluye su utilización como biosensores o biorreactores.

10 Los biosensores permiten un análisis directo, sensible y rápido de las especies biológicas y químicas y por lo tanto se utilizan en muchas áreas de la asistencia sanitaria y ciencias de la vida, que comprenden desde revelar y diagnosticar enfermedades hasta el descubrimiento y el cribado de nuevos fármacos y moléculas (Cosnier, S. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 507-520; Maite, S. Francisco, A. *J. Chemical Reviews.* 2003, 104, 3239-3265; Vagdama, P Crump P. *Analyst.* 1992, 117, 1657; Cosnier & al., *J. Electroanalytical Chemistry*, vol. 449, nº 1/2, 1998, 165-171).

15 Los dispositivos de biosensores acoplan una entidad de reconocimiento bioespecífica a la superficie de un transductor, que "transduce" un episodio de reconocimiento celular en una señal eléctrica medible, lo que señala la presencia de la molécula diana.

20 Las matrices de hidrogel han sido muy utilizadas para construir unos biosensores como el prometedor hidrogel con alginato, que pertenece a la familia de los copolímeros que presentan β -D-manurónico con enlace 1,4, y residuos de ácido α -L-glucurónico que varían tanto en proporciones como en disposición secuencial (Torres, L. G. Sanches-de-la-Vega, N. A. *Process Biochem.* 1998, 33, 625; Kierstan, M. Bucke, C. *Biotech. Bioeng.* 2000, 67, 726; Gombotz, W. R. Wee, S. F. *Adv. Drug. Delv. Rev.* 1998, 31, 267; Cosnier, S. Novoa, A. Mousty, C. Marks, R. S. *Analytica Chim. Acta.* 2002, 453, 71-79).

25 Otros hidrogeles y (co)polímeros reticulables se dan a conocer en la técnica (Smeds & al., *J. Biomed. Materials Res.*, vol. 54, nº 1. 2001, 115-121; Yang & al., *Synthetic Materials*, vol. 32, 1989, 191-200; Tokura & al., *Carbohydrate Polymers*, vol. 13, nº 4, 1990, 363-374; Zhang & al., *Carbohydrate Polymers*, vol. 26 nº 3, 1995, 205-209; Gandini & al., *Polymer*, vol. 44, nº 25, 2003, 7565-7572).

30 Los geles se forman *in situ* de forma espontánea en presencia de iones divalentes como el calcio en un proceso de una sola etapa que tiene lugar en unas condiciones muy suaves. El gran éxito técnico en su atrapamiento y encapsulación es debido al entorno suave que proporcionan al material atrapado, así como a la existencia de una elevada porosidad, debido a la estructura de red abierta en el gel. Esto permite unas tasas de difusión elevadas en la totalidad de la estructura del gel y facilita los intercambios con la solución acuosa. Sin embargo, debido precisamente a su elevada porosidad, las macromoléculas como las enzimas penetrarán en la solución acuosa, limitando así la utilización de esta matriz a básicamente células enteras u orgánulos celulares (Smidsord, O. Skajak-Barak, G. *TIBTECH.* 1990, 8, 71; Oretega, N. Busto, M. D. Peraz Mateos, M. *Bioresour. Technol.* 1998, 64, 105; Martinsen, A. Skajak, G. Smidsord, O. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 33, 79; Blandino, A. Macias, M. Cantero, D. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 319).

35 Se han propuesto varios procedimientos para la estabilización de los geles con alginato y reducir su porosidad para proporcionarles la propiedad de liberación controlada. Los procedimientos utilizados más habitualmente son el recubrimiento policatiónico (Schacht, S. Vandichel, J. C. *Encapsulation and Controlled Release*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993, 18-34) y el reticulado covalente (Levy, M. C; Edward-Levy, F. J. *Microencapsulation*, 1996, 13, 169), no satisfactorios hasta la fecha.

40 La presente invención se refiere por lo tanto a un nuevo hidrogel funcionalizado en el que el esqueleto del hidrogel y un polímero se unen mediante uno o más enlaces covalentes, y que el polímero se forma *in situ* mediante la polimerización de un hidrogel funcionalizado injertado que presenta por lo menos una porción polimerizable.

Según la presente invención, "injertado" significa un enlace covalente entre el hidrogel y la porción polimerizable.

45 La presente invención se refiere al esqueleto de un hidrogel funcionalizado injertado con por lo menos una porción polimerizable en el que el hidrogel es un polímero de alginato y la porción polimerizable está injertada en un grupo ácido carboxílico del polímero de alginato.

50 Las porciones polimerizables son conocidas en la técnica. En una forma de realización preferida, la porción polimerizable se selecciona de entre el grupo constituido por tiofeno, anilina y pirrol, preferentemente un grupo pirrol.

55 Los hidrogeles funcionalizados según la presente invención comprenden ventajosamente un grupo espaciador entre el esqueleto del hidrogel y la porción polimerizable. Este espaciador se selecciona para evitar una interferencia sustancial durante el proceso de polimerización de la porción polimerizable. Se puede seleccionar de entre los grupos alquilenilo, grupos cicloalquilenilo, grupos alquenillenilo, sustituidos eventualmente por uno o más sustituyentes.

Según la presente invención, los grupos alquénulos son preferentemente C1-C6 lineales o grupos alquénulos ramificados, que incluyen los radicales metilenilo, etilenilo, propilenilo, butilenilo, pentilenilo y hexilenilo. Se aplican las mismas definiciones para los grupos alquénuleno pero comprende una o más enlaces insaturados.

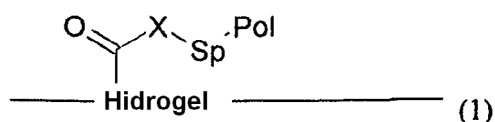
Los grupos cicloalquénulos son preferentemente grupos C3-C6 cicloalquénulos, que incluyen los grupos ciclopropilenilo, ciclopentilenilo y ciclohexilenilo.

Tanto el esqueleto del hidrogel como la porción polimerizable se pueden unir a al espaciador en el mismo átomo de carbono, o en distintos átomos de carbono.

Se pueden sustituir uno o más grupos -CH₂- o -CH- del espaciador por oxígeno, un grupo amino o carbonilo.

En las formas de realización preferidas, la porción polimerizable se injerta en la porción de hidrogel a través de una unión amida o una unión éter.

Los hidrogeles funcionalizados según la invención preferidos se pueden representar por la fórmula (1) siguiente.



en la que,

el hidrogel es un esqueleto de alginato,

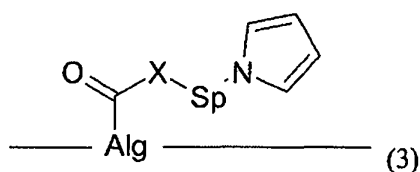
Pol es una porción de polimerización tal como se ha definido anteriormente y a continuación,

Sp es un grupo de espaciador tal como se ha definido anteriormente y a continuación,

X es un oxígeno de un grupo amino NR₁, en el que R₁ se selecciona de entre H ó un grupo C1-C3 alquilo.

En las formas de realización preferidas, el hidrogel funcionalizado según la invención comprende un polímero de alginato como esqueleto del hidrogel y una porción pirrol como parte de polimerización.

Los polímeros de alginato preferidos que comprenden por lo menos una porción pirrol se pueden representar mediante la fórmula (3) siguiente



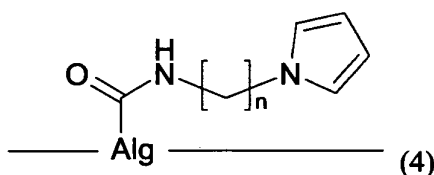
en la que,

X se selecciona de entre O ó NR₁, y R₁ se selecciona de entre H ó un grupo alquilo C1 a C3,

Sp es una porción espaciadora seleccionada de entre grupos alquénulos, grupos cicloalquénulos, grupos alquénulenos, sustituidos al final por uno o más sustituyentes, y

Alg es un azúcar del polímero de alginato de la esqueleto.

Los hidrogeles con alginato preferidos que comprenden por lo menos una porción pirrol injertada de la invención se pueden representar mediante la fórmula (4) siguiente



en la que,

5 n es un número entero de 1 a 6, preferentemente 3, y

Alg es un azúcar del polímero de alginato del esqueleto.

10 Los hidrogeles con alginato injertados con unas porciones pirrol comprenden preferentemente de 10% a 40% de porciones pirrol sobre la base al número total de porciones de ácido carboxílico del polímero de alginato, más preferentemente aproximadamente 30% de porciones pirrol.

15 Para obtener un esqueleto de hidrogel y un polímero se unen con uno o más enlaces covalentes siendo la porción polimerizable del hidrógeno funcionalizado de la presente invención además polimerizada.

La polimerización *in situ* de las porción polimerizable comportará la formación del polímero correspondiente unido covalentemente al esqueleto del hidrogel mediante unos o más enlaces covalentes, como un polímero de polipirrol.

20 Las propiedades adicionales del hidrogel funcionalizado de la presente invención están asociadas con la elección del polímero que se injerta en el esqueleto del hidrogel.

Por ejemplo, un polímero de polipirrol añadirá unas propiedades electroquímicas específicas.

25 La presente invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de un hidrogel funcionalizado descrito anteriormente y a continuación, que comprende la reacción del esqueleto de un hidrogel con una porción polimerizable funcionalizada para permitir la formación de un enlace covalente entre el esqueleto del hidrogel y la porción polimerizable.

30 La formación de un enlace covalente entre el esqueleto del hidrogel y una porción de polimerización, en última estancia a través de un espaciador, dependerá de la estructura química del esqueleto del hidrogel y de la porción polimerizable. Se conocen en la técnica procedimientos para este tipo de injertos.

35 El procedimiento de la invención comprende además la polimerización del hidrogel funcionalizado de la invención, bajo condiciones adecuadas para la polimerización de la porción polimerizable.

Estos procedimientos son conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, la polimerización de la porción polimerizable se realiza química o electroquímicamente.

40 La presente invención también se refiere a la composición de un polímero que comprende el hidrogel funcionalizado tal como se ha definido anteriormente y a continuación preferentemente en forma de una película o un gel.

45 La invención también se refiere a una composición que comprende un hidrogel funcionalizado de la invención o la composición de un polímero tal como se ha definido anteriormente y a continuación combinado con por lo menos un segundo elemento seleccionado de entre células, proteínas, ADN u otras moléculas. Esta composición puede estar comprendida en un biosensor, en un biorreactor o en composiciones farmacéuticas que comprenden una composición definida anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención comprende la utilización de formulaciones farmacéuticas para su utilización médica en humanos que comprende una composición de hidrogel funcionalizado de la presente invención como ingredientes terapéuticos. Estas formulaciones farmacéuticas pueden incluir unos portadores farmacéuticos eficaces, y opcionalmente, pueden incluir otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de que sean compatibles con los ingredientes terapéuticos y no resultan excesivamente perjudiciales para su recipiente. El ingrediente o los ingredientes terapéuticos están previstos en una cantidad necesaria para conseguir el efecto terapéutico deseado.

55 El término "portador" se refiere a un diluyente, un adyuvante, un excipiente, o un vehículo con el que se administra el conjugado. Estos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, que incluyen los de origen animal, vegetal, sintético o de petróleo, como el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similar. Cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente, el agua es el portador preferido. También se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones acuosas de glucosa y de glicerol

60

como portadores líquidos, especialmente para las soluciones inyectables.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, cal, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, propilenglicol, agua, etanol y similares.

Si se desea, la composición también puede contener cantidades inferiores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes que tamponan el pH.

Las composiciones pueden presentar forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similar. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores habituales como los triglicéridos.

Los medios de administración ejemplificativos incluyen la administración por vía oral, parenteral, rectal, tópica, sublingual, mucosa, nasal, oftalmológica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática e intrauterina.

La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como de calidad farmacéutica de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Figura 1. Acoplamiento del pirrol al alginato vía química de la carbodiimida.

Sección experimental

Materiales. Los productos químicos obtenidos comercialmente tienen un grado de pureza analítica y se utilizaron sin ninguna purificación adicional. El Protanal alginato sódico LF10/60 (de *Laminaria hyperborea*, contenido 70%G, peso molecular medio de 128 kDa, la viscosidad de la solución al 1% (p/v) es 40 cP) se suministró a través de FMC Biopolymer (Noruega). 1-(2-cianoetil) pirrol (C9135-2), solución híbrida de aluminio-litio (62423), celita (22145), 1-etil-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida HCl (EDAC; E-1769), ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico (MES) tampón (M-8250), cloruro cálcico (C-5426), polifenoloxidasas (PPO) (EC 1.14.18.1, de hongo) con una actividad de 3.620 U mg⁻¹ sólido, Tris-HCl (T-3253) se compraron de Sigma y Aldrich Co. (EEUU), N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS; 24510) se adquirió en Pierce (Rockford, EEUU). Dietiléter (5551550) se obtuvo de Frutarom (Israel), perclorato de litio (194711000) se compró de Acros Organics y Catecol (200-427-5) de ICN Biomedical GmbH.

Síntesis de N-(3-aminopropil) pirrol. Se añadió gota a gota una solución de 1-(2-cianoetil) pirrol (0,02 mol) en éter anhídrido (15 ml) a una suspensión de LiAlH₄ (0,05 mol) en éter anhídrido (150 ml) y la mezcla se sometió a reflujo durante 10 horas. Después de que se enfriara, se destruyó el exceso de híbrido mediante la adición sucesiva de agua (1,7 ml), una solución de NaOH al 15% (p/v) (1,7 ml) y agua (5,1 ml). La solución se calentó a una temperatura de 40°C durante 2 horas y se filtró en celita antes de la evaporación hasta el secado. Se obtuvo un aceite de color amarillo (Naji, A., Cretin, M., Persin, M., Sarrazin, J. *J. Polmer. Sci.* 2003, 212, 1-1) con un rendimiento de 91,6%. ¹RMNδ (CDCl₃): 1,90 (m, 2H, CH₂-2); 2,70 (t, 2H, CH₂-3); 3,95 (t, 2H, CH₂-1); 6,14 (d, 2H, CH-β); 6,65 (d, 2H, CH-α). ¹³C-RMNδ (CDCl₃): 35,5 (CH₂-2); 39,7 (CH₂-3). Espectroscopia FTIR: los rasgos característicos del espectro del N-(3-aminopropil) pirrol son un pico fuerte muy marcado a 3.370 cm⁻¹ con un hombro medio en 3.295 cm⁻¹ que corresponde a las modalidades de las vibraciones de tensión N-H "libres" asimétricas y simétricas de las aminas alifáticas primarias.

Preparación de un alginato conjugado con pirrol. El conjugado de alginol-pirrol se preparó mediante la adición de 50 mg (0,25 mmol) de N-(3-aminopropil) pirrol a una solución de alginato (solución de 20 ml, 0,25 mmol de monómero de alginato, 50 mg) en un tampón MES 0,1 M, con pH 6,0. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos para facilitar una dispersión homogénea del reactivo pirrol en la solución de reacción. Después, se añadieron 13,5 g (0,0625 mmol) de NHSS y 24 mg (0,125 mmol) de EDAC (las proporciones de los reactivos se calcularon para una modificación molar teórica del 50% del número de grupos carboxílicos de alginato). Después de 3 horas a temperatura ambiente, el polímero resultante se dializó con agua desionizada doblemente utilizando una membrana 6000-8000 MWCO (314 N. River St. USA). El agua se cambió dos veces al día durante tres días, y transcurrido ese tiempo el alginato modificado se liofilizó.

Análisis espectroscópico. Para la espectroscopia FTIR se prepararon unas muestras de polímero en forma de películas delgadas mediante la disolución de 4 mg/ml del alginato modificado en agua desionizada doblemente. La solución resultante se vertió en una placa Petri de poliestireno y se secó en un horno a una temperatura de 50°C durante 24 horas para producir una película de polímero delgada y transparente (Sartori, C.; Finch, D.; Ralph, B.; Gilding, K. *Polymer.* 1997, 38, 43-51). Se realizaron mediciones con infrarrojos en el modo transmisión en un espectrómetro infrarrojo Bruquer Equinox 55. El espectro de FTIR presentó una media de 128 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹.

Para la espectroscopia de ¹³C-RMN, se disolvieron muestras de alginato modificado en D₂O. las medidas de ¹³C-RMN se realizaron con un instrumento Broker Advance DNX (500 MHz) que utiliza los programas Pals habituales.

Ensayo cuantitativo sobre el grado de modificación alginato. Se evaluó el grado de modificación del alginato por N-(3-aminopropil) pirrol mediante mediciones de la absorbancia UV a 230 nm. Se disolvieron muestras de pirrol-alginato para producir una solución de alginato al 0,01% (p/v) y se midió utilizando un Espectrómetro Ultrospec 2100 Pro UV/Visible (Biochrom CB4 0FJ, Inglaterra) a una longitud de onda de 230 nm. El grado de modificación del alginato se calculó a partir de la curva de calibración obtenida mediante la medición de la absorbancia de diferentes cantidades de N-(3-aminopropil) pirrol en una solución de alginato de 0,01% (p/v). Se utilizó una solución estándar de alginato a una concentración de (0,01% p/v) como control.

Mediciones de la viscosidad. Se determinó la viscosidad de varias soluciones de pirrol-alginato y alginato sin modificar [1,53-3% (p/v) en agua desionizada doblemente] utilizando un reómetro CLS-50 de presión controlada (TA Instruments, UK). Las mediciones se realizaron utilizando geometría de plato cónico (4 cm/4°)

Análisis HPSEC-MALLS. Las distribuciones del peso molecular de los polímeros se determinaron con un fotómetro (DAWN DSP, Wyatt Technology Inc., Santa Barbara, USA) dispersor de luz láser multiángulo (MALLS), acondicionado con una célula de fluido K5 y un láser He-Ne (633 nm). Se prepararon muestras de polímeros, 3 mg/L, en un tampón que contenía 0,02% (p/v) de azida sódica y nitrato sódico 0,1M en una solución de imidazol 10 mM a pH7,0. Las separaciones fraccionales se realizaron en columnas de separación de 100-, 300- y 1000-Å PSS Suprema (Polymer Standar Service, Alemania). La fase móvil se dejó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo nominal de 0,7 mL/min. Se calibraron los detectores de MAALS y del índice diferencial de refracción (DRI) con soluciones de tolueno filtrado con grado HPLC y de NaCl, respectivamente. El instrumento MALLS se normalizó utilizando un estándar P 23 (dispersor de luz isotrópico). El valor dn/dc (incremento del índice de refracción específico) de los polímeros estudiados se calculó en 0,155 [mL/g], según el valor descrito en los documentos para el alginato sódico en presencia de NaCl.¹⁸

Instrumentos electroquímicos. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en una célula electroquímica convencional (Metrohm). Se utilizó un electrodo Ag-AgCl- KCl saturado como electrodo de referencia y se colocó un cable Pt en un compartimiento separado que contenía el electrolito de apoyo se utilizó como electrodo de barra. El electrodo en funcionamiento era un electrodo de disco rotatorio de carbono vidrioso (diámetro de 5 mm) pulido con una pasta de diamante de 2 µm (MECAPREX Press PM). Las mediciones amperiométricas se realizaron en un tampón Tris-HCl a 0,1 M (pH= 6,5) utilizando un potenciostato Tacussel PRG-DL y un termostato celular electroquímico a una temperatura de 20 ± 1°C. El control electroquímico de la cantidad de enzima liberada en la solución tamponada se llevó a cabo con un potenciostato Autolab 100.

El proceso de electropolimerización se realizó a temperatura ambiente mediante una oxidación potencial controlada durante 20 minutos a 0,94 V en una solución acuosa de 0,1 M LiClO₄ utilizando un potenciostato EG & G Princeton Applied Research 173 equipado con un programador universal Modelo 175 conjuntamente con un grabador Kipp and Zonen BD 91 WY/t.

Preparación de los electrodos enzimáticos. Se preparó una solución acuosa al 2% (p/v) de alginato o pirrol-alginato en un tampón Tris-HCl 0,1 M (pH= 6,5) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución resultante se filtró utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm para extraer microorganismos y contaminantes.

Se esparcieron sobre la superficie de los electrodos de carbono vidriosos (diámetro de 5 mm) 15µl de una mezcla de 2% (p/v) de alginato o pirrol-alginato que contenía oxidasa polifenol (PPO). Después, se gelificaron los recubrimientos mediante inmersión en 0,1M CaCl₂ durante 15 minutos. Después, el electrodo pirrol-alginato-PPO se situó a una potencia de 0,94 V durante 10 minutos para oxidar las partes pirrol en las cadenas polipirrólicas dentro del gel.

Resultados y discusión

Modificación del alginato. Se preparó pirrol-alginato en una fase acuosa mediante química carbodiimida según el esquema que se muestra en la Figura 1. El enfoque de fase acuosa de química carbodiimida utiliza carbodiimida soluble en agua (EDAC) que cataliza la formación de enlaces amida entre ácidos carboxílicos y aminas mediante la activación del carboxilato para formar un intermediario de O-acilisourea (Khorana, H. G. *Chem. Rev.* 1953, 53, 145-166, DeTar, D.F.; Silverstein, R.; Rofers, F. F., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 1024-1030). Este intermediario es inestable en una solución acuosa y experimenta una rápida hidrólisis. Para que el procedimiento sea satisfactorio, la forma activa de los carboxilos del alginato deberían ser más estables que el derivado de O -acilisourea. Esta condición se pudo cumplir mediante los denominados "ésteres activos", como los ésteres N-hidroxisuccinimidilo (NHS) desarrollados para la síntesis de péptidos (Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 1839-1842) a sus derivados sulfonatados (Staros, J. V. *Biochemistry* 1982, 21, 3950-3955).

La conjugación química del alginato se diseñó para obtener una modificación de aproximadamente 25-35% de la molécula para mantener aproximadamente 70% de los residuos carboxílicos sin modificar y disponibles para su reticulado mediante calcio. Según nuestro estudio anterior (Polyak, B.; Shimona, G.; Marks, R. S. *Biomacromolecules*. 2004, 5, 389-396) y otros estudios (Rowley, J. A.; Madlambayan, G.; Money, D. J. *Biomaterials*.

1999, 20, 45-53) con la modificación biotina-alginato, las eficacias de la reacción fueron aproximadamente un 70%, por lo tanto, se utilizó un 50% de química de activación con ácido urónico para conseguir el grado de modificación deseado del alginato. El procedimiento de emparejamiento se realizó utilizando las condiciones óptimas de reacción descritas anteriormente.

Las reacciones de control sin la adición de EDAC para la activación se realizaron para cada uno de los experimentos. Después de la diálisis, se detectó menos del 1% del grupo de pirrol mediante espectroscopia UV, lo que indica que la incorporación de pirrol no es el resultado de interacciones no específicas o del anclaje físico de N-(3-aminopropil) pirrol por el polisacárido.

Caracterización espectroscópica del pirrol-alginato. El producto pirrol-alginato se caracterizaba por la espectroscopia FTIR y ^{13}C -RMN. Los rasgos característicos del espectro del pirrol-alginato son picos fuertes muy marcados a 1.666 cm^{-1} y a 1.560 cm^{-1} que corresponden a la banda de amida I, vibraciones de tensión C=O, una banda amida II, vibraciones de unión N-H respectivamente, y un pico mediano muy marcado a 1282 cm^{-1} (banda amida II, interacción entre las vibraciones de unión N-H y de tensión C-N) (Silverstein, R. M.; Webster, F. X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6ª Edición, 1997).

El espectro de ^{13}C -RMN confirmó la conjugación del pirrol al alginato a través de la formación de una unión amida. En contraste con el intercambio químico del grupo carboxilo a 174,4 ppm presente en el alginato sin modificar, el producto pirrol-alginato mostró dos nuevos intercambios químicos, el de 1-amida carbonilo (CONH) a 174 ppm y el de un carbono en el anillo de pirrol (CHN) a 121,6 ppm.

Cuantificación del contenido de pirrol en el alginato modificado. Se evaluó la importancia de la modificación del alginato por N-(3-aminopropil) pirrol mediante espectroscopia de absorción de UV-visible, que es una técnica útil para la detección y las medidas de cuantificación de cromóforos que experimentan transiciones $\text{N} \rightarrow \pi^*$ ó $\pi \rightarrow \pi^*$. Debido a su sensibilidad, la espectroscopia de UV-visible ha sido especialmente útil para la identificación y el análisis de material "extraño" en monómeros de polímeros residuales, inhibidores, antioxidantes y demás³³⁻³⁴. Una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ tiene lugar en el anillo de pirrol presente en el conjugado de pirrol-alginato y que permite la cuantificación de la cantidad de N-(3-aminopropil)pirrol mediante espectroscopia de absorción de UV visibles a una longitud de onda de 230 nm. Se midieron varias muestras dentro de un intervalo de concentración (50-250 μM) de N-(3-aminopropil) pirrol disuelto en una solución de alginato (0,1 p/v%) mediante absorción de UV a una longitud de onda de 230 nm. Los datos recogidos en las mediciones de absorción de UV presentaban un intervalo lineal muy bueno en las concentraciones de N-(3-aminopropil) pirrol ($R^2= 0,99$). El coeficiente de extinción de 2080 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para N-(3-aminopropil) pirrol se calculó a partir de la pendiente de la curva trazada.

El valor medio del grado de modificación del alginato obtuvo aproximadamente un $30\pm 3\%$ de modificación molar para un número de muestras en relación a diferentes baños sintéticos del conjugado de pirrol-alginato. La desviación estándar relativamente baja indica una buena reproducibilidad del procedimiento de modificación del alginato.

Características de los parámetros de peso molecular y viscosidad. La distribución diferencial de masa molar muestra cuanto material (fracción de peso diferencial) está presente en todos los intervalos de peso. La distribución acumulativa proporciona, para cada masa molar, las fracciones en peso de material que presenta una masa molar inferior al peso proporcionado. Por lo tanto, la distribución acumulativa es de aproximadamente cero en los pesos moleculares bajos y a la unidad en los pesos moleculares elevados. La distribución acumulativa es, por lo tanto, especialmente útil para determinar qué fracciones de peso molecular están contenidas en los extremos moleculares elevados y bajos de la muestra (Tristan T., Hugo, G. J. *Agric. Food. Chem.* 2000, 48, 5455-5458). El producto pirrol-alginato muestra un cambio evidente a pesos moleculares más elevados en ambas presentaciones de la distribución.

Este resultado de la dispersión de luz proporciona un procedimiento para determinar la distribución absoluta de peso molecular y tamaño (Debye, P. J. W. *J. Appl. Phys.* 1944, 15, 338-342), lo que implica que el pirrol probablemente se encuentra homogéneamente distribuido sobre el esqueleto del alginato. El peso molecular medio (M_p) para el pirrol-alginato (modificación molar de $30\pm 3\%$) se midió como 370-390 kDa ($M_p/M_n= 3,03-3,4$ mediante mecanismos de SEC. Este valor representa un aumento del M_p inicial del alginato ($M_p= 128\text{ kDa}$ $M_p/M_n= 1,14$). El significado de la proporción M_p/M_n para el pirrol-alginato y alginato es que se dispone de polímeros polidispersados.

La viscosidad de las soluciones de pirrol-alginato a varias concentraciones mostró que las viscosidades eran más elevadas que las de la solución de alginato original. (Tabla 1).

Este descubrimiento refleja el aumento del peso molecular del alginato modificado en relación con el alginato original así como el aumento del carácter hidrofóbico del alginato modificado debido a las porciones de pirrol orgánico.

Tabla 1. Viscosidad del pirrol-alginato modificado 30±3% y del alginato original medido a una velocidad de 100 s⁻¹

| Concentración de polímero (% p/v) | Viscosidad (cp) ^a | |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------|
| | Pirrol-alginato | Alginato original |
| 1,5 | 309 | 46,25 |
| 2,0 | 900,9 | 105,2 |
| 2,5 | 957,9 | 196,4 |
| 3,0 | 1977 | 605,7 |

5 ^a Estos datos representan la media de los tres experimentos independientes con unmaximal de 5%.

Las interacciones del grupo carboxílico en el monómero de alginato aumentan la barrera estérica afectando a la distancia entre las cadenas de los polímeros, lo que conduce a una reducción de las fuerzas de cizallamiento y una reducción de la viscosidad de la solución del alginato regular en comparación con las soluciones de pirrol-alginato, en las que la modificación química del grupo carboxílico del monómero a través de N-(3-aminopropil) pirrol conduce a menos interacciones, estabilidad mayor del hidrogel y viscosidad elevada.

Construcción del biosensor.

15 Para caracterizar el impacto del esqueleto de polipirrol electrogenerado *in situ* sobre las propiedades de retención del gel de alginato, se investigó el fenómeno de liberación o pérdida de enzimas para el alginato regular y el pirrol-alginato. Como modelo de enzima se seleccionó la polifenol oxidasa (PPO) que cataliza la oxidación de los fenoles y o-difenoles con un consumo simultáneo de oxígeno. Las dos configuraciones de biosensor (alginato-PPO y polipirrol-alginato-PPO) se sumergieron separadamente en una solución tampón de Tris-HCl 0,1 M (pH= 6,5) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fuga de enzimas en la solución se evaluó amperométricamente a partir de su actividad sobre la oxidación del catecol. Después, se colocó un electrodo de carbono vidrioso a -0,2 V vs Ag/AgCl y se registró la reducción de corriente de la quinona generada enzimáticamente después de la adición del catecol (2 mM).

25 La comparación de la parte lineal de la pendiente de la curva de corriente vs. tiempo con la pendiente obtenida utilizando las mismas condiciones en presencia de moléculas sin PPO indicó que el 20% (15 µg) y el 60% (45 µg) de las moléculas de PPO iniciales atrapadas habían desaparecido de los recubrimientos de polipirrol-alginato y alginato, respectivamente. Esto demuestra inequívocamente el efecto beneficioso aportado por la polimerización de las porciones pirrol injertadas químicamente en el gel de alginato en las propiedades de retención de la enzima del gel resultante.

El polipirrol electrogenerado *in situ* parece actuar como un aglutinante polimérico adicional que refuerza la estabilidad del gel de alginato. Además, se investigaron las características analíticas de los electrodos de polipirrol-alginato-PPO y alginato-PPO para la determinación del catecol manteniendo constante el potencial de electrodo en ambos biosensores a -0,2 V para reducir la quinona generada enzimáticamente en los geles. El estado estacionario de la respuesta corriente-tiempo para las inyecciones de catecol indica un tiempo de respuesta corto (20 s) para ambas configuraciones de biosensor lo que ilustra las excelentes permeabilidades de estos geles de alginato. La calibración resultante de las curvas condujo a un valor de sensibilidad (determinado por la pendiente de la parte inicial de la curva de calibración) para el catecol de 350 a 80 µAM⁻¹ cm⁻² para los sensores de polipirrol-alginato y alginato respectivamente. Además, el valor de corriente máxima (I_{máx}) para el biosensor de polipirrol-alginato (42 µA cm⁻²) fue 4,4 veces superior al registrado por el biosensor de alginato (9,5 µA cm⁻²). Se debería destacar que la I_{máx} está directamente relacionada con la cantidad disponible de enzima inmovilizada. Estos resultados corroboran el papel principal que ejerce el polipirrol generado *in situ* para la retención de moléculas de enzima inmovilizadas con la conservación de su actividad.

Funcionalización del electrodo.

Para la funcionalización del electrodo, se rociaron sobre la superficie del electrodo (disco de carbono, diámetro de 5 mm) 3 µl de una solución acuosa al 2% (p/v) de alginato o pirrol-alginato y se dejó reaccionar con una gota de 0,1 M CaCl₂ durante 5 minutos^{16, 17}. Para demostrar la posibilidad de polimerizar electroquímicamente las porciones pirrol injertados en el esqueleto del alginato en su forma de gel y la influencia del polímero resultante en las propiedades físicas del recubrimiento de alginato, se examinó la transferencia de masa a través de diferentes geles de alginato mediante voltametría cíclica. De este modo se ilustró la permeabilidad del carboxílico ferroceno (2 mM) en Tris-HCl (0,1 M pH= 7) a través de los recubrimientos de alginato y pirrol-alginato por su oxidación de un electrón en la superficie subyacente del electrodo. La presencia de estos recubrimientos de geles conduce a una disminución similar y acusada en la intensidad del sistema de picos reversible en comparación con la señal registrada en un electrodo descubierto. Ambos geles se oxidaron después mediante una electrolisis potencial controlada en H₂O + LiClO₄ 0,1 M durante 10 minutos a 0,93 V versus un electrodo Ag-AgCl-KCl saturado (Ag/AgCl). El polímero de pirrol-alginato esperado fue efectivamente reflejado a través de la potente disminución (-70%) en la intensidad del

pico de oxidación del derivado de ferroceno en comparación con su valor inicial (34 μA) antes del proceso de electropolimerización. Este aumento de la resistencia de difusión refleja la formación de cadenas polimerizadas dentro de la estructura del gel. En contraste, el voltamograma cíclico en relación al alginato oxidado regularmente mostró un aumento de la intensidad de corriente de 32 μA a 42 μA . Esto puede reflejar una pérdida parcial de gel de alginato en la solución durante la etapa de polimerización lo que ilustra de este modo la inestabilidad del recubrimiento.

Para confirmar la existencia de una red de polipirrol en el caso del pirrol-alginato oxidado, que sería capaz de reforzar la estabilidad del gel, se realizó una etapa de eliminación de polímero obtenida mediante el lavado orgánico y la desestabilización química (sumergiéndolo durante 10 minutos en una solución agitada de etanol 95% (v/v) seguido de 10 minutos en solución tamponada de fosfato 0,1 M (pH= 7) para extraer el recubrimiento de alginato de la superficie del electrodo. En el caso del polipirrol-alginato, se observó un aumento en el pico de oxidación que alcanzó el 50% del valor de la intensidad registrado en un electrodo desnudo mientras que para el alginato regular se registró una señal electroquímica idéntica a la manifestada en un electrón descubierto. Esta comparación demuestra claramente el efecto beneficioso aportado por el proceso de electropolimerización en la estabilidad del recubrimiento de alginato. En especial, la presencia de una red polimerizada en el interior del gel parece contrarrestar el destructivo efecto de los iones de fosfato que induce normalmente un desplazamiento del agente gelificante CaCl_2 .

Para corroborar la presencia de cadenas de polipirrol dentro del gel de alginato, se determinaron las permeabilidades de los recubrimientos de alginato y polipirrol-alginato mediante experimentos con un electrodo de disco rotatorio (RDE) que se realizaron a diferentes velocidades de rotación en presencia de hidroquinona (1 mM) en Tris-HCl 0,1 M (pH= 7). La gran diferencia entre los valores de permeabilidad, respectivamente $3,65 \times 10^{-1}$ y $2,7 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el alginato y el polipirrol-alginato, refleja inequívocamente los obstáculos estéricos debidos a las cadenas polipirrolícas generadas *in situ*.

Además de la estabilización del recubrimiento de alginato, otra propiedad útil sería la posibilidad de atrapar con firmeza las proteínas como en la fabricación de sensores enzimáticos. La capacidad del polipirrol-alginato para retener proteínas se investigó con glucosa oxidasa (GOx) (elegido como modelo) por su capacidad para catalizar la producción de H_2O_2 electroactivo en presencia de glucosa y oxígeno. La liberación de moléculas de GOx se puede evaluar amperométricamente a través de la oxidación del H_2O_2 generado enzimáticamente. Con este propósito se prepararon dos tipos separados de recubrimientos de enzimas mediante la dispersión sobre la superficie del electrodo (diámetro de 5 mm) de una mezcla que contenía 15 μl de alginato o de pirrol-alginato y GOx (75 μg) seguido de la incubación con CaCl_2 (0,1 M) durante 5 minutos. Tal como se ha descrito anteriormente, el electrodo de polipirrol-alginato-GOx se obtuvo mediante electropolimerización a 0,93 V (Aubrée-Lecat, C., Hervagault, A., Delacour, P., Beau de, C. Bourdillon y M. H. Remy, *Anal. Biochem.* 1989, 178, 247).

Los electrodos resultantes se sumergieron en 2 ml de solución tampón Tris-HCl 0,1 M agitada (pH 7) durante una hora. A la liberación de moléculas de GOx con el paso del tiempo le siguió periódicamente el muestreo de los exudados mediante unas alícuotas de determinación electroquímica (100 μl) después de 5, 10, 30, 45 y 60 minutos se inyectaron en un tampón de fosfato (10 ml, pH 7) que contenía glucosa y se registró el aumento de la concentración de H_2O_2 a través de su oxidación en un electrodo de platino con un potencial de electrodo constante a 0,6 V. La parte lineal de la pendiente de la corriente anódica vs. la curva de tiempo se comparó con la obtenida utilizando las mismas condiciones en presencia de una cantidad conocida de GOx.

Parece ser que la liberación del enzima disminuye con el tiempo alcanzando un valor estable después de una hora. Por lo tanto, un 40% (30 μg) y un 12% (9 μg) de la cantidad de moléculas de GOx de las películas de alginato y polipirrol-alginato respectivamente atrapadas inicialmente se perdieron. Esto demuestra claramente una mejor retención de las moléculas enzimáticas en los hidrogeles de polipirrol-alginato gracias al reticulado polimérico adicional.

Finalmente, los biosensores amperométricos de glucosa se diseñaron incorporando GOx (15 μg) en recubrimientos de hidrogel de alginato o polipirrol-alginato (3 μl). Los electrodos de enzimas resultantes se mantuvieron a un potencial de electrodo constante a 0,6 V y se registró su respuesta amperométrica a la glucosa en una solución tampón de 0,1 M Tris-HCl (pH= 7). Las mediciones amperométricas se realizaron con una célula electroquímica termoestacionada a 25°C bajo condiciones de agitación en 10 ml (0,1 M Tris-HCl, pH7) y las soluciones de reserva de glucosa mutarrotaron a temperatura ambiente durante 24 horas antes de su utilización.

Las curvas de calibración que representan la respuesta del biosensor como una función de la concentración de glucosa indicaron que en ambas configuraciones la corriente aumentaron linealmente con la concentración de glucosa, mientras que a concentraciones se alcanzó una pseudomeseta. Tal como se esperaba, la comparación del rendimiento del biosensor en términos de corriente máxima (I_{max}) y los valores de sensibilidad muestra que el recubrimiento de polipirrol-alginato proporcionó unos valores de I_{max} (1,11 μA) y sensibilidad (122 μA^{-1}) más elevados que los obtenidos con el electrón de alginato, concretamente 0,62 μA y 34 μA^{-1} . Esto confirma que el proceso de polimerización que induce un grado de retención de moléculas de GOx superior, contribuye a la mejora del rendimiento del biosensor.

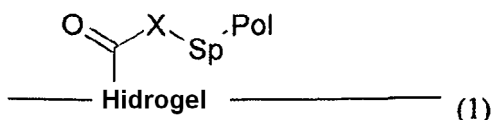
5 También se investigó la influencia de la cantidad de recubrimiento de polipirrol-alginato-GOx electrodepositado en las características analíticas del electrodo enzimático. Después de los sucesivos procesos de gelificación y polimerización de 3 y 15 μl de mezclas de pirrol-alginato-GOx, se determinaron los rendimientos analíticos de los biosensores. Ambos biosensores presentaban un comportamiento cinético similar que se ilustraba por un valor idéntico de la constante Michaelis-Menten (12 mM) y un tiempo de respuesta más veloz (4 s).

10 Sin embargo, los valores superiores de I_{max} y sensibilidad (4,17 μA y 600 μAM^{-1} , respectivamente) se obtuvieron con el correspondiente biosensor de polipirrol-alginato a 15 μl . Se debería destacar que se calculó una proporción similar (4-5) para la comparación de los valores de la I_{max} y la sensibilidad. Este factor está en concordancia con la proporción (5) de las cantidades depositadas de GOx, ilustrando así, la reproductibilidad del efecto de mejora debido a la red de polipirrol.

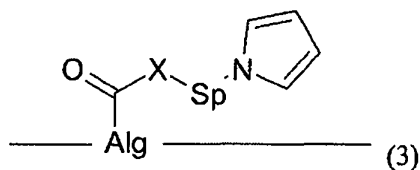
15 Los resultados descritos en la presente memoria demuestran, por primera vez, las capacidades de la polimerización electroquímica de un polímero de alginato predepositado bajo su forma de gel sobre una superficie de un electrodo y su utilidad en el refuerzo de las propiedades mecánicas y químicas del gel de alginato. El polipirrol-alginato constituye así un recubrimiento electrogenerado atractivo para la inmovilización de enzimas.

REIVINDICACIONES

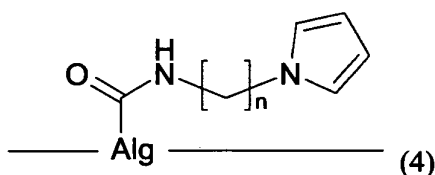
- 5 1. Esqueleto de hidrogel funcionalizado injertado con por lo menos una porción polimerizable en el que el hidrogel es un polímero de alginato y la porción polimerizable está injertada en un grupo de ácido carboxílico del polímero de alginato.
2. Polímero funcionalizado según la reivindicación 1, en el que la porción polimerizable se selecciona de entre el grupo constituido por tiofeno, anilina y pirrol.
- 10 3. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que comprende una porción espaciadora entre el esqueleto del hidrogel y la porción polimerizable.
- 15 4. Polímero funcionalizado según la reivindicación 3, en el que el espaciador se selecciona de entre los grupos alquilenilo, grupos cicloalquilenilo, grupos alquenilenilos, sustituidos eventualmente por uno o más sustituyentes.
5. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la porción polimerizable se injerta a través de un enlace amida o un enlace éter.
- 20 6. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 5, representado por la fórmula siguiente



- 25 en la que,
 Hidrogel es un polímero de alginato,
 Pol es una porción de polimerización tal como se define en las reivindicaciones anteriores,
 30 Sp es una porción espaciadora tal como se define en las reivindicaciones anteriores y,
 X es un oxígeno o un grupo amino NR₁, en el que R₁ se selecciona de H o un grupo C₁-C₃ alquilo.
- 35 7. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la porción de polimerización es una porción pirrol.
8. Hidrogel funcionalizado según la reivindicación 7, en el que es un polímero de alginato que comprende por lo menos una porción pirrol de la fórmula siguiente



- 40 en la que,
 X se selecciona de entre O ó NR₁, y R₁ se selecciona de entre H o un grupo alquilo C₁ a C₃,
 45 Sp es una porción espaciadora seleccionada de entre los grupos alquilenilos, los grupos cicloalquilenilos, los grupos alquenilenilos, sustituidos eventualmente por uno o más sustituyentes y,
 Alg es un azúcar del polímero del esqueleto de alginato.
- 50 9. Hidrogel funcionalizado según la reivindicación 8, que comprende por lo menos una porción pirrol injertado de la siguiente fórmula



en la que,

n es un número entero del 1 al 6, preferentemente 3 y,

Alg es un azúcar del polímero del esqueleto del alginato.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
10. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 7 a 9, en el que comprende de 10% a 40% de porciones pirrol sobre la base del número total de porciones de ácido carbónico del polímero de alginato.
 11. Hidrogel funcionalizado según la reivindicación 10, en el que comprende aproximadamente 30% de porciones pirrol.
 12. Hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la porción polimerizable es además polimerizada.
 13. Hidrogel funcionalizado según la reivindicación 12, que comprende un esqueleto de hidrogel y un polímero, en el que el esqueleto de hidrogel y el polímero están unidos con uno o más enlaces covalentes.
 14. Composición de polímero que comprende el hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 13.
 15. Composición de polímero según la reivindicación 14, en forma de una película o un gel.
 16. Composición que comprende un polímero funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 13 o una composición de polímero según una de las reivindicaciones 14 ó 15 combinada con por lo menos un segundo elemento seleccionado de entre células, proteínas, ADN u otras moléculas.
 17. Composición farmacéutica que comprende una composición según la reivindicación 16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
 18. Biosensor que comprende una composición según la reivindicación 15 ó 16.
 19. Procedimiento para la preparación de un hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende hacer reaccionar un esqueleto de hidrogel de alginato con una porción polimerizable funcionalizada para permitir la formación de un enlace covalente entre el esqueleto de hidrogel de alginato y la porción polimerizable en un grupo de ácido carboxílico del polímero de alginato.
 20. Procedimiento para la preparación de un hidrogel funcionalizado según la reivindicación 12 ó 13, que comprende la polimerización del hidrogel funcionalizado según una de las reivindicaciones 1 a 11 u obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 19, bajo condiciones adecuadas para la polimerización de la porción polimerizable.
 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la polimerización de la porción polimerizable se realiza química o electroquímicamente.

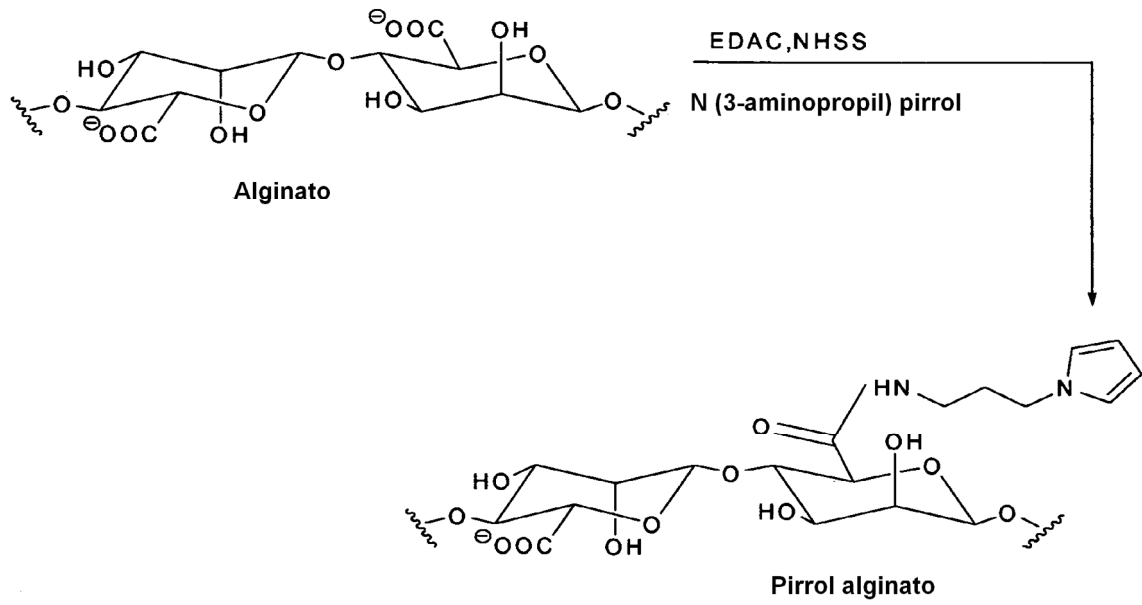


Figura 1